



# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2013**

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

**VIII. ročník**

**Košice, 10.-11. september 2013**



Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu  
10.-11. september 2013  
v Košiciach

*Usporiadali:*

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Slovenská akadémia 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 978-80-971428-0-3**

# OBSAH

- 1. PREFERMENTOVANÝ CEREÁLNY SUBSTRÁT A JEHO VPLYV NA RAST KURČIAT A KVALITU HYDINOVÉHO MÄSA**  
Bača M.<sup>1</sup>, Marcinčák S.<sup>1</sup>, Čertík M.<sup>2</sup>, Guothová L.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice,  
<sup>2</sup>Oddelenie biochemickej technológie, FCHPT STU, Bratislava 11
- 2. VPLYV ZNO NANOČASTÍC NA RASTLINNÚ MODELOVÚ KULTÚRU TABAKU**  
Ballová E.<sup>1,2</sup>, Babula P.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> Katedra farmakognózie a botaniky, UVLF, Košice, <sup>2</sup> Ústav prírodných liečiv, VFU, Brno 14
- 3. VPLYV VLASTNOSTÍ PLA NANOSFÉR NA AMYLOIDNÚ AGREGÁCIU INZULÍNU**  
Bednáriková Z.<sup>1,2</sup>, Koneracká M.<sup>2</sup>, Závašová V.<sup>2</sup>, Šipošová K.<sup>2</sup>, Kopčanský P.<sup>2</sup>, Girman V.<sup>3</sup>,  
Gažová Z.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Katedra Biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice, <sup>2</sup>Ústav experimentálnej fyziky, SAV,  
Košice, <sup>3</sup>Katedra fyziky kondenzovaných látok, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice 17
- 4. SPEKTROFOTOMETRICKÉ METÓDY ŠTÚDIA ANTIRADIKÁLOVÝCH VLASTNOSTÍ NIEKTORÝCH RASTLINNÝCH EXTRAKTOV**  
Fejercáková A., Vašková J., Vaško L.  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED, Košice 20
- 5. SCREENING REZÍDUÍ ANTIBIOTÍK V PEČENI A OBLIČKÁCH JATOČNÝCH ZVIERAT METÓDOU STAR A NAT TESTOM**  
Gondová, Z., Kožárová, I., Poláková, Z.  
Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie  
v Košiciach 23
- 6. PARAZITY A PATOGENY PLAZOV**  
Haklová B.<sup>1</sup>, Majláthová V.<sup>1</sup>, Majláth I.<sup>1,2</sup>, Petrilla V.<sup>3</sup>, Kokošová N.<sup>2</sup>, Hižňanová A.<sup>2</sup>, Oros M.  
<sup>1</sup>, Peťko B.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, <sup>2</sup>Ústav ekologických a biologických  
vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Moyzesova 11, 040 01 Košice, <sup>3</sup> Univerzita  
veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra anatómie, histológie a fyziológie,  
Komenského 73, 041 81 Košice 26
- 7. IMUNOMODULAČNÝ VPLYV GLUKÁNU PROTI MIGRÁCII LARIEV A. SUUM**  
Hermanovská L., Dvorožňáková E.  
Parazitologický ústav SAV, Košice 29
- 8. VPLYV PRÍJMU OMEGA-3 PNMK NA HODNOTY CHOLESTEROLU V KRVI**  
Hertelyová, Z., Vaško, L.  
Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED, a.s., LF UPJŠ Košice 32
- 9. VPLYV PROADIFENU NA VÝSLEDNÚ CYTOTOXICITU MITOXANTRONU V BUNKÁCH ĽUDSKEJ PROMYELOCYTOVEJ LEUKÉMIE**  
Hiľovská L., Jendželovský R., Jendželovská Z., Mikeš J., Fedoročko P.  
Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta  
UPJŠ v Košiciach 35

- 10. EXPRESIA CHEMOKÍNOV PO *IN VITRO* APLIKÁCIÍ PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A *SALMONELLA ENTERICA* (SE147)**  
Husáková E., Kolesárová M., Levkutová M., Herich R., Spišáková V., Levkut M.  
*Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice* 38
- 11. CITLIVOSŤ GRAM-NEGATÍVNYCH BAKTÉRIÍ ZO PŠTROSOV A INÝCH DRUHOV HYDINY K ANTIMIKROBIÁLNYM SUBSTANCIÁM**  
Imrichová, J., Kandričáková, A.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice* 41
- 12. EXPRESIA ADRENERGNÝCH RECEPTOROV U PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÍ KRÁLIKOV**  
Janštová Ž.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, Slovenská republika* 44
- 13. ODLIŠNÝ VPLYV HYPERICÍNU NA ÚČINOK MITOXANTRONU V SENZITÍVNYCH A REZISTENTNÝCH LEUKEMICKÝCH BUNKÁCH**  
Jendželovská Z., Jendželovský R., Hiľovská L., Mikeš J., Fedoročko P.  
*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ v Košiciach* 47
- 14. LAKTOBACILY, IZOLÁTY Z TRUSU BAŽANTOV A ICH VLASTNOSTI**  
Kandričáková A.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 50
- 15. ÚLOHA SOD-2 V CITLIVOSTI ADENOKARCINÓMOVÝCH MCF-7 BUNIEK NA FOTODYNAMICKÚ TERAPIU HYPERICÍNOM**  
Kimáková P.<sup>1</sup>, Solár P.<sup>1</sup>, Ferenc P.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav Biologických a Ekologických vied, Prírodovedecká Fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice,* <sup>2</sup> *Ústav Biológie, Fakulta Humanitných a Prírodných vied, Prešovská Univerzita, Prešov* 53
- 16. EXPRESIA PCNA U NMU- INDUKOVANÝCH NÁDOROV MLIEČNEJ ŽLÁZY U POTKANOV: KORELÁCIA S MITOTICKÝM INDEXOM A HISTOLOGICKÝM OBRAZOM**  
Kissová V., Ševčíková Z., Revajová, V.  
*Ústav patologickej anatómie, UVLF, Košice, Katedra patologickej anatómie a fyziológie* 56
- 17. KOMPARATÍVNE MAPOVANIE *LCA5L* GÉNU A ANALÝZA SEKVENCIÍ VYBRANÝCH EXÓNŮV U ZÁSTUPCOV ČEĽADE *BOVIDAE***  
Kolesárová V., Šiviková K.  
*Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky UVLF, Košice* 59
- 18. TREMATODA DRAVÝCH VTÁKOV A SOV – NÁLEZ NOVÝCH DRUHOV PRE SLOVENSKÚ FAUNU**  
Komorová P.<sup>1</sup>, Sitko J.<sup>2</sup>, Hurníková Z.<sup>1</sup>, Chavko J.<sup>3</sup>, Molnár L.<sup>4</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,* <sup>2</sup> *Ornitologická stanica Múzea Komenského, Přerov, Česká republika,* <sup>3</sup> *Ochrana dravcov na Slovensku, Bratislava,* <sup>4</sup> *Klinika vtákov a exotických zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach* 62
- 19. ÚLOHA PLK1 A CHK1 KINÁZY POČAS PRVEJ EMBRYONÁLNEJ MITÓZY**  
Kovaříková V.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 65

20. **VPLYV APLIKÁCIE PROBIOTÍK A ĽANOVÉHO SEMENA V PROBLÉMOVOM CHOVE PRASÍAT**  
 Kravcová Z., Sopková D., Vlčková R., Krešáková L.  
*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Košice* 68
21. **ANATOMICKÁ KONFIGURÁCIA A VARIABILITA SRDCOVÝCH ŽÍL U POTKANA**  
 Krešáková L.<sup>1</sup>, Schusterová I.<sup>2</sup>, Kravcová Z.<sup>1</sup>, Maloveská M.<sup>1</sup>, Vdoviaková K.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF Košice*, <sup>2</sup>*Lekárska fakulta, UPJŠ Košice* 71
22. **IN VITRO ŠTÚDIUM BIOLOGICKEJ AKTIVITY EXTRAKTU BOHATÉHO NA ANTOKYÁNY NA NORMÁLNYCH A NÁDOROVÝCH BUNKÁCH**  
 Kšonžeková P.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>, Csank T.<sup>1</sup>, Mariychuk R.<sup>2</sup>, Tkáčiková L.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice*, <sup>2</sup>*Katedra ekológie a ochrany životného prostredia, Národná univerzita v Užhorode, Užhorod, Ukrajina* 74
23. **MNOŽSTVO TELESNÉHO TUKU MATKY OVPLYVŇUJE POČET A DISTRIBÚCIU IZOLOVANÝCH OOCYTOV**  
 Kubandová J.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 77
24. **FAKTORY VPLYVAJÚCE NA ÚČINNOSŤ VAKCINÁCIE U MAČIEK**  
 Kulichová L., Mojžišová J., Vojtek B., Smrčo P.  
*Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach* 80
25. **HPLC V ANALÝZE REZÍDUÍ KOKCIDIOSTATÍK V POTRAVINÁCH ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU**  
 Maďarová M., Kožárová I.  
*Katedra hygieny a technológie potravín, UVL a F v Košiciach* 83
26. **VARIÁCIE ODTOKU LYMFY Z LYMPHOCENTRUM MESENTERICUM CAUDALE U KRÁLIKA**  
 Maloveská M., Krešáková L., Vdoviaková K.  
*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF v Košiciach* 86
27. **ZMENY SÉROVÝCH PROTEÍNOV U JAHNIAT V PRIEBEHU PRVÉHO MESIACA ŽIVOTA**  
 Nagyová V., Šoltéssová H., Tóthová Cs., Nagy O.  
*Klinika prežívavcov, UVLF, Košice* 89
28. **CHLAMYDIÓZA U EXOTICKÝCH VTÁKOV**  
 Novotná D.<sup>1</sup>, Bálent P.<sup>1,2</sup>, Valenčáková, A.<sup>1</sup>, Molnár L.<sup>3</sup>, Halánová, M.<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra biológie a genetiky, UVLF, Košice*, <sup>2</sup>*Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava*, <sup>3</sup>*Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice*, <sup>4</sup>*Ústav verejného zdravotníctva, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice* 92
29. **GENETICKÁ VARIABILITA A. PHAGOCYTOPHILUM V STREDNEJ EURÓPE VO VZŤAHU K VEKTOROM A REZERVOÁROVÝM HOSTITEĽOM**  
 Pangráčová L.<sup>2</sup>, Baráková I.<sup>1,3</sup>, Carpi C.<sup>3,4</sup>, Stanko M.<sup>1,2</sup>, Mošanský L.<sup>2</sup>, Kraljik J.<sup>2</sup>, Peňko B.<sup>2</sup>, Rizzoli A.<sup>3</sup>, Derdáková M.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav zoológie SAV, Bratislava, Slovensko*, <sup>2</sup>*Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, Košice, Slovensko*, <sup>3</sup>*Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Trento, Taliansko*, <sup>4</sup>*Pensylvánska štátna univerzita, Oddelenie biochémie a molekulárnej biológie, USA* 95

30. **NÁČRT PRÍBUZENSKÝCH VZŤAHOV VYSOKOHORSKÝCH ZÁSTUPCOV**  
 Paučulová L., Šemeláková M., Varcholová K., Panigaj L.  
*Ústav biologických a ekologických vied, Katedra zoológie, UPJŠ v Košiciach* 98
31. **RÝCHLOTESY, AKO JEDEN Z EFEKTÍVNYCH SPÔSOBOV STANOVENIA REZÍDUÍ ANTIBIOTÍK V POTRAVINÁCH ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU**  
 Poláková, Z., Kožárová, I., Gondová, Z.  
*Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF v Košiciach* 101
32. **STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV Z MÄSA BAŽANTA OBYČAJNÉHO (*PHASIANUS COLCHICUS*) VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM**  
 Regecová I.<sup>1</sup>, Pipová M.<sup>1</sup>, Jevinová P.<sup>1</sup>, Marušková K.<sup>1</sup>, Kmet' V.<sup>2</sup>, Koréneková B.<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>*Katedra hygieny potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice,* <sup>2</sup>*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Slovenská akadémia vied, Košice* 104
33. **ABUNDANCIA A SEZÓNNA DYNAMIKA POTENCIÁLNYCH VEKTOROV EHDV NA VÝCHODNOM SLOVENSKU**  
 Sarvašová A.<sup>1</sup>, Kočišová A.<sup>1</sup>, Csank T.<sup>2</sup>, Bhide K.<sup>2</sup>, Sopoliga I.<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav parazitológie, UVLF, Košice,* <sup>2</sup>*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice,* <sup>3</sup>*ÚZ pre chov a choroby zveri, rýb a včiel, Rozhanovce* 107
34. **DIAGNOSTIKA A VÝSKYT KVASINIEK RODU *MALASSEZIA* SPP. U PSOV**  
 Sihelská Z.<sup>1</sup>, Váczi P.<sup>2</sup>, Čonková E.<sup>2</sup>, Holoda E.<sup>1</sup>, Badlík M.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach,* <sup>2</sup>*Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach* 110
35. **SLEDOVANIE PROBIOTICKÝCH VLASTNOSTÍ U *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* A *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IZOLOVANÝCH Z MLIIEKA A MLIIEČNYCH VÝROBKOV**  
 Straková E.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 113
36. **IZOLÁT V6 Z DRENÁŽNEJ VODY SKLÁDKY HNEDEHO KALU V ŽIARI NAD HRONOM – PRAVDEPODOBNE NOVÝ DRUH RODU *BREVUNDIMONAS***  
 Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Vandžurová, A.<sup>1</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, UPJŠ, Košice,* <sup>3</sup>*Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica* 116
37. **STRATA DRUHOVEJ IDENTITY ŽIVORODÝCH RÝB**  
 Šmiga Ľ.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Koščo J.<sup>2</sup>, Lazar P.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra výživy, dietetiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice,* <sup>2</sup>*Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied PU, Prešov* 119
38. **ULTRASONOGRAFICKÁ DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÝCH OCHORENÍ U TELIAT**  
 Šoltésová H., Vargová M., Nagyová V., Tóthová Cs., Nagy O.  
*Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice* 121
39. **PREVALENCIA INTESTINÁLNYCH HELMINTÓZ U DETÍ Z MEDZEVA A OKOLIA**  
 Štrkolcová G., Goldová M.  
*Ústav parazitológie, UVLF, Košice* 124



40. **ENTEROKOKY IZOLOVANÉ Z TRÁVIACEHO TRAKTU VČELY MEDONOSNEJ (APIS MELLIFERA)**  
Vaníková S.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, <sup>2</sup> Katedra genetiky, UPJŠ, Košice 127
41. **VPLYV NEFOTOAKTIVOVANÉHO HYPERICÍNU NA VÝSKYT „SIDE POPULATION“ A AGRESÍVNY FENOTYP BUNIEK PLŮCNEHO ADENOKARCINÓMU A549**  
Vargová J., Mikeš J., Mikešová L., Zihovicsová Z., Fedoročko P.  
Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice 130
42. **METABOLICKÉ PRODUKTY MESOCESTOIDES VOGAE MODULUJÚ FUNKCIE DENDRITICKÝCH BUNIEK IN VITRO**  
Vendelová E.<sup>1</sup>, Nono JK.<sup>2</sup>, Lutz M.<sup>3</sup>, Brehm K.<sup>2</sup>, Hrčková G.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice, Slovensko, <sup>2</sup>Univerzita vo Würzburgu, Inštitút pre hygienu a mikrobiológiu, Würzburg, Nemecko, <sup>3</sup>Univerzita vo Würzburgu, Inštitút pre virológiu a imunobiológiu, Würzburg, Nemecko 133
43. **ORGANICKÉ FORMY MANGÁNU VO VÝŽIVE HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT**  
Venglovská K.  
Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice 136
44. **OVULAČNÝ POMER U SÚK**  
Vitková T., Hajurka J.  
Klinika malých zvierat, UVLF, Košice, Oddelenie chirurgie, ortopédie, röntgenológie a reprodukcie, UVLF, Košice 139
45. **POROVNANIE BACHOROVEJ FERMENTÁCIE VYBRANÝCH MEDICINÁLNYCH RASTLÍN – PREDBEŽNÁ ŠTÚDIA IN VITRO**  
Wencelová M.  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice 142



# PREFERMENTOVANÝ CEREÁLNY SUBSTRÁT A JEHO VPLYV NA RAST KURČIAT A KVALITU HYDINOVÉHO MÄSA

Bača M.<sup>1</sup>, Marcincák S.<sup>1</sup>, Čertík M.<sup>2</sup>, Guothová L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Oddelenie biochemickej technológie, FCHPT STU, Bratislava

## ABSTRAKT

Skrmovanie prefermentovaného cereálneho substrátu obohateného o PUFA hydine je jednou z možností zvýšenia príjmu PUFA u konzumentov. V práci bol sledovaný vplyv prefermentovaného substrátu (3 %) obohateného o kyselinu  $\gamma$ -linolénovú (GLA), samostatne a v kombinácii s 0,1 % extraktom repíka lekárskeho (GLA+R) podávanom hydine vo vode na rast kurčiat, na zloženie mastných kyselín, oxidačnú stabilitu, antioxidačnú aktivitu a senzorické vlastnosti stehennej a prsnej svaloviny počas chladiarenského skladovania (4 °C, 7 dní). Pokusné skupiny dosiahli vyššiu priemernú jatočnú hmotnosť a výťažnosť na úrovni 78 %. Skrmovanie prefermentovaného substrátu viedlo k zmene profilu mastných kyselín, najmä k zvýšeniu n-3 MK (EPA, DHA, DPA). GLA skupina ako jediná vykazovala štatisticky významne nižšiu oxidačnú stabilitu mäsa ( $P < 0,05$ ). Výsledky poukázali na to, že 0,1 % repík ako antioxidant, postačuje na ochranu hydínového mäsa obohateného o PUFA pred zvýšenou oxidáciou. Hodnotenie senzorických vlastností stehennej a prsnej svaloviny nepreukázalo významné rozdiely v skupinách.

## ÚVOD

Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) sú významnou súčasťou pre fungovanie organizmu. Omega-3 a omega-6 mastné kyseliny nie sú produkované v ľudskom tele, a musia byť získané prostredníctvom stravy alebo doplnkov (Rubio-Rodríguez a kol., 2010). Nedostatočný príjem PUFA vedie k poruchám kardiovaskulárneho, endokrinného, nervového, imunitného, respiračného a reprodukčného systému (Harris a kol., 2008). Jednou z možností získania vysokohodnotných PUFA sú biotechnologické postupy založené na Solid-state fermentácií (SSF), ktoré boli použité k obohateniu obilnín o PUFA. SSF je charakterizovaná ako proces, pri ktorom nižšie vláknité huby rastú na vlhkom pevnom substráte v neprítomnosti voľnej vody a za vhodných podmienok sú schopné transformovať obilné substráty na produkty, ktoré obsahujú n-6 a n-3 PUFA (Pandey, 2003). Fermentáciou sa súčasne znižujú antinutričné látky a čiastočne hydrolyzujú biopolyméry v substrátoch (Slugen a kol., 1994). Využitie SSF s použitím rôznych druhov obilnín ako zdroja živín a rôznych druhov húb (*Thamnidium sp.*, *Mortierella sp.*, *Mucor sp.*) bolo úspešne použité pre výrobu GLA, EPA a DHA (Čertík a kol., 2006). Skrmovaním týchto prefermentovaných substrátov obohatených o MK môžeme ovplyvniť zloženie mastných kyselín hydínového mäsa (Zelenka a kol., 2008). Avšak, mäso s vyšším obsahom PUFA vykazuje senzorické zmeny a nižšiu nutričnú hodnotu, z dôvodu rýchlej oxidácie. Aby sa zabránilo zvýšenej oxidácii a strate kvality mäsa je potrebné vytvoriť vhodný systém kombinácie PUFA a antioxidantov.

## MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 90 ks jednoduchých brojlerových kurčiat hybrida COBB 500 rozdelených do troch skupín po 30 ks. Prvá skupina (K) bola kŕmená klasickými kŕmnymi zmesami HYD 01, HYD 02 a HYD 03. Druhá (GLA) a tretia pokusná skupina (GLA+R) boli kŕmené kŕmnymi zmesami HYD 01, HYD 02 a HYD 03 s prídavkom 3 % prefermentovaného cereálneho substrátu obohateného o GLA, pričom tretej skupine bol navyše podávaný vo vode 0,1 % extrakt repíka lekárskeho (*Agrimonia eupatoria L.*). Počas výkrmu (42 dní) mali kurčatá prístup ku krmivu a k vode *ad libitum*. Priebežne sa sledoval klinicky zdravotný stav, spotreba krmiva a hmotnosť zvierat. Zvieratá boli po omráčení usmrtené a vykŕvené.

Následne boli odobraté vzorky stehennej a prsnej svaloviny. Vzorky boli zabalené do polyetylénových obalov a skladované v chladničke pri 4 °C počas 7 dní. Oxidácia tukov v stehennej a prsnej svalovine bola stanovená pomocou metódy tiobarbiturového čísla (TBA) podľa Marcinčák a i. (2004). Stanovenie mastných kyselín bolo vykonané plynovou chromatografiou podľa Čertík a i. (2008). Stanovenie antioxidačnej aktivity mäsa bolo vykonané spektrofotometrickou metódou redukcie DPPH radikálu. Sensorické hodnotenie odbornou komisiou 5 bodovým hodnotiacim systémom bolo vykonané 24 hodín po zabití (Príbela, 2001). Na sensorickú analýzu bola použitá uvarená svalovina stehien a pfs. Štatistické spracovanie výsledkov bolo vykonané štatistickým programom Graph Pad Prism 5.0 (2007).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Brojlery oboch pokusných skupín vykazovali vyššiu konverziu krmiva, čo sa prejavilo nižšou spotrebou krmiva a vyššou jatočnou hmotnosťou (dáta neuvedené). Pri hodnotení profilu mastných kyselín došlo v skupinách GLA a GLA+R k zvýšeniu obsahu n-3 a n-6 PUFA (Tab. 1).

Tabuľka 1 Profil mastných kyselín stehennej a prsnej svaloviny

Fatty acids	Prsia K	Prsia GLA	Prsia GLA+R	Stehno K	Stehno GLA	Stehno GLA+R
C 15:0	1,915	2,947	1,950	1,115	1,036	1,898
C 16:0	22,149	21,467	21,340	20,939	21,463	20,308
C 16:1	3,643	2,997	2,902	5,356	4,678	3,485
C 18:0	12,439	16,132	12,904	9,609	9,817	12,941
C 18:1-9c	27,381	21,938	25,623	30,420	29,777	25,831
C 18:1-11c	2,396	2,957	2,700	2,328	2,157	2,481
C 18:2 LA	20,567	18,717	22,599	21,883	22,782	21,642
C 18:3 GLA	0,132	0,180	0,152	0,173	0,196	0,169
C 18:3 ALA	1,182	0,802	1,296	1,242	1,430	1,078
C 20:0	0,142	0,232	0,127	0,103	0,095	0,142
C 20:3 DGLA	0,681	1,139	0,724	0,417	0,425	0,673
C 20:4 ARA	2,813	4,356	2,729	2,620	2,308	3,795
C 20:5 EPA	0,208	0,386	0,232	0,109	0,111	0,156
C 22:5 DPA	0,521	0,776	0,527	0,386	0,355	0,589
C 22:6 DHA	0,446	0,544	0,412	0,251	0,215	0,369
Σ SFA	37,153	41,275	36,850	32,315	33,036	35,896
Σ MUFA	33,782	28,222	31,686	38,618	37,144	32,398
Σ PUFA n-3	2,598	2,876	2,700	2,149	2,272	2,423
Σ PUFA n-6	24,884	25,500	27,090	25,628	26,241	27,052
Σ PUFA	27,882	28,825	30,222	28,148	28,933	29,948
n-6/n-3 index	9,578	8,866	10,035	11,926	11,552	11,167

LA- kys. linolová, ALA- kys. α-linolénová, GLA- kys. γ-linolénová, DGLA- kys. dihomog-linolénová, ARA – kys. arachidonová, EPA- kys. eikozapentaénová, DPA- kys. dokozapentaénová, DHA- kys. dokozahehexaénová, SFA- saturated fatty acids, MUFA- monounsaturated fatty acids

Hodnoty GLA boli vyššie v oboch skupinách oproti kontrole, taktiež v oboch skupinách boli zvýšené hodnoty dihomog-GLA. GLA slúži ako prekursor dihomog-GLA, ktorá má protizápalové účinky, aj keď patrí do skupiny n-6 PUFA. Výsledky poukazujú, že obsah esenciálnych PUFA ako sú EPA, DHA a DPA sa v pokusných skupinách výrazne zvýšil. Tabuľka 2 vyjadruje množstvo malondialdehydu (MDA) ako hlavného sekundárneho rozkladného produktu PUFA. V 1. deň bol štatistický významný rozdiel zistený len vo vzorkách GLA stehna a GLA prsia (P < 0,05).

**Tabuľka 2 Rozkladné zmeny tukov vyjadrené ako množstvo malón dialdehydu ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) počas chladiarenského skladovania**

	1. deň	4. deň	7. deň
K Stehno	$0,0779 \pm 0,03^a$	$0,1830 \pm 0,002$	$0,3769 \pm 0,03$
GLA Stehno	$0,1380 \pm 0,02^b$	$0,2208 \pm 0,02$	$0,4245 \pm 0,03$
GLA+R Stehno	$0,0986 \pm 0,02^a$	$0,2030 \pm 0,03$	$0,3730 \pm 0,01$
	1. deň	4. deň	7. deň
K Prsia	$0,0372 \pm 0,04^a$	$0,1386 \pm 0,03^a$	$0,2761 \pm 0,03$
GLA Prsia	$0,1766 \pm 0,03^b$	$0,3314 \pm 0,05^b$	$0,3808 \pm 0,08$
GLA+R Prsia	$0,0242 \pm 0,01^a$	$0,1864 \pm 0,04^a$	$0,3586 \pm 0,02$

a,b – hodnoty s rozdielnym označením v stĺpci sú štatisticky rozdielne ( $P < 0,05$ )

Pridaný repík výrazne pozitívne ovplyvnil zníženie oxidačných procesov v mäse. Hodnoty MDA sú u všetkých skupín na 4. a 7. deň vyrovnané, štatisticky nevýznamné ( $P > 0,05$ ). Štatistický rozdiel ( $P < 0,05$ ) bol zaznamenaný len pri vzorkách prsnej svaloviny GLA na 4. deň skladovania. Porovnateľné výsledky v oblasti oxidačnej stability po skrmovaní kyseliny linolovej v kombinácii s antioxidantom dosiahol Jung a i. (2010). Najvyššiu antioxidačnú aktivitu hydínového mäsa ( $P < 0,05$ ) vykazovala skupina GLA+R v 1. a 7. deň skladovania (dáta neuvedené). Taktiež môžeme konštatovať, že skrmovanie prefementovaného substrátu a repíka ako antioxidantu nemalo výrazný vplyv na senzorické hodnotenie (dáta neuvedené). Pri oboch pokusných skupinách bola mierne lepšie hodnotená chuť mäsa. K podobným záverom došiel aj Lee a i. (2004), ktorý poukazuje na zlepšené senzorické vlastnosti mäsa hydiny po pridaní rastlín s antioxidačným účinkom.

*Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantového projektu VEGA č. 1/0648/11.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Čertík, M. et al. Biotechnology as a useful tool for nutritional improvement of cereal-based materials enriched with polyunsaturated fatty acids and pigments. *Acta Agro. Hungarica*, 2008; 56: 377-384.
- Čertík, M. et al. Enhancement of Nutritional Value of Cereals with  $\gamma$ -Linolenic Acid by Fungal Solid-State Fermentations. *Food Technol. Biotechnol.* 2006; 44(1): 75–82.
- Harris, W. S. et al. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1): 12–24.
- Jung, S. et al. Effect of dietary mixture of gallic acid and linoleic acid on antioxidative potential and quality of breast meat from broilers. *Meat Science*. 2010; 86: 520-526.
- Lee, K. W., Everts, H., Beynen, A. C. Essential oils in broiler nutrition. *Int. J. Poultry Sci.* 2004; 12(3): 738-752.
- Marcinčák, S. et al. Determination of lipid oxidation level in broiler meat by liquid chromatography. *J. AOAC Int.*, 2004; 87(5): 1148-1152.
- Pandey, A. Solid-state fermentations. *Biochem. Eng. J.* 2003; 13: 81–84.
- Príběla, A. Senzorické hodnotenie potravinárskych surovín, aditívnych látok a výrobkov. Inštitút vzdelávania veterinárnych lekárov, Košice, 2001.
- Rubio-Rodríguez, N et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2010; 11: 1–12.
- Slugen, D et al. Process for dietic treatment of cereal substrates using solid state fermentation of Mucoraceae filamentous fungi. Czech patent No. 279043 (1994).
- Zelenka, J., Jarošová, A., Schneiderová, D. Influence of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on sensory characteristics of chicken meat. *Czech J. Anim. Sci.* 2008; 53(7): 299-305.

# VPLYV ZnO NANOČASTÍC NA RASTLINNÚ MODELOVÚ KULTÚRU TABAKU

Ballová L<sup>1,2</sup>, Babula P<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra farmakognózie a botaniky, UVLF, Košice

<sup>2</sup> Ústav přírodních léčiv, VFU, Brno

## ABSTRAKT

Nanočastice (NP) majú uplatnenie v rôznych odvetviach vďaka svojim jedinečným vlastnostiam, veľkej plochy a malého objemu. Napriek tomu môže mať ich neustále sa zvyšujúce používanie aj potenciálne negatívne dôsledky v environmentálnej oblasti. Boli potvrdené toxické vplyvy na baktérie, bunkové kultúry, riasy aj živočíšne modely. Oblasť fytonanotoxikológie, skúmajúca toxický vplyv nanočastíc na rastliny, je zatiaľ málo preskúmaná. V našej štúdiu sme skúmali vplyv nanočastíc oxidu zinočnatého (nZnO) (0, 1, 10, 100 a 400 ng/ml) na modelovú bunkovú kultúru tabaku BY-2 (*Nicotiana tabacum*, L. var. Brilliant yellow - 2) po dobu 4 dní. Zistili sme významný negatívny vplyv ZnO nanočastíc na viabilitu pri ich koncentrácii 100 a 400 ng/ml ktoré boli manifestované aj morfológickými zmenami. Efekt času bol významný na parameter čerstvá hmotnosť a objem sedimentovanej kultúry vzhľadom k celkovému objemu suspenzie (PCV). Výsledky tejto práce ukazujú na potenciálne poškodenie buniek a stagnáciu až redukciu rastu rastlín exponovaných nZnO.

## ÚVOD

Nanočastice (NP) sú látky, ktorých minimálne jeden rozmer je v rozmedzí 1-100 nanometrov. Hlavným dôvodom ich narastajúceho používania je veľký aktívny povrch vzhľadom k ich malej veľkosti. NP môžu byť vyrobené z látok chemického (uhlíkové, kovové, polymérne nanočastice) alebo biologického pôvodu (fosfolipidy, dextrans, chitosan) (Wang, 2004). Podľa „The Nanotechnology Consumer Products Inventory“ patria nanočastice oxidu zinočnatého (nZnO) do skupiny najčastejšie používaných nanočastíc z radov oxidov kovov (<http://www.nanotechproject.or/...draft/>). nZnO sú široko používané vďaka svojim antikorozívnym vlastnostiam, transparentnosti a schopnosti pohlcovať UVA a UVB žiarenie a našli uplatnenie v širokej škále komerčných prípravkov (transparentné UV ochranné filmy, elektronické zariadenia, sklo, keramika, stavebné materiály, kozmetické prípravky a opaľovacie krémy atď. (Wang 2004). Nanopolúcia (znečistenie nanočasticami) predstavuje v súčasnosti narastajúci problém v dôsledku rýchleho rozvoja nanotechnológií a ich následného uplatnenia v praxi, keďže NP majú vykazujú aj potenciálne zdravotné a environmentálne riziká. nZnO vykazujú závažnú toxicitu voči baktériám, riasam, ľudským bunkovým kultúram a myšiam (Heinlaan a kol. 2008; Kasemets a kol. 2009). Oblasť fytotoxikológie nZnO (mechanizmy vzniku toxicity a toxikokinetika) je doteraz málo preskúmaná, no je dôležitá pre možnosť ich prípadnej akumulácie v potravinovom reťazci.

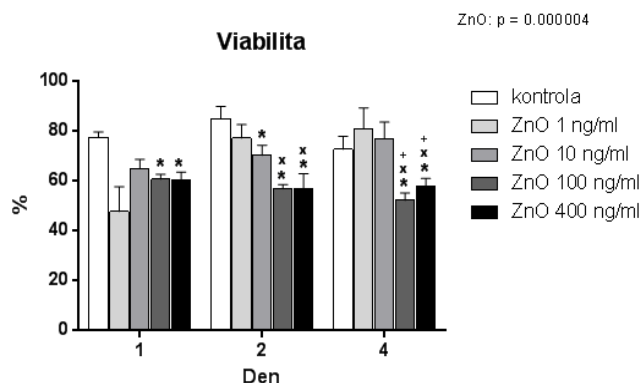
## MATERIÁL A METODIKA

Použitie chemikálie boli zaobstarané z firmy Sigma-Aldrich (USA) a boli uchovávané za podmienok udávaných výrobcom. Bunková suspenzia *Nicotiana tabacum* L. cv. Brilliant Yellow-2 (BY-2) bola kultivovaná v Murashige a Shook médiu (MS) modifikovanom podľa Nagata (1992). Ku kultivačnému médiu MS boli pridané sterilné komerčne zakúpené nZnO (<50 nm, Sigma-Aldrich, USA) v nasledovných koncentráciách 0, 1, 10, 100 a 400 ng/ml (n = 3/daná koncentrácia). Vzorky (n = 3/daný časový interval) boli zbierané v časových intervaloch 1, 2, 3 a 4 dni po pridaní nZnO. Parametre hodnotiace rast suspenzie (čerstvá hmotnosť a objem sedimentovanej kultúry vzhľadom k celkovému objemu suspenzie (PCV)) boli stanovované gravimetricky resp. metódou packed cell volume (PCV). Viabilita buniek rastlinnej kultúry BY-2 bola stanovená mikroskopicky (Axioscop 40, Carl Zeiss Nemecko) s použitím fluorescenčného farbiva fluoresceíndiacetátu (FDA) a propídiuiodidu (PI)

počítaním v desiatich poliach v triplikátoch. Na spracovanie a vyhodnotenie výsledných fotografií bunkovej kultúry bol použitý NIS elements software (Nikon, Japonsko). Na štatistické vyhodnotenie bola použitá dvojcestná ANOVA s následným Fisherovým Post-hoc testom (Statistica<sup>®</sup>) a výsledky sú vyjadrené ako MEAN ± S.E.M (hodnoty s  $p < 0,05$  boli považované za štatisticky významné).

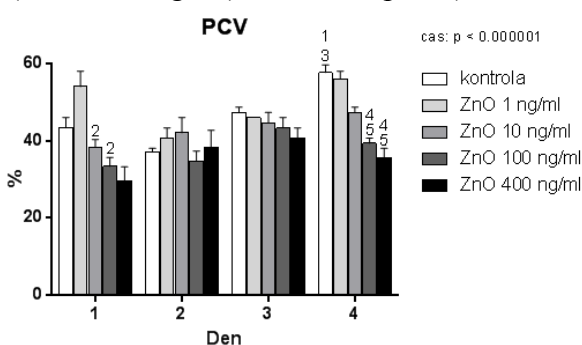
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viabilita buniek rastlinnej kultúry BY-2 bola výrazne ovplyvnená len samotnou expozíciou nZnO hlavne pri koncentrácii 100 a 400 ng/ml a to už po prvom dni (obr 1). Morfologické zmeny v danom časovom intervale pri expozícii nZnO (400 ng/ml) preukázali poškodením bunkovej steny.

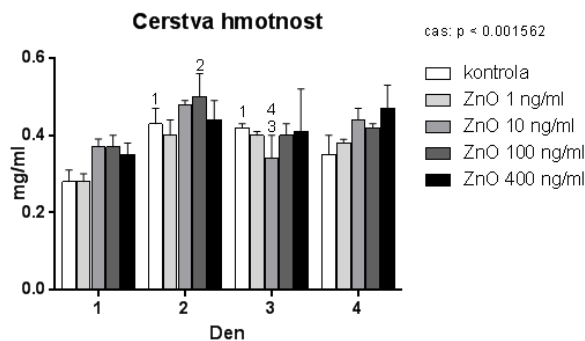


Obr. č. 1: Graf závislosti viability v % na koncentrácii ZnO nanočastic a dĺžke expozície. \* vs. kontrola v rámci daného dňa; \* vs. ZnO 1 ng/ml v rámci daného dňa; + vs. ZnO 10 ng/ml v rámci daného dňa.

Objem sedimentovanej kultúry vzhľadom k celkovému objemu suspenzie (PCV, obr. č. 2) obdobne ako aj parameter čerstvá hmotnosť (obr. č. 3) bol štatisticky významne modifikovaný len v rámci času. Nárast PCV bol najvyšší po 4 dňoch v rámci kontrolných skupín, čo sa zároveň prejavilo aj preukázateľne najnižším prírastkom po expozícii nZnO (100 a 400 ng/ml) v dane skupine (PCV, obr. č. 2)



Obr. č. 2: Graf závislosti PCV v percentách oproti koncentrácii nanočastic a dĺžke expozície. <sup>1</sup> vs. kontrola v 1 deň; <sup>2</sup> vs. ZnO 1ng/ml v 1 deň; <sup>3</sup> vs. kontrola v 2 deň; <sup>4</sup> vs. kontrola v 4 deň, <sup>5</sup> vs. ZnO 1ng/ml v 4 deň.



Obr. č. 3: Graf závislosti čerstvej hmotnosti na množstve nanočastic a dobe expozície. <sup>1</sup> vs. kontrola v 1 deň; <sup>2</sup> vs. ZnO 100 ng/ml v 1 deň; <sup>3</sup> vs. ZnO 10 ng/ml v 2 deň; <sup>4</sup> vs. kontrola v 3 deň.

Predpokladá sa, že toxický účinku nZnO spočíva v troch mechanizmoch. Prvý typ je založený na toxicite uvoľňovaného iónu  $Zn^{2+}$ , čo vedie k porušeniu bunkovej homeostázy zinku a následne k inhibícii enzymatickej aktivity, k mitochondriálnemu poškodeniu a nakoniec k bunkovej smrti. Druhý spôsob je založený na povrchovej interakcii, pri ktorej môže dochádzať k produkcii toxických substancií ako napríklad chemických radikálov a reaktívnych foriem kyslíka (ROS). nZnO je navyše fotokatalyzátor a zvyšuje generovanie



ROS po ožiarení. Tretia možnosť toxicity n ZnO je, že nanočastice alebo ich povrch môžu priamo interagovať a poškodzovať biologické systémy (Ma a kol. 2013).

Účinok nZnO bol pozorovaný u rôznych jednoklíčnolistových (*Allium cepa*, *Lolium perenne*, *Zea mays*) aj dvojklíčnolistových rastlín (*Raphanus sativus*, *Brassica napus*, *Lactuca sativa*, *Cucurbita pepo* a *Cucumis sativus*). Bola pozorovaná redukcia rastu koreňového systému, redukcia biomasy, deformácia koreňovej čiapočky (Lin a Xing, 2007; Lin a Xing (2008; Stampoulis a kolektív (2007)). Potenciálny genotoxický efekt nZnO bol zisťovaný sledovaním mitózy v bunkách koreňovej hlavičky *Allium cepa*. Výsledky ukazujú, že rast koreňov bol inhibovaný priamoúmerne narastajúcej koncentrácii nanočastíc. Redukcia koreňového rastu a odlišná morfológia koreňov môže poukazovať na indukciu chromozomálnych aberácií a redukciu mitotickej aktivity, ktoré môžu viesť k smrti bunky (Shaymurat, 2011).

V našej práci bola zaznamenaná stagnácia rastu suspenzie, ktorá súhlasí s redukciami biomasy, rastu a mitotickej aktivity pozorovaných v iných štúdiách. Výsledky po expozícii nZnO, ako napríklad: poškodenie koreňovej čiapočky, deformácia povrchu koreňov a chromozomálne aberácie vedúce k smrti bunky, korelujú s pozorovanou zníženou viabilitou kultúry BY-2.

Výsledky našej štúdie poskytujú nové informácie o možných fyto toxických a genotoxických účinkoch ZnO NP na rastliny. Mnoho kľúčových otázok v ekotoxikologických účinkoch nanočastíc zostáva stále nevyriešených.

*Táto publikácia vznikla v rámci plnenia grantového projektu za finančnej podpory agentúry IGA 2013 VFU;88/2013/FaF; Vplyv ZnO nanočastíc na rošlinnou modelovou kultúrou BY-2. Práca bola podporovaná NRL UVLF v KE.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 2008; 71, 7: 1308-1316.
- Kasemets K, Ivask A, Dubourguier H.C., Kahru A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*. 2009; 23, 6: 1116-1122.
- Lin D, Xing B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 2007; 150: 243–250.
- Lin D, Xing B. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental science & technology*. 2008; 42, 15: 5580-5585.
- Ma H., Willians P. L., Diamond S. A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - a review. *Environmental Pollution*. 2013; 172: 76-85.
- Nagata T, Nemoto Y, Hasezawa S. Tobacco BY-2 cell-line as the heLa-cell in the cell biology of higher-plants. *Int. Rev. Cytol.* 1992; 132: 1–30.
- Shaymurat T, Gu J, Xu Ch, Yang Z, Zhao Q, Liu Y. Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): A morphological study. *Nanotoxicology* 2012; 6,3:241-248.
- Stampoulis D, Sinha S, White J. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental science & technology*. 2009; 43, 24:9473-9479.
- Wang Z. Zinc oxide nanostructures: growth, properties, and applications. *Journal of Physics*. 2004; 16: R829-R858.
- [http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis\\_draft/1.7.2013](http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/1.7.2013).



# VPLYV VLASTNOSTÍ PLA NANOSFÉR NA AMYLOIDNÚ AGREGÁCIU INZULÍNU

Bednáriková Z.<sup>1,2</sup>, Koneracká M.<sup>2</sup>, Závišová V.<sup>2</sup>, Šipošová K.<sup>2</sup>, Kopčanský P.<sup>2</sup>, Girman V.<sup>3</sup>, Gažová Z.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Katedra Biochémie, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice*

<sup>2</sup>*Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice*

<sup>3</sup>*Katedra fyziky kondenzovaných látok, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice*

## ABSTRAKT

Tvorba proteínových amyloidných fibril v rôznych častiach ľudského tela je spojená s mnohými neliečiteľnými ochoreniami. Inzulínové amyloidné fibrily sú vysoko organizované proteínové agregáty, ktoré sa *in vivo* vyskytujú u pacientov trpiacich injekčnou inzulínovou amyloidózou. Študovali sme *in vitro* účinok rôznych nanosfér vytvorených z polyméru kyseliny mliečnej (PLA) na amyloidnú fibrilizáciu inzulínu. Zistili sme, že inhibičná aktivita PLA nanosfér závisí od ich fyzikálno-chemických vlastností, ktoré boli determinované ich modifikáciou. Najväčšia inhibičná aktivita bola detegovaná pre PLA nanosféry s najmenším hydrodynamickým priemerom, ktoré boli modifikované hovädzím sérovým albumínom (BSA) a obsahovali magnetitové jadro.

## ÚVOD

Patológia viac ako 20 ľudských ochorení (napr. Alzheimerova a Parkinsonova choroba, diabetes, rôzne systémové amyloidózy a iné) je spojená s prítomnosťou amyloidných agregátov lokalizovaných v rôznych častiach ľudského organizmu, ktoré sú v prevažnej miere tvorené jedným druhom poly/peptidu typickým pre dané ochorenie (Dobson a Karplus, 1999). Inzulínové amyloidné agregáty sa vyskytujú u diabetikov v miestach vpichu inzulínu pri jeho dlhodobej aplikácii. Vytváranie inzulínových amyloidných agregátov predstavuje tiež problém pri skladovaní a transporte tohto liečiva, ako aj pri používaní inzulínových púmp (Yumlu a kol., 2009).

V súčasnej dobe nie je možné amyloidné ochorenia liečiť, experimentálne údaje získané na bunkových a zvieracích modeloch však naznačujú, že inhibícia tvorby amyloidných agregátov je pre tieto systémy prospešná (Khlitunova a kol., 2006). Inhibičná aktivita bola zistená pre protilátky, malé peptidy, surfaktanty, nízkomolekulové zlúčeniny, a v súčasnej dobe aj pre niektoré druhy nanočastíc. Súčasnú *in vitro* experimenty poukazujú na to, že inhibičný účinok nanočastíc je podmienený hlavne ich fyzikálno-chemickými vlastnosťami (Siposova a kol., 2012; Bellova a kol., 2010).

Študovali sme interakciu dvoch rôznych typov PLA nanosfér s cieľom zistiť, či sú schopné ovplyvniť tvorbu inzulínových amyloidných agregátov.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Chemikálie*

Ľudský rekombinantný inzulín (I2643 - 50MG) a tioflavín T (ThT - T3516) boli zakúpené od firmy Sigma Aldrich, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> od firmy LaChem.

### *Amyloidná agregácia inzulínu*

Inzulínové amyloidné agregáty boli pripravené 2 h inkubáciou roztoku inzulínu (10 μM) v 50 mM fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7.5 pri teplote 65°C a intenzívnom miešaní (1 200 rpm). Prítomnosť amyloidných fibril bola potvrdená meraním ThT fluorescencie a transmisnou elektrónovou mikroskopiou.

### *Príprava PLA nanosfér*

PLA nanosféry boli pripravené modifikovanou nanoprecipitačnou metódou. Organická fáza, roztok polyméru kyseliny mliečnej o koncentrácii 10 mg/ml, bola po kvapkách pridávaná do

vodného koloidného roztoku. Tento koloidný roztok bol pripravený zmiešaním roztoku kyseliny plurónovej (25,6 mg/ml) a roztoku Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočastíc (koncentrácia magnetitu = 72 mg/ml). PLA nanosféry s magnetitovým jadrom boli modifikované pridaním rôzneho množstva zásobného roztoku BSA (100 mg/ml) ku fixnej koncentrácii PLA nanosfér, čím sme pripravili BSA nanosféry s definovanými hmotnostnými pomermi BSA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 0.1, 1, 10. Následne bola zmes miešaná niekoľko hodín pri izbovej teplote. Veľkosť nanosfér bola určená pomocou DLS meraní.

#### *Viazanie ThT*

Prítomnosť inzulínových fibríl bola detegovaná nárastom intenzity ThT fluorescence v emisnom spektre. ThT bol excitovaný pri 440 nm a emisia bola meraná pri 485 nm, výsledná koncentrácia ThT bola 20 μM. Merania boli uskutočnené v 96-jamkovej platni pomocou spektrofluorimetra Synergy MX (od firmy BioTek) so šírkou excitačnej a emisnej štrbiny 9.0 nm.

#### *Sledovanie inhibičnej aktivity PLA nanosfér na amyloidnú agregáciu inzulínu*

K roztoku inzulínu (10 μM = 58 μg/ml) boli pridané jednotlivé PLA nanosféry v pomere = 4:1, ktorý bol následne vystavený podmienkam indikujúcim amyloidnú fibrilizáciu. Inhibičný efekt nanosfér bol detegovaný meraním intenzity fluorescence ThT. Inhibičné aktivity jednotlivých nanosfér boli určené ako rozdiel fluorescenčnej intenzity získanej pre inzulínové amyloidné agregáty (100%) a normalizovanej fluorescence meranej po inkubácii s nanosférami. Experimenty boli uskutočnené vždy trikrát a použité údaje predstavujú priemerné hodnoty s priemernou odchýlkou.

#### *Transmisná elektrónová mikroskopia*

Vzorky boli nanosené na medenú mriežku potiahnutú formvarom. Po adsorpcii vzorky boli mriežky opláchnuté destilovanou vodou a voľne usušené na vzduchu. Následne bola na ne nanosená vrstva uhlíka. Vzorky boli sledované elektrónovým mikroskopom JEOL-TEM 2100F pri 200kV v STEM BF režime.

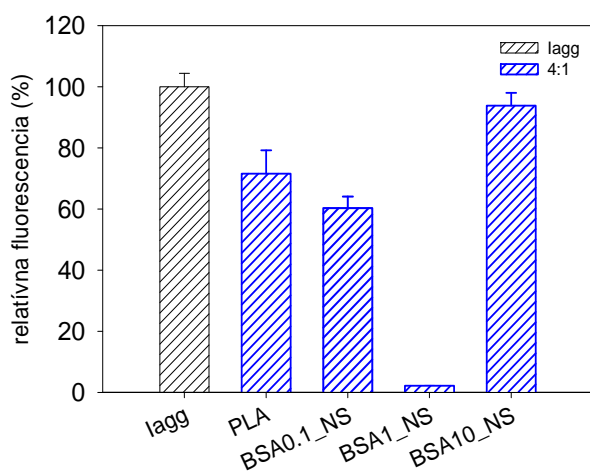
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Súčasný poznatky poukazujú na významný terapeutický potenciál nanočastíc v biomedicíne, avšak ich účinok na amyloidnú agregáciu proteínov nebol doteraz predmetom intenzívneho výskumu. Sledovali sme preto interakciu rôznych druhov nanosfér s amyloidnou agregáciou inzulínu. Použili sme dva typy nanosfér: i) PLA - sférické nanosféry vytvorené iba z polyméru kyseliny mliečnej, ii) BSA\_NS - PLA nanosféry dopované Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočasticami a modifikované rôznym množstvom hovädzieho sérového albumínu (BSA) s pomermi BSA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 0.1, 1.0 a 10.

Pomocou metódy viazania ThT sme pre nanosféry sledovali inhibičný účinok na amyloidnú agregáciu inzulínu (obr.1). Nanosféry tvorené len z PLA (PLA) sa vyznačovali len veľmi slabou inhibičnou aktivitou, pozorovali sme iba 28% zníženie fibrilizácie inzulínu. Pre PLA nanosféry s magnetitovým jadrom a modifikované rôznym množstvom BSA bola pozorovaná veľmi rozdielna inhibičná aktivita. Pre BSA10\_NS bola inhibičná aktivita podstatne nižšia (~ 6 %), ako aktivita pozorovaná pre samotné PLA nanosféry. O niečo väčšia aktivita bola detegovaná pre BSA0.1\_NS (~ 40%). Výrazná inhibícia inzulínovej fibrilizácie bola určená pre BSA1\_NS, a to takmer 98%. Získané výsledky inhibičných aktivít spolu s hydrodynamickými priemermi nanosfér sú uvedené v Tabuľke č. 1. Zaujímavým je zistenie, že inhibičná aktivita nepriamo koreluje s veľkosťou nanosfér, t.j. čím menší je rozmer nanosfér, tým je ich schopnosť inhibovať tvorbu fibríl väčšia.

Inhibičný účinok nanosfér bol potvrdený aj pomocou elektrónovej transmisnej mikroskopie. Na obr. 2A môžeme vidieť inzulínové fibrily s charakteristickou amyloidnou morfológiou. Na obrázku 2B sú znázornené sférické nanosféry s pomerom BSA1\_NS s priemerom približne 127 nm. Prítomnosť týchto nanosfér mala inhibičný účinok na tvorbu

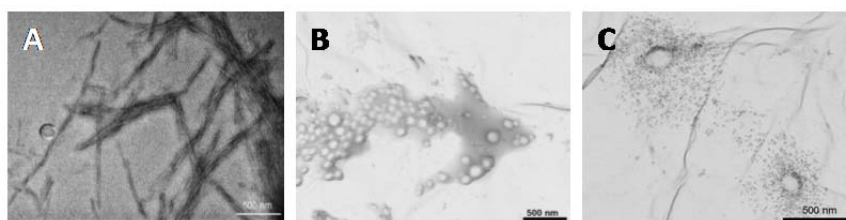
amyloidných agregátov. Pozorovali sme redukcii množstva fibríl, ako aj zmeny v ich dĺžke a morfológii (obr. 2C).



typ nanosféry	D <sub>hydr</sub> (nm)	inhibičná aktivita (%)
PLA	123,7	28,4
BSA0.1_NS	134,1	39,7
BSA1_NS	127,2	97,8
BSA10_NS	149,4	6,2

Tab.1 Veľkosť a inhibičná aktivita PLA nanosfér.

**Obr. 1 Inhibičný účinok nanosfér na amyloidnú agregáciu inzulínu.** Fluorescenčné signály detegované pre inzulínové amyloidné fibrily (čierno-biele pruhy) a v prítomnosti PLA nanosfér s rôznym pomerom BSA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (0.1; 1; 10) pre pomer inzulín: nanosféry = 4:1 (modré pruhy).



**Obr. 1 STEM zobrazenie inzulínových fibríl.** A) 10μM inzulínové fibrily; B) nanosféry BSA1\_NS; C) fibrilizácia inzulínu v prítomnosti nanosfér BSA1\_NS. Čiara predstavuje 500 nm.

Na základe experimentálnych údajov je možné vyvodit' záver, že PLA nanosféry samotné ako aj dopované magnetitom a modifikované BSA majú schopnosť ovplyvniť fibrilizáciu inzulínu. Rozsah inhibičného účinku závisí od veľkosti nanosféry a prítomnosti Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočastíc. Ako najlepšie inhibítory sa ukázali magnetitom dopované PLA nanosféry modifikované BSA v hmotnostnom pomere BSA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> = 1:1, pravdepodobne v dôsledku ich najmenej veľkosti. Naše výsledky poukazujú na možné terapeutické využitie nanosfér v prevencii amyloidnej agregácie.

*Táto práca vznikla za podpory projektov VEGA 0181, 0041, ŠF EU 26110230061, APVV 0171-10 a VVGS98/13-14.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dobson, C.M., Karplus, M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1999. 9: 92-101.  
 Yumlu, S. et al. *Human pathology.* 2009.40: 1655-1660.  
 Khlistunova, I. et al. *J. Biol. Chem.* 2006. 281: 1205-1214.  
 Bellova, A. et al. *Nanotechnology.* 2010. 21: 1-6.  
 Siposova, K. et al. *Nanotechnology.* 2012. 23: 1-10.

# SPEKTROFOTOMETRICKÉ METÓDY ŠTÚDIA ANTIRADIKÁLOVÝCH VLASTNOSTÍ NIEKTORÝCH RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

Fejerčáková A., Vašková J., Vaško L.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED, Košice

## ABSTRAKT

Polyfenolické zlúčeniny rastlín tvoria množstvo-skupín chemických zlúčenín, ktoré vznikajú esterifikáciou, metyláciou alebo polymerizáciou. Môžu tvoriť až 65% celkových antioxidantov prítomných v rastlinách. Na základe poznatkov o antioxidačných vlastnostiach sekundárnych metabolitov rastlín sme sa v našej práci zamerali na sledovanie účinku rozdielnych koncentrácií vybraných rastlinných extraktov- repík lekársky (*Agrimonia eupatoria*), horec žltý (*Gentiana lutea*) a hrozno (*Vitis vinifera*) voči superoxidovému a hydroxylovému radikálu v rôznych podmienkach pH (6,5 a 7,4) a ich efektu voči oxidu dusnatému a peroxynitritu. In vitro experimenty sú vo všeobecnosti významné z hľadiska priblíženia resp. objasnenia predpokladaného mechanizmu účinku rastlinných extraktov na organizmus. Jednoduchou, citlivou a relatívne rýchlou metódou stanovenia antioxidačných vlastností rastlinných extraktov je metóda spektrofotometrie. V prítomnosti antioxidantu, vygenerovaný voľný radikál získava jeden elektrón, čím dochádza k poklesu absorbancie. Pri použití pH=6,5, ktoré je viac charakteristické pre bunky, bola pozorovaná vyššia antioxidačná aktivita testovaných látok voči peroxynitritu, naopak rastlinné extrakty boli účinnejšie voči superoxidovému a hydroxylovému radikálu pri použití pH=7,4. Voči oxidu dusnatému sme zaznamenali pomerne slabý inhibičný účinok, ktorý mal navyše so vzrastajúcou koncentráciou klesajúci charakter.

## ÚVOD

Bunky živého organizmu prakticky nepretržite produkujú voľné radikály, označované ako ROS (reactive oxygen species) a reaktívne dusíkaté radikály označované ako RNS (reactive nitrogen species). ROS a RNS sú nestále, vysoko reaktívne energetické molekuly, ktoré sú schopné samostatnej existencie krátky čas. V biologickom systéme sa môžu tvoriť prooxidatívnymi enzýmovými systémami, lipidovou oxidáciou, ožiareními, zápalom v tele, fajčením, látkami znečisťujúcimi ovzdušie a procesom glykoxidácie (Stief, 2003). Reakcie voľných radikálov, prípadne látok neradikálovej povahy s biomakromolekulami sú najčastejšou príčinou poškodenia bunkových štruktúr, buniek a celých tkanív. Voči ich pôsobeniu v organizme existuje mnoho obranných mechanizmov, ktorých sa zúčastňujú látky, tzv. antioxidanty. V súčasnej dobe sa sústreďuje veľký záujem práve na antioxidanty z prírodných rastlinných zdrojov z dôvodu obáv nad bezpečnosťou a toxicitou syntetických antioxidantov (Wenk, 2003). K hlavným komponentom extraktov rastlín, ktoré vykazujú antioxidačný účinok, patria polyfenolické zložky a flavonoidy. Flavonoidy, okrem ich priameho antioxidačného účinku, ovplyvňujú aj tvorbu radikálov nepriamo aktiváciou alebo deaktiváciou antioxidačných enzýmov podieľajúcich sa na vzniku rôznych radikálov. Zároveň pôsobia na rôzne signálne cesty v bunke a ovplyvňujú tak napríklad extracelulárne signál regulujúce kinázy a iné transkripčné faktory. Cieľom predloženej práce bolo sledovať účinok rozličných koncentrácií vybraných rastlinných extraktov (repík lekársky, horec žltý a hrozno) voči superoxidovému ( $O_2^-$ ), hydroxylovému radikálu ( $\cdot OH$ ), a peroxynitritu ( $ONOO^-$ ) pri rôznych podmienkach pH (6,5 a 7,4) zásobného tlmivého roztoku, pričom bola porovnávaná ich schopnosť oxidovať tieto radikály. Rovnako bol sledovaný aj ich efekt voči oxidu dusnatému ( $NO$ ).

## MATERIÁL A METODIKA

K štúdiu bol použitý suchý extrakt vňate repíka lekárskeho (*Agrimonia eupatoria*), etanolový extrakt koreňa horca žltého (*Gentiana lutea*) a suchý extrakt zo šupiek červeného hrozna (*Vitis vinifera*). Bola sledovaná koncentračná (5, 25, 50, 75, 100 µg/mL PBS) a pH závislosť (6,5 a 7,4) testovaných látok voči  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$  a  $ONOO^-$ , rovnako ako aj ich aktivita voči NO. Antioxidačná aktivita voči  $O_2^-$  bola stanovená podľa Beauchampa a Fridovicha (1971). K zásobnému tlmivému roztoku bol pridaný L- metionín a EDTA. K takto pripravenému roztoku bol následne pridávaný riboflavin, nitrotetrazóliová modrá (NBT) a testovaný rastlinný extrakt v koncentračnom rozsahu 5-100 µg/ml. Po 10 a 20 minútovom ožarovaní zmesi UV ortuťovou lampou najprv bez prítomnosti študovaných látok a následne za prítomnosti testovaných látok boli stanovené absorbancie roztokov pri 450 nm a 560 nm.  $\cdot OH$  bol stanovený podľa Halliwella et al. (1987). Reakčná zmes obsahovala 2-deoxy-D-ribózu rozpustenú v zásobnom tlmivom roztoku (pH 6,5 alebo 7,4) s obsahom NaCl, Mohrovej soli a peroxidu vodíka ( $H_2O_2$ ). K tejto zmesi boli aplikované testované extrakty v rôznych koncentráciách, pričom zmes bola inkubovaná pri 37 °C 10 minút. Následne boli pridané kyselina tiobarbiturová (TBA) a trichlóroctová (TCA) a zmes bola zahrievaná 8 minút pri 100 °C. Po ochladení boli zaznamenané absorbancie zmesí bez a s prítomnou testovanou látkou pri 532 nm. Z rozdielu absorbancií bez a s prítomnou testovanou látkou možno určiť % inhibície pre použitú koncentráciu danej látky voči  $\cdot OH$ . Nakoľko NO je reaktívna molekula s krátkou životnosťou (3-5 s), veľmi často sa jeho obsah stanovuje nepriamo, t.j. na základe obsahu jeho stabilnejších produktov, vznikajúcich jeho oxidáciou. Schopnosť testovaných látok vycytávať NO bol stanovený prostredníctvom detekcie nitritu Griessovou reakciou pri 546 nm (Miranda et al., 2001). Roztok  $ONOO^-$  bol pripravený reakciou okysleného  $H_2O_2$  s roztokom dusitanu sodného a následným rýchlym pridaním hydroxidu sodného. Jeho koncentrácia bola indikovaná absorbanciou pri 302 nm (Beckman, 1994).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

$O_2^-$  patrí k voľným radikálom s pomerne malou reaktivitou, ktorá je závislá na prostredí v ktorom je rozpustený, a to hlavne na pH. Jeho toxicita sa pripisuje najmä tvorbe iných reaktívnejších metabolitov ako napríklad  $H_2O_2$  a  $\cdot OH$ . Testované rastlinné extrakty preukázali pomerne slabý inhibičný efekt voči  $O_2^-$ , pričom tento vplyv bol koncentračne a pH závislý. Lepší účinok bol sledovaný pri vyššom pH. Pri použití koncentrácie 100 µg/mL sme zaznamenali u hrozna 55 %, u horca žltého 40 % a repíka 20 % inhibičný efekt voči superoxidu. V prípade  $\cdot OH$  sme rovnako zaznamenali nárast antioxidačnej aktivity so vzrastajúcou koncentráciou extraktov, pričom v prípade extraktu repíka a horca bolo % inhibície 50 % pri použitej koncentrácii 100 µg/ml a použitom pH 7,4. V prípade hrozna sme pri rovnakých podmienkach zistili až 80 % inhibičnú aktivitu. Bolo zistené, že medzi obsahom polyfenolov a schopnosťou vycytávať  $\cdot OH$  je vysoká pozitívna korelácia (Shyamala et al., 2005). Pri použití nižšieho pH (6.5) bol antioxidačný efekt látok voči hydroxylovému radikálu o polovicu nižší. Alkalizáciou sa antiradikálova aktivita rastlinných extraktov znižuje, naopak v kyslom prostredí sa zvyšuje (Kosar a kol., 2005). NO je jednoduchá zlúčenina dusíka, ktorej úloha v metabolizme živých organizmov sa skúma relatívne krátko. Tvorí sa prirodzene v ľudskom tele a zabezpečuje komunikáciu medzi bunkami a mnoho iných fyziologických funkcií. Nadprodukcia NO je však škodlivá nielen na úrovni bunky, ale aj na úrovni celého organizmu. Bolo zistené, že sekundárne metabolity rastlín môžu mať značný význam v prevencii škodlivého účinku pri nadprodukcii NO (Yabuki a kol., 1999). Testované rastlinné extrakty preukázali vyšší inhibičný efekt voči NO pri použití nižšej koncentrácie (30 % v prípade extraktu repíka lekárskeho a hrozna a 40 % pri použití extraktu z horca). V prítomnosti kyslíka sa vzájomnou reakciou  $O_2^-$  a NO formuje veľké množstvo oxidatívne aktívnej molekuly,  $OONO^-$ . Aj napriek svojej neradikálovej



povahe, je to potenciálny oxidant, ktorý spôsobuje fragmentáciu DNA, lipidovú peroxidáciu a zasahuje aj do bunkových signalizačných dráh (Halliwell a Guterridge, 1986; Valko a kol., 2007). Repík lekársky a horec žltý boli účinnejšie voči peroxynitritu pri použití pH 6,5, pričom sme zaznamenali približne 80 % inhibičný efekt v porovnaní s pH 7,4, kde ich účinok voči peroxynitritu bol podstatne nižší (65 %). Naopak v prípade extraktu hrozna sme vplyv pH na schopnosť vychytávania peroxynitritu nezaznamenali. Jeho inhibičná aktivita voči ONOO<sup>-</sup> bola v rôznych podmienkach pH vyrovnaná (60 %).

*Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/1236/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beauchamp C., Fridovich I.: Superoxide dismutase: improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 44: 276-287
- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C.: The deoxyribose method: a simple test tube assay for the determination of rate constant for reaction of hydroxyl radical. *Anal. Biochem.* 1987, 165: 215-219.
- Miranda K.M., Espey M.G. Wink D.A.: A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001, 5: 62-71.
- Shyamala B.N., Sheetal G., Lakshmi J.A., Prakash, J.: Leafy vegetable extracts- antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. *Innovative Food Sci. Emerging Technol.* 2005, 6: 239-245.
- Halliwell B., Guterridge J.M.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986, 246: 501-514.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M., Telser J.: Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, 39: 44-84.
- Beckman J.S., Chen H., Ischiropulos H., Crow J.P.: Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods Enzymol.* 1994, 233: 229-240.
- Kosar M., Dorman H.J.D, Hiltunen R.: Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected Lamiaceae species. *Food Chem.* 2005, 91: 525-533.
- Yabuki M., Kariya S., Ishisaka R., Yasuda T., Yoshioka T., Horton A.A., Utsumi K.: resistance to nitric oxide mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu, Zn-superoxide dismutase and catalase. *Free Radic Biol Med.* 1999, 26: 325-332.
- Stief T.W.: The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med. Hypotheses*, 2003, 60: 567-572.
- Wenk C.: Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian Austral. J. Anim.* 2003, 16: 282-289.

# SCREENING REZÍDUIÍ ANTIBIOTÍK V PEČENI A OBLIČKÁCH JATOČNÝCH ZVIERAT METÓDOU STAR A NAT TESTOM

Gondová, Z., Kožárová, I., Poláková, Z.

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

## ABSTRAKT

Predmetom štúdie bolo stanovenie prítomnosti rezíduí antibiotík v pečeni a obličkách ošípaných a hovädzieho dobytku použitím dvoch mikrobiálnych inhibičných testov (MIT) - metódy STAR (screeningový test na stanovenie antibiotík a sulfónamidov s použitím piatich bakteriálnych kmeňov) a NAT testu (the Nouws Antibiotic Test). Pri metóde STAR boli pozitívne na reziduá antibiotík pečeň a obličky ošípaných a hovädzieho dobytku na platniach s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 a *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, čo predpokladá prítomnosť beta-laktámových antibiotík, sulfónamidov a makrolidových antibiotík. Pri metóde NAT boli pozitívne len obličky hovädzieho dobytku na platni s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, čo predpokladá prítomnosť beta-laktámových a makrolidových antibiotík.

Viac pozitívnych výsledkov detegovaných pri metóde STAR poukazuje na vyššiu citlivosť uvedenej metódy na reziduá antibiotík vo vyšetrovaných matriciach. Na základe zhody inhibície testovaných kmeňov predpokladáme prítomnosť beta-laktámových a makrolidových antibiotík v obličkách hovädzieho dobytku.

## ÚVOD

Aplikácia antibiotík na liečbu infekčných ochorení je bežnou praxou v chovoch potravinových zvierat. Výsledkom používania týchto liečiv je však nevyhnutne prítomnosť ich rezíduí v tkanivách potravinových zvierat a potenciálne ohrozenie verejného zdravia. Z dôvodu neuváženej, či nesprávneho podávania antibiotík potravinovým zvieratám, resp. nedodržania stanovenej ochrannej lehoty, môžu byť reziduá antibiotík prítomné v živočíšnych produktoch v množstvách presahujúcich stanovené maximálne limity (MRL).

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. Metódy používané za účelom úradnej kontroly rezíduí veterinárnych liekov v potravinách živočíšneho pôvodu musia spĺňať požiadavky ustanovené rozhodnutím Komisie 2002/657/ES a stanovovať reziduá na príslušnej úrovni (MRL). Pod pojmom „maximálny limit rezíduí“ rozumieme maximálnu koncentráciu 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, ktorých princípom je inhibícia 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 v tkanivách potravinových zvierat sú v súčasnosti príslušným orgánom schválené nasledovné úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín, a to platňová metóda STAR a liekovková metóda PREMI<sup>®</sup>TEST.

Metóda STAR (CH 12.19, 2006) pozostáva z piatich testovacích platní, z ktorých každá 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 uľahčujúcu následný post-screening rezíduí alebo ich chemickú confirmáciu.

NAT test nepatrí medzi úradné metódy schválené na stanovenie rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu. Predmetom našej práce bolo stanoviť a vzájomne porovnať citlivosť oboch metód na reziduá antibiotík v pečeni a obličkách ošípaných a hovädzieho dobytku. Vyšetrovaný materiál pochádzal zo zvierat zabitých na bitúnkoch a posúdených pri prehliadke *post mortem* úradným veterinárnym lekárom ako požívateľné pre ľudskú spotrebu.

## MATERIÁL A METODIKA

Testovacie kmene a kultivačné médiá boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia) a Difco (Holandsko) a pripravené podľa postupu uvedeného v Zozname úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív – metóda STAR (CH 12.19, 2006) a pri NAT teste podľa autorov Pikkemaat a i. (2008). Pri metóde STAR sme použili médium s *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 s koncentráciou  $5 \times 10^6$  spór.ml<sup>-1</sup>, *B. subtilis* BGA ( $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>), *K. rhizophila* ATCC 9341 ( $5 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>), *E. coli* ATCC 11303 ( $10^5$  spór.ml<sup>-1</sup>) a *B. cereus* ATCC 11778 ( $3 \times 10^4$  spór.ml<sup>-1</sup>). Pre NAT test bolo použité médium s *K. rhizophila* ATCC 9341 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>), *B. subtilis* BGA ( $10^5$  KTJ. ml<sup>-1</sup>), *B. cereus* ATCC 11778 ( $10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>), *Y. ruckeri* NCIM 13282 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>) a *B. pumilus* CN 607 ( $10^6$  KTJ.ml<sup>-1</sup>). Vzorky pečeni a obličiek boli pri metóde STAR získané pomocou sterilného korkovrtu, následne narezané na hrúbku približne 2 mm a aplikované na povrch agaru v Petriho miske. Pri NAT teste sme použili sterilné papierové disky s priemerom 12,7 mm, nasiaknuté tekutinou obličkovej panvičky a pečene. Disky sme aplikovali do otvorov v agare s priemerom 14 mm a doplnili platňovo špecifickými fosfátovými roztokmi v množstve 200 – 300 µl. Takto pripravené platne sme inkubovali pri teplote  $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (*K. rhizophila* ATCC 9341, *B. pumilus* CN 607, *B. subtilis* BGA, *E. coli* ATCC 11303),  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  (*B. cereus* ATCC 11778, *Y. ruckeri* NCIM 13282) 16-18 hodín a *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 pri teplote  $55 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  počas 12 – 15 hodín.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Veľkosť IZ bola pri metóde STAR meraná od okraja papierového disku po vonkajší okraj IZ a pri metóde NAT sme merali celý priemer IZ pomocou digitálneho posuvného meradla (Mitutoyo, Japonsko) s presnosťou na 0,1 mm. Za pozitívne sme považovali vzorky, pri ktorých pri metóde STAR bola prítomná inhibičná zóna o veľkosti  $\geq 2$  mm (*B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149  $\geq 4$  mm) a pri NAT teste o veľkosti  $\geq 15$  mm. Výsledky stanovenia rezíduí antibiotík vo vyšetrovaných vzorkách použitím metódy STAR a NAT testu sú prezentované v tabuľke 1. Veľkosti IZ sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD) desiatich meraní jednej vzorky (Microsoft Office Excel 2007).

Výsledky prezentované v Tabuľke 1 poukazujú na inhibíciu rastu dvoch testovacích kmeňov, *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 a *K. rhizophila* ATCC 9341, čo predpokladá prítomnosť rezíduí beta-laktámových a makrolidových antibiotík vo vyšetrovaných vzorkách.



**Tabuľka 1:** Veľkosti IZ (mm ± SD) detegované pri vyšetrowaní obličiek a pečeni ošípaných a hovädzieho dobytku metódou STAR a NAT testom

druh zvierat'a	matrica	STAR					NAT				
		<i>B. subtilis</i> BGA	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>E. coli</i> ATCC 11303	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	<i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i> ATCC 10149	<i>B. subtilis</i> BGA	<i>Y. ruckeri</i> NCIM 13282	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>B. pumilus</i> CN 607	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341
hovädzí dobytok	pečeň 1	0	0	0	3,21 ±1,89	4,86 ±0,97	0	0	0	0	0
	pečeň 2	0	0	0	2,29 ±0,35	4,54 ±0,77	0	0	0	0	0
	pečeň 3	0	0	0	3,06 ±0,78	4,05 ±0,84	0	0	0	0	0
	pečeň 4	0	0	0	3,44 ±0,79	5,22 ±1,87	0	0	0	0	0
	oblička 1	0	0	0	3,03 ±0,97	6,26 ±0,84	0	0	0	0	23,41 ±0,92
	oblička 2	0	0	0	6,45 ±0,34	5,57 ±1,06	0	0	0	0	22,67 ±0,10
	oblička 3	0	0	0	2,76 ±0,75	5,58 ±0,67	0	0	0	0	18,79 ±0,65
	oblička 4	0	0	0	2,24 ±0,63	5,73 ±1,23	0	0	0	0	0
ošípané	pečeň 1	0	0	0	3,30 ±0,67	7,84 ±1,06	0	0	0	0	0
	pečeň 2	0	0	0	2,88 ±0,50	5,47 ±0,94	0	0	0	0	0
	pečeň 3	0	0	0	0	5,36 ±0,88	0	0	0	0	0
	pečeň 4	0	0	0	0	8,34 ±1,05	0	0	0	0	0
	oblička 1	0	0	0	3,30 ±0,67	7,65 ±2,13	0	0	0	0	0
	oblička 2	0	0	0	0	7,34 ±0,69	0	0	0	0	0
	oblička 3	0	0	0	0	7,91 ±0,75	0	0	0	0	0
	oblička 4	0	0	0	0	6,32 ±1,06	0	0	0	0	0

Screening reziduí antibiotík v živočišných produktoch, ako aj vývoj nových metód detekcie antibiotík je veľmi dôležitý z pohľadu ochrany verejného zdravia. Obe porovnávané metódy patria medzi platňové difúzne metódy, kde sa prítomnosť inhibujúcej látky (reziduum) prejaví tvorbou čirej zóny inhibície okolo vyšetrowanej vzorky. Všetky vyšetrowané vzorky, pri ktorých bola vytvorená IZ, považujeme za potenciálne pozitívne. Z tohto dôvodu sú mikrobiálne inhibičné testy dôležitými metódami prvotného screeningu reziduí antibiotík v živočišných produktoch schopné roztriediť vyšetrowané vzorky na negatívne a potenciálne pozitívne. Avšak, pre potvrdenie, resp. vylúčenie prítomnosti reziduí antibiotík v potenciálne pozitívnych vzorkách je potrebné ďalšie vyšetrenie vzoriek schválenými konfirmačnými metódami.

*Spracovanie príspevku bolo podporené grantom MŠ SR VEGA 1/0939/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- CH 12.19: Screeningový test na stanovenie reziduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR). Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. In: Vestník MP SR, Doplnok č.1/2006, 38, 2006, s. 68 - 81.
- NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010, o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácií, pokiaľ ide o maximálne limity reziduí v potravinách živočišneho 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 reziduí v živých zvieratách a v produktoch živočišneho pôvodu. Zbierka zákonov č. 320/2003, čiastka 145, 2003, s. 2541 - 2585.
- 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.
- ZÁKON NÁRODNEJ RADY SLOVENSKEJ REPUBLIKY č. 229/2007 Z. z. z 12. decembra 2006 o veterinárnej starostlivosti. Zbierka zákonov č. 39/2007, čiastka 28, s. 162 - 223.

## PARAZITY A PATOGÉNY PLAZOV

Haklová B.<sup>1</sup>, Majláthová V.<sup>1</sup>, Majláth I.<sup>1,2</sup>, Petrilla V.<sup>3</sup>, Kokošová N.<sup>2</sup>, Hižňanová A.<sup>2</sup>, Oros M.<sup>1</sup>, Peňko B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup>Ústav ekologických a biologických vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Moyzesova 11, 040 01 Košice, Slovenská republika

<sup>3</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra anatómie, histológie a fyziológie, Komenského 73, 041 81 Košice

### ABSTRAKT

Plazy predstavujú v porovnaní s inými živočíchmi (napr. cicavce) málo pŕštudovanú skupinu. Rovnako ako iné živočíchové slúžia plazy ako hostitelia ektoparazitov (kliešťov a roztočov), ktoré prenášajú pôvodcov rôznych ochorení. V našej štúdiu sme sa zamerali na jednobunkové krvné parazity a na baktérie z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Z 809 vyšetrených plazov sa nám prítomnosť jednobunkovcov podarilo potvrdiť u 145 jedincov (17,9% prevalencia). PCR metódou a sekvenovaním pozitívnych vzoriek sme potvrdili prítomnosť *Hepatozoon* sp. u exotických druhov hadov, európskych plazov a ich ektoparazitov. Zástupcovia komplexu *B. burgdorferi* s.l. predstavujú pôvodcov ochorení spôsobujúcich Lymeskú boreliózu a návratné horúčky. U kliešťov *I. ricinus* parazitujúcich na európskych jaštericiach sme identifikovali *B. lusitaniae* a *B. burgdorferi* sensu stricto. Prítomnosť *B. burgdorferi*, *B. afzelii* a nedávno opísanej REP (reptile-associated) *Borrelia* bola zistená u 14 jedincov tropických druhov hadov.

### ÚVOD

Plazy predstavujú skupinu živočíchov, ktorá je v porovnaní s inými stavovcami (ryby, vtáky a cicavce) málo preštudovaná. Medzi parazity, ktoré infikujú plazy, patria krvné jednobunkovce, z ktorých väčšina patrí do podkmeňa Apicomplexa. Najčastejšie sa u plazov vyskytujú *Karyolysus*, *Hepatozoon*, *Haemogregarina* a *Hemolivia*, ktoré sa vyznačujú rôznou hostiteľskou špecifitou (Smith, 1998). Väčšina dostupných údajov o krvných parazitoch vychádza z mikroskopického pozorovania morfológie gamontov v erytrocytoch plazov, ktorá je u rôznych druhov veľmi uniformná. Okrem jednobunkovcov slúžia plazy ako hostitelia pre rôzne patogény. V práci sme sa zamerali na spirochéty patriace do komplexu *B. burgdorferi* s. l. Zástupca komplexu, *B. lusitaniae*, bol detegovaný u plazov (*Lacerta viridis* a *L. agilis*) a ich ektoparazitov (*Ixodes ricinus*) (Majláthová a kol., 2006, 2008). Takano a kol. (2010) na základe izolátov z kliešťov zozbieraných z importovaných plazov charakterizoval novú skupinu borélií asociovanú s plazmi (REP = reptile-associated).

### MATERIÁL A METODIKA

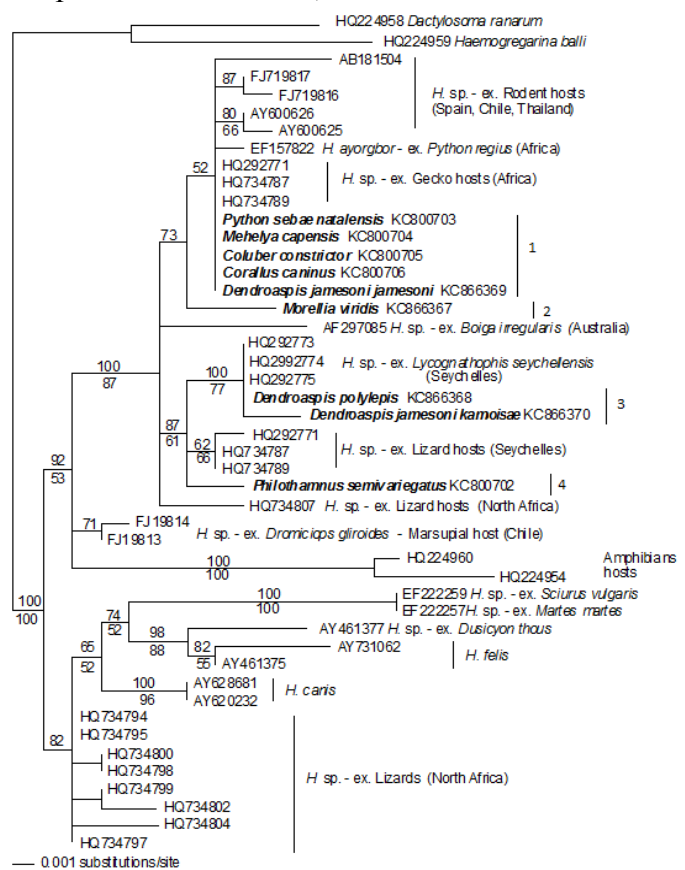
Plazy boli odchyťované rukou, slučkou alebo hákom. Následne boli z jedincov odobraté ektoparazity, šupiny a orgány (pečeň, srdce a slezina), ktoré sa uchovávali v 70% etanole. Krv sa odoberala ventrálnou punkciou kaudálnej žily a uchovávala sa v skúmavke s citrátom. Z kvapky krvi sa zhotovoval krvný náter, ktorý sa nechal vysušiť na vzduchu. Po odobratí biologického materiálu boli plazy pustené do voľnej prírody. Nátery sa farbili pomocou farbiva Giemsa po dobu 30 minút. Ofarbené nátery sa hodnotili svetelným mikroskopom pri 400x zväčšení, pričom v každom nátere sa pozorovalo približne 50 zorných polí. Ak počas pozorovania neboli nájdené gamonty, náter bol hodnotený ako negatívny. Ektoparazity sa identifikovali pomocou kľúča a stereolupy. Následne bola z krvi a orgánov izolovaná DNA pomocou komerčného kitu. DNA z ektoparazitov a šupín bola izolovaná alkalickou hydrolýzou (1,25% amoniak). Použitím metódy PCR boli fragmenty DNA parazitov a patogénov amplifikované použitím rôznych primerov: HEMO1/HEMO2 (Perkins a Keller, 2001) a HEP300/HEP900 (Újvári a kol., 2004) na amplifikáciu časti génu 18S rDNA

jednobunkovcov; IGSa/IGSb (Black a Roehrdanz, 1998) a BflaPAD/BflaPDU, BflaPBUnest/BflaPCRnest (Sato a kol., 1997) primerov pre detekciu prítomnosti patogénov z komplexu *B. burgdorferi* s.l.. Amplikóny intergénového medzerníka borélií boli následne podrobené metóde RFLP (Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov). Vybrané pozitívne vzorky boli sekvenované a použité na objasnenie fylogenetických vzťahov pozitívom dvoch metód - Maximum Likelihood a Bayesova analýza. Materiál sa zbieral z viacerých lokalít v rámci Európy (Slovensko, Maďarsko, Poľsko, Grécko a Švédsko), z južnej Afriky (Svazijsko, Ghana, Uganda, Kamerun, Tanzánia, JAR a Egypt), Ázie (Indonézia) a Ameriky. Zozbieraný materiál predstavoval 806 vzoriek z 57 druhov plazov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sa vyšetrilo 806 plazov, pričom prítomnosť krvných jednobunkovcov bola pozorovaná u 145 jedincov (prevalencia 17,9%). Na základe výsledkov sme zistili, že do cirkulácie parazitov sú zapojené rôzne druhy plazov. U afrických, ázijských a amerických hadov (*Dendroaspis*, *Mehelya*, *Python*, *Philothamnus*, *Morelia*, *Corallus* a *Coluber*)sa amplifikáciou časti génu 18S rDNA potvrdila prítomnosť *Hepatozoon* sp., čo predstavuje prvý nález *Hepatozoon* sp. u spomínaných hadov. Fylogenetické analýzy (Obr.1) ukázali vysokú variabilitu *Hepatozoon* sp. medzi rôznymi hostiteľmi. Blízko príbuzné haplotypy boli nájdené u hadov z dvoch rôznych geografických oblastí, Afrika a Amerika. Príbuznosť parazitov dvoch poddruhov *D. jamesoni* pozorovaná nebola, čo môže súvisieť s ich geografickou izoláciou. U európskych hadov (*N. natrix*, *N. tessellata*, *Z. longissimus*, *C. austriaca* a *V. berus*) prítomnosť jednobunkovcov pozorovaná nebola. Ektoparazity odobraté z európskych jašteríc predstavovali dva druhy – *I. ricinus* a *Ophionyssus* sp., pričom PCR metódou sme u oboch druhov zistili prítomnosť *Hepatozoon* sp.

Na prítomnosť borélií sa vyšetrilo 470 (358 lariev a 112 nýmfov) kliešťov *I. ricinus* z európskych jašteríc (*L. viridis*, *L. agilis*, *Zootoca vivipara* a *Podarcis muralis*). Metódou PCR-RFLP sme v izolátoch kliešťov potvrdili prítomnosť *B. lusitaniae* a *B. burgdorferi* s.s. Prítomnosť borélií bola zisťovaná aj u 177 jedincov rôznych druhov exotických hadov, z ktorých 14 jedincov bolo infikovaných boréliami, čo predstavuje 7,9% prevalenciu. Sekvenačnou analýzou a porovnaním v génovej banke sme zistili prítomnosť *B. burgdorferi* u 8 jedincov patriacich do 3 rodov (*Dendroaspis*, *Morelia* a *Naja*), *B. afzelii* u *N. nigricincta woodi* a REP *Borrelia* u *P. sebae natalensis*, čo predstavuje prvý nález *Borrelia* sp. u spomínaných hadov. Doposiaľ bola



Obr. 1 Fylogenetické vzťahy *Hepatozoon* sp. na základe sekvencií génu 18S rRNA. Nami získané sekvencie sú zvýraznené hrubo a predstavujú 5 haplotypov rozdelených do 4 základných línií (označené 1-4 za čiarou).

REP *Borrelia* zistená u kliešťov *Amblyomma trimaculatum*, *A. latum*, *A. geoemydae*, *Hyalomma aegyptium* a u plazov *Testudo graeca*, *T. horsfieldii* a *Geochelone pardalis* (Takano a kol., 2010, 2011). Zistenie prítomnosti spirochét z komplexu *B. burgdorferi* s.l. v exotických hadoch naznačuje existenciu doposiaľ neopísaných parazito-hostiteľských vzťahov v rámci tohto komplexu a predpokladá, že do transmisie spirochét sú zapojené aj iné vektory, mimo kliešťov z rodu *Ixodes*.

*Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu Ochrana životného prostredia pred parazitóznymi pod vplyvom globálnych klimatických a spoločenských zmien (kód ITMS:26220220116) na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (0,5), ITMS: 26110230045, projektu VEGA 2/0199/11 a VEGA 1/0579/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Black IV, W.C. a Roehrdanz, R.L. Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: Prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol.* 1998; 15: 1772-1785.
- Majláthová, V., Majláth, I., Derdáková, M., Víchová, B. a Peťko, B. *Borrelia lusitaniae* and Green Lizards (*Lacerta viridis*), Karst Region, Slovakia. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12: 1895-1901.
- Majláthová, V., Majláth, I., Hromada, M., Tryjanowski, P., Bona, M., Antczak, M., Víchová, B., Dzimko, S., Mihalca, A. a Peťko, B. The role of the sand lizard (*Lacerta agilis*) in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *International Journal of Medical Microbiology.* 2008; 298: 161-167.
- Perkins, S. L. a Keller, A. K. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *J Parasitol.* 2001; 87: 870-876.
- Sato, Y., Konishi, T., Hashimoto, Y., Takahashi, H., Nakaya, K., Fukunaga, M. a Nakao, M. Rapid diagnosis of lyme disease: Flagellin gene-based nested polymerase chain reaction for identification of causative *Borrelia* species. *International Journal of Infectious Diseases.* 1997; 2: 64-73.
- Smith, T. G. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *J Parasitol.* 1996; 82: 565-585.
- Takano, A., Goka, K., Une, Y., Shimada, Y., Fujita, H., Shiino, T., Watanabe, H. a Kawabata, H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. *Environ Microbiol.* 2010; 12: 134-146.
- Takano, A., Fujita, H., Kadosaka, T., Konnai, S., Tajima, T., Watanabe, H., Ohnishi, M. a Kawabata, H. Characterization of reptile-associated *Borrelia* sp. in the vector tick, *Amblyomma geoemydae*, and its association with Lyme disease and relapsing fever *Borrelia* spp. *Environ Microbiol.* 2011; 5: 632-637.
- Újvári, B., Madsen, T. a Olsson, M. High prevalence of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) infection in water pythons (*Liasis fuscus*) from tropical Australia. *J Parasitol.* 2004; 90: 670-672.

# IMUNOMODULAČNÝ VPLYV GLUKÁNU PROTI MIGRÁCII LARIEV *A. SUUM*

Hermanovská L., Dvorožňáková E.

Parazitologický ústav SAV, Košice

## ABSTRAKT

*Ascaris suum* vyvoláva Th2 imunitnú odpoveď a v práci sme testovali účinok glukánového imunomodulátora (Th1 aktivátor) na askariózu myši. Parazitárna infekcia bola signifikantne redukovaná u myši modulovaných glukánom. Glukán zvýšil proliferačnú aktivitu T buniek do 2 týždňov po aplikácii a následná infekcia *A. suum* zvýšila tento efekt aj počas ďalších 2 týždňov. Infekcia *A. suum* predĺžila stimuláciu pomocných CD4<sup>+</sup> T buniek indukovanú glukánom na ďalšie 2 týždne. Cytokínová odpoveď myši s glukánom bola nasmerovaná do Th1 typu, produkcia IFN- $\gamma$  sa zvýšila a následná infekcia *A. suum* ju neredukovala. Th2 cytokínová tvorba (IL-5, IL-10, IL-4) u infikovaných myši imunomodulovaných glukánom bola signifikantne znížená. Produkcia superoxidového aniónu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) v peritoneálnych a pľúcnych makrofágoch bola najviac stimulovaná u infikovaných myši s aplikáciou glukánu, s maximom na 1. a 2. týždeň po infekcii. Získané výsledky naznačujú pozitívny účinok glukánovej imunomodulácie na primárne efektory bunkovej imunity, glukán stimuloval tvorbu IFN- $\gamma$  a metabolickú aktivitu makrofágov, ktoré mohli prispieť k výraznej redukcii parazitárnej infekcie hostiteľa.

## ÚVOD

Imunitnú odpoveď hostiteľa vyvolávajú najmä migrujúce larvy *A. suum*, ktoré v miestach aktivácie produkujú exkréčno-sekrecné produkty a proteolytické enzýmy, schopné invadovať tkanivá hostiteľa (Frontera a kol., 2004). Ovpływujú humorálne aj celulárne zložky imunity. Miesta aktivácie imunitnej odpovede pri askarióze sú: 1) črevo – blokovanie migrácie lariev pri reinfekcii prostredníctvom lokálnej imunitnej odpovede; 2) pečeň – zvýšené zápalové reakcie zachytávajú a deštruujú larvy parazita; 3) pľúca – lokálna IgA protilátková odpoveď v súčinnosti s tkanivovými reakciami eliminuje larvy (Eriksen a kol., 2004). Askarióza je asymptomatické, väčšinou chronické ochorenie. Je výsledkom dvojakého účinku helminta na imunitný systém. *A. suum* usmerňuje imunitnú odpoveď hostiteľa do Th2 cytokínového profilu (IL-4, IL-5, IL-10), ktorý môže aktivovať imunologické cesty, napr. produkciu IgE, ktoré sú irelevantné pre helminta, alebo podporujú jeho prežívanie v hostiteľovi (Enobe a kol., 2006). Zápalové cytokíny (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), produkované Th1 subsetom pomocných buniek, aktivujú zápalové reakcie poškodzujúce helminta.

Imunomodulátory môžu regulovaním intenzity Th1 alebo Th2 imunitnej odpovede prispieť k zefektívneniu terapie parazitárnych ochorení. Glukány sú imunomodulátory biologického pôvodu,  $\beta$ -(1,3)-D polyméry glukózy, nachádzajúce sa v bunkových stenách baktérií, húb a kvasiniek. Stimulujú najmä fagocyty vrodenej imunity, ovpływujú aj špecifickú imunitu – aktivácia T a B lymfocytov. Viazu sa na receptory makrofágov, neutrofilov a NK buniek (Di Renzo a kol., 1991; Thornton a kol., 1996; Větvička a kol., 1996). Stimulované leukocyty vo zvýšenej miere produkujú cytokíny IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Rasmussen a Seljelid, 1991; Kidd, 2000), reaktívne zlúčeniny kyslíka (Gallin a kol., 1992), oxid dusíka (Sakurai a kol., 1997) a metabolity kyseliny arachidónovej (Czop a Austen, 1985).

Cieľom tejto práce bolo otestovať účinok glukánového imunomodulátora na myšiach s experimentálnou askariózou.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 72 myši kmeňa BALB/c (18-20 g), rozdelených do 4 skupín po 18 myši: 1. skupina – kontrola, myši bez infekcie a imunomodulácie. 2. skupina – myši infikované 1000 vajíčkami *A. suum*/myš *per os* na 0. deň experimentu. 3. skupina – myši,



ktorým bol podávaný glukánový imunomodulátor (GI)(Mevak, SR) intramuskulárne v dávke 5 mg/kg ž.h. na -14., -10., -7., -3. deň pred infekciou. 4. skupina – myši, ktorým bol podávaný glukánový imunomodulátor (GI)(Mevak, SR) v dávke 5 mg/kg ž.h. intramuskulárne pred infekciou na -14., -10., -7., -3. deň a následne boli infikované 1000 vajčkami *A. suum*/myš *per os* na 0. deň experimentu.

Baermanovou metódou z pečene a pľúc infikovaných myší boli získané larvy *A. suum*. Proliferačná odpoveď slezinových T lymfocytov bola hodnotená MTT testom. Na stanovenie CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T lymfocytov bola použitá prietoková cytometria (BD Biosciences). Superoxidový anión v makrofágoch bol stanovený podľa Hrkovej a Velebného (1997). Produkcia cytokínov splenocytmi myší bola detegovaná capture ELISA metódou.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parazitárna záťaž bola redukovaná u myší imunomodulovaných glukánom. Počty lariev *A. suum* v pečeni signifikantne poklesli na 4. deň po infekcii (p.i.), rovnako aj v pľúcach na 7. a 14. deň p.i. Aj iní autori potvrdili redukčný účinok glukánu na počet lariev škrkaviek *Ascaris suum* (Šoltýs a kol., 1994), *Toxocara canis* (Dvorožňáková a Akao, 2000; Hrková a Velebný, 2001) a pásomnice *Echinococcus multilocularis* (Porubcová a kol., 2007).

Tabuľka č. 1. Intenzita parazitárnej infekcie *A. suum* (počet izolovaných lariev) u myší imunomodulovaných glukánom a infikovaných *A. suum*.

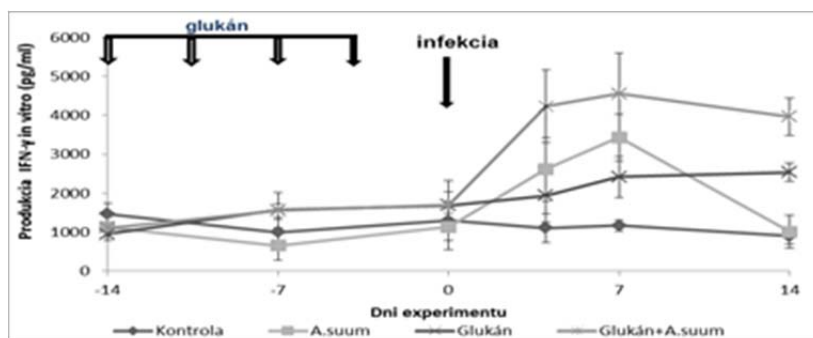
Deň po infekcii	<i>A. suum</i>		Glukán + <i>A. suum</i>	
	pečeň (priemer±SD)	pľúca (priemer±SD)	pečeň (priemer±SD)	pľúca (priemer±SD)
4. p.i.	335,5±65,8		121,3±70,2*	
7. p.i.	10,5±3,5	86,3±23,6	2,3±4,0	33,2±2,1*
14. p.i.	3,5±2,1	41,4±4,0	0	7,3±5,2*

\*P<0,05

*A. suum* ovplyvňuje regulačné mechanizmy imunitnej odpovede hostiteľa, čo mu zabezpečuje únik a prežitie, a to prostredníctvom imunomodulačných molekúl, zapojených do prezentácie antigénu, proliferácie a aktivácie buniek, do protilátkovej odpovede (Soares a Araújo, 2008). T lymfocyty regulujú protilátkovú a bunkovú imunitu, makrofágy sa uplatňujú v zápalových reakciách, kde produkujú reaktívne metabolity kyslíka (Gregory a Wing, 2002). Glukány indukujú najmä proliferáciu a funkčnú aktivitu fagocytov (makrofágy, NK bunky) (Větvička a kol., 1996; Šoltýs a Quinn, 1999). Avšak, zvyšujú aj aktivitu T lymfocytov a produkciu cytokínov (Sakurai a kol., 1997; Kidd, 2000). Imunostimulačný potenciál glukánu tak môže podporiť obranné mechanizmy hostiteľa, ktoré sa zúčastňujú na deštrukcii parazita.

V našej práci glukán zvýšil proliferáciu T lymfocytov do 2 týždňov od prvej aplikácie imunomodulátora, následná infekcia *A. suum* túto stimuláciu predĺžila na ďalšie 2 týždne. Počty pomocných CD4<sup>+</sup> T buniek dosiahli maximum na 3. týždeň imunomodulácie a následná infekcia *A. suum* predĺžila tento stimulačný účinok o ďalšie 2 týždne. Pomocné CD4<sup>+</sup> T lymfocyty sú dôležité regulačné zložky nešpecifickej imunity. Rozpoznanie antigénu T bunkou má za následok prenos rôznych intracelulárnych signálov, ktoré vedú k proliferácii T buniek, k syntéze cytokínov a receptorov pre tieto cytokíny. Cytokínová odpoveď myší s glukánovou moduláciou bola nasmerovaná do Th1 imunitnej odpovede, produkcia IFN-γ sa zvýšila a ani následná infekcia *A. suum* nepotlačila tvorbu tohto cytokínu. Produkcia IL-5 cytokínu (Th2 odpoveď) sa zvýšila po infekcii *A. suum*, ale u myší s glukánom boli koncentrácie IL-5 nižšie. Aj tvorba IL-10 a IL-4 cytokínov bola výrazne inhibovaná u myší imunomodulovaných glukánom. Infiltrácia antigén-špecifických CD4<sup>+</sup> T buniek a produkcia

IL-5 v miestach zápalu hrá centrálnu úlohu pri pulmonálnej eozinofilii a hypersenzitívnych zápalových reakciách v pľúcach (Matsumoto a kol., 2003).



Graf 1: Produkcia cytokínu IFN- $\gamma$  v splenocytoch myši imunomodulovaných glukánom a infikovaných *A. suum*.

Th1 cytokínová odpoveď aktivovala metabolizmus makrofágov. Produkcia superoxidového aniónu ( $O_2^-$ ) v peritoneálnych makrofágoch narastala od 2. týždňa aplikácie glukánu, s maximom v 1. týždni infekcie *A. suum*. Pľúcne makrofágy boli tiež stimulované u infikovaných myši s glukánom od 1. do 2. týždňa p.i. V tomto období bola zistená aj výrazná redukcia lariev parazita v pečeni a následne aj v pľúcach.

Výsledky práce poukazujú na možnosť využitia glukánového imunomodulátora v prevencii pred rozvojom patologických procesov v pľúcach pri askarióze, ktoré sú vyvolávané masívnou migráciou lariev parazita. Glukán pozitívne ovplyvnil primárne efektorové zložky bunkou sprostredkovanej imunity, stimuloval tvorbu prozápalového cytokínu IFN- $\gamma$  (Th1) a metabolickú aktivitu makrofágov, ktoré sa podieľajú na výraznej redukcii lariev parazita v hostiteľskom organizme.

*Práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA 2/0093/11 a VEGA 2/0172/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Czop JK, Austen KF. *Proceed NAS USA*. 1985; 82:2751-2755.  
 Di Renzo L, Yefenof E, Klein E. *Eur J Immunol*. 1991; 21:1755-1758.  
 Dvorožňáková E, Akao N. *Sborník Čes slov parazit dny*. 2000; 35.  
 Enobe CS, Araújo CA, Perini A, et al. *Parasite Immunol*. 2006; 28:453-461.  
 Eriksen L, Bogh HO, Loftager M, et al. *J Vet Med*. 2004; 51:185-190.  
 Frontera E, Roepstorff A, Serrano FJ, et al. *Vet Parasitol*. 2004; 119:59-71.  
 Gallin EK, Green SW, Patchen M. *Int J Immunopharm*. 1992; 14:173-183.  
 Gregory SH, Wing EJ. *J Leukocytes Biol*. 2002; 72:239-248.  
 Hrčková G, Velebný S. *J Helminthol*. 2001; 75:141-146.  
 Kidd PM. *Altern Med Rev*. 2000; 5:4-27.  
 Matsumoto N, Katoh S, Mukae H, et al. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003; 130:209-15.  
 Porubcová J, Dvorožňáková E, Ševčíková Z. *Parasitol Res*. 2007; 101:751-760.  
 Rasmussen LT, Seljelid R. *J Cell Biochem*. 1991; 46:60-68.  
 Sakurai T, Kaise T, Yadomae T, et al. *Eur J Pharmacol*. 1997; 334:255-263.  
 Soares MF, Araújo CA. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008; 7:113-8.  
 Šoltýs J, Benková M, Borošková Z. *Vet Immunol Immunopath*. 1994; 42:379-388.  
 Šoltýs J, Quinn MT. *Infect Immun*. 1999; 67:244-252.  
 Thornton BP, Větvicka V, Pitman M, et al. *J Immunol*. 1996; 156:1235-1246.  
 Větvicka V, Thornton BP, Ross GD. *J Clin Invest*. 1996; 98:50-61.

## VPLYV PRÍJMU OMEGA-3 PNMK NA HODNOTY CHOLESTEROLU V KRVI

Hertelyová, Z., Vaško, L.

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

### ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo sledovať účinok omega-3 PNMK (EPA a DHA) na celkový cholesterol (TC) a jeho zložky (LDL, HDL) a markery kardiovaskulárnych ochorení (KVO) (non HDL a index LDL/HDL). V našej práci sme sa zamerali na sledovanie zmien v hladine cholesterolu v skupine 300 mladých ľudí, prevažne študentov LF UPJŠ Košice. Denná dávka EPA a DHA bola 1,35 g. Suplementácia trvala 30 dní. TC, HDL a TAG boli stanovené spektrofotometricky enzymatickou metódou. LDL, non HDL a index LDL/HDL boli kalkulované. Zaznamenali sme pokles TC, LDL a non HDL, ale takisto aj HDL. V závere môžeme zhodnotiť, že mesačný príjem EPA a DHA v dávke 1,35 g mal pozitívne účinky na lipidový profil v populácii mladých ľudí najmä v skupine s patologickými hodnotami cholesterolu.

### ÚVOD

Omega-3 mastné kyseliny sú najhodnotnejšie z polynenasýtených mastných kyselín (PNMK) vyskytujúcich sa v prírode. Ich účinok je hypolipidemický, protizápalový, imunostimulačný, antiagregačný, antiarytmogénny, kardioprotektívny, hypotenzívny a antiproliferatívny. Najviac prác je popísaných v súvislosti s kardiovaskulárnymi ochoreniami (Mourek a kol., 2007). KVO postihujú v posledných rokoch čoraz viac mladých ľudí a takisto stúpa počet mladých ľudí s vysokými hladinami celkového cholesterolu a LDL-cholesterolu. Vysokoškolskú (VŠ) mládež negatívne ovplyvňuje zvyšujúci sa psychický stres, nadmerná konzumácia alkoholu, fajčenie, zlá výživa, nedostatočná telesná aktivita, ktorá je dôsledkom ich spôsobu života počas niekoľkoročného VŠ života (Jurkovičová a kol., 2010).

Cieľom našej práce bolo sledovať účinok omega-3 PNMK (EPA a DHA) na celkový cholesterol (TC) a jeho zložky (LDL, HDL) a markery KVO (non HDL a index LDL/HDL) počas mesačného príjmu v skupine klinicky zdravých mladých ľudí.

### MATERIÁL A METODIKA

Experimentu sa zúčastnilo 124 študentov, z toho 64 účastníkov experimentálnej skupiny a 60 účastníkov kontrolnej skupiny. Vekový priemer účastníkov bol 22,34±3,68. Experiment bol schválený Etickou komisiou LF UPJŠ KE 28.3.2012. Suplementácia omega-3 PNMK trvala 30 dní, dávkovanie EPA a DHA bola 3x/deň. Množstvo dennej dávky EPA a DHA bolo 1,35g. Pre suplementáciu ω-3 PNMK sme vybrali výživový doplnok MaxiCor "70+20" (FARMAX Slovakia a.s., Bratislava). Účastníci experimentálnej skupiny chodievali na odbery raz do týždňa, účastníci kontrolnej skupiny na začiatku a na konci experimentu.

Vyšetrované lipidové parametre (TC, HDL) sme stanovili z krvného séra spektrofotometricky enzymatickou metódou pomocou biochemického analyzátora COBAS MIRA (Roche, Švajčiarsko). Štandardy, kalibrátory a kontrolné séra boli dodané cez BioVendor - laboratórni medicína, a.s. (Brno, Česká Republika). LDL, non HDL a pomer LDL/HDL sme vypočítali podľa vzorcov:

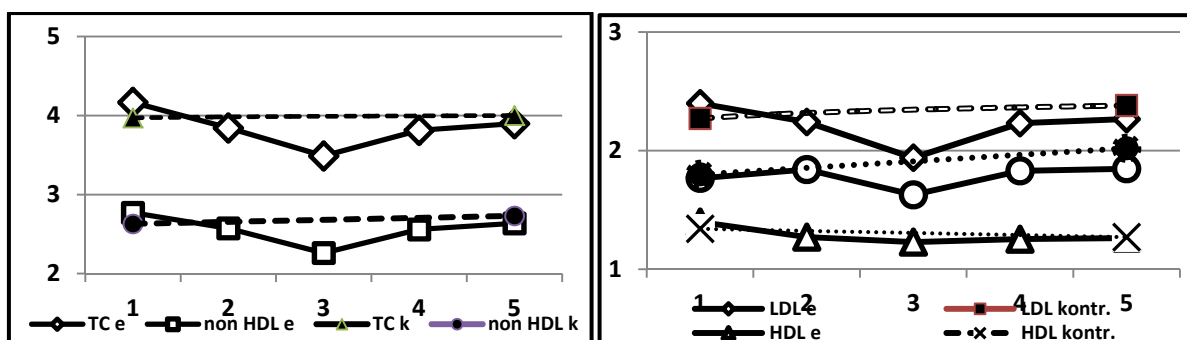
$$a) LDL = TC - \left( HDL + \frac{TAG}{2,2} \right) \quad b) \text{ non HDL} = TC - HDL \quad c) \text{ pomer LDL/HDL} = \frac{LDL}{HDL}$$

Výsledky sme hodnotili metódou deskriptívnej štatistiky pomocou štatistického testu Anova jednovýberová. Vzťahy medzi spojitými premennými a korelačné vzťahy sme hodnotili podľa Pearsona a medzi sledovanými skupinami sme hodnotili Tukey testom, kde odlišné písmená znamenajú štatisticky významné vzťahy pri  $P < 0,05$ . Štatistické spracovanie výsledkov sme robili pomocou programov Microsoft Office Excel 2007, SPSS verzia 19,0 a MINITAB for Windows 11,21.



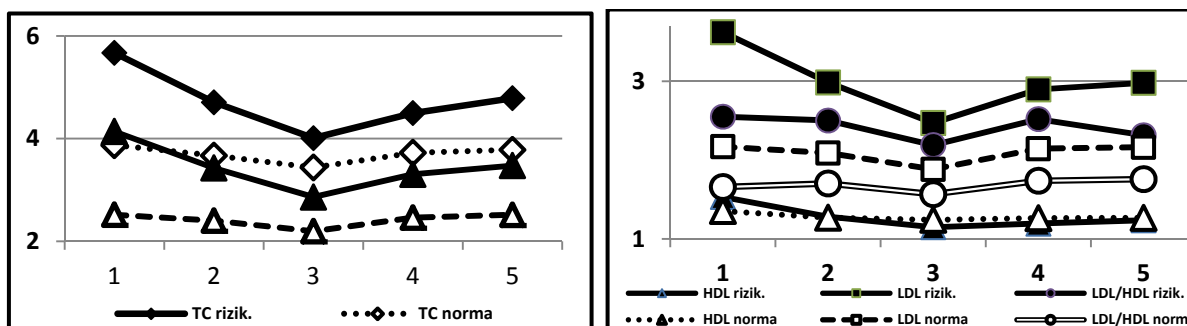
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na začiatku experimentu mali účastníci kontrolnej skupiny všetky hodnoty sledovaných parametrov nižšie ako účastníci experimentálnej skupiny. Sledovaním zmien v hladinách jednotlivých zložiek cholesterolu v experimentálnej skupine (obr. 1, 2) sme v treťom týždni zaznamenali štatisticky významný pokles všetkých sledovaných parametrov: TC o 19,48%, LDL o 23,71%, non HDL o 22,57% pri  $P < 0,001$ , HDL o 13,82% pri  $P < 0,01$  a nesignifikantný pokles LDL/HDL o 8,57%. V ďalších týždňoch suplementácie hodnoty lipidových parametrov rástli v porovnaní s tretím týždňom. Na konci suplementácie sme v porovnaní s prvým odberom zaznamenali nesignifikantný pokles TC o 6,92%, non HDL o 4,92% a LDL o 5,73% a signifikantný pokles HDL o 11,11% pri  $P < 0,05$ . Sledovaním rozdielov LDL/HDL v experimentálnej skupine sme na konci suplementácie zistili jeho nárast o 4,33% vplyvom zvýšenia hladiny LDL, ale aj poklesu HDL. V kontrolnej skupine sme zaznamenali pokles HDL (o 5,51%) a nárast ostatných lipidových parametrov (TC o 0,76%, LDL o 4,85%, non HDL o 3,80%, LDL/HDL o 12,22%) (obr. 1 a 2).



Obr. 1 a 2: Lipidové parametre v experimentálnej (e) a kontrolnej (k, kontr.) skupine

Na začiatku experimentu 13 účastníci experimentálnej skupiny mali zvýšené hodnoty v 2 a viac lipidových parametrov. Počas príjmu EPA a DHA sme sledovali nielen zmeny lipidových parametrov v celej skupine, ale aj jednotlivo v tzv. rizikovej skupine a porovnali sme túto skupinu s ostatnými účastníkmi experimentálnej skupiny (obr. 3 a 4). Na začiatku experimentu probandi s patologickými hodnotami mali vyššie hodnoty všetkých sledovaných zložiek cholesterolu (TC o 46,5%; HDL o 13,2%; non HDL o 64,4%, LDL o 66,9%, LDL/HDL o 53,81%). Príjmom omega-3 PNMK sme zaznamenali výraznejší pokles všetkých sledovaných parametrov v sledovanej skupine v porovnaní s ostatnými probandami.



Obr. 3 a 4: Lipidové parametre v referenčnej skupine (norma) a patologickej skupine (rizik.)

Najvýraznejší pokles v skupine so zvýšenými lipidovými parametrami bol v treťom týždni: TC o 41,4%, HDL 33,4%, non HDL 44,6%, LDL 46,7% a LDL/HDL o 16,4%). Rozdiely lipidových parametrov medzi fyziologickou a rizikovou skupinou boli minimálne o polovicu

menšie ako na začiatku experimentu s výnimkou HDL, kde vyššie hodnoty boli zaznamenané v skupine s referenčnými hodnotami. Na konci príjmu omega-3 PNMK v porovnaní s tretím týždňom mierne vzrástli hladiny cholesterolu, avšak boli výrazne nižšie v porovnaní s hodnotami na začiatku experimentu. Hodnota HDL mierne rástla v porovnaní s tretím týždňom, teda sledujeme neskoršiu reakciu HDL na príjem omega-3 PNMK (obr. 3 a 4).

Výsledky viacerých experimentálnych, klinických a epidemiologických štúdií potvrdili protektívne pôsobenie  $\omega$ -3 PNMK na rozvoj a progresiu aterosklerotického procesu, ktorý súvisí so zmenami v lipidovom profile (Žák et al., 2011). Porovnaním štúdií sme zistili rozdiely medzi našou a inými sledovanými štúdiami (Harris a kol., 1997, Park, Harris, 2003, Fedačko a kol., 2007, Vrablík, 2007, Simopoulos, 2008, Pella, 2009).

Hodnoty TC v našej štúdií klesali počas príjmu  $\omega$ -3 MK v priemere o 11%. Naše výsledky v hladinách TC sme nemohli porovnať s ostatnými štúdiami, pretože nesledovali zmenu celkového cholesterolu, ale len jeho jednotlivé zložky. Predpokladáme, že TC takisto významne klesal v priebehu suplementácie. Trend zostupu TC, ale aj *non* HDL a LDL bol podobný v referenčnej aj v rizikovej skupine s tým rozdielom, že druhá spomínaná skupina mala výrazne vyššie hodnoty sledovaných parametrov.

Koncentrácie HDL sa počas suplementácie výrazne nemenili, ale mierne klesali v priemere o 12%. Pozorovaním rizikovej skupiny sme zaznamenali výrazný pokles HDL na rozdiel od referenčnej skupiny. Práce iných autorov nezaznamenávajú väčšinou žiadne zmeny alebo mierny nárast hladín HDL (Harris a kol., 1997, Park, Harris, 2003, Fedačko a kol., 2007, Vrablík, 2007, Simopoulos, 2008, Pella, 2009). Vrablík (2007) zaznamenal protektívne zmeny hladín HDL suplementáciou DHA, nie EPA.

Hodnoty *non* HDL a LDL podľa našich zistení klesali počas príjmu  $\omega$ -3 MK v priemere o 11%, na rozdiel od iných štúdií, ktoré skôr zaznamenávajú nárast LDL, najmä u pacientov so závažnou hypertriacylglyceridémiou, avšak pri hodnotách *non* HDL takisto sledovali niektorí autori pokles v priemere o 14% (Fedačko a kol., 2007, Vrablík, 2007).

V našej štúdií sme počas suplementácie zachytili pozitívne zmeny vo všetkých zložkách cholesterolu s výnimkou HDL v celej experimentálnej skupine, avšak oveľa výraznejšie zmeny boli v skupine s patologickými hodnotami. Potvrdili sme, že príjem  $\omega$ -3 MK má význam aj v prevencii, no najmä u jedincov s rizikovými lipidovými hodnotami, ktoré môžu v neskoršom veku iniciovať závažné KVO.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Fedačko J. a kol. N-3 PUFA's: from dietary supplements to medicines. *Pathophysiology*, 2007; 14:127–32.

Harris W.S. a kol. Safety and efficacy of Omacor in severe hypertriglyceridemia. *J. Cardiovasc. Risk.*, 1997; 4:385–91.

Jurkovičová J. a kol. Prevalencia a trendy vývoja rizikových faktorov kardiovaskulárnych chorôb u vysokoškôlkov. In: *Životné podmienky a zdravie*, zborník vedeckých prác. Bratislava : Úrad verejného zdravotníctva. 2010. 142-51.

Mourek J. a kol. Omega-3 mastné kyseliny. *Zdraví a vývoj*. Praha/Kroměříž : Triton., 2007. 174s.

Park Y., Harris W.S. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *Journal of Lipid Research*, 2003; 44 (4) 455-63.

Pella D. Význam omega-3 mastných kyselín v liečbe dyslipidemií. *Via pract.*, 2009; 6 (12): 488–90.

Simopoulos A.P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med.*, 2008; 233 (6): 674-88.

Vrablík M. Omega-3 mastné kyseliny a kardiovaskulárny onemocnění. *Interní Med.*, 2007; 9 (6): 262–64.

ŽÁK A. a kol. *Ateroskleróza. Nové pohledy*. Praha : Grada., 2011. 200s.

# VPLYV PROADIFENU NA VÝSLEDNÚ CYTOTOXICITU MITOXANTRONU V BUNKÁCH ĽUDSKEJ PROMYELOCYTOVEJ LEUKÉMIE

Hil'ovská L., Jendželovský R., Jendželovská Z., Mikeš J., Fedoročko P.

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

## ABSTRAKT

Mnohopočetná lieková rezistencia (MDR) je častým dôvodom neúspešnej chemoterapeutickej liečby. Vznik MDR sa v mnohých prípadoch spája so zvýšenou expresiou a aktivitou transportných proteínov patriacich do rodiny ATP-dependentných transportných proteínov (ABC transportéry). Látky schopné inhibície ABC transportérov by mohli zlepšiť účinnosť terapie. Viaceré štúdie poukazujú na chemosenzitizačnú schopnosť nesteroidných antiflogistík v dôsledku ovplyvnenia aktivity ABC transportérov. V tejto práci sme sa zamerali na štúdium kombinovaného účinku inhibítora P450 monooxygenáz, proadifenu, na výslednú cytotoxicitu mitoxantronu (MTX) v bunkách ľudskej promyelocytovej leukémie (bunková línia HL-60 citlivá na MTX a bunková línia cBCRP so zvýšenou expresiou *ABCG2*, rezistentná na MTX). Výsledky viacerých analýz (MTT test, analýza externalizácie fosfatidylserínu, analýza zmien mitochondriálneho membránového potenciálu a bunkového cyklu) naznačujú, že 24 hod predinkubácia buniek s proadifenom zvyšovala citlivosť oboch bunkových línií voči mitoxantronu, pričom tento efekt bol významnejší v prípade rezistentnej bunkovej línie. Na základe týchto výsledkov je možné predpokladať, že proadifen by mohol ovplyvniť aktivitu proteínu BCRP, avšak ešte sú potrebné ďalšie štúdie na odhalenie presného mechanizmu zapojeného do procesu proadifenom sprostredkovanej senzitivácie buniek voči účinku mitoxantronu.

## ÚVOD

Jedným z najzávažnejších problémov pri chemoterapeutickej liečbe a častým dôvodom neúspešnej terapie je znižujúca sa senzitivita nádorových buniek voči aplikovanému liečivu, čo napokon vedie ku vzniku mnohopočetnej liekovej rezistencie (MDR). Jedným z najvýznamnejších mechanizmov zodpovedných za MDR je zníženie intracelulárnej koncentrácie liečiva až na neúčinnú hladinu prostredníctvom ATP-dependentných membránových transportných proteínov (ABC transportéry) (Türk a Szakács, 2009). Nesteroidné antiflogistiká (NSAIDs) sú v klinickej praxi využívané ako látky s protizápalovým, analgetickým a antipyretickým účinkom. Svoje uplatnenie však majú aj v protinádorovej liečbe (Hanif a kol., 1996; Souza a kol., 2000). NSAIDs sú schopné zvyšovať citlivosť nádorových buniek voči antiproliferatívnemu účinku chemoterapeutík v dôsledku zmeny aktivity ABC transportných proteínov, čo napokon vedie k posilneniu cytotoxického účinku protinádorových liečiv (Arico a kol., 2002; Zatelli a kol., 2007; Roy a kol., 2010). V tejto práci sme sa zamerali na analýzu vplyvu kombinovaného účinku NSAIDs (proadifen) a chemoterapeutika. Proadifen (SKF-525A) bol vybraný na základe predchádzajúcich výsledkov získaných na našom pracovisku (Jendželovský a kol., 2009). Vychádzajúc z týchto údajov, najmä schopnosti proadifenu ovplyvniť transportéry BCRP a MRP1, bolo do experimentálnej schémy zahrnuté chemoterapeutikum mitoxantron (MTX). MTX je bežne využívané cytostatikum a taktiež substrát viacerých transportných proteínov, najmä *ABCG2* (BCRP).

## MATERIÁL A METODIKA

*Bunkové línie.* Bunkové línie ľudskej promyelocytovej leukémie HL-60 (ATCC) (citlivá voči MTX) a cBCRP subklon (poskytol prof. Balazs Sarkadi, D.Sc., Výskumný ústav biológie membrán, Budapešť, Maďarská republika) (rezistentná voči MTX) boli nasadené do 96-jamkových kultivačných platničiek (MTT) alebo 6-jamkových kultivačných platničiek

(analýzy prietokovej cytometrie) a kultivované v kompletom médiu RPMI 1640 doplnené 10 % FBS v inkubátore s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou pri 37°C a 95 % vlhkosti.

*Test metabolickej aktivity buniek (MTT).* 24 hod pred pridaním mitoxantrónu, bol k bunkám pridaný proadifén. Po uplynutí doby pôsobenia MTX (24 a 48 hod) bol k bunkám pridaný MTT, ktorý je živými bunkami metabolizovaný na nerozpustný fialový formazán. Metabolizácia MTT bola po 4 hod zastavená pridaním 10 % SDS. Nasledujúci deň bola odmeraná absorbancia ( $\lambda=585$ ) rozpusteného formazánu pomocou spektrofluoroluminometra FluorStar Optima. Programom CalcuSyn (Chou a Talalay, 1984) a na základe kombinačného indexu bol stanovený vplyv predinkubácie buniek s proadifénom na účinok mitoxantrónu.

*Analýza zmien mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP).* Pre analýzy zmien MMP boli bunky zozbierané 24 a 48 hod po pridaní MTX, opláchnuté roztokom PBS, farbené 0,1  $\mu$ M TMRE (tetrametylrodaním etyl ester) po dobu 30 min pri izbovej teplote. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

*Analýza externalizácie fosfatidylserínu a viability.* Bunky boli zozbierané v už spomínaných časových intervaloch, farbené s Annexin V-FITC po dobu 20 min pri izbovej teplote, opláchnuté a následne farbené s propídium jodidom minimálne 5 min. Vzorky boli merané prietokovým cytometrom BD FACSCalibur.

*Analýza bunkového cyklu.* Pre analýzy bunkového cyklu boli bunky zozbierané a fixované v 70 % chladenom etanole po dobu minimálne 24 hod pri -20°C. Pred analýzou boli bunky dvakrát premyté chladeným PBS a farbené 30 min Vindelovým roztokom s obsahom propídium jodidu a RNázy. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chemoterapia je dôležitou a často využívanou liečebnou metódou. Mnohé nádory sú však voči účinkom protinádorových liečiv rezistentné. Vznik rezistencie sa najčastejšie spája so zvýšenou expresiou a aktivitou ABC transportných proteínov. Ich činnosťou sa redukuje intracelulárna koncentrácia liečiva až na neúčinnú hladinu. Inhibícia ich funkcie by mohla znamenať posilnenie cytotoxického účinku protinádorových liečiv. Výsledky dosiahnuté v našich laboratóriách poukazujú na nesteroidné antiflogistikum, proadifén, ako na ďalšiu látku schopnú inhibovať aktivitu ABC transportérov (Jendželovský a kol., 2009). Na základe týchto poznatkov je možné predpokladať, že proadifén by mohol byť schopný potlačiť rezistenciu nádorových buniek a zvýšiť účinnosť vybraného chemoterapeutika, mitoxantrónu. Mitoxantrón sa bežne v klinickej praxi využíva na liečbu leukémií a v mnohých prípadoch sú voči nemu nádorové bunky rezistentné. Cieľom tejto štúdie bola analýza vplyvu predinkubácie buniek ľudskej promyelocytovej leukémie s proadifénom na účinok mitoxantrónu a overenie hypotézy potlačenia rezistencie.

V prvom kroku experimentov sme sa zamerali na výber koncentrácií IC<sub>20</sub> samotného proadifénu a mitoxantrónu pre obe bunkové línie (MTT test), pričom hodnoty IC<sub>20</sub> ako pre mitoxantrón tak aj pre proadifén boli výrazne vyššie v prípade rezistentnej bunkovej línie.

24 hod predinkubácia buniek s proadifénom zvýšila cytotoxicitu mitoxantrónu v prípade oboch bunkových línií, avšak výraznejšie zmeny sme pozorovali pri rezistentnom subklone cBCRP. Pomocou programu CalcuSyn a na základe kombinačného indexu (Chou a Talalay, 1984) sme zistili, že proadifén má v prípade buniek HL-60 aditívny až synergický účinok, pričom v prípade rezistentnej bunkovej línie je účinok výlučne synergický. V ďalších fázach experimentov sme uskutočnili analýzy pomocou prietokovej cytometrie. V prípade detekcie depolarizácie mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP), samotný mitoxantrón zvýšil percento buniek s depolarizovanou mitochondriálnou membránou v oboch bunkových líniach, avšak v prípade kombinácie proadifénu s mitoxantrónom sme výrazný nárast percenta buniek zaznamenali iba pri rezistentných bunkách. Pri kombinovanej terapii sme zaznamenali

aj významný nárast subpopulácie apoptotických a nekrotických buniek v porovnaní s účinkom samotného mitoxantrónu, zatiaľ čo v bunkách HL-60 došlo iba k minimálnemu nárastu subpopulácie nekrotických buniek. Samotný mitoxantrón vyvolal akumuláciu oboch bunkových línií v G2 fáze bunkového cyklu, avšak predinkubácia rezistentných buniek s proadifenom zvrátila tento stav a spôsobila akumuláciu buniek v S fáze. Ovplyvnenie efektivity chemoterapie prostredníctvom proadifenu je málo preskúmané. Táto práca odhalila schopnosť proadifenu modulovať výslednú cytotoxicitu použitého chemoterapeutika. Na základe týchto výsledkov je možné predpokladať, že proadifen potencieje účinok mitoxantrónu a zvyšuje jeho cytotoxicitu, avšak na odhalenie presného mechanizmu zvyšovania účinku chemoterapeutika pôsobením proadifenu budú potrebné ďalšie analýzy.

*Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11 a Nadáciou Výskum rakoviny č. O-12-102/0001-00.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, Ogier-Denis E. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem.* 2002, 277(31):27613-27621.
- 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.
- Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff SI, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol.* 1996, 52(2):237-245.
- Jendželovský R, Mikes J, Koval' J, Soucek K, Procházková J, Kello M, Sacková V, Hofmanová J, Kozubík A, Fedorocko P. 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):1716-1723.
- Roy KR, Reddy GV, Maitreyi L, Agarwal S, Achari C, Vali S, Reddanna P. Celecoxib inhibits MDR1 expression through COX-2-dependent mechanism in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010, 65(5):903-911.
- Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2000, 60(20):5767-5772.
- Türk D, Szakács G. Relevance of multidrug resistance in the age of targeted therapy. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2009, 12(2):246-252.
- Zatelli MC, Luchin A, Tagliati F, Leoni S, Piccin D, Bondanelli M, Rossi R, degli Uberti EC. Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent the development of chemoresistance phenotype in a breast cancer cell line by inhibiting glycoprotein p-170 expression. *Endocr Relat Cancer.* 2007, 14(4):1029-1038.



## EXPRESIA CHEMOKÍNOV PO *IN VITRO* APLIKÁCIÍ PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A *SALMONELLA ENTERICA* (SE147)

Husáková E., Kolesárová M., Levkutová M., Herich R., Spišáková V., Levkut M.

*Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice*

### ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo sledovať účinok vybraných probiotických kmeňov na hladinu expresie zápalových chemokínov K60 a MIP1 $\beta$ , v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek izolovaných z kurčiat, po ovplyvnení *S. enterica* serovar *Enteritidis* (SE147). Hladina expresie K60 a MIP1 $\beta$  bola stanovená metódou kvantitatívnej real-time PCR. Najvyššia expresia K60 a MIP1 $\beta$  nastala po 24h kultivácii v kultúrach buniek vystavených pôsobeniu SE 147. Zvýšená expresia chemokínov nastala aj v skupine SE147+*E. faecium* AL41 po 48h kultivácii a taktiež v skupine obsahujúcej *E. faecium* H31 po 24h kultivácii. V skupine obsahujúcej SE147+*L. fermentum* AD1 sme zaznamenali najvyššiu expresiu K60 a MIP  $\beta$  po 24h kultivácii. V porovnaní s kontrolami, sú dynamické zmeny v expresii chemokínov reakciou na bakteriálnu infekciu *S. enterica* serovar *Enteritidis* (SE147). Tieto výsledky naznačujú, že probiotické kmene ovplyvňujú expresiu zápalových chemokínov MIP1 $\beta$ , K60 a majú potenciálnu úlohu v modulácii aktivácie imunitného systému.

### ÚVOD

Chemokíny predstavujú skupinu približne 50 malých peptidov, ktoré sú účinnými aktivátormi a chemoatraktantmi leukocytov. Okrem ich úlohy v zápalových a imunitných reakciách participujú na procesoch angiogenézy, hematopoézy a zvyšujú antitumorové obranné mechanizmy. Sú efektorovými molekulami prirodzenej a získanej imunity. Indukujú a koordinujú imunitnú odpoveď zameranú na široké spektrum patogénov (Swaggerty a kol., 2008). Detekcia vtáčích chemokínov je limitovaná nedostatkom špecifických protilátok, avšak dostupnosť ich génových sekvencií umožňuje kvantifikovať hladinu expresie mRNA využitím kvantitatívnej real-time RT-PCR metódy. Súčasné štúdie poukazujú na vysokú citlivosť RT-PCR metódy a schopnosť kvantifikovať rozsiahle spektrum chemokínov (Beal a kol., 2004; Smith a kol., 2005). MIP1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein) a K60 sú účinné atraktanty pre Th1 CD4<sup>+</sup> lymfocyty a makrofágy a indukujú migráciu heterofilov a lymfocytov (Mantovani a kol., 2003). Celkovo možno konštatovať, že charakter imunitnej odpovede reprezentovaný jednotlivými bunkovými populáciami, je časovo regulovaný proces nadviazaný na dynamiku produkcie chemokínov. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv vybraných probiotických kmeňov na expresiu zápalových chemokínov v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek, po ovplyvnení salmonelovou infekciou.

### MATERIÁL A METODIKA

#### *Izolácia a kultivácia PMBC z periférnej krvi sliepok*

Z klinicky zdravej hydiny bola krv odobratá z *vena cutanea ulnaris* do 1,5% EDTA, nariadená pomocou PBS v pomere 1:2 a prenesená do skúmaviek s obsahom histopaqa-u 1077 (Sigma-Aldrich, UK). Po centrifugácii bol vzniknutý prstenec buniek prenesený do 1ml PBS a 2-krát premytý pri 14000rpm 5min. Izolované bunky boli nasadené na 12-jamkovú kultivačnú platničku v počte 1x10<sup>7</sup> buniek/mL a kultivované cez noc (39°C, 5% CO<sub>2</sub>) v médiu RPMI 1640 obohatené o 10mM HEPES a 10% bovinného fetálneho séra. Po kultivácii bolo do príslušných jamiek pridané 200 $\mu$ l *S. Enteritidis* SE147 (poskytnuté: Doc. Rychlík, VÚVEL, Brno, Česká republika) v počte 1x10<sup>8</sup> CFU/ml a 200  $\mu$ l probiotických kmeňov: *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1 (poskytnuté: Dr. Lauková,

IAP SAS, Košice, Slovensko) v počte  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Po pridaní baktérií boli PMBC kultivované počas 24 a 48 hodín.

#### *Homogenizácia buniek PMBC a izolácia RNA*

Po uplynutí kultivačnej doby boli bunky odsaté a sцентрифugované pri 12900 rpm 1min. K vzniknutému peletu buniek bol pridaný lyzačný pufer s obsahom  $\beta$ -merkaptoetanolu (Qiagen, USA). K celobunkovému lyzátu bol pridaný v pomere 1:1 70% etanol a celá zmes bola homogenizovaná pomocou vortex mixéra (Labnet, USA) 1min. Izolácia RNA sa uskutočnila použitím RNAeasy mini kitu podľa inštrukcií od výrobcu (Qiagen, USA). Čistota a výsledná koncentrácia RNA bola stanovená spektrofotometricky pomocou Nanodropu. Získaná RNA bola prepísaná použitím Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, UK). Výsledná cDNA bola 10x zriedená destilovanou vodou a použitá ako templát pre RT-PCR.

#### *Real-time PCR*

Pomocou RT-PCR bola stanovená relatívna expresia chemokínov K60 a MIP1 $\beta$ . Stupeň expresie cieľových génov bol normovaný voči 2 housekeepingovým génom: glyceraldehyd – 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) a ubikvitín (UB). Detekcia špecifických produktov RT-PCR prebiehala na CFX 96 Real time systéme (Bio-Rad, USA) pomocou Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoScientific, UK) podľa preddefinovaného programu: počiatočná denaturácia 15 minút pri 95°C a 45 cyklov: denaturácia pri 95°C 20 sekúnd, anelácia pri 60°C 30 sekúnd, extenzia pri 72°C 30 sekúnd a finálna elongácia 72°C 10min. Celkový objem reakčného mixu bol 25  $\mu$ l a pozostával z 12,5  $\mu$ l Supermix-u, 10  $\mu$ l primerov a 2,5  $\mu$ l templátu cDNA.

Na štatistickú analýzu dát bola použitá jednocestná ANOVA, Bonferoniho test (GraphPad InStat).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bunkové kultúry vystavené pôsobeniu *S. enterica* serovar *Enteritidis* SE147, vykazovali najvyššiu expresiu prozápalových chemokínov K60 a MIP1 $\beta$  po 24h kultivácii. Avšak v kultúrach, ktoré obsahovali SE147 a *E. faecium* AL41 bola expresia K60 výrazne znížená po 24h kultivácii. Expresia MIP1 $\beta$  bola zvýšená po 48h kultivácii po pôsobení *E. faecium* AL41. Probiotický kmeň *E. faecium* H31 pôsobil v smere zníženej expresie K60 a MIP1 $\beta$  po 24h aj 48h kultivácii, v porovnaní s kultúrami so samotnou infekciou SE147. Najsilnejší stimulačný účinok na expresiu K60 a MIP1 $\beta$  mal probiotický kmeň *L. fermentum* AD1, po 24h kultivácii. V súčasnosti sa viaceré štúdie zaoberajú účinkami probiotík v imunitnej odpovedi v priebehu rôznych ochorení. V našej práci sme sledovali účinky rôznych probiotických kmeňov na imunologické mechanizmy v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek izolovaných z kurčiat, po infekcii *S. enterica* serovar *Enteritidis* SE147. Zhang a kol. (2012) vo svojej práci sledovali *in vitro* účinky baktérií rodu *Lactobacillus* na indukciu prozápalových chemokínov. Podobné výsledky zaznamenal Amit-Romach a kol. (2010), ktorý poukázal na využitie baktérií rodu *Lactobacillus* ako probiotík v kontrole kolonizácie črevnými patogénmi. Naše výsledky naznačujú, že aplikácia probiotického kmeňa *L. fermentum* AD1 pôsobí stimulačne na expresiu prozápalových chemokínov K60 a MIP1 $\beta$ . Táto prozápalová odpoveď je kľúčovým miestom v iniciácii imunitnej odpovede hostiteľa na prítomnosť patogénov. Tieto výsledky tiež naznačujú, že zvýšená expresia chemokínov môže mať kľúčovú úlohu v migrácii buniek do miesta zápalu. Probiotické kmene zosilňujú imunitný status hostiteľa prostredníctvom špecifickej a nešpecifickej imunitnej odpovede.

*Táto práca bola financovaná prostredníctvom grantov VEGA: 1/0886/11, 1/0885/11, 1/0313/12 a KEGA: 008-4/2011.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beal, R.K., Powers, C., Wigley, P., Barrow, P.A., Smith, A.L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Avian Pathol.* 2004; 33:25–33.
- Smith, C.K., Kaiser, P., Rothwell, L., Humphrey, T., Barrow, P.A., Jones, M.A. *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells. *Infect. Immun.* 2005; 73:2094–2100.
- Swaggerty, L.CH, Igal Y. Pevzner, Kaiser P., Michael H. Kogut. Profiling pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA expression levels as a novel method for selection of increased innate immune responsiveness. *Vet. Immun. and Immunopathol.* 2008; 8:1-8.
- Mantovani, A., Locati, M., Sozzani, S. *The Cytokine Handbook*, 4th ed., Academic Press, San Diego, CA. 2003; 2:1083–1100.
- Zhang, J.L., Xie, Q.M., Ji, J., Yang, W.H., Wu, Y.B., Li, C., Ma, J.Y., Bi, Y.Z. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poult. Sci.* 2012; 91:2755-2760.
- Amit-Romach, E., Uni, Z., & Reifen, R. Multistep mechanism of probiotic bacterium, the effect on innate immune system. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2010; 54(2): 277–284



# CITLIVOSŤ GRAM-NEGATÍVNYCH BAKTÉRIÍ ZO PŠTROSOV A INÝCH DRUHOV HYDINY K ANTIMIKROBIÁLNYM SUBSTANCIÁM

Imrichová, J., Kandričáková, A.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 04001 Košice, Slovenská republika

## ABSTRAKT

V chovoch hydiny sú zo skupiny Gram-negatívnych baktérií častými pôvodcami ochorení koliformné baktérie, avšak zo zoonotického hľadiska sú to baktérie z rodu *Campylobacter*. Následkom ekologizácie živočíšnej výroby postupne dochádza k využívaniu antimikrobiálnych látok prírodného charakteru vo výžive zvierat. Jednou z možností sú enterocíny (bakteriocíny), látky bielkovinového charakteru s antimikrobiálnym účinkom. Cieľom tejto štúdie bolo detegovať Gram-negatívne baktérie v truse vybraných druhov hydiny so zameraním sa na kmene *E. coli* a *Campylobacter* spp. a testovať ich citlivosť k antimikrobiálnym látkam (antibiotikám a enterocínom-*Ent*). Vzorky trusu boli odobraté z rôznych druhov hydiny vrátane pštrosov a spracované štandardnou mikrobiologickou metódou. Izolované kolónie boli indentifikované MALDI-TOF spektrometrom; 75 kmeňov bolo taxonomicky priradených k druhu *E. coli*, 26 k druhu *C. jejuni* a 1 k druhu *C. coli*. Izoláty boli ošetrené semi-purifikovanými *Ent* (10) produkovanými izolátmi *Enterococcus faecium* rôzneho pôvodu s koncentráciou (3200-51200 AU/ml). *In vitro* štúdia preukázala vysoké % inhibície Gram-negatívnych baktérií enterocínmi, čo predstavuje dobrú víziu do budúcnosti v súvislosti s preventívnymi opatreniami v chovoch.

## ÚVOD

Chov hydiny patrí k efektívnym odvetviam živočíšnej výroby a v súčasnosti sa čoraz viac sústreďuje aj na menej tradičné druhy tzv. potravinových zvierat, akými sú napr. pštrovy. Tie sa chovajú predovšetkým pre ich dieteticky hodnotné mäso, avšak aj vysoko cenenú kožu, vajcia a ďalšie produkty. V chovoch hydiny sa ako najčastejší nežiaduci agens zo skupiny Gram-negatívnych baktérií uvádzajú predovšetkým koliformné baktérie najmä z rodu *Escherichia* a zo zoonotického aspektu sú to baktérie z rodu *Campylobacter* (EFSA, 2010; Cooper, 2005). Hoci sú to baktérie patriace k normálnej mikroflóre tráviaceho traktu, mnohé ich kmene majú patogénne účinky. Keďže cieľom každého chovateľa je udržiavanie zdravého chovu a tým získavanie zdravých a bezpečných potravín, cieľom tejto štúdie bolo poukázať na alternatívne možnosti eliminácie a/alebo prevencie pred infekciami spôsobenými týmito druhmi baktérií. Ekologizácia živočíšnej výroby totiž vedie k postupnému nahradzovaniu syntetických zložiek krmív substanciami alebo produktmi tzv. naturálneho teda prírodného pôvodu. Zdrojom naturálnych, bioaktívnych substancií s antimikrobiálnym účinkom môžu byť okrem iného aj baktérie; bakteriocín-produkujúce kmene baktérií sú producentmi bakteriocínov, látok proteínového charakteru s antimikrobiálnym účinkom. Enterocíny (*Ent*) sú podkupinou bakteriocínov, ktoré sú produkované niektorými zástupcami rodu *Enterococcus* (Franz a kol., 2007). Tie vďaka ich antimikrobiálnym vlastnostiam, ale aj pre svoju stabilitu v prostredí tráviaceho traktu predstavujú možnosť ako chrániť chov pred rozšírením črevného ochorenia, ale predstavujú aj možnosti redukcie už vzniknutých ochorení (Lauková a kol., 2004). Druhy baktérií testované v rámci tejto štúdie sú známe dlhodobou sa zvyšujúcou rezistenciou na rôzne druhy antibiotík. Preto bolo cieľom tejto práce detegovať Gram-negatívne baktérie v truse vybraných druhov hydiny so zameraním sa na kmene *E. coli* a *Campylobacter* spp. a testovať ich citlivosť ku *Ent*.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky trusu boli odobraté od 140 pštrosov troch vekových skupín a z nosníc, brojlerov a kačíc z domácich chovov. Odber vzoriek prebehol v súlade s predpismi Štátnej veterinárnej

a potravinovej správy Slovenskej Republiky. Odobratých bolo 54 vzoriek trusu zo pštrosov a 24 vzoriek z domácich chovov. Vzorky boli spracované štandardnou mikrobiologickou zried'ovacou metódou (ISO) a inokulované na selektívne kultivačné médiá Mac Conkey agar (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) a Cled agar (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, England) pre určenie počtu koliformných baktérií a na *Campylobacter* agar base – Karmali (Oxoid) pre záchyt baktérií *Campylobacter*-like. Izolované koliformné a *Campylobacter*-like kolónie boli testované na puritu a postúpené na identifikáciu s použitím MALDI Biotyper™ identifikačného systému (Bruker Daltonics, USA), ktorý bakteriálne druhy rozlišuje na základe analýzy hmotnostných spektier bielkovín. U identifikovaných zástupcov rodov *Escherichia* a *Campylobacter* bola testovaná citlivosť/rezistencia na antibiotiká agarovou difúznou metódou (CLSI, 2009) na TSY agare (Tryptikáza sójový bujón; Becton & Dickinson) a PYG médium (Peptón-kvasničné médium s glukózou) s použitím antibiotických diskov (s koncentráciou a špecifikáciou antibiotík bežne používaných vo veterinárnej praxi). Inhibičná aktivita enterocínov voči izolovaným druhom baktérií bola testovaná kvantitatívnou difúznou metódou podľa De Vuysta a kol. (1996) použitím TSY bujónu a BHI bujónu (Becton & Dickinson) pre kultiváciu a 1,5 % a 0,7 % TSY a PYG agaru. Inhibičná aktivita bola vyjadrená v Arbitrárných jednotkách na mililiter (AU/ml), čo predstavuje najvyššie riedenie enterocínu, ktoré ešte spôsobuje inhibíciu rastu indikátorového kmeňa. Pre štúdium bolo použitých 10 semi-purifikovaných enterocínov produkovaných izolátmi *Enterococcus faecium* rôzneho pôvodu (*Ent* EM 41, *Ent* EM 42, *Ent* M, *Ent* 55, *Ent* 412, *Ent* 9296, *Ent* EK13, *Ent* 4231, *Ent* EF 131, *Ent* 2019), ktoré boli izolované na našom pracovisku. Aktivita enterocínov na rast *Enterococcus avium* EA5 (základný indikátor-citlivý kmeň z ciciaka, pozitívna kontrola) bola nasledovná a daná v jednotkách AU/ml: *Ent* 55 - 51 200; *Ent* EM 41 - 51 200, *Ent* 412 - 25 600, *Ent* 9296 - 25 600, *Ent* EK13 - 25 600, *Ent* EM 42 - 25 600 AU/ml; *Ent* M - 6 400; *Ent* 4231 - 3 200; *Ent* EF 131 - 12 800; *Ent* 2019 - 51 200. Následne bola u kmeňa *E. coli* 221/c sledovaná kompetitívna aktivita. Použité boli 3 enterocíny (*Ent* M, *Ent* EM 41, *Ent* 412). Pre kultiváciu indikátorového kmeňa bol použitý TSY bujón; kontrolná i pokusná vzorka (KV, PV) boli inokulované 0,1 % preinokulom (18 hodinová bujónová kultúra, EC 221/c). PV a KV boli následne kultivované vo vodnom kúpeli pretrepávaním pri 37°C po dobu 24 hodín. Použité enterocíny boli pridané na začiatku kultivácie (PV1) a v logaritmickej fáze rastu (PV2) kmeňa EC 221/c (3. hodina rastu). Vzorky (1,5 ml), vrátane nulte vzorky, boli odoberané každú hodinu pričom bola spektrofotometricky pri OD<sub>600</sub> (Spekol 11, Carl Zeiss, Jena, Nemecko) odmeraná ich optická denzita a každé dve hodiny boli sledované počty bakteriálnych buniek (MacConkey agar, Becton & Dickinson). Počty prežívajúcich buniek boli vyjadrené v KTJ/ml.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koliformné kolónie (100) boli na základe identifikačného skóre vyselektované a na testovanie antimikrobiálnej citlivosti bolo použitých 75 kmeňov taxonomicky identifikovaných ako *E. coli*; 41 hemolytických a 34 kmeňov hemolýzu netvorilo. Rovnakou metódou boli stanovené *Campylobacter*-like baktérie, u ktorých bola potvrdená identita *Campylobacter jejuni* (26) a *C. coli* (1). Zachytené kmene baktérií boli ďalej použité ako indikátorové baktérie pre testovanie citlivosti k antibiotikám a inhibičnej aktivity enterocínov. K použitým antibiotikám boli kmene *E. coli* prevažne rezistentné. Kmene *Campylobacter* spp. boli na použité antibiotiká citlivé. V prípade kmeňov *E. coli* bolo 32 kmeňov (43%) citlivých najmenej na 1 enterocín a rast 43 (57%) kmeňov nebol ovplyvnený vôbec. Doposiaľ sú dostupné len limitované poznatky o inhibičných účinkoch bakteriocínov produkovaných Gram-pozitívnymi baktériami na rast Gram-negatívnych baktérií. Vo všeobecnosti totiž bakteriocíny viac inhibujú rast Gram-pozitívnych baktérií. Izolované kmene *E. coli* zo pštrosov boli najcitlivejšie na *Ent* 412 (*E. faecium* 412, izolát z trusu koňa), ktorý inhiboval z celkového

počtu testovaných kmeňov (75) rast 26 kmeňov (35%); *Ent* 9296 (*E. faecium* 9296, izolát zo siláže), inhiboval rast 26 kmeňov (35%). *Ent* M (*E. faecium* AL41, enviromentálny izolát) inhiboval rast 24 kmeňov (32%). *Ent* EK13 produkovaný enviromentálnym izolátom CCM 7419 a *Ent* 4231 produkovaný kmeňom *E. faecium* CCM4231 ruminálneho pôvodu inhibovali každý rast 22 kmeňov (29%). Inhibičný účinok na rast 9 kmeňov baktérií (12%) preukázal *Ent* 55 produkovaný izolátom z hrvoľa kurčaťa. Izoláty zo pštroša *Ent* EM 41, *Ent* EM 42 prejavovali pomerne vysokú aktivitu voči testovaným kmeňom. Na účinky *Ent* EM 41 bolo citlivých 21 kmeňov a 8 kmeňov (11%) bolo citlivých na *Ent* EM 42. Aktivita enterocínov bola najmenej 100 AU/ml. Kmene z rodu *Campylobacter* boli citlivé predovšetkým na účinok *Ent* EF 131 (*E. faecium* EF 131, bobor) a *Ent* 9296. V prípade *Ent* EF 131 bol inhibovaný rast 15 kmeňov (55,5 %) a *Ent* 9296 spôsobil inhibíciu rastu 7 (25,9 %) kmeňov baktérií. *In vivo*, bola tendencia zníženia počtov kampylobakterov zaznamenaná aj v modelovom experimente a to po podávaní *Ent* EM 41 (nepublikované údaje). V našom *in vitro* testovaní bol v prípade *Ent* EM 41 zaznamenaný inhibičný účinok na 11,1 % kmeňov. Tieto čiastkové výsledky teda poukazujú na možnosť ovplyvňovania rastu *Campylobacter* spp. baktérií enterocínmi, čo má význam najmä z hľadiska prevencie. Opakovane sa nám aj v tejto štúdií potvrdilo, že efektivita enterocínu nesúvisí so zdrojom kmeňa produkujúceho daný *Ent*. Naše výsledky už v minulých prácach preukázali inhibičný účinok enterocínov na rast Gram-negatívnych koliformných baktérií a to nielen v *in vitro* podmienkach (Lauková a kol., 1993), ale tiež v *in situ* (Lauková a Turek, 2011) a v *in vivo* podmienkach napr. u králikov (Szabóová a kol., 2008). Aj keď sú naše výsledky zatiaľ preliminárne predstavujú dobrú víziu do budúcnosti. V štúdií je však potrebné ďalej pokračovať a rozširovať naše poznatky o efektívite bakteriocínov voči kmeňom *E. coli* a *Campylobacter* najmä tých, ktoré sú rezistentné na komerčne používané antibiotiká.

*Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 2/0002/11 Slovenskej vedeckej grantovej agentúry. Za spoluprácu ďakujem pani Margite Bodnárovej a RNDr. Katarine Dubikovej.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- CLSI document M100-S19 (2009). Changes in the CLSI standards for antimicrobial susceptibility testing:sixteenth informational supplement. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne. Cooper, R.G. In *Animal Science Journal* Vol. 76, 2005; 97-106.
- De Vuyst L, Callewart R, Crabbe K Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. In *Microbiol.* 142, 1996; s. 817-827.
- EFSA; Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. In *The EFSA Journal* 8; 2010, s. 1496.
- Franz C.M.A.P., van Belkum M.J., Holzapfel W.H., Abriouel H., Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. In *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 2007; s. 293-310.
- Lauková A., Mareková M., Javorský, P. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 1993; s. 257-260 1993.
- Lauková A., Turek P. Effect of enterocin 4231 in Slovak fermented salami Púchov after its experimental inoculation with *Listeria innocua* Li1. In *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* Vol.10 (4), 2011; s. 423-431.
- Szabóová, R., Chrastinová, L., Lauková, A., Haviarová, M., Simonová, M., Stropfová, V., Faix, Š., Vasilková Z., Chrenková, M., Plachá I., Rafay J. Bacteriocin-producing strain *E. faecium* CCM4231 and its use in rabbits. In *Internat. J. Probiot. Prebiot* 3, 2008; 77-82.

# EXPRESIA ADRENERGNÝCH RECEPTOROV U PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÍ KRÁLIKOV

Janštová Ž.

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

## ABSTRAKT

Aktivácia adrenergných receptorov (po väzbe ligandov – adrenalínu a noradrenalínu) má vplyv na mnohé fyziologické procesy, vrátane embryogenézy. Úloha a expresia adrenergných receptorov v najskorších štádiách embryonálneho vývinu je však málo známa a dostupné informácie sa týkajú len myšacieho modelu. V tejto práci sme sa zamerali na štúdium expresie adenoreceptorov v rôznych štádiách preimplantačného vývinu (oocyty, moruly a blastocysty) králikov. Výsledky RT-PCR analýzy potvrdili, že šesť typov adenoreceptorov je exprimovaných v niektorých štádiách preimplantačného vývinu embrya, pričom tri typy adenoreceptorov neboli detegované v žiadnom štádiu.

## ÚVOD

Adrenalin a noradrenalin pôsobia ako neurotransmitery a hormóny, pričom bola preukázaná významná úloha týchto katecholamínov aj pri základných vývinových procesoch ako sú embryogenéza a morfogénéza, kde sa podieľajú na regulácii bunkovej proliferácie, diferenciácie a migrácie (Pendleton a kol., 1998; Weiss a kol., 1998; Herlenius a Lagercrantz, 2001). Adrenalin a noradrenalin aktivujú v bunkách adrenergné receptory, ktoré patria do skupiny receptorov spojených s G proteínmi. Všetky adenoreceptory predstavujú heptahelikálne transmembránové proteíny s N- extracelulárnym a C-intracelulárnym koncom. Sedem transmembránových domén je navzájom prepojených slučkami, ktoré majú významnú úlohu pri prenose signálu. Adenoreceptory sa rozdeľujú do troch typov: alfa1 ( $\alpha 1$ ), alfa2 ( $\alpha 2$ ) a beta ( $\beta$ ), pričom každý typ zahŕňa tri podtypy:  $\alpha 1A$ ,  $\alpha 1B$ ,  $\alpha 1D$ ;  $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$ ,  $\alpha 2C$ ;  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  (Watson a Arkinstall, 1994; Kobilka, 2011).

## MATERIAL A METÓDY

Izolácia králičích (New Zealand White rabbit) oocytov a kultivácia embryí bola uskutočnená štandardnými technikami (Chrenek a kol., 2005) na pracovisku Centra výskumu živočíšnej výroby v Nitre.

### *Bioinformatická analýza a dizajnovanie primérov*

Pre štúdium expresie transkriptov alfa 1 receptorov sme použili priméry navrhnuté v práci Piao a kol. (2000). Priméry pre ďalšie adenoreceptory sme dizajnovali pomocou programu Primer 3, pričom sme použili nukleotidové sekvencie adrenergných receptorov uložené v databáze GenBank. Pre dizajnovanie primérov na amplifikáciu transkriptov králičích beta adrenergných receptorov sme použili sekvencie vytvorené bioinformatickou analýzou genomických sekvencií (uložené v GenBank). Pre králičí  $\alpha 2C$  adenoreceptor nebola doteraz zverejnená žiadna sekvencia, preto sme pri dizajnovaní použili nukleotidové sekvencie  $\alpha 2C$  génu myši, potkana a človeka.

### *RT-PCR a analýza PCR produktov*

Celkovú RNA sme získali extrakciou z 80-120 králičích preimplantačných embryí a neoplodnených oocytov. Ako pozitívnu kontrolu sme použili RNA izolovanú z králičích tkanív (srdce, pečeň, mozog). Izolácia RNA bola uskutočnená pomocou TRIzol reagent (Invitrogen Life technologies, Karlsruhe, Nemecko). Kompetentná cDNA bola syntetizovaná pomocou reverznej transkriptázy Superscript<sup>TM</sup> III (Invitrogen Life Technologies). Ako negatívna kontrola bola použitá reakcia bez reverznej transkriptázy.

Takto získanú cDNA sme prečistili elanolovou precipitáciou a pelet cDNA sme rozpustili v 10 mM Tris (pH 8,3). Do PCR reakcie sme pridali 1 µl cDNA. PCR produkt sme detegovali pomocou elektroforetickej analýzy na 2% agarózovom géle. Na overenie totožnosti sme každý PCR produkt štiepili s dvomi restriktčnými enzýmami.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Expresiu adrenergných receptorov u králikov sme skúmali v rôznych preimplantačných vývinových štádiách (oocyty, moruly a blastocysty). Na detekciu sme použili RT-PCR, pričom podmienky pre jednotlivé PCR reakcie boli optimalizované na tkanivách so známou expresiou jednotlivých adrenoreceptorov. V prípade králičieho  $\alpha 2C$  receptora, ktorého nukleotidová sekvencia nie je známa sme dizajnovali priméry pomocou známych homologických sekvencií iných cicavcov (myš, potkan, človek). Výsledky tejto práce ukázali, že u oocytov a preimplantačných embryí králika dochádza k transkripcii génov adrenergných receptorov, pričom sme zaznamenali viacero profilov expresie. Transkripty niektorých adenoreceptorov ( $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2C$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 2$ ) boli prítomné vo všetkých troch vývinových štádiách. Alfa 1A receptor bol exprimovaný v blastocystách, ale nie v skorších štádiách. Naopak,  $\alpha 1B$  receptor bol exprimovaný v oocytoch, ale nie neskôr. Receptory  $\alpha 1D$ ,  $\alpha 2B$  a  $\beta 3$  sme neidentifikovali v žiadnych štádiách (Tab.1).

Tab. 1 Expresia adrenergných receptorov u králikov v rôznych preimplantačných vývinových štádiách

	$\alpha 1A$	$\alpha 1B$	$\alpha 1D$	$\alpha 2A$	$\alpha 2B$	$\alpha 2C$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
<b>Oocyty</b>	ND	D	ND	D	ND	D	D	D	ND
<b>Moruly</b>	ND	ND	ND	D	ND	D	D	D	ND
<b>Blastocysty</b>	D	ND	ND	D	ND	D	D	D	ND

D - detegovaný, ND- nedetegovaný

Tieto výsledky ukazujú, že expresia adrenergných receptorov u oocytov a preimplantačných embryí nie je špecifikom myšacieho modelu, ale môže byť všeobecnou charakteristikou cicavčieho preimplantačného vývinu. Zaujímavé je, že na rozdiel od myši (Čikoš a kol., 2005; 2007) u králičích preimplantačných embryí sú exprimované všetky tri typy adenoreceptorov (alfa 1, alfa 2 a beta), čo naznačuje možné medzidruhové rozdiely v expresii jednotlivých podtypov adrenergných receptorov počas preimplantačného vývinu.

Aj keď fyziologická úloha adrenergných receptorov v preimplantačnom vývine nie je známa, predpokladá sa že tieto receptory by mohli mať určitú úlohu za nevhodných alebo patologických podmienok materského organizmu. Je známe, že v strese stúpajú hladiny katecholamínov v krvi, pričom adrenalín a nóradsrenalín boli detegované v tekutine vajcovodu u králikov a kráv (Khatchadourian, 1987; Way, 2001). Výsledky niektorých experimentov ukazujú, že materský stres môže významne ovplyvniť tak vývin oocytu, ako aj vývin embrya v najskorších štádiách embryogenézy (Burkuš 2013, Zhang 2011). Adrenergné receptory by teda mohli hrať úlohu v sprostredkovaní vplyvu materského stresu na oplodnenie oocytu, preimplantačný vývin a implantáciu embrya do maternice.

*Práca bola podporená grantami APVV-0815-11 a VEGA 2/0029/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Burkuš J, Čikoš Š, Fabian D, Kubandová J, Czikková S, Koppel J. Maternal restraint stress negatively influences growth capacity of preimplantation mouse embryos. *Gen Physiol Biophys.* 2013; 32: 129-137.



- Čikoš Š, Veselá J, Ilková G, Reháček P, Czikková S, Koppel J. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 2005; 71: 145–153.
- Čikoš Š, Reháček P, Czikková S, Veselá J, Koppel J. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction*. 2007; 133: 1139–1147.
- Chrenek P, Vasicek D, Makarevich A, Jurcik R, Suvegova K, Bauer M, Parkanyi V, Rafay J, Batorova, Paleyanda RK. Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos. *Transgenic Research*. 2005; 14: 417-428.
- Herlenius E, Lagercrantz H. Neurotransmitters and neuromodulators during early human development. *Early Human Development*. 2001; 65: 21–37.
- Khatchadourian C, Menezo Y, Gerard M, Thibault C. Catecholamines within the rabbit oviduct at fertilization time. *Hum Reprod*. 1987; 2: 1-5.
- Kobilka BK. Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011; 32: 213-218.
- Pendleton RG, Rasheed A, Roychowdhury R, Hillman R. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends in Pharmacological Sciences*. 1998; 19: 248–251.
- Piao H, Taniguchi T, Nakamura S, Zhu J, Suzuki F, Mikami D, Muramatsu I. Cloning of rabbit alpha(1b)-adrenoceptor and pharmacological comparison of alpha(1a)-, alpha(1b)- and alpha(1d)-adrenoceptors in rabbit. *Eu J Pharmacol*. 2000; 396: 9-17.
- Strosberg AD. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Science*. 1993; 2: 1198-1209.
- Watson S, Arkininstall S. Adrenaline and noradrenaline, The G-protein Linked Receptor Factsbook. *Academic Press Limited*. 1994; 32–55.
- Way AL, Barbato GF, Killian GJ. Identification of norepinephrine in bovine oviductal fluid by high performance liquid chromatography. *Life Sci*. 2001; 70: 567-576.
- Weiss ER, Maness P, Lauder JM. Why do neurotransmitters act like growth factors? *Perspectives on Developmental Neurobiology*. 1998; 5: 323–335.
- Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, Zhou P, Tan JH. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol Reprod*. 2011; 84: 672–681.

# ODLIŠNÝ VPLYV HYPERICÍNU NA ÚČINOK MITOXANTRONU V SENZITÍVNYCH A REZISTENTNÝCH LEUKEMICKÝCH BUNKÁCH

Jendželovská Z., Jendželovský R., Hiľovská L., Mikeš J., Fedoročko P.

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

## ABSTRAKT

Častou príčinou zlyhania aplikovanej liečby sú interakcie liečiv a prírodných látok. Práve množstvo rastlinných metabolitov, ktoré sú obsiahnuté v extraktoch z liečivých bylín, zvyšuje riziko vzniku negatívnych liekových interakcií. Napriek početným výsledkom mnohých experimentálnych a klinických štúdií, informácií dodnes nie je dost' a stále sa vynárajú ďalšie príčiny komplikácií protinádorovej liečby. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv hypericínu (HYP), jedného zo sekundárnych metabolitov ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum* L.), na účinky mitoxantronu (MTX) v bunkách ľudskej promyelocytovej leukémie (HL-60, cBCRP). Výsledky viacerých analýz (MTT test, analýza externalizácie fosfatidylserínu a viability, analýza zmien mitochondriálneho membránového potenciálu) poukazujú na schopnosť HYP zmierniť cytotoxicitu MTX v senzitivných bunkách HL-60. Opačný efekt sme zaznamenali v prípade rezistentnej bunkovej línie cBCRP, kde došlo vplyvom HYP k zoslabeniu rezistencie týchto buniek voči MTX. Navyše, vyplývajúce z rozdielnej akumulácie HYP v bunkách a odlišnej úrovne expresie proteínu BCRP medzi týmito bunkovými líniami, môžeme predpokladať, že HYP by mohol byť potenciálnym substrátom tejto transportnej pumpy. Dosiahnuté výsledky by mohli upozorniť na riziko súbežného užívania extraktov z ľubovníka s cytostatikami a prispieť k odhaleniu mechanizmov zodpovedných za vznik negatívnych liekových interakcií s liečivými bylinami.

## ÚVOD

Jednou z príčin zlyhania chemoterapeutickej liečby nádorov sú liekové interakcie vznikajúce v dôsledku prijímania viacerých liečiv a xenobiotík. Tie sú schopné ovplyvniť niektoré farmakokinetické a farmakodynamické mechanizmy do takej miery, že dochádza k ovplyvneniu účinku samotného cytostatika. Je známe, že aj množstvo liečivých bylín a látok v nich obsiahnutých, prispieva k vzniku liekových interakcií. Napriek tomu, že tieto interakcie môžu mať výrazne negatívny dopad na efektivitu viacerých liečebných postupov, stále viac ľudí užíva produkty z liečivých rastlín spolu s predpísanými liekmi. Jednou z takýchto bylín je aj ľubovník bodkovaný (*Hypericum perforatum* L.), ktorého extrakty a prípravky sa vo vysokej miere využívajú ako antidepresíva. Biologicky aktívne metabolity obsiahnuté v ľubovníku sú však schopné modulovať viaceré farmakokinetické mechanizmy, predovšetkým metabolizmus (cytochróm P450 monoxygenázy) a transport liečiv (ABC transportné proteíny) (Mueller a kol., 2006; Tian a kol., 2005). Výsledky z našich laboratórií poukazujú na indukčný potenciál hypericínu (HYP), jedného zo sekundárnych metabolitov ľubovníka bodkovaného, voči expresii a aktivite ABC transportných proteínov MRP1 a BCRP (Jendželovský a kol., 2009). Toto zistenie by mohlo prispieť k odhaleniu negatívnych liekových interakcií, ktoré by mohli byť zodpovedné za prípadné komplikácie v liečbe nádorových ochorení. Vychádzajúc z predpokladu, že HYP by mohol ovplyvniť účinok cytostatík prostredníctvom aktivácie ABC transportných proteínov, bolo našim cieľom analyzovať vplyv predinkubácie leukemických buniek s HYP na účinok mitoxantronu (MTX) – substrátu ABC transportnej pumpy BCRP.

## MATERIÁL A METODIKA

*Bunkové línie.* Ako experimentálny model boli použité dve bunkové línie ľudskej promyelocytovej leukémie. Bunková línia HL-60 predstavuje líniu senzitivnu voči MTX.



Bunková línia cBCRP bola retrovirálne transformovaná génom *ABCG2* a tak sa vďaka nadmernej expresii transportného proteínu BCRP (*ABCG2*) vyznačuje značnou rezistenciou voči danému cytostatiku. 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 HYP (0,1 a 0,5 µM) po dobu 24 hod a následne k nim bol pridaný MTX (IC<sub>50</sub>). Po uplynutí doby pôsobenia MTX (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 4 hod inkubácii bol na zastavenie metabolizácie MTT a rozpustenie kryštalického formazánu pridaný 10 % roztok SDS (dodecylsulfát sodný). Nasledujúci deň bola pomocou spektrofluoroluminometra FluoStar Optima odmeraná absorbanca ( $\lambda = 585$  nm) rozpusteného formazánu.

*Analýza bunkového cyklu.* Pre cytometrickú analýzu bunkového cyklu boli bunky vystavené pôsobeniu HYP (0,1 a 0,5 µM) a po tejto 24 hod predinkubácii bol pridaný MTX (IC<sub>50</sub>). Následne po uplynutí 6, 24 a 48 hod boli bunky zozbierané, opláchnuté v chladenom roztoku PBS, fixované v chladenom 70 % etanole a uchované cez noc pri -20°C. Pred samotnou analýzou boli fixované bunky dvakrát opláchnuté v chladenom roztoku PBS, resuspendované vo farbiacom roztoku (0,1 % Triton X-100; 0,137 mg/ml ribonukleáza A; 0,02 mg/ml propídium jodid) a inkubované v tme po dobu 30 min pri izbovej teplote. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

*Analýza externalizácie fosfatidylserínu a viability.* Bunky boli zozbierané 24 a 48 hod po pridaní MTX (IC<sub>50</sub>), ktorému predchádzala 24 hod predinkubácia s HYP (0,1 a 0,5 µM). Následne boli bunky farbené s Annexin V-FITC v tme po dobu 20 min pri izbovej teplote, opláchnuté a farbené s propídium jodidom (2 µg/ml) minimálne 5 min. Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

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

*Stanovenie obsahu hypericínu v bunkách.* Bunky HL-60 aj cBCRP boli inkubované v médiu s HYP (0,1 a 0,5 µM). Po 48 a 72 hod boli bunky zozbierané, opláchnuté roztokom PBS, resuspendované v roztoku HBSS a pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur bola meraná fluorescencia HYP.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Liekové interakcie predstavujú v súčasnosti závažný klinický problém aj v protinádorovej terapii. Môžu sa prejaviť výraznými zmenami účinkov liečiv na organizmus, ktoré sú častokrát nežiadúce. Pomerne časté sú interakcie liečiv s metabolitmi produkovanými rôznymi liečivými bylinami, medzi inými aj ľubovníkom bodkovaným (*Hypericum perforatum* L.). Viacero experimentálnych a klinických štúdií odhalilo a potvrdilo indukčný potenciál hyperforínu voči niektorým cytochróm P450 monooxygenázam a transportnému proteínu P-gp (Mueller a kol., 2006; Tian a kol., 2005). To malo za následok výrazné zníženie biologickej dostupnosti tých liečiv, ktoré sú substrátmi daných metabolických enzýmov a efluxných púmp a tým pádom aj zlyhanie celého terapeutického prístupu. Výsledky dosiahnuté v našich laboratóriách však poukazujú aj na hypericín, ako na ďalší biologicky aktívny metabolit ľubovníka bodkovaného, ktorý je schopný indukovať aktivitu ABC transportných proteínov MRP1 a BCRP (Jendželovský a kol., 2009). Okrem toho, že tieto

transmembránové pumpy výrazne vplývajú na farmakokinetiku množstva cytostatík, spájajú sa aj so vznikom rezistencie nádorových buniek voči širokému spektru liečiv. Na základe spomenutých faktov je možné predpokladať, že HYP by mohol byť schopný navodiť rezistenciu nádorových buniek prostredníctvom aktivácie transportných proteínov a tým obmedziť účinnosť následne aplikovaných chemoterapeutík – substrátov daných púmp.

Cieľom tejto štúdie bolo analyzovať vplyv hypericínu na účinok MTX (substrátu BCRP) v ľudských leukemických bunkách, ktoré sa výrazne líšia v senzitivite voči MTX. Zistili sme, že nízke koncentrácie HYP (0,1 a 0,5  $\mu\text{M}$ ) sú schopné zmierniť, respektíve oddialiť nástup cytotoxického účinku MTX v senzitívnych bunkách HL-60. Aj keď HYP nedokázal zvrátiť akumuláciu buniek v G2/M fáze bunkového cyklu vyvolanú MTX, zaznamenali sme významný nárast metabolickej aktivity a redukciu subpopulácie mŕtvych, nekrotických aj apoptotických buniek. V prípade rezistentnej bunkovej línie cBCRP mal však HYP opačný efekt. Dosiahnuté výsledky odhalili významný nárast subpopulácie apoptotických aj nekrotických buniek v porovnaní s pôsobením samotného MTX, môžeme teda konštatovať, že HYP ešte potencioval jeho cytotoxický účinok. Tieto výsledky sú zaujímavé aj z hľadiska obsahu HYP v bunkách. Kým v bunkách HL-60 bol nameraný markantný nárast obsahu HYP, jeho intracelulárna hladina bola v bunkách cBCRP niekoľkonásobne nižšia. To korešponduje s našimi predošlými výsledkami (Jendželovský a kol., 2009) a podporuje predpoklad, že hypericín by mohol byť eliminovaný z buniek prostredníctvom proteínu BCRP. Zároveň je zaujímavé, že napriek jeho nízkym hladinám v bunkách cBCRP, zosilňuje tento rastlinný metabolit cytotoxicitu MTX. Je možné, že HYP by potenciálne mohol do určitej miery interagovať s proteínom BCRP a tým spomaliť eflux MTX v týchto bunkách. Pre objasnenie konkrétnych mechanizmov, ktoré by mohli byť zodpovedné za spomenuté zmeny odpovede buniek na MTX, sú však nevyhnutné ďalšie štúdie a analýzy. Predpokladáme, že vplyvom HYP by mohlo dôjsť aj k modulácii ďalších systémov a signálnych dráh zodpovedných za rezistenciu nádorových buniek, keďže tá je značne multifaktoriálna a uplatňuje sa v nej viacero mechanizmov.

Dosiahnuté výsledky by mohli prispieť k odhaleniu liekových interakcií zodpovedných za prípadné komplikácie v liečbe nádorových aj iných ochorení. Je dôležité upozorniť na extrakty z ľubovníka bodkovaného, keďže ich dlhodobé užívanie by nielen kvôli obsahu hyperforínu, ale aj kvôli obsahu hypericínu, mohlo mať za následok ovplyvnenie účinnosti aplikovanej liečby.

*Táto práca bola podporovaná grantom poskytnutým Nadáciou Výskum rakoviny č. O-12-102/0001-00 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0626/11.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Mueller SC, Majcher-Peszynska J, Uehleke B, Klammt S, Mundkowski RG et al. The extent of induction of CYP3A by St. John's wort varies among products and is linked to hyperforin dose. *Eur J Clin Pharmacol.* 2006; 62(1):29-36.
- Tian R, Koyabu N, Morimoto S, Shoyama Y, Ohtani H, Sawada Y. Functional induction and de-induction of P-glycoprotein by St. John's wort and its ingredients in a human colon adenocarcinoma cell line. *Drug Metab Dispos.* 2005; 33(4):547-54.
- 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.

# LAKTOBACILY, IZOLÁTY Z TRUSU BAŽANTOV A ICH VLASTNOSTI

Kandričáková A.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Bažanta poľovného (*Phasianus colchicus*) zaraďujeme medzi malú pernatú zver (do čeľade *Phasianidae*, do radu *Galliformes*, do rodu *Phasianus*). Bažanty sa chovajú hlavne pre športový lov, ale využitie má aj ich mäso. Prioritou chovateľov je preto udržiavať dobrý zdravotný stav zvierat v chovoch. Dobrý zdravotný stav zvierat a rozvoj imunitného systému závisí od bežnej črevnej mikroflóry. Súčasť obligátnej mikroflóry, o ktorej sú u bažantov nedostatočné informácie, tvoria aj kyselinu mliečnu produkujúce baktérie. Najmä niektorí zástupcovia rodu *Lactobacillus* svojimi vlastnosťami priaznivo ovplyvňujú intestinálny trakt zvierat či ľudí. Odobraté boli fekálne vzorky od 60 farmových bažantov vo veku 16-17 týždňov. Zmesné vzorky trusu boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou s následným vysiatím príslušných riedení na MRS agar. Inkubované boli 48 h pri 37°C. Náhodne odpichnuté kolónie boli identifikované systémom MALDI Biotyper™. Celkové počty laktobacilov dosahovali v priemere hodnotu 2.72 (log<sub>10</sub>) KTJ/g. Z 50 kmeňov boli 4 izoláty taxonomicky priradené do rodu *Lactobacillus*, k dvom druhom: *Lactobacillus brevis* a *L. plantarum*. Identifikácia týchto druhov bola potvrdená aj fenotypickými vlastnosťami a produkciou enzýmov. Priemerná hodnota kyseliny mliečnej dosiahla 3, 73 mmol/l. Laktobacily boli prevažne citlivé na testované antibiotiká. Aktivita antimikrobiálnych substancií produkovaných testovanými kmeňmi sa prejavila inhibíciou najmenej 2 indikátorových kmeňov zo 16 testovaných; inhibované boli prevažne kmene *Listeria monocytogenes* a *L. innocua*. Najaktívnejšia bola substancia produkovaná kmeňom LP13; inhibovala 14 zo 16 testovaných indikátorových kmeňov. Bakteriocín-like aktivita je jedným z povzbudzujúcich výsledkov pre následné testovanie a výber vhodného kmeňa pre aplikačné klinické testovanie.

## ÚVOD

Chov bažantov je zameraný hlavne na športový lov, ale svoje využitie má aj bažantie mäso, ktoré je dodávané do reštaurácií ako kulinárska špecialita. Prvoradým záujmom chovateľov je preto zabezpečiť zdravé chovy. Bažanty radíme do triedy vtáky (*Aves*), podtriedy pravé vtáky (*Neornithes*), rad hrabavce (*Galliformes*), čeľaď bažantovité (*Phasianidae*), rod bažant (*Phasianus*), druh bažant poľovný (*Phasianus colchicus*). Riziká výskytu ochorení v chovoch bažantov sú vysoké hlavne u mláďat v čase ich vypúšťania do voľného revíru. Dôležitú úlohu v rozvoji imunitného systému má bežná črevná mikroflóra. Z hľadiska popisu bakteriálneho zloženia či osídlenia bažantov existujú doposiaľ len veľmi obmedzené a nepostačujúce informácie. Dominujúcou mikroflórou sú kyselinu mliečnu produkujúce baktérie (KMPB) ako napr. bifidobaktérie, peptokoky a streptokoky vrátane enterokokov, ale aj bacily (Shulin a Xiuli, 1998). Súčasťou bežnej črevnej mikroflóry sú samozrejme aj laktobacily taktiež patriace medzi kyselinu mliečnu produkujúce baktérie. Niektorí zástupcovia rodu *Lactobacillus* (Bergeys Manual, 2009) sú odolní voči nízkemu pH a žlčovým soliam a majú priaznivý účinok na intestinálny trakt zvierat a ľudí (Strompfová a kol., 2005; Strompfová a kol., 2006; Jahreis a kol., 2002). Doposiaľ je k dispozícii len málo informácií o mikroflóre bažantov; a práve pre vyššie uvedené schopnosti laktobacilov sme sa v tejto práci zamerali na ich výskyt, izoláciu a vlastnosti.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky trusu boli odobraté od 60 farmových bažantov z bažantnice na západnom Slovensku. Bažanty boli kŕmené zmesou BZ3 pre odchov bažantov a mali prístup ku vode *ad libitum*.

Boli umiestnené vo voliérach s voľným pohybom. Vek bažantov sa pohyboval od 16 do 17 týždňov. Odber vzoriek bol v súlade s veterinárnymi predpismi ako aj so súhlasom prevádzkovateľa. Zmesné vzorky trusu boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou (riedenia v Ringerovom roztoku) a príslušné riedenia boli následne vysievané na MRS agar pre záchyt laktobacilov (De Man-Rogosa-Sharpe bujón s 1,5% prídavkom agaru, Merck, Nemecko, ISO 15214). Média boli kultivované 48 hodín pri 37°C. Bakteriálne počty boli vyjadrené v kolónie tvorných jednotkách na g (log<sub>10</sub>, KTJ/g). Náhodne odpichnuté kolónie boli skontrolované na puritu a identifikované systémom MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonics, USA), pričom lyzáty bakteriálnych buniek boli pripravené podľa inštrukcií výrobcu (Bruker Daltonics, 2008). Fenotypové vlastnosti boli potvrdené pomocou BBL Crystal Anaerobe testov (Beckton a Dickinson, Cockeysville, USA). U vybraných izolátov bola spektrofotometricky vyhodnotená produkcia kyseliny mliečnej (mmol/l); k bližšej diagnostike sme použili aj API-ZYM testy pre stanovenie enzymatickej aktivity (BioMérieux, France). Citlivosť na antibiotiká bola otestovaná diskovou difúznou metódou (EFSA, 2012) a produkcia antimikrobiálnych substancií kvantitatívnou metódou podľa Skalku (1983). Ďalšie probiotické vlastnosti sú v procese testovania.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Laktobacily patria do oddelenia *Firmicutes*, triedy *Bacilli*, radu *Lactobacillales*, čeľade *Lactobacillaceae* (Bergeys Manuál, 2009). Celkové počty laktobacilov v truse bažantov dosahovali v priemere hodnotu 2.72 (log<sub>10</sub>) KTJ/g. Tieto počty boli podobné ako aj u inej hydiny (Marciniáková, 2006). Z 50 izolátov KMPB boli 4 izoláty taxonomicky zaradené do rodu *Lactobacillus*; 2 kmene boli priradené k druhu *Lactobacillus brevis* a 2 kmene k druhu *L. plantarum*, s vysokým identifikačným skóre v rámci ich taxonomickej identifikácie: *Lactobacillus brevis* LB 11- 2, 401; *Lactobacillus brevis* LB12- 2, 383; *L. plantarum* LP 13- 2, 292; *L. plantarum* LP 14- 2, 104. Fenotypická identifikácia (tvorba NH<sub>3</sub> z arginínu a fermentácia disacharidov) potvrdila taxonomické zaradenie izolátov (Bergeys Manuál, 2009). Najmä *L. plantarum* patrí ku najčastejšie detegovaným druhom v rôznych prostrediach, tráviaci trakt živočíchov nevynímajúc (Nemcová, 1997). Hodnoty produkcie kyseliny mliečnej sa pohybovali v rozmedzí od 2, 82 do 4, 865 mmol/l; priemerná hodnota bola 3, 73 mmol/l, čo je typické pre homofermentatívne laktobacily. Enzýmy β-glukuronidáza, β-glukozidáza, ktoré sú nežiaduce pre probiotické využitie kmeňov boli u LP13, LP14 a LB12 negatívne, preto kmene LP13, LP14 a LB12 sú podstupené na testovanie ďalších vlastností vrátane probiotických. Identifikované laktobacily boli citlivé na erytromycín, rifampicín, chloramfenikol a tetracyklín. U kmeňov LB12, LP13 bola preukázaná rezistencia na vankomycín a kanamycín, čo je u laktobacilov častým diagnostickým znakom (Swenson a kol., 1990). Kmeň LP14 bol aj gentamicín rezistentný. Aktivita antimikrobiálnych substancií produkovaných testovanými kmeňmi sa prejavila inhibíciou najmenej 2 indikátorových kmeňov zo 16 testovaných; inhibované boli prevažne *L. monocytogenes* a *L. innocua*. Najaktívnejšia bola substancia produkovaná kmeňom LP13, ktorá inhibovala 14 zo 16 testovaných indikátorových kmeňov. Najmä označovaná bakteriocín-like aktivita je jedným z povzbudzujúcich výsledkov pre následné testovanie a výber vhodného kmeňa pre aplikačné klinické testovanie.

*Práca bola podporená projektom VEGA No. 2/0002/11. Ďakujeme za pomoc pri príprave médií pani Margite Bodnárovej a za asistenciu pri Maldi Biotyperu RNDr. 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, Whiley. 2009, ISBN 0- 387- 95041-9.

- EFSA Jornal 2012, 10, 6, 2740. Scientific opinion, Guidance on the assesment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance-EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal feed (FEEDAP).
- Jahreis G, Vogelsang H, Kiessling G, Schubert R, Bunte C, Hammes, WP. Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. Food Res Int 2002; 35:135-138.
- Marciňáková M. probiotické mikroorganizmy v krmivách a v tráviacom trakte zvierat a ich úloha v prevencii. Doktorandská dizertačná práca, SAV Košice 2006, 1-111.
- Nemcová R. Criteria of selection of lactobacilli for probiotic use. Vet. Med. 1997; 42: 19-27.
- Shulin X, Xiuli S. Normal bacterial floras in intestinal tract of ring- necked pheasant. J Forestry Res 1998; 9: 105- 107.
- Skalka B, Pillich J, Pospíšil L. Further observations on *Corynebacterium renale* as an indicator in the detection of exfoliative-positive strains of *Staphylococcus aureus*. Zbl Bakt Hyg 1983; A256:168-174
- Strompfová V, Marciňáková M, Gancarčíková S, Jonecová Z, Sciranková E, Guba P, Koščová J, Boldížárová K, Lauková A. New probiotic strain *Lactobacillus fermentum* AD1 and its effect in Japanese quail. Vet Med Czech 2005;50:415-420.
- Strompfová V, Marciňáková M, Simonová M, Bogovic–Matijašic B, Lauková A. Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. Anaerobe 2006; 12:75-79.
- Swenson JMS, Facklam RR, Thornsberry CT. Antimicrobial susceptability of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *lactobacillus* sp. Antimicrob Agents Chemoth 1990; 34: 543-549.



# ÚLOHA SOD-2 V CITLIVOSTI ADENOKARCINÓMOVÝCH MCF-7 BUNIEK NA FOTODYNAMICKÚ TERAPIU HYPERICÍNOM

Kimáková P.<sup>1</sup>, Solár P.<sup>1</sup>, Ferenc P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav Biologických a Ekologických vied, Prírodovedecká Fakulta, Univerzita P. J. Šafárika, Košice

<sup>2</sup> Ústav Biológie, Fakulta Humanitných a Prírodných vied, Prešovská Univerzita, Prešov

## ABSTRAKT

V tejto štúdií sme sa zamerali na otestovanie antioxidantných systémov v MCF-7 a MDA-MB-231 bunkách, pričom sme svoju pozornosť upriamili na zmeny v aktivite a expresii superoxid dismutázy-2 (SOD-2). Cieľom bolo zistiť či zmeny SOD-2 vedú k tomu, že bunky MCF-7 sa dokážu rýchlejšie vysporiadať s intracelulárnou hladinou reaktívnych druhov kyslíka (ROS), čo vedie k eliminácii poškodenia MCF-7 buniek v skorých časových intervaloch po fotodynamickej terapii (PDT) s hypericínom (PDT-HY) a či tento mechanizmus môže byť možnou príčinou rezistencie tejto bunkovej línie na PDT-HY v porovnaní s bunkami MDA-MB-231, ktoré vykazujú vyššiu citlivosť na túto terapiu. Na otestovanie aktivity SOD-2 sme použili kit pre stanovenie aktivity tohto enzýmu. Zmeny hladín mRNA SOD-2 sme analyzovali pomocou Real-Time PCR detekčného systému. Nárast resp. pokles intracelulárnej hladiny ROS bol detekovaný pomocou prietokového cytometra. V bunkách MCF-7 sme 3 hod. po PDT zaznamenali pokles ROS na rozdiel od buniek MDA-MB-231, za čím stojí zvýšená aktivita SOD-2, ktorá zodpovedá za rýchlejší pokles intracelulárnej hladiny ROS. Zvýšená aktivita SOD-2 rovnako korelovala aj s nárastom hladiny mRNA tohto génu a to aj za podmienok tmy. Inhibítor SOD-2 – 2-metoxyestradiol (2ME) viedol ku zvýšeniu expresie, avšak kombinácia s PDT-HY viedla k poklesu expresie SOD-2 na úroveň kontroly.

## ÚVOD

PDT je v súčasnosti jednou z najmodernejších alternatívnych terapeutických metód používaných v liečbe solídnych nádorov aj nemalígnych lézií (Allison a kol., 2001). Princíp tejto metódy spočíva v aktivácii fotosenzibilizátora (FS) svetlom príslušnej vlnovej dĺžky (600-800nm). Protinádorový účinok je výsledkom akumulácie FS v deliacich sa nádorových bunkách, priameho cytotoxického účinku ROS a poškodenia ciev zásobujúcich bunky živinami a kyslíkom (Dougherty a kol., 1998). Za fyziologických podmienok, antioxidantné obranné systémy prekonávajú potenciálny toxický účinok ROS intracelulárnou SOD, katalázou a glutation peroxidázou (Dempfle a kol., 1994). Rovnováha medzi ROS a antioxidantnou ochranou je rozhodujúca pre životaschopnosť buniek. Nádorové bunky však majú nedostatok antioxidantných obranných systémov, čo odráža ich vysokú citlivosť k ROS (Fang a kol., 2009).

## MATERIÁL A METODIKA

**Bunkové línie:** V experimente sme použili ľudské nádorové bunkové línie MDA-MB-231 a MCF-7 pôvodom z mamárneho adenokarcinómu, ktoré sme získali z Biofyzikálneho ústavu, Českej Akadémie Vied, Česká republika.

**Reagencie:** V našej štúdií sme použili ako fotosenzibilizátor HY (Applichem, Darmstad, Nemecko) a ako inhibítor SOD-2 bol použitý 2ME (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Nemecko).

**Stanovenie hladiny ROS:** Intracelulárna hladina ROS bola analyzovaná prietokovým cytometrom BD FACS Calibur v FL-1 kanály použitím fluorescenčnej próby dihydrorodamín 123.

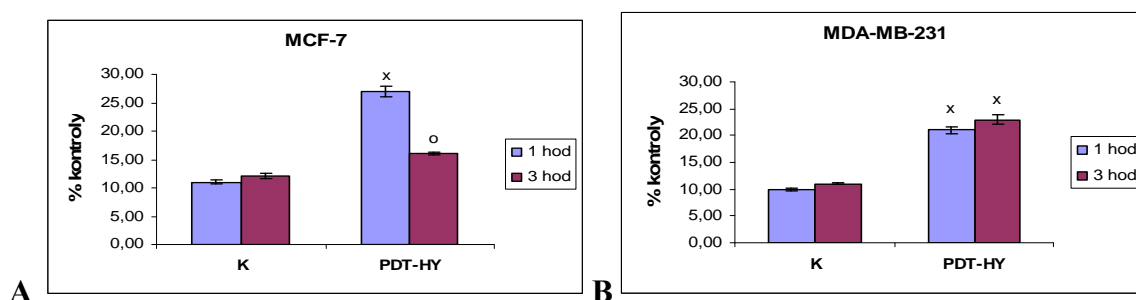


Stanovanie aktivity SOD-2: Aktivita SOD-2 bola stanovená pomocou kitu na meranie aktivity tohto enzýmu (Biovision). Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 450nm pomocou prístroja Fluostar Optima.

Real-Time PCR: Celkovú vyzisovanú RNA sme použitím reverznej transkriptázy prepísali do cDNA a tá bola analyzovaná pomocou Real-Time PCR detekčného systému (iCycler iQ, Bio-Rad). Expresia SOD-2 génu bola normalizovaná voči expresii  $\beta$ -aktínu (SOD-2/  $\beta$ -aktín). Výsledky boli vyhodnotené na základe porovnania s kontrolou a sú prezentované ako priemer  $\pm$  SD troch nezávislých experimentov.

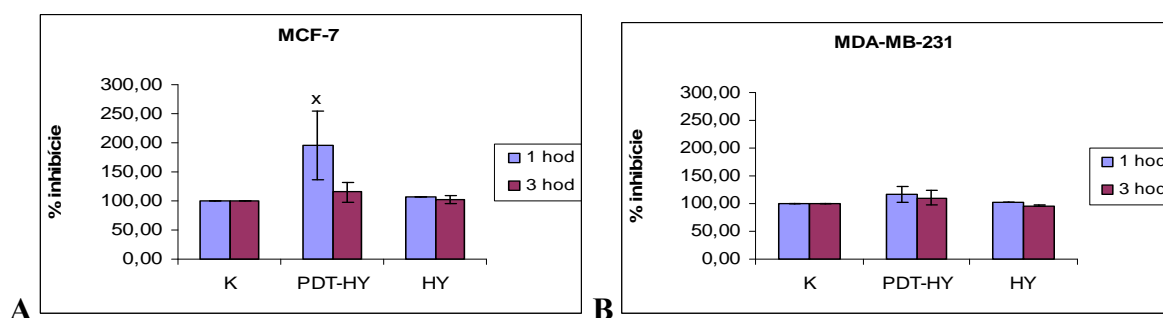
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Testovaním intracelulárnej hladiny ROS v bunkách MCF-7 a MDA-MB-231 po PDT-HY sme už 1 hod. po aplikácii zaznamenali zvýšenie produkcie ROS v oboch bunkových líniiach. V čase 3 hod. po PDT v bunkách MCF-7 došlo k poklesu hladiny ROS, zatiaľ čo v bunkách MDA-MB-231 zostali hladiny ROS zvýšené (Graf 1.)



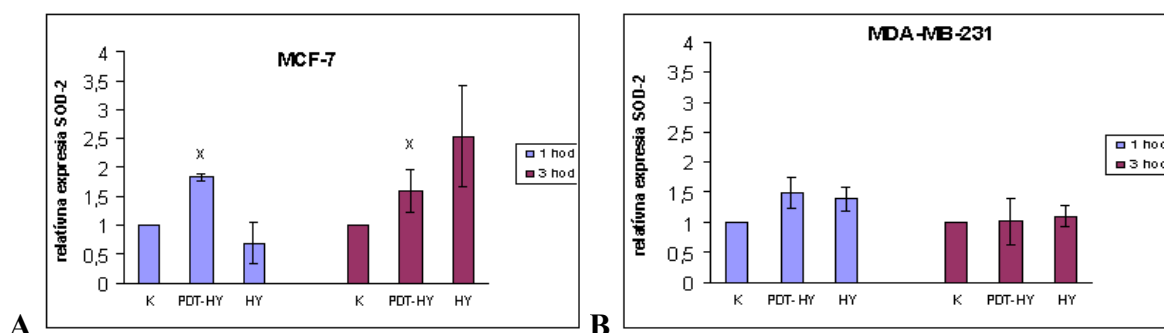
**Graf 1:** Vplyv PDT s hypericínom (PDT-HY) na tvorbu reaktívnych produktov kyslíka v bunkových líniiach MCF-7 (A) a MDA-MB-231 (B) 1 a 3 hod. po PDT. Štatisticky významné rozdiely PDT-HY oproti kontrole (K) sú vyznačené symbolom x ( $p < 0,05$ ) a rozdiely PDT-HY 3 hod. oproti PDT-HY 1 hod. sú vyznačené symbolom o ( $p < 0,05$ ).

Za týmto javom stojí zvýšená aktivita SOD-2, ktorá bola v prípade bunkovej línie MCF-7 výraznejšia už 1 hod. po PDT, zatiaľ čo v prípade buniek MDA-MB-231 bol pozorovaný len mierny nárast aktivity tohto enzýmu (Graf 2.). Podobný efekt bol pozorovaný už aj v prípade ionizujúceho žiarenia (Golab a kol., 2003). Vyššia aktivita SOD-2 je pravdepodobne zodpovedná za rýchlejší pokles ROS už v krátkom čase po PDT, čím sa eliminuje poškodenie buniek, čo môže byť na druhej strane aj možnou príčinou rezistencie MCF-7 buniek na terapiu PDT-HY.



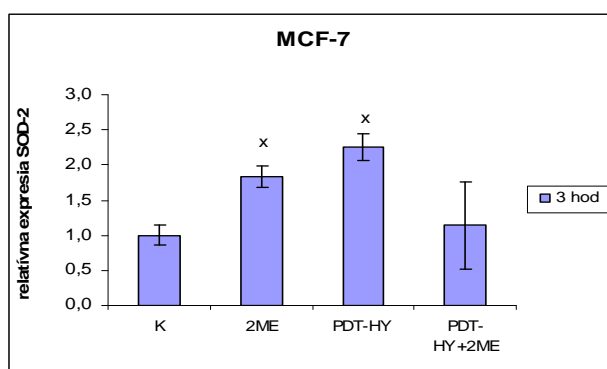
**Graf 2.:** Vplyv PDT s hypericínom (PDT-HY) a nefotoaktivovaného hypericínu (HY) na aktivitu mitochondriálnej superoxid dismutázy 2 (SOD-2) v bunkových líniiach MCF-7 (A) a MDA-MB-231 (B). Štatisticky významné rozdiely PDT-HY oproti kontrole (K) sú vyznačené symbolom x ( $p < 0,05$ ).

Je zaujímavé, že v prípade MCF-7 buniek bola zvýšená aktivita SOD-2 spojená aj s nárastom expresie génu SOD-2 a to nie ako výsledok fotoaktivácie HY, resp. PDT, ale ako účinok pôsobenia HY v podmienkach tmy (Graf 3.).



**Graf 3.:** Vplyv PDT s hypericínom (PDT-HY) a nefotoaktivovaného hypericínu (HY) na zmenu hladiny mRNA superoxid dismutázy 2 (SOD-2) v bunkových líniiach MCF-7 (A) a MDA-MB-231 (B). Štatistický významné rozdiely PDT-HY oproti kontrole (K) sú vyznačené symbolom x ( $p < 0,05$ ).

Úlohu SOD-2 v rezistencii MCF-7 buniek na PDT-HY sme sa rozhodli otestovať aj použitím 2ME - inhibítora SOD-2. Paradoxne však 2ME taktiež zvýšil expresiu SOD-2, no na druhej strane, kombinácia terapií PDT-HY a 2ME znížila expresiu génu SOD-2 na úroveň kontroly (Graf 4.). Účinok kombinácie PDT-HY a 2ME sa prejavil aj na výraznom poklese proliferáčnej schopnosti MCF-7 buniek a zároveň aj na zvýšení citlivosti týchto buniek na PDT-HY.



**Graf 4.:** Vplyv 2-metoxiestradiolu (2ME), PDT s hypericínom (PDT-HY) resp. ich kombinácie (PDT-HY+2ME) na zmenu hladiny mRNA superoxid dismutázy 2 (SOD-2) v bunkovej línii MCF-7. Štatistický významné rozdiely 2-ME a PDT-HY oproti kontrole (K) sú vyznačené symbolom x ( $p < 0,05$ ).

*Táto práca bola podporená Slovenskou Agentúrou pre Výskum a Rozvoj prostredníctvom grantu č. APVV-0040-10 a Vedeckou Grantovou Agentúrou Ministerstva Školstva Slovenskej Republiky prostredníctvom grantu č. VEGA 1/0733/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Allison R. a kol. Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality. *Cancer*. 2001; 91:1-8.
- Dougherty T.J. a kol. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:889-905.
- Demple B. a kol. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*. 1994; 63:915-948.
- Fang J. a kol. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009; 61:290-302.
- Golab J. a kol. Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. 2003; 278:407-414.

# EXPRESIA PCNA U NMU- INDUKOVANÝCH NÁDOROV MLIEČNEJ ŽĽAZY U POTKANOV: KORELÁCIA S MITOTICKÝM INDEXOM A HISTOLOGICKÝM OBRAZOM

Kissová V., Ševčíková Z., Revajová, V.  
Ústav patologickej anatómie, UVLF, Košice  
Katedra patologickej anatómie a fyziológie

## ABSTRAKT

Cieľom našej práce bola detekcia expresie PCNA v NMU - indukovaných nádoroch mliečnej žľazy u potkanov a jej korelácia s mitotickým indexom a histologickým obrazom. Najnižšia expresia PCNA bola pozorovaná v prípade solídneho karcinómu, o ktorom je známe, že aj napriek malígnej histopatológii sa nádor z hľadiska klinického často správa ako benígny. Najvyššie hodnoty boli zaznamenané u nekrotizujúcich adenokarcinómov. Nekróza je regresívny proces detegovaný u rýchlo rastúcich nádorov a jeho výskyt je spojený s horšou prognózou onemocnenia. Práca preukázala koreláciu medzi histologicky detegovanými typmi experimentálne indukovaných malígnych nádorov mliečnej žľazy u potkanov, ich mitotickou a PCNA aktivitou.

## ÚVOD

Nádor mliečnej žľazy je komplexné genetické ochorenie charakterizované kumuláciou mnohých molekulárnych zmien (Chan a kol. 2005). Štúdie vykonané na experimentálnych zvieracích modeloch preukázali, že je to komplexný viacstupňový proces, ktorý môže byť vyvolaný buď chemikáliami, žiarením, vírusmi alebo genetickými faktormi (Russo a Russo, 2000). NMU (*N*-Nitroso-*N*-methylurea) je vysoko špecifický karcinogén pre vyvolanie nádorov mliečnej žľazy (Perše a kol. 2008). Reakcia je maximálna vtedy, keď je karcinogén podaný mladým, pohlavne nezrelým nekastrovaným zvieratám, u ktorých je mliečna žľaza nediferencovaná a vysoko proliferujúca (Russo a Russo, 1998). Určenie stupňa diferenciácie patrí medzi základné klasifikačné metódy, v rámci ktorej je okrem základnej diagnózy určená proliferatívna aktivita nádorových buniek. Proliferácia je jedným zo základných parametrov, ktorý je stanovovaný u nádorov v súvislosti s určením stupňa ich invazívnosti a rastu. Okrem mitotického indexu je stanovovaný hlavne proteín PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Madewell, 2001). Cieľom našej práce je detekcia expresie PCNA u NMU-indukovaných nádorov mliečnej žľazy u potkanov a jej korelácia s mitotickým indexom a histologickým obrazom

## MATERIÁL A METODIKA

### Zvieratá

V pokuse boli použité samice potkanov plemena Sprague-Dawley (SD) vo veku 5 týždňov (ANLAB s.r.o. Praha, Česká republika). Po týždni v karanténe boli držané vo zverinci Ústavu patologickej anatómie (ÚPA) UVLF pri štandardných podmienkach (21-23°C, pri vlhkosti vzduchu 50±10% a pri riadenom 12 hodinovom svetelnom režime). Potkany boli umiestnené v pevných plastových nádobách s hoblinami po dvoch, pričom jeden bol označený vodovzdorným perom na chvoste. Prijem krmiva (komerčná zmes MP-OŠ-06, Miško P., Snina, SR) a tekutiny bol zabezpečený *ad libitum* počas celého pokusu.

### Experiment

NMU (*N*-Nitroso-*N*-methylurea, Sigma Aldrich Chemical Company, St. Lois, MO, USA) bol rozpustený vo fyziologickom roztoku. Na 42. a 49. deň bol pokusným zvieratám podaný i. p. (0,5ml / zviera) v dávke 50 mg/kg /ž. h., 15 minút po príprave. Po 16 týždňoch boli na histologické a imunohistochemické vyšetrenia odobraté vzorky (z kontrolnej skupiny 2 ks,

z pokusnej 10 ks) o veľkosti 1cm<sup>3</sup> a fixované v 10% roztoku formalínu po dobu 48 hod, následne spracované bežnou technikou zaliatím do parafínu a ofarbené hematoxylin eozinom. Na detekciu expresie PCNA bol použitý komerčný kit Dako ARK<sup>TM</sup> (Animal Research Kit). Mikroskopické vyšetrenia boli uskutočnené svetelným mikroskopom Nikon Labophot 2 (Nikon, Japan). Program NIS-Elements Advanced Research 3.0 Programme (komerčný program) bol použitý pre kvantifikáciu mitotických obrazcov a PCNA pozitívnych buniek. Pri zväčšení 40x bolo náhodne vybraných šesť polí, ktoré predstavovali plochu kalibrovanej okulárovej mriežky LTD 0,25 mm<sup>2</sup> IdxGrD (Ch. Gröpl Electronmikroskopy, UK). Počet buniek s pozitívnou reakciou proti PCNA bol vyjadrený percentuálne ako PCNA index, a to pomerom medzi celkovým počtom buniek a počtom PCNA pozitívnych buniek. Merané základné dáta expresie PCNA boli aj štatisticky vyhodnotené jednocestným ANOVA testom. Pre porovnanie štatistických rozdielov medzi pokusnými a kontrolnými skupinami bol použitý *post hoc* Tukey test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počty mitóz a expresia PCNA vyjadrená ako PCNA index sú uvedené v tabuľke č.1. Najnižšie hodnoty boli zaznamenané u solídneho karcinómu, naopak najvyššie u nekrotizujúcich adenokarcinómov a u jedného infiltrujúceho adenokarcinómu.

Pri štatistickom vyhodnocovaní počtov PCNA pozitívnych buniek v histologických preparátoch bolo zistené, že k významným rozdielom v porovnaní s kontrolami vzorkami došlo v prípade všetkých vzniknutých nádorov ( $P < 0,001$ ) avšak v prípade solídnych karcinómov boli rozdiely menej výrazné ( $P < 0,01$ ).

Tabuľka 1. PCNA index a mitotická aktivita v NMU experimentálne vyvolaných nádoroch mliečnej žľazy potkanov.

Histologická diagnóza	Počet mitóz	PCNA index (%)
Cystický papiliformný adenokarcinóm	10	61,7
Papilárny adenokarcinóm	5	32,7
Papiliformný miestami cystický adenokarcinóm	5	42,9
Nekrotizujúci cystický adenokarcinóm	12	60,3
Infiltrujúci cystický adenokarcinóm	16	52,8
Nekrotizujúci, infiltrujúci cystický papiliformný adenokarcinóm	18	49,78
Dobre ohraničený solídny karcinóm	4	23,3
Infiltrujúci cystický adenokarcinóm	11	53,4
Cystický adenokarcinóm	6	32,6
Nekrotizujúci adenokarcinóm	25	80,5
Kontrola	-	11,3
Kontrola	-	5,5

Táto práca preukázala koreláciu medzi histologicky detegovanými typmi experimentálne indukovaných malígnych nádorov mliečnej žľazy u potkanov, ich mitotickou a PCNA aktivitou.

Najnižší PCNA index ako aj štatisticky najmenej výrazné rozdiely boli pozorované v prípade solídneho karcinómu, o ktorom je známe, že aj napriek malígnej histopatológii sa nádor

z hľadiska klinického často správa ako benígny. Táto skutočnosť je pravdepodobne spôsobená súvislou stratou neoplastických buniek apoptózou (Goldschmidt a Shofer, 1992). Navyššia mitotická aktivita a PCNA index boli zaznamenané u jedného infiltrujúceho a nekrotizujúcich adenokarcinómov. Počas posledného štádia tzv. vaskulárnej fázy rastu nádorov dochádza veľmi často k alterácii nádorového tkaniva. Jeho cievny systém môže byť značne dezorganizovaný, bizarných tvarov, čo vedie k spomaleniu cirkulácie krvi. Vďaka rýchlemu rastu nádorov v nich stúpa intersticiálny tlak, ktorý ešte potencujú prepúšťajúce cievy, pretože endotelové bunky v týchto cievach sú nezrelé a diskontinuálne. V konečnom dôsledku dochádza ku kompresii ciev, prípadne k vzniku centrálnej nekrózy. Tento obraz je často pozorovaný hlavne pri veľkých a rýchlo rastúcich nádoroch, kde je limitované nutričné a cievne zásobenie v ich mikroprostredí a bunky sú vystavené hypoxii (Bucová, 2001). Záverom je možné konštatovať, že súbežné vyšetrenie histologického obrazu, expresie PCNA a mitotickej aktivity nádorov poskytuje komplexnejší obraz o prebiehajúcim neoplastickom procese. Výsledkom je získanie väčšieho množstva údajov, ktoré umožnia presnejšie nádor definovať hlavne z hľadiska jeho následnej expanzie a invazívnosti.

*Projekt bol financovaný z grantu VEGA č. 1/0800/10: Štúdium diagnostiky patologických procesov v tkanivách pomocou termografie a experimentálne použitie rádioterapie pri nádoroch zvierat.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bucová, M. Chemokines, tumour growth and angiogenesis. Bratisl. lek. listy, č.1, 22-27, 2001
- Chan, M. M. et al. Gene expression profiling of NMU-induced rat mammary tumors: cross species comparison with human breast cancer. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, p. 1343-1353.
- Murray, J. T. et al. Histological analysis of low dose NMU effects in the rat mammary gland. *BMC Cancer*, 2009, vol. 9, 267.
- Perše, M. et al. N-methylnitrosourea Induced Breast Cancer in Rat, the Histopathology of the Resulting Tumours and its Drawbacks as a Model. *Pathol. Oncol. Res*, 2009, vol. 15, 115-121.
- Russo, I. R., Russo, J. Role of Hormones in Mammary Cancer Initiation and Progression. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1998, vol.3, 49-61.
- Russo, J., Russo, I. R. Atlas and Histologic Classification of Tumors of the Rat Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2000, vol. 5, 187-200.
- Shirai, K. et al., Synergistic effect of MNU and DMBA in mammary carcinogenesis and H-ras activation in female Sprague–Dawley rats. *Cancer Letters*, 1997, vol. 120, 87-93.
- Huggins, C. B. Experimental Leukemia and Mammary Cancer, University of Chicago Press, Chicago, IL, 1979. In *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 1998, vol. 3, no. 1.
- Madewell, B. R. Cellular proliferation in tumours: A review of methods, interpretation, and clinical applications. In *J. of Vet. Internal Medicine*. 2001, vol. 15, p. 334 – 340.
- Goldschmidt, M. H. – Schofer, F.S. Skin tumors of the dog and cat. Pergamon Press, Oxford, 1992, p. 16-49.

# KOMPARATÍVNE MAPOVANIE *LCA5L* GÉNU A ANALÝZA SEKVENCIÍ VYBRANÝCH EXÓNOV U ZÁSTUPCOV ČEĽADE *BOVIDAE*

Kolesárová V., Šiviková K.

*Ústav genetiky, Katedra biológie a genetiky UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

*LCA5L* gén (Leber congenital amaurosis 5-like) bol identifikovaný ako jediný pravý homológ génu kódujúceho proteín lebercilín (LCA5), ktorý je spojený s ochorením Leberova kongenitálna amauróza. Ochorenie je charakterizované dystrofiou retiny s rôznymi klinickými prejavmi porúch zraku. V našej práci sme sa zamerali na zistenie lokalizácie *LCA5L* génu na chromozómoch kravy, ovce a kozy a sekvenáciu vybraných kódujúcich úsekov. Fluorescenčnou *in situ* hybridizáciou sme detegovali *LCA5L* gén v distálnej časti dlhého ramena chromozómu 1 všetkých druhov (BTA1q44 u hovädzieho dobytká, OAR1q43 u ovce a CHI1q44 u kozy). Sekvenovaním vybraných exónov *LCA5L* génu sme zistili vysokú mieru identity, čo sa zhoduje s popisovanou homológiou autozómov v čeľadi *Bovidae*. Podrobnejšou analýzou sekvenovaných výsledkov sme zaznamenali tri „tiché“ bodové mutácie. Nukleotidová substitúcia v pozícii 1016 (A/G) v bovinom exóne 4 sa zhodovala s údajom v databáze GenBank (rs10149293); dve ďalšie, v pozícii 1903 (C/T) u ovce a 137094787 (C/T) u kozy v exóne 9, boli identifikované prvýkrát.

## ÚVOD

Leberova kongenitálna amauróza (LCA), je zriedkavé geneticky podmienené ochorenie spôsobené dystrofiou retiny. Má mnohé klinické prejavy, ako napr. nystagmus, redukovanú elektroretinografickú odpoveď na svetelný podnet, až stratu zraku. Doteraz bolo identifikovaných 14 génov, ktorých mutácie sú schopné vyvolať LCA, medzi nimi aj gén kódujúci proteín lebercilín (LCA5). Den Hollander a kol. (2007) identifikovali proteín homologický s lebercilínom, (*LCA5L*, lebercilin like). *LCA5L* sa nachádza hlavne v riasinkovitých tkanivách a považuje sa za možnú príčinu ciliopátií (Mans a kol., 2012). Génová terapia uskutočnená na psoch a myšiach trpiacich LCA viedla k čiastočnému obnoveniu zraku.

Cytogenetické mapy sa uplatňujú pri komplexnom štúdiu genómu zvierat. Florescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) umožňuje určiť pozíciu génu na chromozóme a identifikovať konzervované segmenty evolučne príbuzných druhov. Humánny *LCA5L* gén bol lokalizovaný na chromozóme 21 (HSA21q22.2 pre čeľad' *Bovidae* sú údaje o jeho chromozómovej pozícii neúplné. Referenčné sekvencie sú prezentované ako „predbežné“ pre boviný, (GenBank ID: 781766), resp. „modelové“ pre ovčie *LCA5L* gén (GenBank ID: 10123084). U kozy ešte nebol tento gén identifikovaný.

Cieľom našej práce bolo určiť pozíciu *LCA5L* génu u kravy, ovce a kozy použitím FISH techniky s BAC sondou CH240-118J20 Vybrané exóny každého študovaného druhu sme následne amplifikovali a porovnali so známymi/predpokladanými sekvenciami dobytká/ovce.

## MATERIÁL A METODIKA

Periférnu krv sme odobrali od 2 býčkov, 2 oviec a 2 kôz. Chromozómové preparáty sme pripravili štandardnou cytogenetickou metódou s modifikáciou pre FISH analýzu podľa Šiviková a kol. (2013). Digoxigenínom značenú bovinú BAC sondou CH240-118J20 obsahujúcu sekvenciu *LCA5L* sme najprv použili na hybridizáciu denaturovaných chromozómov v metafáze, potom detegovali protilátkou Anti-Dig a následne ofarbili kontrastným farbivom DAPI/Antifade. Mikroskopické fotografie sme upravili ISIS softvérom (Metasystems, Nemecko). Lokalizáciu sondy sme určili porovnaním s GTG idiogramom (ISCNDB, 2001) a DAPI reverzným pruhovaním. DNA pre PCR analýzu sme izolovali



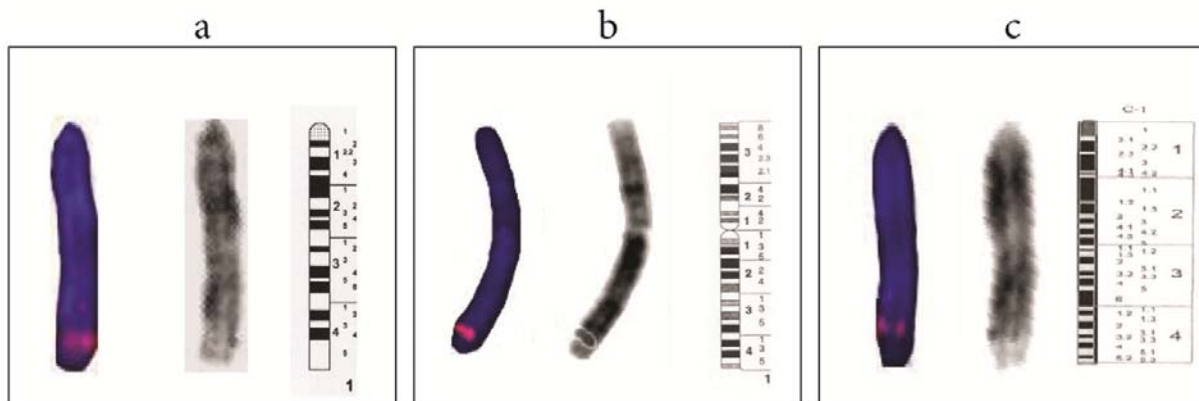
metódou vysokej koncentrácie soli od 2ks každého druhu. Primery pre boviný exón 4 (AAAGCACAGCTGGAA TGTACC - TGGACAAC TCTGAGTGAGC) a exón 9 (TGGAAGCACAACCATCTCTG - CTCCAGAATCTCCAAAAGCA) sme navrhli PRIMER 3<sup>®</sup> softvérom. Výsledky sekvenovania sme porovnali s referenčnými sekvenciami dostupnými v GenBank databáze (NM\_00195068.1 pre hovädzí dobytok a XM\_004003351.1 pre ovcu). Ako referenčná sekvencia kozy sa použila sekvencia identifikovaná BLASTN komparáciou DNA sekvencie kozy (CM001710.1) a sekvencie bovinného *LCA5L* génu (NM\_00195068.1).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledkami dosiahnutými analýzou FISH sme detegovali hybridizáciu BAC sondy CH240-118J20 v distálnom úseku q ramena chromozómu č. 1 u všetkých druhov. Presná lokalizácia génu na chromozóme bola určená porovnaním DAPI-reverzného prúžkovania so štandardným karyotypom (ISCNDB, 2001); a to u kravy v BTA1q44 (obr. 1a), u ovce v OAR1q43 (obr. 1b) a u kozy v CHI1q44 (obr. 1c).

Sekvenovaním PCR fragmentov exónu 4 a 9 sme sa zamerali na detekciu *LCA5L* génu u kravy a ovce, a potvrdenie prítomnosti génu u kozy, ako aj určenie prípadných nukleotidových polymorfizmov (SNPs, single nucleotide polymorphisms). Porovnaním úseku kozej DNA (CM001710.1) a kompatibilnej referenčnej sekvencie bovinného *LCA5L* génu sme zistili vysokú mieru identity v rámci exónov 4 a 9 (95-96%). V exóne 4 bol identifikovaný polymorfizmus v pozícii 1016 (A/G, bez zmeny aminokyselínovej sekvencie) len u dobytka. Analýzou ďalšieho exónu sme zaznamenali 2 substitúcie: u ovce na pozícii 1903 (C/T) v porovnaní s referenčnou sekvenciou XM\_004003351.1 a u kozy na pozícii 137094787 (CM001710.1) (C/T, predpokladaný exón 9 pomocou BLASTN analýzy).

Obr. 1 Chromozómová lokalizácia *LCA5L* génu u: kravy (a), ovce (b) a kozy (c). V ľavej časti FISH mapovanie, v strede chromozóm prúžkovaný DAPI-reverzným farbením a v pravej časti GTG idiogram (ISCNDB, 2001).



Pozičné mapovanie *LCA5L* génu u zástupcov čeľade *Bovidae* nebolo doteraz vykonané. Našimi výsledkami sme potvrdili vysokú mieru konzervácie autozómov čeľade. Podľa ISCNDB (2001), sa G-prúžkovacou technikou odhalilo homológické usporiadanie jednotlivých prúžkov a zhodné poradie génov na chromozómoch BTA1, OAR1q a CHI1. FISH stále patrí medzi metódy vhodné pre mapovanie génu s úrovňou rozlíšenia limitovanou na prúžok. Porovnaním cytogenetickej mapy človeka a kozy, Schibler a kol., (2009) dokumentovali, že v rovnakom úseku ako *LCA5L* gén je lokalizovaný aj marker *DVEPC119*; u človeka na HSA21q22.2 a u kozy na CHI1q44. Medzi ďalšie známe gény a markery vyskytujúce sa v rovnakom prúžku patria: *TF* gén u kozy (CHI1q44; Schibler a kol., 2009)

a kravy (BTA1q41-46; Schmutz a kol., 1998) a *DVPEC119*, *TF* a *TFDP2* gény u ovce (OAR1q43; Di Meo a kol., 2007; Goldamer a kol., 2009).

Analýza výsledkov sekvenácie odhalila 3 heterozygotné SNPs, ktoré sú považované kvôli nezmenenému poradiu aminokyselín v reťazci za tzv. „tiché“ mutácie. Nukleotidová substitúcia zistená v pozícii 1016 bovinného exónu 4 (A/G) bola zhodná so substitúciou publikovanou v NCBI databáze. Tiché mutácie sú definované ako mutácie, ktoré nemajú vplyv na kódujúcu časť génu. Avšak predpokladá sa, že ich lokalizácia v konzervovaných úsekoch kódujúcich proteíny môže byť príčinou aberantného zostrihu, a tým ovplyvniť funkciu génu. Asociácia medzi Leberovou kongenitálnou amaurozou a mutáciami v *LCA5* géne, ako aj identifikáciu *LCA5L* génu ako jeho pravého homológa, bola prvýkrát formulovaná autormi Den Hollander a kol. (2007). Identifikáciou viacerých homologických sekvencií *LCA5* a *LCA5L* génov u cicavcov sa predpokladá, že oba pochádzajú od spoločného predka. Navyše bioinformatickou analýzou sme zistili existenciu viacerých transkriptov *LCA5L* génu (2 u hovädzieho dobytku a 3 u človeka) s rovnako dlhou proteínovou sekvenciou (670aa) a rovnakým počtom kódujúcich exónov (7).

Výsledky našej práce potvrdili, že autozómy u zástupcov čeľade *Bovidae* sú konzervované a sekvenovaním vybraných exónov sme odhalili vysokú mieru homológie *LCA5L* génu. Dve, doteraz nepopísané nukleotidové substitúcie sme zistili v sekvenciách exónu 9 u ovce a kozy.

*Práca vznikla vďaka fin. podpore grantov VEGA 1/0125/11, 1/0117/13 a vďaka odbornému usmerneniu Ústavu genetiky VFU, Brno a Odd. genetiky a reprodukcie VÚVL, Brno.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Den Hollander AI, Koenekoop RK, Mohamed MD, Arts HH, Boldt K, Towns KV, Sedmak T, Beer M, et al. Mutations in *LCA*, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 2007; 39:889-895.
- Di Meo GP, Perucatti A, Floriot S, Hayes H, Schibler L, Rullo R, Incarnato D, Ferretti L, Cockett N, Cribru E, Williams JL, Eggen A, Iannuzzi L. An advanced sheep (*Ovis aries*, 2n=54) cytogenetic map and assignment of 88 new autosomal loci by fluorescence in situ hybridization and R-banding. *Anim. Genet.* 2007; 38:233-240.
- Goldamer T, Di Meo GP, Lühken G, Drögenmüller C, Wu CH, Kijas J, Dalrymple BP, Nicholas FW, Maddox JF, Iannuzzi L, Cockett NE. Molecular cytogenetics and gene mapping in sheep (*Ovis aries*, 2n=54). *Cytogenet. Genome Res.* 2009;126:63-76.
- ISCNDB International system for chromosome nomenclature of domestic Bovids. (ed. by Di Bernardino D, Di Meo GP, Gallagher DS, Hayes H, Iannuzzi L - coordinator). *Cytogenet. Cell. Genet.* 2001; 92:283-299.
- Mans DA, Coene KLM, Boldt K, Lamers IJC, van Reeuwijk J, Loges NT, Bolat E, Franke L, Hetterschijt L, Letteboer SJF, Peters TA, Omran H, Cremers FPM, Ueffing M, Roepman R (2012) Lebercilin-like protein is embedded in a ciliary protein network and is preferentially expressed in motile cilia. *Cilia* 1(suppl.1):93
- Schibler L, Di Meo GP, Cribru EP, Iannuzzi L. Molecular cytogenetics and comparative mapping in goats (*Capra hircus*, 2n=60). *Cytogenet. Genome Res.* 2009; 126:77-85.
- Schmutz SM, Moker JS, Berryere TG. In situ hybridization of five loci to cattle chromosome 1. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1998; 81:51-53.
- Šviková K, Dianovský J, Holečková B, Galdíková M, Kolesárová V. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere* 2013; 92:555-562.

## TREMATODA DRAVÝCH VTÁKOV A SOV – NÁLEZ NOVÝCH DRUHOV PRE SLOVENSKÚ FAUNU

Komorová P.<sup>1</sup>, Sitko J.<sup>2</sup>, Hurníková Z.<sup>1</sup>, Chavko J.<sup>3</sup>, Molnár L.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ústav parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Ornitologická stanica Múzea Komenského, Přerov, Česká republika

<sup>3</sup>Ochrana dravcov na Slovensku, Bratislava

<sup>4</sup>Klinika vtákov a exotických zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

### ABSTRAKT

O výskyte parazitov dravých vtákov na Slovensku existuje len veľmi málo údajov. Cieľom nášho výskumu je prispieť k poznaniu parazitofauny dravých vtákov pochádzajúcich z nášho územia, ktorá doposiaľ nebola komplexne skúmaná. Od roku 2012 sme vyšetrili na prítomnosť parazitov 88 dravcov (Falconiformes) a sov (Strigiformes) z druhov *Buteo buteo* (63), *Buteo lagopus* (2), *Buteo rufinus* (1), *Accipiter gentilis* (4), *Accipiter nisus* (2), *Falco cherrug* (1), *Milvus milvus* (1), *Pernis apivorus* (1), *Circus aeruginosus* (3), *Haliaeetus albicilla* (1). Zistených bolo 8 druhov motolíc (Trematoda): *Strigea falconis* (Szidat, 1928), *Strigea strigis* (Schränk, 1788), *Strigea vandenbroekae* (Dubois, 1966), *Parastrigea flexilis* (Dubois, 1934), *Paracoenogonimus ovatus* (Katsurada, 1914), *Neodiplostomum attenuatum* (Linstow, 1906), *Neodiplostomum spatoides* (Dubois, 1937) a *Neodiplostomum perlatum* (Ciurea, 1911). S výnimkou druhu *Strigea falconis* boli všetky druhy zaznamenané po prvýkrát a ide o prioritné nálezy v rámci slovenskej fauny.

### ÚVOD

Je známe, že parazitizmus u voľne žijúcich vtákov je všadeprítomný a väčšina jedincov je počas svojho života vystavená pôsobeniu množstva rôznych parazitov, avšak naše poznatky o ich výskyte u vtákov vo voľnej prírode sú len zlomkovité. Štúdium parazitizmu je vystavené radu obmedzení, ktoré robia prácu s voľne žijúcimi druhmi oveľa zložitejšou ako je výskum u ľudí alebo domestikovaných zvierat (Atkinson a kol., 2008). Vtáky sú vo všeobecnosti považované za indikátory stavu životného prostredia. Dravé vtáky sú pre zdravé ekosystémy obzvlášť dôležité, keďže mnohé z nich sa nachádzajú na vrchole potravného reťazca (Ferguson-Lees a Christie, 2001). Zároveň stoja na konci životného cyklu mnohých druhov parazitov, ktorých prítomnosť v hostiteľských druhoch závisí okrem iného aj od typu a diverzity koristi, ktorú dotýčny hostiteľ skonzumuje (Sanmartín a kol., 2004).

Naším cieľom je zmapovanie stavu parazitofauny dravých vtákov na Slovensku a sledovanie výskytu nových druhov parazitov, pričom v tomto príspevku sa zameriavame na druhy z triedy Trematoda – motolice.

### MATERIÁL A METODIKA

Od roku 2012 vyšetrujeme uhynuté dravce a sovy z územia Slovenska na prítomnosť parazitov metódou úplnej helmitologickej pitvy. Uhynuté vtáky získavame na základe povolenej výnimky MŽP SR v spolupráci s ornitológmi a záchranným a rehabilitačnými stanicami, pričom ide výlučne o jedince, ktoré uhynuli vo voľnej prírode, po strete s automobilmi, po zásahu elektrickým prúdom alebo jedince, ktoré uhynuli na následky zranení v zariadeniach na záchranu chránených živočíchov. Vyšetřili sme 88 dravcov (Falconiformes) a sov (Strigiformes) z druhov *Buteo buteo* (63), *Buteo lagopus* (2), *Buteo rufinus* (1), *Accipiter gentilis* (4), *Accipiter nisus* (2), *Falco cherrug* (1), *Milvus milvus* (1), *Pernis apivorus* (1), *Circus aeruginosus* (3) a *Haliaeetus albicilla* (1). Všetky jedince boli podrobené úplnej helmintologickej pitve, pri ktorej sme izolovali parazity z tiel uhynutých vtákov. Motolice sme konzervovali v 4 % formalíne, ofarbili železitým karmínom, preniesli

cez alkoholový rad do xylénu a zaliali kanadským balzomom. Druhovú diagnostiku bola vykonaná na základe morfológických znakov motolíc.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Helmintologickou pitvou sme u dravých vtákov z územia Slovenska zistili nasledujúce druhy motolíc:

*Strigea falconis* (Szidat, 1928)

Zistená bola v čreve myšiaka lesného (*Buteo buteo*) (16/63), myšiaka hrdzavého (*Buteo rufinus*) (1/1), jastraba lesného (*Accipiter gentilis*) (2/4), jastraba krahulca (*A. nisus*) (1/2), haji červenej (*Milvus milvus*) (1/1) a u kani močiarnej (*Circus aeruginosus*) (2/3).

Je to bežne sa vyskytujúca motolica dravých vtákov s kozmopolitným rozšírením (Dubois, 1968). Parazituje v čreve dravcov. Vývinový cyklus je obligátne tetraheteroxénny, sú k nemu potrební 4 hostitelia. Prvým medzihostiteľom sú ulitníky z čeľade Planorbidae – kotúľka obrúbená (*Planorbis planorbis*). Experimentálne boli zistené aj iné druhy z tejto čeľade. Cercárie prenikajú do pľúc žiab, kde sa menia na mezocercárie. V prírode boli zistené u skokanov *Rana temporaria* a *Rana arvalis*, ale pri pokusoch sa vyvíjali aj v ďalších druhoch. Medzihostiteľom metacercárií môžu byť žaby, hady, vtáky aj cicavce (Odening, 1967). Na území Slovenska bol tento druh nájdený u myšiaka lesného (Tenora a Lusk, 1960; Škarda, 1964).

*Strigea strigis* (Schränk, 1788)

Motolica z čeľade Strigeidae charakteristická najmä pre sovy (Strigiformes). V nami vyšetovaných vtákoch bola zistená u myšiaka lesného (*Buteo buteo*) (3/63) a myšiarky ušatej (*Asio otus*) (1/3). Ide o prvé nálezy na území Slovenska.

*Strigea vandenbroekae* (Dubois, 1966)

Druh charakteristický výlučne pre včelára lesného (*Pernis apivorus*). Je to prvý nález na Slovensku (1/1). Dva nálezy tohto parazita pochádzajú z územia Českej republiky (Sitko, 1994; Sitko, 1998). Vývinový cyklus nie je známy.

*Parastrigea flexilis* (Dubois, 1934)

Motolica parazitujúca v čreve dravcov. Na Slovensku až doposiaľ jej výskyt nebol zaznamenaný. V nami vyšetovaných vzorkách bola nájdená u kani močiarnej (*Circus aeruginosus*) (1/3). V Českej republike ju opísal Sitko (1998) taktiež u *C. aeruginosus*. Informácie o vývinovom cykle tejto motolice nie sú dostupné (Sitko a kol., 2006).

*Paracoenogonimus ovatus* (Katsurada, 1914)

Na Slovensku doteraz nezaznamenaný druh z čeľade Cyathocotylidae. Nám sa ho podarilo izolovať z čreva orliaka morského (*Haliaeetus albicilla*) (1/1). Vývinový cyklus prebieha cez slimáky *Viviparus contectus*, *V. viviparus* a ďalej cez ryby a jašterice z druhu *Lacerta praticola*. Ako definitívni hostitelia sa v literatúre uvádzajú orliaky morské (*Haliaeetus albicilla*) a kane močiarné (*Circus aeruginosus*) (Sitko a kol., 2006).

*Neodiplostomum attenuatum* (Linstow, 1906)

Motolica vyskytujúca sa v celej holarktickej zoogeografickej oblasti. Typickým hostiteľom je myšiak lesný (*Buteo buteo*) (Sitko et al., 2006). V nami vyšetovaných dravcoch bol prioritne potvrdený u myšiaka lesného (*Buteo buteo*) (13/63), myšiaka hrdzavého (*Buteo rufinus*) (1/1) a včelára lesného (*Pernis apivorus*) (1/1). Vo vývinovom cykle sa uplatňujú kotúľky (*Anisus vortex*, *Gyraulus albus*). Mezocercárie boli experimentálne dokázané u skokanov (*Rana arvalis*, *Rana temporaria*) a metacercárie boli zistené u užovky obojkovej (*Natrix natrix*) (Odening, 1965).

*Neodiplostomum spatoides* (Dubois, 1937)

Motolica nájdená u kani močiarnej (*Circus aeruginosus*) (1/3), predstavuje prvý nález tohto druhu pre Slovensko. Lokalizuje sa v čreve dravcov. Vývinový cyklus prebieha cez kotúľky (*Planorbis Planorbis*). Mezocercárie boli potvrdené v žabách z rodov *Bufo*, *Pelobates* a *Rana*

a metacerkárie v hadoch (*Natrix natrix*) (Vojtková, 1970). V Českej republike bol determinovaný u *Accipiter gentilis*, *A. nisus*, *Circus cyaneus* a *C. aeruginosus* (Sitko, 1994; Sitko, 1998).

*Neodiplostomum perlatum* (Ciurea, 1911)

Prvý zaznamenaný výskyt na Slovensku, zistený u orliaka morského (*Haliaeetus albicilla*) (1/1). Motolice parazituje v tenkom čreve. Larválne štádiá sa vyvíjajú v rybích hostiteľoch (*Cyprinus carpio*, *Carassius carassius*). Na území Českej republiky ju opísal Sitko (1969) u sokola rároha (*Falco cherrug*).

Zistenie nových druhov trematód je významné nielen z hľadiska poznania parazitov dravých vtákov a sov, ale prispieva aj k rozšíreniu poznatkov o diverzite fauny Slovenska.

Výskum bol podporovaný grantom VEGA 1/0702/12.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Atkinson C. T., Thomas N. J., Hunter D. B. Parasitic Diseases of Wild Birds. Wiley-Blackwell 2008. 13-120.
- Dubois G. Synopsis des Strigeidae et des Diplostomatidae (Trematoda). Mémoires de la Société des Sciences Naturelles de Neuchatel 1968. 10: 1-723.
- Ferguson-Lees J., Christie D. A. Raptors of the World. Christopher Helm 2001. 992 s.
- Odening K. Der Lebenszyklus von *Neodiplostomum attenuatum* (Trematoda, Strigeida) im Raum Berlin. Biologische Rundschau 1965. 3: 250-253.
- Odening K. Die Lebenszyklen von *Strigea falconispalumbi* (Viborg.), *S. strigis* (Schrank) und *S. sphaerula* (Rudolphi) (Trematoda, Strigeida) im Raum Berlin. Zool. Jb. Syst. 1967. 94: 1-67.
- Sanmartín M. L., Álvarez F., Barreiro G., Leiro J. Helminth fauna of Falconiform and Strigiform birds of prey in Galicia, Northwest Spain. Parasitology Research 2004. 92: 255-263.
- Sitko J. Findings of trematodes (Trematoda) in wild birds of Czechoslovakia. Věstník Čs. spol. zool. 1969. 33: 79-87.
- Sitko J. Helminths of birds of prey (Falconiformes) and owls (Strigiformes) in Czech Republic and their influence on health condition of caged birds. Zprávy moravské ornitologické stanice 1994. 52: 53-84.
- Sitko J. Trematodes of birds of prey of Czech Republic. Helminthologia 1998. 32: 131-146.
- Sitko J., Faltýnková A., Scholz T. Checklist of the Trematodes (Digenea) of birds of the Czech and Slovak Republic. Academia Praha 2006. 111 s.
- Škarda J. The helminthfauna of some wild birds in Czechoslovakia. Acta Universitatis Agriculturae, Brno B. 1964. 12: 269-293.
- Tenora F., Lusk S. Beitrag zur näheren Kenntnis der Helminthenfauna bei Raubvögeln (Falconiformes) in der Tschechoslowakei. Acta Universitatis Agriculturae, Brno A 1960. 2: 205-2011.
- Vojtková L. Beitrag zur Kenntnis der Helminthofauna der Wasserwirbellosen. I. Trematoden der Familien Lecithodendriidae Odhner, 1911, Plagiorchiidae Lühe, 1911, Gorgoderidae Looss, 1901. Acta Societatis Zoologicae Bohemoslovaca 1970. 34: 317-333.



# ÚLOHA PLK1 A CHK1 KINÁZY POČAS PRVEJ EMBRYONÁLNEJ MITÓZY

Kovaříková V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Bunkový cyklus je riadený veľkým množstvom proteínkináz, ktoré regulujú jednotlivé kroky cyklu. Zamerali sme sa na dve kľúčové serín/treonínové proteínkinázy, ktoré plnia rôzne funkcie počas bunkového cyklu, pričom interagujú so svojimi špecifickými substrátmi, čím ovplyvňujú dôležité udalosti bunkového delenia. Polo-like kináza 1 (Plk1) je primárne zapojená v aktivácii komplexu Cdk1-cyklín B pri vstupe do mitózy, maturácii centrozómov a tvorbe vretienka pred zahájením cytokinézy. Checkpoint kináza 1 (Chk1) plní kontrolnú úlohu pri zahájení mitózy a aktivácii kontrolného bodu mitotického vretienka („spindle assembly checkpoint“ – SAC). Tiež sa zúčastňuje transformácie signálov v rámci reparácie poškodenej DNA. Chk1 kináza je negatívnym regulátorom Plk1 kinázy a to nezávisle od poškodenia DNA

Hlavným cieľom štúdie je špecifikácia úloh kľúčových proteínkináz (Plk1 a Chk1) v priebehu ranného vývoja preimplantačného embrya so zameraním na zahájenie a priebeh jeho prvého mitotického cyklu. Experimentálne je štúdium zamerané na sledovanie biochemických aktivít týchto proteínkináz pri vzniku deliaceho vretienka („spindle assembly“) a kontrole cytokinézy („cell cycle checkpoint“) a tiež na vplyv enzymatickej aktivity týchto proteínkináz na celkovú proliferáciu preimplantačného embrya.

## ÚVOD

Polo-like kinázy (Plk kinázy) sú rodinou fylogeneticky konzervovaných enzýmov, ktoré majú mnoho úloh pri prechode buniek M fázou. Sú pomenované podľa *polo* génu *Drosophily melanogaster*, ktorý bol pôvodne identifikovaný cez recesívne letálne materské mutácie. Konzervované homológy Plk boli identifikované v kvasinkách, *Xenopus laevis*, *C. elegans* a v cicavcoch (Archambault a kol., 2012). Homológom polo-like kinase 1 (Plk1) je Cdc5p v *Saccharomyces cerevisiae*, plo1 v *Schizosaccaromyces pombe*, Plx1, Plx2, a Plx3 v *Xenopus laevis*. Polo-like kinázy kvasiniek, hmyzu, obojživelníkov a cicavcov obsahujú rovnakú celkovú štruktúru, ktorá je sekvenčne dobre fylogeneticky konzervovaná v N-koncovej katalytickej doméne a C-koncovej regulačnej doméne, čo naznačuje blízku evolučnú spojitosť medzi týmito enzýmami a ich funkčnú dôležitosť pre bunku.

Checkpoint kináza 1 (Chk1) je evolučne konzervovaná serín/treonín proteínkináza (Okita a kol., 2012) a účinkuje ako hlavný mediátor, ktorý spája mechanizmy monitorovania integrity DNA a efektorové komponenty bunkového cyklu. Homológy Chk1 kinázy boli identifikované v cicavcoch, *Drosophily melanogaster*, kvasinkách, *Caenorhabditis elegans*, *Xenopus laevis* (Ning a kol., 2011). Vo všetkých eukaryotických bunkách má Chk1 dobre konzervovanú primárnu štruktúru, obsahujúcu N-terminálnu kinázovú doménu, flexibilný spájací (linkerový) región a C-terminálnu doménu (Katsuragi a kol., 2004) veľkú približne 200 AMK zvyškov a SQ/TQ doménu (317-383).

## POLO-LIKE 1 KINÁZA

Plk1 sa nepriamo zúčastňuje aktivácie MPF fosforyláciou Cdc25C a cyklínu B1 (Jackman a kol., 2003), čím kontroluje maturáciu centrozómu pri prechode G2/M (Dai a kol., 2003) a následne tvorbu bipolárneho deliaceho vretienka pred vstupom do anafázy (Zhao a kol., 2010, Vugt a kol., 2004). Plk1 je tak súčasťou dôležitých kontrolných mechanizmov mitotického cyklu (Dai a kol., 2003, Petronczki a kol., 2008). Kinázová aktivita Plk1 kinázy dosahuje vrchol v M-fáze, kedy je táto kináza plne fosforylovaná. Načasovanie aktivácie Plk1 však musí byť synchronizované s aktiváciou MPF, preto je rýchla aktivácia Plk1 pri vstupe bunky



do mitotického delenia dôležitá (van de Weerd a kol., 2006). Aktivita Plk1 je tiež nevyhnutná počas cytokinézy a formovaní deliaceho vretienka (Brennan a kol., 2007). Plk1 tu hrá významnú úlohu pri vytváraní stabilného pripojenia mikrotubulov na kinetochóry, čo následne súvisí so správnym usporiadaním chromozómov v štádiu metafázy, teda pred vstupom bunky do anafázy a následnej cytokinézy.

#### REGULÁCIA Plk1 KINÁZY

Aktivita Plk1 je počas bunkového cyklu striktné kontrolovaná. Počas mitózy je Plk1 fosforylovaná na treonínovom zvyšku (Thr210 v Plk1, Thr201 v Plx1 - homológ Plk1 u *Xenopus*) v jej aktivačnej slučke (T loop) a táto fosforylácia je potrebná pre jej kinázovú aktiváciu. Kinázová aktivita Plk1 je regulovaná pomocou jej vlastnej molekulárnej konformácie, pretože polo-box PBD interaguje s kinázovou doménou a potláča jej aktivitu v bunkách počas interfázy v prípade, keď Thr210 nie je fosforylovaný. Táto inhibičná interakcia absentuje počas mitózy (Seki a kol., 2008).

Synergické pôsobenie kinázy Bora a Aurora A kinázy (AURKA) kontroluje prechod G2/M v rámci mitotického cyklu. V G2 fáze sa výrazne akumuluje Bora kináza čím sa podporuje aktivácia Plk1 pomocou AURKA, čo vedie ku aktivácii Cdk1 a vstupu bunky do mitózy. Bora interaguje s Plk1 a kontroluje prístupnosť jej aktivačnej slučky pre fosforyláciu a aktiváciu pomocou AURKA. Takto kinázy Bora a AURKA kontrolujú vstup bunky do mitózy a predstavujú mechanizmus pre jeden z doteraz nejasných, ale najdôležitejších dejov bunkového cyklu (Seki a kol., 2008). Vstup do mitózy je vo finále kontrolovaný aktiváciou Cdk1, ktorej aktivita je regulovaná priamo mitotickými cyklínmi a fosfatázou Cdc25C (Murray 2004) a nepriamo Plk1 a AURKA (Lenart a kol., 2007). Plk1, Cdc25 a Cdk1 formujú spätnoväzobnú slučku a pozitívne regulujú navzájom svoju aktivitu (Murray, 2004).

#### CHECKPOINT KINÁZA 1

Táto kináza ako substrát ATM kinázy v kvasinkách a tiež vo vyšších eukaryotoch sa zúčastňuje pri monitorovaní integrity DNA a regulácii procesov opravy poškodenej molekuly DNA. V odpovedi na poškodenie molekuly DNA hrajú primárnu úlohu dve fosfo-inositolové kinázy: „ataxia telangiectasia mutated“ (ATM) a „ataxia telangiectasia mutated-related“ (ATR) (Tang a kol., 2006), ktoré sú členmi rodiny fosfoinozitol 3-kináz (PIKK) (Okita a kol., 2012). Po akumulácii ATM a ATR v mieste poškodenej molekuly DNA sa obe efektorové kinázy Chk1 a Chk2 fosforylačne aktivujú. Takto aktivované Chk1 a Chk2 proteínkinázy asociujú s množstvom substrátov, ktoré sú kľúčovými regulátormi procesu reparácie poškodeného miesta DNA a tým ďalšieho priebehu bunkového cyklu (Tang a kol., 2006). Nové výsledky výskumu naznačujú, že histón H3 je veľmi dôležitým substrátom, ktorý je po aktivačnej fosforylácií pomocou Chk1 zapojený v transkripčnej represii spôsobenej DNA poškodením. Okrem toho Chk1 hrá dôležitú úlohu aj počas bunkového rastu, pri vstupe do mitózy (G2/M) a v procese bunkovej smrti – apoptózy (Okita a kol., 2012). Počas nenarušeného priebehu bunkového cyklu Chk1 kináza kontroluje aktivitu cytoplazmatickej Cdc25B fosfatázy. Chk1 kináza lokalizovaná na centrozóme blokuje predčasnú aktiváciu Cdc2 prostredníctvom Cdc25B fosfatázy, čím kontroluje predčasný vstup do mitózy (Boddy a kol., 1998).

Na základe publikovaných údajov možno zhrnúť funkcie Chk1 počas metafázy, kde je Chk1 nevyhnutná pre správne usporiadanie chromozómov a aktiváciu SAC v prípade poruchy usporiadania chromozómov po nekorektnom pripojení mikrotubulov v kinetochóroch tvoriaceho sa mitotického vretienka.

#### REGULÁCIA Chk1 KINÁZY

Regulácia Chk1 si vyžaduje množstvo komplexných udalostí, pričom všetky komponenty

tejto signálnej dráhy neboli ešte identifikované. Stále zostáva neobjasnený detailný molekulárny mechanizmus aktivácie Chk1 kinázy. Nie je známe ako je aktivita Chk1 v neporušenom bunkovom cykle kontrolovaná, ale počas poškodenia DNA je Chk1 aktivovaná pomocou ATM a ATR fosforylácie (Pabla a kol., 2012). Dráha ATM/ATR-Chk1-Cdc25 hrá úlohu v S-fáze alebo kontrolnom bode G2/M. Ako odpoveď na preťaženie replikačnú vidlicu, alebo poškodenie DNA molekuly aktivovaná ATR fosforyluje Chk1 na Ser317 a Ser345, čo indukuje katalytickú aktiváciu a nukleárnu akumuláciu Chk1 kinázy. Chk1 potom fosforyluje a tým inhibuje rodinu špecifických proteín fosfatáz Cdc25. Inhibícia Cdc25 pomocou Chk1 indukuje zastavenie cyklu, čo poskytuje čas na reparáciu lézií molekuly DNA.

*Práca bola podporená grantom APVV-0237-10.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Archambault V, Carmena M. Polo-like kinase-activating kinases Aurora A, AuroraB and what else. *Cell Cycle*. 2012; 11:1490-1495
- Boddy MN, Furnari B, Mondesert O, Russell P. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science*. 1998; 280: 909-912
- Brennan IM, Peters U, Kapoor TM, Straight AF. Polo-Like Kinase Controls Vertebrate Spindle Elongation and Cytokinesis. *PLoS ONE*. 2007; 2:1-8
- Dai W, Cogswell JP. Polo-like kinases and the microtubule organization center: Targets for cancer therapies. *Prog Cell Cycle Res*. 2003; 5:327-334
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol*. 2003; 5:143-148
- Katsuragi Y, Sagata N. Regulation of Chk1 Kinase by Autoinhibition and ATR-mediated Phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*. 2004, 15:1680-1689
- Lenart P, Petronczki M, Steegmaier M, Di Fiore B, Lipp JJ, Hoffmann M, Rettig 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
- Murray AW. Recycling the Cell Cycle: Review Cyclins Revisited. *Cell*. 2004; 116:116-221.
- Ning LF, Wang HP, San D, Sang JL. C-terminal domain of Chk1 regulates its subcellular location and kinase activity for DNA repair. *Chinese Sci Bull*. 2011; 56:3138-3147
- Okita N, Minato S, Ohmi E, Tanuma S, Higami Y. DNA damage-induced CHK1 autophosphorylation at Ser296 is regulated by an intramolecular mechanism. *FEBS Letters*. 2012; 586:3974-3979
- Pabla N, Bhatt K, Dong Z. Checkpoint kinase 1 (Chk1)-short is a splice variant and endogenous inhibitor of Chk1 that regulates cell cycle and DNA damage checkpoints. *PNAS*. 2012; 109:197-202
- Petronczki M, Lenart P, Peters JM. Polo on the Rise—from Mitotic Entry. *Developmental Cell*. 2008; 14:646-659
- Seki A, Coppinger JA, Jang CHY, Yates JR, Fang G. Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science*. 2008; 320:1655-1658.
- Tang J, Erikson RL, Liu X. Checkpoint kinase 1 (Chk1) is required for mitotic progression through negative regulation of polo-like kinase 1 (Plk1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:11964-9
- van de Weerd BCM, Medena RH. Polo-Like Kinases A Team in Control of the Cell Cycle. 2006; 5:853-864
- 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. *The journal of biological chemistry*. 2004; 279:36841-36854
- Zhao Y, Ai J, Zhang H, Zhu G. Polo-like kinase-1 regulates first cleavage of one-cell embryos in culture during assisted reproduction. *Saudi Med J*. 2010; 31:247-252

## VPLYV APLIKÁCIE PROBIOTÍK A ĽANOVÉHO SEMENA V PROBLÉMOVOM CHOVE PRASIAŤ

Kravcová Z., Sopková D., Vlčková R., Krešáková L.  
*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

V práci sme sledovali účinok skrmovania probiotických mikroorganizmov v kombinácii s polynenasýtenými mastnými kyselinami (ľanové semeno, odroda Flanders) na zdravotný stav zvierat v chove s potvrdenou infekciou *E.coli* a *Coronavirus*. Pozorovali sme 36 prasiat rozdelených do 2 skupín: Kontrolnej (K, n=18), ktorej bola podávaná komerčná krmná zmes s prídavkom syra typu Čedar a pokusnej (LMK, n=18), ktorej bol podávaný syr s probiotickými kmeňmi (*L. plantarum* a *L. fermentum*) a šrotované ľanové semeno v 10% koncentrácii v krmive. Zvieratá sa počas pokusu klinicky sledovali, merala sa im telesná teplota, hodnotila sa konzistencia a vlhkosť trusu, sledovali sa aj vybrané krvné a biochemické parametre. Náš pokus poukázal na zlepšenie zdravotného stavu zvierat u pokusnej skupiny (LMK), ktorá vykazovala lepšiu klinickú stav oproti kontrolnej skupine.

### ÚVOD

Záujem o ochranu zdravia človeka a produkciu kvalitných a bezpečných potravín neustále stúpa. Do popredia sa dostáva výskum nových metód prírodného charakteru. Probiotiká majú schopnosť pomocou stabilizácie fyziologickej funkčnosti ekosystému tráviaceho traktu pôsobiť proti vzniku rôznych ochorení zvierat. Najvýhodnejšou možnosťou zvýšenia účinnosti probiotík sa javí ich kombinácia so synergickými pôsobiacimi komponentmi prirodzeného pôvodu. Medzi takéto komponenty patria prebiotiká (predovšetkým oligosacharidy), fyto-komponenty, nešpecifické substráty, metabolity mikroorganizmov, mikroelementy (Gibson a Roberfroid, 1995; Yadava a kol., 1995) a polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK) (Bomba a kol., 2005). PNMK sú esenciálne, pretože sa do organizmu zvierat dostávajú výlučne z potravy alebo krmiva. Patria tu n-3 a n-6 PNMK, ktoré sa zúčastňujú mnohých dôležitých reakcií (sekrečných, rastových, reprodukčných, imunitných) (Komprda, 2003; Simopoulos, 2008).

Preto v našej štúdií sme sa zamerali na účinok probiotík a PNMK (v podobe ľanového semena, odroda Flanders) na zdravotný stav prasiat v problémovom chove s potvrdenou infekciou *E.coli* a *Coronavirus*.

### MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 36 prasiat vo veku 28 dní plemena Slovenská biela ušľachtilá x Landras, ktoré boli získané z chovu Pozdišovce, KOAN spol., s.r.o., 072 01 Krásnovce 183. Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín a kŕmené 10 dní pred odstavom priamo v chove, 14 dní po odstave (po prevoze do pokusného zariadenia Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie UVLF KE), kde pokus pokračoval.

Schéma aplikácie probiotík (identická pre chov aj pre pokusné zariadenie na UVLF): pokusnej skupine (LMK, n=18) boli predkladané probiotické syry (*L. plantarum* a *L. fermentum*) v dávke 4g/ks/deň z každého syra (1g syra obsahuje  $1 \times 10^9$  CFU) a šrotované ľanové semeno odroda Flanders v 10% koncentrácii (zdroj n-3 PNMK); kontrolnej skupine (K, n=18) bol predkladaný čistý syr (trvanlivý syr typu Čedar) v dávke 8g/ks/deň. Všetky zvieratá boli súčasne kŕmené upravenou štartérovou krmnou zmesou OŠ 02 (Spišské kŕmne zmesi, Spišské Vlchy, SR) a vodou ad libitum.

V chove kde bola vykonaná aj depistáž s nálezom negatívneho parazitologického vyšetrenia a na základe mikrobiologického vyšetrenia bola v nazálnych výteroch potvrdená prítomnosť bežnej komenzálnej mikroflóry. Rektálne výtery a vzorky trusu rovnako potvrdili prítomnosť

bežnej komenzálnej mikroflóry črevného traktu (*E. coli*, enterobaktérie, bacily). U niektorých zvierat bola dokázaná prítomnosť hemolytickej *E.coli* a *Coronavirusu*.

V pokusnom zariadení Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie UVLF KE boli zvieratá ustajnené v montovaných nerezových klietkach s roštovou podlahou vystlanou v ¾ izolačnou podlahovou gumou a s teplotou prostredia 20-22°C. U prasiatok boli vzorky krvi odoberané z *plexus venosus suborbitalis* v deň odstavu (n=6), na 7. deň po odstave (n=6) a na 14. deň po odstave (n=6). Krv bola odoberaná do skúmaviek s prídavkom K3EDTA pre hematologické vyšetrenie na automatickom analyzátore BC-2008 VET (Mandray, China), a súčasne bola krv odoberaná bez pridávania antikoagulačných prostriedkov a po jedn hodinovom státi sa centrifugovala pri 349 g/15 min. V získanom krvnom sére sme spektrofotometrickým prístrojom Alizé (Lisabio, Francúzsko) stanovili celkový cholesterol (CCH), celkové bielkoviny (CB), celkovú aktivitu laktát dehydrogenázy (CLDH). V rovnakom čase boli odoberané vzorky trusu, ktoré boli hodnotené vizuálne (1-tuhý, 2-pastózny, 3-riedky, 4-vodnatý, 5-s prímiesou krvi alebo hlienu), bola sledovaná telesná teplota (o 8:00 a 15:00, každý deň) a súčasne bola stanovená vlhkosť trusu pomocou sušenia vzorky pri 80°C až do konštantnej hmotnosti. Výsledky boli navzájom porovnané jednocestným ANOVA testom. Pre porovnanie štatistických rozdielov medzi skupinami bol použitý Tukeyov porovnávací test. Grafické znázornenie výsledkov je v podobe hodnoty aritmetického priemeru a jeho štandardnej chyby (Mean ± SEM).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Tab.1 Namerané parametre získané počas skrmovania probiotík a PNMK u prasiat (Mean±SEM)**

Sledovaný parameter	Deň odstavu		7. deň po odstave		14. deň po odstave	
	K	LMK	K	LMK	K	LMK
TT (°C)	39,02±0,094 58	39,1±0,0856 3	39,07±0,298 5	38,87±0,130 8	38,62±0,087 24	38,73±0,17 64
T	1**	1,333±0,210 8	2,667±0,210 8	1,833±0,477 3	2,833±0,166 7**	1,667±0,42 16
VT (%)	75,6±3,305	77,87±2,823	87,86±0,994 2*	87,48±2,545	70,74±4,935 *	75,81±3,52 7
Er (T/l)	6,087±0,175 5	6,203±0,119 6	6,388±0,367 9	6,149±0,843 1	6,713±0,182 0	7,063±0,18 98
Le (G/l)	19,72±0,717 1**	18,63±1,700 **	24,12±2,539	19,55±2,148	19,82±2,198 **	31,35±2,16 0**
Hk (l/l)	0,3867±0,01 978	0,315±0,008 466	0,3617±0,01 621	0,29±0,0474 7	0,3267±0,01 202	0,355±0,01 118
TCH	3,115±0,146 7	3,437±0,255 2	3,163±0,305 9	2,698±0,282 3	3,162±0,232 5	2,975±0,12 85
TP	48,62±1,956	54,32±2,221	59,67±4,409	55,45±2,04	49,2±3,594*	62,88±3,39 4*
TLDH	17,03±0,971 5*	22,62±1,089 *	22,37±1,477 ***	12,63±1,837 ***	13,93±0,530 8	15,2±0,565 7

TT = telesná teplota, T = trus, VT = vlhkosť trusu, Er = erytrocyty, Le = leukocyty, Hk = hematokrit, TCH = celkový cholesterol, TP = celkový proteín, TLDH = celková laktát dehydrogenáza

\*(P<0,05) – signifikantný rozdiel, \*\* (P<0,01) - veľmi signifikantný rozdiel, \*\*\* (P<0,001) - extrémne signifikantný rozdiel

Z nameraných výsledkov vyplýva, že telesá teplota nebola počas pokusu výrazne ovplyvnená ( $P>0,05$ ). Konzistencia trusu sa výrazne líšila ( $P<0,01$ ) u kontrolnej skupiny v deň odstavu a na konci pokusu (14. deň skrmovania). Vlhkosť trusu sa často používa ako index kvality vylučovania. V našom pokuse sme u oboch sledovaných skupín zaznamenali zníženie obsahu vody, čo je v súlade s tvrdeniami Wang a kol. (2009). Počet leukocytov bol výrazne vyšší u oboch skupín (leukocytóza) oproti fyziologickej norme (11 – 18 G/l), čo je pravdepodobne spôsobené infekčným agensom ako reakcia na zápal. Počet erytrocytov sa pohyboval v rámci fyziologických hodnôt a nevykazoval u pozorovaných skupín výrazné rozdiely ( $P>0,05$ ). Hematokrit mal taktiež stály charakter v priebehu celého pokusu.

N-3 PNMK prítomné v ľanovom oleji majú hypolipidemický účinok, a tým znižujú riziko vzniku aterosklerózy a hypertenzie (Ikeda a kol., 1998). V našom pokuse sme zaznamenali postupné znižovanie celkového cholesterolu, ktoré však nebolo významné ( $P>0,05$ ). Aktivita laktát dehydrogenázy sa v období suplementácie krmiva probiotikami a PNMK postupne znižovala, no najvýraznejší rozdiel sme zachytili u zvierat na 7. deň skrmovania ( $P<0,001$ ). Obdobie odstavu je kritickým obdobím v živote prasiat, kedy dochádza v organizme k mnohým zmenám, najmä vo fyziológii gastro-intestinálneho traktu, ktorý je hlavným miestom trávenia a vstrebávania živín. Najvýraznejšou zmenou je redukcia výšky klkov a prehlbovanie krýpt čreva (Pluske a kol., 1997), čo sa považuje za príčinu zníženia absorpcie červa. Z nameraných výsledkov vyplýva, že aplikácia probiotík v kombinácii s látkami prirodzeného pôvodu (ľanového semena, odroda Flanders) mala priaznivý vplyv na zdravotný stav zvierat s potvrdenou infekciou *E.coli* a *Coronavirus*, a teda že priebeh ochorenia sa zmiernil a infekcia, ktorá má primárnu afinitu k črevným enterocytom sa v priebehu pokusu nerozvinula na plno.

*Práca sa uskutočnila v rámci riešenia projektu VEGA č. 1/0706/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bomba A, Nemcová R, Gancarčíková S, Mudroňová D, Joncová Z, Koščová J, Sciranková E, Buleca V, Švalec J. Uplatnenie probiotík vo výžive, v prevencii a terapii chorôb hospodárskych a domácich zvierat. Slov Vet Čas. 2005; 1:31-2.
- Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 1995; 125:1401-12.
- Ikeda I, Zoshida H., Tomooa M., Zosef A., Imaizumi K., Tsuji H., Saito H.: Effects of long-term feeding of marine oils with different positional distribution of eicopentaenoic and docosaheaxaen acids on lipid metabolism, eicosanoid production and platelet aggregation in hypercholesterolemic rats, Lipid 33, 1998 : 9; 897 – 904.
- Komprda T. Základy výživy človeka. 1.vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 162 s. ISBN 80-715-7655-7.
- Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. In Livestock Production Science. 1997; 51:215-36.
- Simopoulos AP. The importance of omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardio-vascular disease and other chronic diseases. Exp Biol Med. 2008; 233:674-88.
- Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of Lactobacillus plantarum MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. Appl Microbiol Biotechnol. 2009; 84:341-7.
- Yadava JNS, Gupta S, Ahmad I, Varma N, Tandon JS. Neutralization of enterotoxins of *E.coli* by coleonol (forskolin) in rabbit and guinea pig ileal loop models. Indian J Anim Sci. 1995; 65:1177-81.



# ANATOMICKÁ KONFIGURÁCIA A VARIABILITA SRDCOVÝCH ŽÍL U POTKANA

Krešáková L<sup>1</sup>., Schusterová P<sup>2</sup>., Kravcová Z<sup>1</sup>., Maloveská M.<sup>1</sup>, Vdoviaková K.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF Košice, <sup>2</sup>Lekárska fakulta, UPJŠ Košice

## ABSTRAKT

Potkan patrí k často používaným modelom v invazívnej kardiológii, napriek tomu je jeho venózný systém málo preštudovaný. Vzhľadom na vysokú variabilitu žíl, cieľom tejto práce bolo opísať priebeh a usporiadanie srdcových žíl potkana s dôrazom na anatomické variácie, použitím korozívnych techník a latexovej injekcie. Nástrekové médium (Spofacryl a ofarbený latex) sme aplikovali do kaudálnej dutej žily po perfúzii cievného systému fyziologickým roztokom. Morfológická variabilita bola manifestovaná rozdielmi v prítomnosti, pozícii a počte srdcových žíl. Nekonštantne sa vyskytovali *v. cordis cranialis* (58,3%), *vv. caudales minores* (16,7%) a anastomózujúca žila (66,7%). Medzi *v. coni arteriosi sinistra* a *v. cordis sinistra* boli pozorované kolaterálne žily (11,1%).

## ÚVOD

Venózný systém srdca zohráva kľúčovú úlohu v aplikácii nových technológií a techník v liečbe kardiovaskulárnych ochorení (Jain a kol., 2006). Potkan predstavuje štandardne používaný model v experimentálnej kardiológii pre *in vitro* ako aj *in situ* štúdie infarktov myokardu (Ytrehus a kol., 2006). V invazívnej kardiológii venózný systém predstavuje potenciálnu cestu pre cieľové dodanie kmeňových buniek, vektorov pre génovú transfekciu, angiogenetických rastových faktorov, alebo kardioprotektívnych reagentov. Početné štúdie na laboratórnych zvieratách hodnotia účinnosť retrográdnej infúzie liečiv do ischemických oblastí myokardu. Retrográdna venózna aplikácia kmeňových buniek umožňuje ich šírenie vo všetkých vrstvách myokardu s jeho minimálnym poškodením (Suzuki a kol., 2004). Z týchto dôvodov sú detailné poznatky o komplexite a variabilite koronárneho venózneho systému dôležitým faktorom pred rôznymi kardiologickými úkonmi a elektrofyziológickými intervenčnými postupmi. Morfológia a variabilita srdcových žíl bola dokumentovaná u človeka (Mlynarski a kol., 2011), niektorých druhov domácich zvierat (Nickel a kol., 1981; Besoluk a Tipirdamaz, 2001) myši (Ciszek a kol., 2007) a kráľika (Yoldas and Nur, 2012). Podľa dostupných informácií sa srdcovým žilám potkana venovala štúdia z roku 1953 (Halpern), neskôr datované práce vychádzali z tejto štúdie. Variácie venózneho systému srdca potkana doposiaľ pozorované neboli. Cieľom tejto práce bolo opísanie anatomickej konfigurácie s dôrazom na variabilitu a komunikáciu srdcových žíl potkana.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili 36 potkanov plemena Wistar, oboch pohlaví, s priemernou hmotnosťou 350 g. Po eutanázii a kanylácii kaudálnej dutej žily sme vykonali perfúziu cievného systému fyziologickým roztokom (Maženský a kol., 2011). Kraniálnu dutú žilu, pľúcny kmeň a aortu sme ligovali. Ako nástrekové médium pre vizualizáciu kardiovenózneho systému sme zvolili komerčne vyrábanú, samopolymerizujúcu, dentálnu živicu Spofacryl® (Spofa – Dental, ČR) a ofarbený latex. Hmotu sme injikovali po ligatúre kanyly zavedenej do *v. cava caudalis*. Macerácia mäkkých tkanív prebehla v 2 - 4 % roztoku KOH počas 3 - 6 dní pri teplote 60 - 70°C (Maženský a kol., 2010). Priebeh a variabilitu žíl srdca sme analyzovali operačným mikroskopom (Leica M 320) a makroskopicky. Anatomická nomenklatúra je v súlade s *Nomina Anatomica Veterinaria* (Danko a kol., 2011) a s predchádzajúcimi štúdiami.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Venózný systém srdca potkana sa štruktúrou líši od hospodárskych zvierat, vrátane kráľika. Podobné usporiadanie srdcových žíl bolo pozorované u myši (Ciszek a kol., 2007). Hlavný rozdiel spočíva v prítomnosti *v. cava cranialis sinistra* (VCCS), hoci existencia tejto žily bola



pozorovaná u myši, kráľíka a ako zriedkavá variácia u mačiek, hovädzieho dobytku (Sekeles a kol., 1982) a človeka (0,3% participantov a 5% pacientov s kongenitálnymi srdcovými malformáciami; Cha a Khoury, 1972). Potkan poukazuje na retenciu primitívnych venózných vzťahov, ktoré sa nevyskytujú u iných cicavcov. Venózný odvod z oblastí *truncus pulmonalis*, *conus arteriosus* ako aj *aorta ascendens* okrem štandardného odvodu, ktorý zabezpečuje **v. conii arteriosi dextra** (VCoD) je z pravej strany tejto oblasti odvádzaný anastomózujúcou žilou, ktorá kríži *arcus aortae* a vstupuje z ventrálnej strany do VCCS. Táto žila bola pozorovaná u 24 potkanov a korešponduje so žilou prítomnou u obojživelníkov (Halpern, 1953). Z ľavej strany *conus arteriosus* odvádzajú krv **v. conii arteriosi sinistra** (VCoS), ktorá prebieha na pravú stranu a vlieva sa do *v. cava cranialis dextra* (VCCD). Tento typ bol sledovaný u rýb (Halpern, 1953). VCoS vzniká v proximálnej tretine srdca ako 3 žily integrujúce v spoločný kmeň, ktorý prebieha medzi ľavou predsieňou a pľúcnym kmeňom a vlieva sa do VCCD vo všetkých pozorovaných prípadoch. Vaskularizuje oblasť *conus arteriosus*, *truncus pulmonalis*, proximálnu tretinu ľavej komory a ventrálnu stranu ľavého uška. U hospodárskych zvierat a kráľíka cieva vstupuje do *v. interventricularis paraconalis* (Yoldas a Nur, 2012; Aksoy a kol., 2009).

**Sinus coronarius** (SC) predstavuje terminálny segment VCCS od miesta vstupu *v. azygos* až po jej vyústenie do pravej predsieni. Je jednou z najdôležitejších žíl srdca, odvádzajú krv zo steny ľavej a čiastočne aj pravej komory, chýba u kráľíka (Yoldas a Nur, 2012). Do SC vstupuje *v. cordis sinistra*, *v. atrii sinistri* a *v. caudalis major*.

**V. cordis sinistra** (VCS) je najväčšou žilou srdca, vzniká na hrote alebo v 4 prípadoch (11,1%) v distálnej tretine srdca ako jedna (91,7%), dve (5,6%) alebo tri žily (2,8%). Prebieha dorzokaudálne okolo ľavého okraja srdca a vstupuje do SC, v dvoch prípadoch (5,6%) spoločne s *v. caudalis major*. Počas celého priebehu prijíma malé žily zo steny ľavej komory, ktoré do nej vstupujú paralelne v pravom uhle. Lokalizáciou zodpovedá *v. marginis ventricularis sinistri* prítomnej u hospodárskych zvierat a človeka (Pakalska, 1974). Medzi VCS a VCoS boli pozorované **kolaterálne žily** v 4 prípadoch (11,1%). Prítomnosť kolaterálnych žíl nebola doposiaľ u potkana a myši opísaná, ale boli zistené u domácich zvierat (Nickel a kol., 1981) a kráľíka (Yoldas a Nur, 2012) medzi *v. interventricularis paraconalis* a *v. marginis ventricularis sinistri*, pričom usporiadanie týchto dvoch žíl korešponduje s *v. conii arteriosi sinistra* a *v. cordis sinistra*. Z kaudálnej oblasti srdca, čiastočne z pravej aj ľavej komory, je krv odvádzaná konštantne prítomnou žilou – **v. caudalis major** (VCM) a nekonštantne sa vyskytujúcimi **vv. caudales minores** (VCMi). VCM bola pozorovaná ako jedna žila, alebo žila formujúca spoločný kmeň s inými žilami (Tab. 1), v strednej tretine srdca alebo v 3 prípadoch (8,3%) na hrote srdca. VCMi boli sledované u 6 potkanov (16,7%) ako jedna (3 prípady - 8,3%) alebo dve žily (2 prípady – 5,6%) a v jednom prípade (2,8%) tvorili spoločný kmeň s ďalšími žilami. Kontrastne boli VCMi u myši referované v 38 prípadoch (82,6%) ako jedna (43,4%), dve (26,1%) alebo tri žily (13,1%; Ciszek a kol., 2007). VCM vstupuje do SC v 23 prípadoch (63,9%) ako samostatná žila alebo tvorí spoločný kmeň, do pravej predsieni sa vlieva v 7 prípadoch (19,4%), VCMi majú distribučnú oblasť v proximálnej tretine srdca medzi *v. caudalis major* a *v. cordis dextra*. Vstupujú do pravej predsieni samostatne alebo spolu s ďalšími prítomnými žilami. Hoci kaudálne žily neboli zistené u hospodárskych zvierat a človeka, ich priebeh možno porovnať s *v. cordis media* (Yoldas a Nur, 2012; Aksoy a kol., 2009; Mlynarski a kol., 2011).

Z pravej komory srdca je krv dominantne odvádzaná žilou **v. cordis dextra** (VCD), ktorá vzniká v distálnej tretine pravej komory, v 3 prípadoch (8,3%) v proximálnej tretine pravej komory a v 4 prípadoch (11,1%) na hrote srdca. Prebieha okolo pravého okraja srdca a ústi do kaudálnych častí pravej predsieni, hoci v dvoch prípadoch vstupuje do VCM. U hospodárskych zvierat a kráľíka odvod z pravej komory srdca zabezpečujú predovšetkým *v. cordis media*, *v. proximalis ventriculi dextri*, *v. distalis ventriculi dextri*, *v. marginis ventricularis dextri*, *v. conii arteriosi dextra* a vlievajú sa do pravej predsieni (Nickel a kol., 1981; Yoldas a Nur, 2012). U 21 potkanov (58,3%) sme zistili prítomnosť **v. cordis cranialis** (VCC), ktorá odvádzajú krv z kraniálnych oblastí proximálnej tretiny pravej komory, prebieha kaudodorzálne medzi VCD a VCoD. Ústi do pravej predsieni ako solitárna žila v 7 prípadoch (19,4%) v 10 prípadoch (27,8%) tvorí prítok VCD, v 4

prípadoch (11,1%) tvorí spoločný kmeň. Existencia VCC je udávaná iba u myši v 8,7% u hospodárskych zvierat sa nevyskytuje.

Vysoká variabilita venózneho systému v oblasti *conus arteriosus* bola pozorovaná u myši (Ciszek a kol., 2007), kde VCoS a VCoD pred pľúcnym kmeňom anastomózujú a tvoria *arcus venosus coni arteriosi prepulmonalis*. U niekoľkých myši bola sledovaná anastomóza koexistujúca s týmto oblúkom – *circulus venosus coni arteriosi*. Tento druh variácie bol u potkana opísaný len počas embryonálneho vývoja (Halpern, 1953). Anastomóza medzi VCoS a *v. atrii sinistri* (VAS) referovaná ako *arcus venosus intercavalis* (prítomná u 23,9% myši) u potkana nebola pozorovaná. Z ľavej predsiene odvádzajú krv VAS a kaudálna vetva VCoS, žily odvádzajúce krv zo steny pravej predsiene neboli u potkana pozorované, čo koreluje so zisteniami u myši (Ciszek a kol., 2007) a potkana (Halpern, 1953).

Tab. 1 Srdcové žily formujúce spoločný kmeň

Žily	Počet prípadov	Frekvencia (%)
VCS + VCM	2	5,6
VCM + VCD + VCC	3	8,3
VCD + VCM	2	5,6
VCM + VCMi + VCD + VCC	1	2,8
VCD + VCC	10	27,8

*Práca bola podporená grantom VEGA 1/0111/13.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aksoy G, Özmen E, Kurtul I, Özcan S, Karadag H. The venous drainage of the heart in Tuj Sheep Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2009; 15(2): 279-286.
- Besoluk K, Tipirdamaz S. Comparative macroanatomic investigations of the venous drainage of the heart in Akkaraman sheep and Angora goats. Anat Histol Embryol. 2001; 30: 249-252.
- Ciszek B, Skubiszewska D, Ratajska A. The Anatomy of the cardiac veins in mice. J Anat. 2007; 211(1): 53-63.
- Danko J, Šimon F, Artimová J. Nomina Anatomica Veterinaria. UVLF Košice, 2011; pp 138-158.
- Halpern, M.H. Extracoronary cardiac veins in the rat. Am J Anat. 1953; 92: 307-328.
- Cha EM, Khoury GH. Persistent left superior vena cava: radiologic and clinical significance. Radiology 1972; 103: 375-381.
- Jain AK, Smoth EJ, Rothman MT. The coronary venous system: An alternative route of Access to the myocardium. J Invasive Cardiol. 2006; 18(11): 563-568.
- 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.
- Maženský D, Danko J. The importance of the origin of vertebral arteries in cerebral ischemia in the rabbit Anatomical Science International. 2010; 85(2): 102-104.
- Młynarski R, Młynarska A, Sosnowski M. Anatomical variants of coronary venous system on cardiac computed tomography. Circ J. 2011; 75: 613-618.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. The Anatomy of the Domestic Animals, Vol.3. Erzurum: Verlag Paul Parey, pp. 70-79.
- Pakalska E. Studies on cardiac veins in the man and domestic pig. Folia Morphol. (Warsz.) 1974; 33: 373-384.
- Sekeles E. Double cranial vena cava in a cow: case report and review of the literature. Zbl Vet Med A. 19 82; 29: 494-503.
- Suzuki K, Murtuza B, Fukushima S, Smolenski R, Carvar A, Coopen SR, Yacoub MH. Targeted cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics, and influence of cardiac function. Circulation. 2004;110:225-230.
- Yoldas A, Nur IH. The distribution of cardiac veins in the New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Iranian Journal of Veterinary Research. 2012; 13(3): 227-233.
- Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: Effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. Am J Physiol. 1994; 267: 2383-90.

# **IN VITRO ŠTÚDIUM BIOLOGICKEJ AKTIVITY EXTRAKTU BOHATÉHO NA ANTOKYÁNY NA NORMÁLNYCH A NÁDOROVÝCH BUNKÁCH**

Kšonžeková P.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>, Csank T.<sup>1</sup>, Mariychuk R.<sup>2</sup>, Tkáčiková Ľ.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav imunológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, Slovensko

<sup>2</sup>Katedra ekológie a ochrany životného prostredia, Národná univerzita v Užhorode, Užhorod, Ukrajina

## **ABSTRAKT**

Cieľom našej práce bolo otestovať cytotoxicitu a antioxidačný potenciál purifikovaného etanolového extraktu z plodín Arónie čiernoplodej (*Aronia melanocarpa*; Wild.) na normálnej (IPEC-1) a nádorovej (CACO-2) bunkovej línii. Získané výsledky dokazujú stimulačný účinok extraktu na proliferáciu IPEC-1 buniek a naopak inhibičný vplyv na rast CACO-2 línii. Anticytotoxické účinky mali aj vyššie koncentrácie extraktu, ale iba na IPEC-1 bunky, čo je navyše v korelácii so zistenými rozdielmi v jeho antioxidačnej aktivite.

## **ÚVOD**

V plodoch bobuľovín predstavujú majoritnú zložku flavonoidov antokyány, ktoré majú veľký význam v obrane proti vírusovým, bakteriálnym a plesňovým ochoreniam rastlín. Antokyány sa prirodzene vyskytujú vo forme glykozidov antocyanidínov v intracelulárnych štruktúrach nazývaných antocyanoplasty (Gould a kol., 2008). Ide o skupinu významných prírodných antioxidantov, u ktorých boli dokázané taktiež antimikrobiálne (Tkáčiková a kol., 2013), protinádorové a protizápalové účinky (Miguel, 2011). Cieľom našej práce bolo otestovať v *in vitro* podmienkach cytotoxicitu a antioxidačný potenciál na antokyány bohatého extraktu pripraveného z plodín arónie. Ako experimentálny model sme použili normálnu IPEC-1 líniu pripravenú z črevných epitelových buniek novonarodených prasiat, ako aj nádorové CACO-2 bunky odvodené z adenokarcinómu hrubého čreva u ľudí.

## **MATERIÁL A METÓDY**

**Príprava extraktu:** V experimente bol použitý purifikovaný etanolový extrakt z plodín Arónie čiernoplodej (AMEP). Extrakt bol pred testovaním nariedený v 0,01% kyseline octovej.

**Bunkové línie:** Na kultiváciu IPEC-1 línii bolo použité médium DMEM/F-12 (Sigma - Aldrich) obohatené o fetálne bovinné sérum (5% FBS; Lonza), epidermový rastový faktor (5 ng/ml; BD Biosciences) inzulín (10 µg/ml), transferín (10 µg/ml) a selénium (10 ng/ml) (ITS; Lonza). Bunky CACO-2 boli kultivované v médiu DMEM (Sigma-Aldrich), ktoré bolo doplnené o FBS (10%) a L-glutamín (4 mM; Lonza). V prípade testovania cytotoxických, anticytotoxických a antioxidačných účinkov boli bunky nasadené na 96-jamkovú platničku v počte  $3 \times 10^4$  IPEC-1 a  $2 \times 10^4$  CACO-2 buniek na jamku. Pre analýzu bunkového cyklu (BC) boli bunky nasadené na 24-jamkovú platničku v počte  $2,25 \times 10^5$  IPEC-1 a  $1,5 \times 10^5$  CACO-2 buniek na jamku. Bunky boli kultivované pri 37 °C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub>. Životnosť buniek bola  $\geq 95\%$ .

**Cytotoxická aktivita (MTT-test):** Nočné bunkové kultúry boli po dobu 24 hod vystavené pôsobeniu AMEP (50, 100, 200 a 400 µg.ml<sup>-1</sup>) a následne inkubované ďalšie 4 hod s 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyl tetrazolium bromidom (MTT; Sigma-Aldrich). Vytvorený formazán bol rozpustený použitím dimetylsulfoxidu (DMSO; Sigma-Aldrich) a pre stabilizáciu produktu bol pridaný glycínový pufer. Ihneď bola meraná absorbancia pri vlnovej dĺžke 570 nm. Metabolická aktivita buniek bola percentuálne vyjadrená v porovnaní s negatívnou kontrolou (0,001% kyselina octová). **Analýza bunkového cyklu (BC):** Po nočnej kultivácii boli bunky 24 hod inkubované s AMEP v koncentrácii 100 µg.ml<sup>-1</sup>. Po inkubácii boli bunky fixované v 70% etanole pri teplote 0°C cez noc. Následne boli bunky

ofarbené propídiu-iodidom (50 µg/ml; Sigma-Aldrich) a zároveň ošetrené RNázou A (100 µg/ml; Sigma-Aldrich). Vzorok boli analyzované na prietokovom cytometri BD FACS Canto a vyhodnotené pomocou BD FACS Diva softvéru.

**Antioxidačná aktivita:** Po nočnej inkubácii bola k bunkám pridaná ne fluorescenčná próba 2',7'-dichlorofluoresceín-diacetát (5 µM; DCFH-DA; Sigma-Aldrich) a AMEP v rôznych koncentráciách (3,1; 12,5 a 50 µg.ml<sup>-1</sup>). Po 3 hod preinkubácii s extraktom boli bunky vystavené pôsobeniu iniciátora tvorby voľných radikálov 2,2'-azobis(2-amidinopropán)dihydrochloridu (1 mM; AAPH; Sigma-Aldrich). Fluorescencia (485<sub>Ex</sub>/527<sub>Em</sub>) bola meraná ihneď po pridaní AAPH (t<sub>0</sub>) a po 24 hod. Antioxidačný účinok bol vyjadrený ako % inhibície tvorby radikálov podľa vzorca:  $(1 - FL_{\text{vzorka}} / FL_{\text{AAPH}}) \times 100$ ; kde FL je pomer fluorescencie vzorky resp. AAPH po 24 hod a v čase nula. **Anticytotoxický účinok a ochranný efekt voči zmenám bunkového cyklu (BC):** Nočné kultúry boli po 3 hod preinkubácii s AMEP inkubované ďalších 24 hod s AAPH v koncentrácii 15 mM (anticytotoxicity) alebo 20 mM (ochranný účinok voči zmenám BC). Následne bola metabolická aktivita buniek vyhodnotená MTT-testom a pomocou prietokovej cytometrie analyzovaná distribúcia buniek v jednotlivých fázach BC.

**Štatistická analýza:** Výsledky boli spracované v programe GraphPad Prism verzia 3.00. Pri porovnaní antioxidačnej aktivity bol použitý nepárový t-test a výsledky anticytotoxického účinku a ochranného efektu voči zmenám BC boli vyhodnotené použitím jednocestnej ANOVA a Dunnetovho, resp. Tukeyho testu.

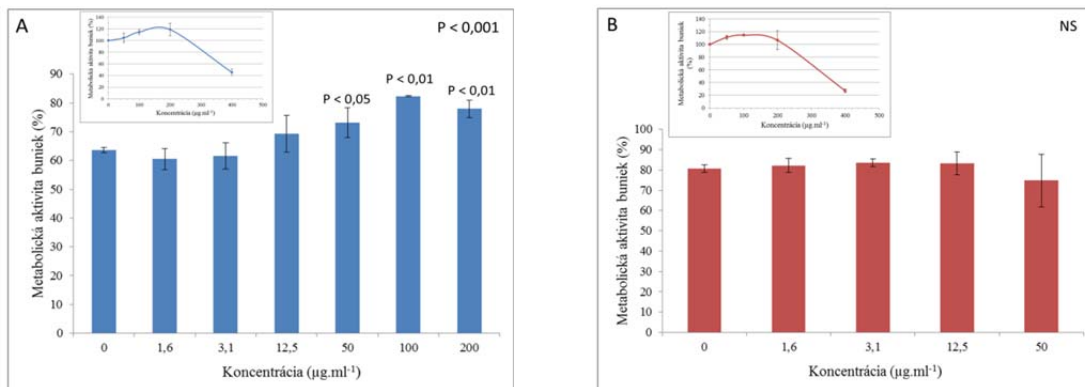
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri testovaní cytotoxickej aktivity AMEP bolo zistené, že hodnota IC<sub>50</sub> extraktu je o niečo nižšia v prípade nádorovej CACO-2 línie (340 µg.ml<sup>-1</sup>) v porovnaní s IPEC-1 bunkami (380 µg.ml<sup>-1</sup>) (Obr.1). Pomocou analýzy BC bol vyhodnotený vplyv testovaného extraktu na proliferáciu buniek (Obr.2). V porovnaní s kontrolou (bunky ošetrené 0,001% kys. octovou) došlo po aplikácii AMEP u IPEC-1 buniek k nárastu v S-fáze (NS - bez signifikancie), avšak u CACO-2 buniek bol zistený nárast v G1 fáze BC (NS). Po ošetrení buniek iniciátorom tvorby voľných radikálov (AAPH) sme u oboch línií zaznamenali nárast apoptických buniek (IPEC-1: P<0,001; CACO-2: NS) za súčasného poklesu v G1 fáze BC (IPEC-1: P<0,01; CACO-2: P<0,05), čo je v zhode so štúdiou Elisia a Kitts (2008). Podobný efekt bol zistený aj v prípade kombinovanej aplikácie AMEP a AAPH na IPEC-1 bunkách, z čoho vyplýva, že danou metódou u normálnych buniek nebol dokázaný ochranný efekt extraktu voči pôsobeniu AAPH. Avšak u CACO-2 buniek kombinované ošetrenie (AAPH a AMEP) malo za následok pokles v subG1 a S fáze (NS) a naopak nárast v G1 fáze BC (P<0,01), a to v porovnaní s aplikáciou samotného AAPH.

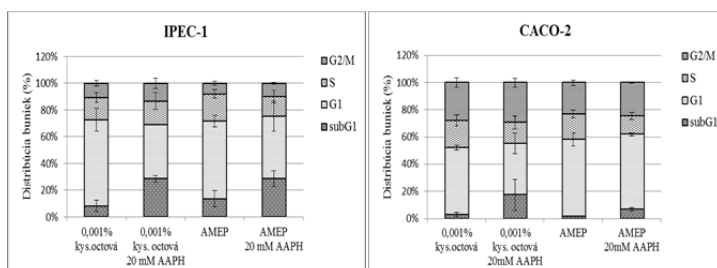
Pri porovnaní antioxidačnej aktivity extraktu bolo síce u CACO-2 buniek po podaní AMEP v nižších koncentráciách zistené vyššie %inhibície (P<0,0001), avšak extrakt v koncentrácii 50 µg.ml<sup>-1</sup> mal štatisticky významne vyšší antioxidačný účinok u IPEC-1 buniek (P<0,01) (Obr.3). Podobné výsledky sme zistili pri testovaní anticytotoxickej aktivity, kedy extrakt podaný v koncentráciách 50-200 µg.ml<sup>-1</sup> mal signifikantne protektívny účinok voči cytotoxickému pôsobeniu AAPH (15mM) na normálne bunky, avšak u nádorových buniek bol zistený opačný efekt už pri koncentrácii 50 µg.ml<sup>-1</sup> (pozri Obr.1). Inými autormi bol podobný anticytotoxický účinok na CACO-2 bunky zistený aj v prípade extraktu pripraveného z Čučoriedky obyčajnej (Elisia a Kitts, 2008).

Na záver môžeme konštatovať, že bol dokázaný stimulačný účinok extraktu na proliferáciu IPEC-1 línie a naopak inhibícia rastu CACO-2 buniek. Pozitívnym zistením je fakt, že anticytotoxická aktivita testovaného extraktu po jeho aplikácii v koncentrácii 50 µg.ml<sup>-1</sup> a viac bola dokázaná len u normálnych buniek, čo je v korelácii aj so zistenými rozdielmi v jeho antioxidačnej aktivite.





**Obr.1: Anticytotoxický účinok purifikovaného etanolového extraktu z arónie na IPEC-1 (A) a CACO-2 bunkách (B).** Metabolická aktivita buniek bola percentuálne vyjadrená v porovnaní s negatívnou kontrolou. Výsledky boli štatisticky spracované použitím jednocestnej ANOVA a Dunnetovho testu. V malých grafoch je zobrazený vplyv samotného extraktu na metabolickú aktivitu buniek. Výsledky sú vyjadrené ako priemerné hodnoty  $\pm$  smerodajné odchýlky ( $n=3$ ).

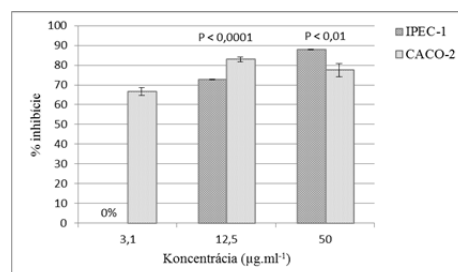


**Obr.2: Analýza bunkového cyklu.**

Výsledky sú zobrazené ako priemerné hodnoty  $\pm$  smerodajné odchýlky ( $n=3$ ).  
**AAAPH** - 2,2'-azobis(2-amidinopropán)dihydrochlorid; **AMEP** - purifikovaný etanolový extrakt z plodín Arónie čiernoplodej

**Obr.3: Antioxidačný účinok purifikovaného etanolového extraktu z arónie na IPEC-1 a CACO-2 bunkách.**

Výsledky boli štatisticky spracované pomocou nepárového t-testu a v grafe sú zobrazené ako priemerné hodnoty  $\pm$  smerodajné odchýlky ( $n=3$ ).



Publikácia bola vytvorená realizáciou projektu MŠ SR-3634/2010-11 Izolácia prírodných látok rastlín procesom lyofilizácie a zmeny ich kvalitatívno-kvantitatívnych vlastností.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Elisia I. a Kitts D.D. Anthocyanins inhibit peroxy radical-induced apoptosis in Caco-2. Molecular and Cellular Biochemistry. 2008; 312: 139-45
- Gould K., Davies K. a Winefield C. Anthocyanins. Biosynthesis, functions and applications. Springer: New York; 2008
- Miguel M.G. Anthocyanins: antioxidant and/or anti-inflammatory activities. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2011; 6: 7-15
- Tkáčiková L., Kšonžeková P., Poráčová J., Mariychuk R. a Eliašová A. Antimicrobial properties of anthocyanin extracts prepared from berries by ethanol and acetone extraction. Acta Facultatis Studiorum Humanitatis et Naturae Universitatis Prešovensis. 2013; XLII: 81-89

# MNOŽSTVO TELESNÉHO TUKU MATKY OVPLYVŇUJE POČET A DISTRIBÚCIU IZOLOVANÝCH OOCYTOV

Kubandová J.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo preskúmať vplyv množstva telesného tuku matky na počet a distribúciu izolovaných oocytov a kvantifikovať množstvo lipidových kvapiek v oocytoch prostredníctvom fluorescenčného farbenia NileRed. Dvojgeneračný model, založený na skrmovaní matiek P generácie vysoko-tukovou diétou počas gravidity a laktácie bol použitý na produkciu štyroch skupín samíc F1 generácie (klasifikované na základe % telesného tuku): s fyziologickým množstvom telesného tuku (CN, 7-8%), mierne zvýšeným množstvom telesného tuku (EXN, 8-11%), s vysokým obsahom telesného tuku (EXF, >11%) a s výrazne zníženým množstvom telesného tuku (CL, <7%). Zaznamenali sme vyšší počet izolovaných oocytov v skupine experimentálnych samíc s mierne zvýšeným množstvom telesného tuku (EXN) v porovnaní s normálnou kontrolnou skupinou samíc (CN). Rovnako sme zaznamenali, že množstvo telesného tuku signifikantne ovplyvnilo aj distribúciu oocytov v prospech fertilizovaných, no zároveň i nezrelých a degenerovaných. Priemerné množstvo tukových kvapiek, ktoré sme hodnotili na základe parametra integrovanej denzity fluorescenčného signálu NileRed bolo v oboch experimentálnych skupinách (EXF aj EXN) nižšie ako v normálnej kontrolnej skupine samíc (CN). Na záver môžeme povedať, že množstvo telesného tuku signifikantne ovplyvňuje počet a distribúciu izolovaných oocytov a fluorescenčné farbenie pomocou NileRed je spoľahlivá technika kvantifikácie lipidových kvapiek v oocytoch.

## ÚVOD

Obezita je veľkým zdravotným problémom na celom svete. V súčasnosti je asi 400 miliónov ľudí na svete s Body mass index nad  $30 \text{ kg m}^{-2}$  klasifikovaných ako obézni (Binder a kol., 2012). Tento problém sa týka aj domácich a hospodárskych zvierat, ktorých stravovacie návyky sa zmenili buď vplyvom toho, že žijú v spoločensťve s človekom, alebo boli cielene upravené pri snahe zvyšovať ich reprodukčné parameter (Wathes a kol., 2007). Obezitou v súčasnosti trpí 20-34% tehotných žien (Farley a kol., 2009). 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). Bolo dokázané, že oocyt a embryo sú schopné metabolizovať pridaný cholesterol aj masťné kyseliny a syntetizovať vlastné steroly a lipidy (Ferguson a Leese, 2006). Predchádzajúce štúdie na cicavčích oocytoch a embryách dospeli k záverom, že množstvo intracelulárnych lipidov odráža ich kvalitu. Intracelulárne lipidy pozostávajú z množstva veľkých lipidových kvapiek, ktoré sú dôležitým energetickým prvkom počas maturácie oocytov, fertilizácie a počas delenia embrya (Barceló-Fimbres a Seidel 2011). Akumulácia lipidov v oocytoch a embryách sa stanovuje napríklad rôznymi kvantitatívnymi a semikvantitatívnymi metódami. V súčasnosti je najjednoduchšia technika kvantifikácie množstva lipidových kvapiek pomocou fluorescenčného farbenia prostredníctvom Nile Red farbičky (Genicot a kol., 2005; Leroy a kol., 2010).

## MATERIÁL A METODIKA

Na produkciu obéznych samíc sme použili dvojgeneračný dietetický model. Samice myši kmeňa ICR (Velaz, Praha, Česká republika) vo veku 4-6 týždňov sme po hormonálnej stimulácii pripustili k samcom rovnakého kmeňa. Fertilizované samice sme rozdelili na dve skupiny. Počas obdobia gravidity (21 dní) a po pôrode (od začiatku laktácie po odstav – 21



dni) boli matky v kontrolnej skupine kŕmené štandardnou peletovou diétou (M1) a matky v experimentálnej skupine kŕmené štandardnou diétou s prídavkom vysoko-energetického prípravku Ensure Plus *ad libidum*. Po odstave (21. deň veku zvierat) boli samice v kontrolnej a experimentálnej skupine kŕmené štandardnou laboratórnou diétou. Výsledkom tohto bola produkcia potomstva (F1 generácia) s vysokou predispozíciou pre vývin obezity v čase pohlavnej dospelosti (35. deň veku). V deň pohlavnej dospelosti (35. deň veku zvierat) bola samiciam F1 generácie vyšetovaná telesná hmotnosť a objem telesného tuku. Objem tuku bol zaznamenávaný pomocou EchoMRI (Echo Medical system, Houston, Texas). Samice boli na základe množstva telesného tuku rozdelené do 4 skupín: CN (7-8%) normálne kontrolné myši s fyziologickým obsahom telesného tuku, EXN (8-11%) normálne experimentálne samice s mierne zvýšeným množstvom telesného tuku, EXF (>11%) obézne experimentálne samice s vysokým obsahom telesného tuku a CL (<7%) chudé kontrolné samice so zníženým obsahom telesného tuku. Oocyty sme získali z 5-6 týždňových spontánne ovulujúcich F1 samíc, ktoré sme pripúšťali samcom toho istého kmeňa počas jedného týždňa. Každý deň sme kontrolovali prítomnosť vaginálnej zátky (plug) pre potvrdenie kopulácie. Oocyty sme izolovali o 8.00 a o 13.00 v deň identifikácie vaginálnej zátky (tzn. 6 a 11 h po predpokladanej ovulácii). Izolované oocyty s jedným polárnym telieskom a mitotickým vretienkom lokalizovaným excentricky boli klasifikované ako neoplozené MI oocyty. Izoláty s dvoma polárnymi telieskami s mitotickým vretienkom lokalizovaným excentricky sme klasifikovali ako oplodnené MII oocyty a izoláty s jedným alebo dvoma polárnymi telieskami obsahujúce dve prvojadrá alebo mitotické vretienko lokalizované v strede oocyty sme klasifikovali ako zygoty. Všetky ostatné jednobunkové izoláty s netypickou morfológiou (chýbajúce polárne teliesko, cytoplazmatická fragmentácia a i.) boli klasifikované ako nezrelé alebo degenerované oocyty.

Pre kvantifikáciu množstva lipidových kvapiek v oocytoch sme použili fluorescenčné farbenie NileRed. Farbičku sme nechali pôsobiť cez noc pri izbovej teplote. Priemerné množstvo tukových kvapiek sme hodnotili meraním integrovanej denzity fluorescenčného signálu zachyteného na mikro-fotografiách v programe Ellipse.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V deň pohlavnej dospelosti (35.deň veku zvierat) boli priemerné hodnoty telesného tuku a hmotnosti v skupine kontrolných samíc s fyziologickým objemom telesného tuku (CN)  $7.48 \pm 0.06$  % a  $22.45 \pm 0.31$ g. Signifikantne vyššie hodnoty telesného tuku a telesnej hmotnosti sme zaznamenali v skupine obéznych experimentálnych samíc s vysokým obsahom telesného tuku (EXF) ( $13.06 \pm 0.24$ %;  $P < 0.001$  a  $24.55 \pm 0.37$ g;  $P < 0.05$ ) v porovnaní s kontrolnými samicami. Štatisticky významne vyššie boli hodnoty telesného tuku aj v skupine experimentálnych samíc s mierne zvýšeným množstvom telesného tuku (EXN) oproti kontrolnej skupine ( $9.54 \pm 0.13$ %;  $P < 0.001$ ). Výsledky boli podobné údajom, ktoré uvádzajú iní autori v predchádzajúcej štúdií na potkanoch, ktorá využívala obdobný dietetický model (Šefčíková a kol., 2008; Levin et al., 1998). V skupine kontrolných chudých samíc so zníženým objemom telesného tuku sme zaznamenali významný pokles objemu telesného tuku ( $5.91 \pm 0.07$ %;  $P < 0.001$ ) a telesnej hmotnosti a ( $17.39 \pm 0.57$ g;  $P < 0.001$ ) v porovnaní s normálnou kontrolnou skupinou samíc.

Stereomikroskopickým hodnotením izolovaných oocytov sme zaznamenali vyšší priemerný počet izolovaných oocytov na matku v skupine experimentálnych samíc s mierne zvýšeným množstvom telesného tuku (EXN) v porovnaní s normálnou kontrolnou skupinou samíc (13.36 vs. 11.37;  $P < 0.05$ ). Tento výsledok uvádzajú aj iní autori (napr. Minge a kol., 2008). Jungheim a kol., (2010) však dokumentoval nižší počet izolovaných oocytov zo skupiny s vysoko-tukovou diétou.

Zistili sme, že množstvo telesného tuku ovplyvňuje distribúciu izolovaných oocytov. O 8.00 sme vyizolovali 56.14% oplodnených oocytov, 38.2% neoplodnených a 5.66% nezrelých oocytov v skupine normálnych kontrolných samíc (CN). Signifikantný rozdiel v distribúcii izolovaných oocytov sme zaznamenali medzi experimentálnou skupinou samíc so zvýšeným množstvom telesného tuku (EXN) a normálnou kontrolnou skupinou samíc (67.29% oplodnených, 29.44% neoplodnených a 3.27% nezrelých;  $P < 0.05$ ). Rozdiel v distribúcii izolovaných oocytov sme zaznamenali aj medzi skupinou obéznych experimentálnych (EXF) a kontrolných normálnych (CN) samíc (65.48% oplodnených, 28.33% neoplodnených a 6.19% nezrelých;  $P < 0.05$ ). V skupine normálnych kontrolných samíc (CN) sme o 13.00 vyizolovali 78.76% oplodnených oocytov, 19.19% neoplodnených a 2.05% nezrelých oocytov. Štatisticky významný rozdiel v distribúcii oocytov sme zaznamenali medzi experimentálnou skupinou obéznych (EXF) samíc oproti kontrolnej skupine normálnych samíc (75.41% oplodnených, 13.93% neoplodnených a 10.66% nezrelých;  $P < 0.01$ ). Rozdiel v distribúcii sme zaznamenali aj v skupine kontrolných samíc so zníženým množstvom telesného tuku (CL) v porovnaní s normálnou kontrolnou skupinou samíc (64.87% oplodnených, 32.43% neoplodnených a 2.7% nezrelých;  $P < 0.05$ ).

Akumulácia lipidových kvapiek v oocytoch a zygotách izolovaných z obéznych samíc (EXF a EXN) mala nižšiu integrovanú denzitu fluorescenčného signálu v porovnaní s normálnou kontrolnou skupinou s fyziologickým obsahom telesného tuku (CN) ( $25.06 \times 10^{-5} \pm 0.55$  a  $25.71 \times 10^{-5} \pm 0.40$  vs.  $28.27 \times 10^{-5} \pm 0.48$ ;  $P < 0.001$ ).

Na záver môžeme povedať, že množstvo telesného tuku signifikantne ovplyvňuje počet a distribúciu izolovaných oocytov i obsah naakumulovaných tukov v nich.

*Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0049/11 a APVV-0815-11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barcello-Fimbres M, Seidel G. Jr, Validation of quantitative fluorescence for determining lipid content of bovine blastocysts stained with Nile red dye. *Biol Reprod* 2007;77:87–88.
- Binder NK, Mithell M, Gardner DK. Parental diet-induced obesity leads to retarded early mouse embryo development and altered carbohydrate utilisation by the blastocysts. *Reprod Fertil Dev* 2012; 24:804-812.
- Farley D, Tejero ME, Comuzzie AG, Higgins PB, Cox L, Werner SL, Jenkins SL, Li C, Choi J, Dick EJ, Hubbard GB, Frost P, Dudley DD, Ballesteros B, Wu G, Nathanielsz PW, Schlabritz-Loutsevitch NE. Feto-placental adaptations to maternal obesity in the baboon. *Placenta* 2009; 30:752-760.
- Ferguson EM, Leese HJ. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. *Mol Reprod Dev.* 2006 ;73:1195-1201.
- Genicot G, Leroy JLMR, Van Soom A, Donnay I. The use of a fluorescent dye, Nile red, to evaluate the lipid content of single mammalian oocytes. *Theriogenology* 2005;63:1181–1194.
- Jungheim ES, Schoeller EL, Marquard KL, Loudon ED, Schaffer JE, Moley KH. Diet-induced obesity model: Abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology* 2010; 151:4039-4046.
- Leroy JL, Van Hoeck V, Clemente M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Van Soom A, Uytterhoeven M, Bols PE. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Hum Reprod* 2010; 25:768-778.
- Levin BE, Kessey RE. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *AM J Physiol* 1998, 274: 412-419.
- Minge CE, Bennett BD, Norman RJ, Robker R. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology* 2008; 149: 2646-2656.
- 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.
- 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.
- Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction. *Biol Reprod* 2007; 77:190-201.

# FAKTORY VPLYVAJÚCE NA ÚČINNOSŤ VAKCINÁCIE U MAČIEK

Kulichová L., Mojžišová J., Vojtek B., Smrčo P.

Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach

## ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo sledovanie vplyvu prípravku Aminex (kationické peptidy a dietárne nukleotidy) na tvorbu špecifických protilátok po vakcinácii mačiek proti panleukopénii mačiek (FPV), mačaciemu kalicivírusu (FCV) a mačaciemu herpesvírusu (FHV). Mačky boli rozdelené do skupín: skupina A - v ktorej bol podávaný Aminex po dobu štyroch mesiacov, skupina K - bez Aminexu. Špecifické protilátky po vakcinácii sme hodnotili ELISA testami na detekciu protilátok. Významné zmeny v tvorbe protilátok ( $p < 0,01$ - $p < 0,05$ ) sme pozorovali v tvorbe protilátok proti mačaciemu herpesvírusu, mačaciemu kalicivírusu a mačaciemu panleukopénii vírusu. Protekčné hladiny protilátok boli dosiahnuté v skupine A skôr ako v skupine K. Naše výsledky ukazujú, že látky na báze dietárnych nukleotidov a kationických peptidov majú priaznivý vplyv pri stimulácii špecifickej imunity a môžu byť užitočné pri prevencii proti mačacím infekčným chorobám.

## ÚVOD

Účinnosť vakcinácie je možné zvyšovať používaním imunostimulačných látok, ktorými rozumieme látky schopné modifikovať imunologickú odozvu na rôznom stupni. Najčastejšie sú používané pri terapii infekčných chorôb alebo pri náprave narušenej funkcie imunitného systému (Greene, 2006). Imunomodulátory podľa pôvodu delíme na látky biologického pôvodu (vitamíny, extrakty húb alebo izoláty z baktérií), produkty imunitného systému (interferóny, lymfokíny, rastové faktory) a syntetického pôvodu (levamizol, izoprinosín). Nukleotidy pozitívne ovplyvňujú lipidový metabolizmus, imunitný systém, rast, vývoj a reparáciu tkaniva (Gil, 2001). Rýchlo proliferujúce tkanivá, ako imunitný systém alebo črevné tkanivo, využívajú nukleotidy alebo dusíkaté bázy z potravy, preto ich príjem v potrave pomáha udržiavať rast a bunkové funkcie v týchto tkanivách (Gil, 2001). Kationické peptidy sa vyznačujú antimikrobiálnou a imunomodulačnou aktivitou.

## MATERIÁL A METODIKA

**Skupina A** – 8 zdravých mačiek, vek 7-8 týždňov, rôzneho plemena a pohlavia, zvieratám bol podávaný prípravok na báze kationických peptidov a dietárnych nukleotidov (Aminex, UNIREGEN spol. s.r.o. ČR) vo forme kvapiek, *per os* v dávke 1 kvapka/1kg po dobu štyroch mesiacov. **Skupina K** – 8 zdravých mačiek, vek 7-8 týždňov, rôzneho plemena a pohlavia, bez aplikácie Aminexu.

Zvieratá boli chované v rovnakých zoohygienických podmienkach, kŕmené štandardným komerčným krmivom vo forme granúl. Na odčervenie bol použitý prípravok Vitaminthe pasta a.u.v. (Virbac S.A., Francúzsko) v dávke 0,5 ml/1kg. Všetky zvieratá boli vakcinované podľa štandardnej vakcinačnej schémy: primovakcinácia (Fellocel CVR) bola vykonaná v 9.týždni veku (0.odber), revakcinácia (Felocell CVR) v 12.týždni veku (21.odber) a druhá revakcinácia (Rabisin, Merial) bola uskutočnená v 15. týždni veku (42.odber). Odber krvi: bol robený punkciou *v.jugularis* alebo *v.cephalica antebrachii*.

Serologická diagnostika: špecifické protilátky sme detekovali : proti panleukopénii mačiek pomocou Feline Panleucopenia Virus Antibody ELISA, proti herpesvírusovej chorobe mačiek pomocou Feline Herpes Virus Antibody ELISA a proti kalicivírusovej chorobe mačiek pomocou Feline Calici Virus Antibody ELISA (B.V. European Veterinary Laboratory EVL).

Štatistická analýza: Mann-Whitney test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke č.1-3 sú uvedené hladiny protilátok proti herpesvírusu, kalicivírusu a panleukopénii u mačiek a ich štatistické porovnanie medzi obidvoma skupinami. Vakcinácia proti hore uvedeným chorobám bola vykonaná u obidvoch skupín na 0.deň a 21.deň. Mierny nárast hladiny protilátok proti herpesvírusu (tab.1) sme zaznamenali na 42.deň u skupiny A. Signifikantné rozdiely v tvorbe protilátok sme zaznamenali vo všetkých odberoch, ale v 21.dni a 42.dni odberu boli odbery štatisticky významné ( $p < 0,01$ ). Protekčná hladina bola dosiahnutá u skupiny A na 42.deň odberu teda 21 dní po booster vakcinácii oproti skupine K. V skupine bez aplikácie Aminexu bola protekčná hladina protilátok dosiahnutá až na 72.deň pokusu teda 42 dní po booster vakcinácii.

**Tabuľka č.3: Titre protilátok proti herpesvírusovej chorobe mačiek a štatistické porovnanie medzi skupinami**

FHV	0.deň	21.deň	42.deň	72.deň
Skupina A	0,511 +/- 0,04	0,562 +/- 0,02	0,948 +/- 0,05	1,32 +/- 0,163
Skupina K	0,426 +/- 0,03	0,476 +/- 0,03	0,666 +/- 0,06	1,04 +/- 0,10
	*	**	**	*

Zdroj: vlastná tabuľka

Mierny nárast hladiny protilátok calicivírusu (tab.2) u skupiny A zaznamenávame od 42.dňa odberu. Signifikantné rozdiely v tvorbe protilátok sme zaznamenali na 42.deň ( $p < 0,01$ ) a 72.deň ( $p < 0,01$ ) odberu v porovnaní so skupinou K. Protekčná hladina bola dosiahnutá v skupine A na 42.deň odberu teda 21.dní po booster vakcinácii oproti skupine K, kde protekčná hladina bola dosiahnutá až na 70.deň odberu teda 42.dní po booster vakcinácii.

**Tabuľka č.4: Titre protilátok proti calicivírusovej chorobe mačiek a štatistické porovnanie medzi skupinami**

FCV	0.deň	21.deň	42.deň	72.deň
Skupina A	0,119 +/- 0,02	0,105 +/- 0,01	0,193 +/- 0,08	0,406 +/- 0,06
Skupina K	0,122 +/- 0,01	0,144 +/- 0,04	0,164 +/- 0,01	0,326 +/- 0,06
	ns	ns	**	**

Zdroj: vlastná tabuľka

Mierny nárast hladiny protilátok proti panleukopénii (tab.3) u skupiny A zaznamenávame od 21.dňa odberu u obidvoch skupín. Signifikantné rozdiely v tvorbe protilátok sme zaznamenali na 21.deň ( $p < 0,05$ ), 42.deň ( $p < 0,01$ ) a 72.deň ( $p < 0,05$ ) odberu v porovnaní so skupinou K. Protekčná hladina bola dosiahnutá v skupine A na 42.deň odberu teda 21.dní po booster vakcinácii oproti skupine K, kde protekčná hladina bola dosiahnutá až na 70.deň odberu teda 42.dní po booster vakcinácii.

**Tabuľka č.5: Titre protilátok proti panleukopénii mačiek a štatistické porovnanie medzi skupinami**

FPV	0.deň	21.deň	42.deň	72.deň
Skupina A	233,3 +/- 12,2	283,3 +/- 186,1	750 +/- 464,7	1200 +/- 367,4
Skupina K	116,6 +/- 51,6	233,3 +/- 172,2	400 +/- 122,4	900 +/- 492,5
	ns	*	**	*

Zdroj: vlastná tabuľka

V našej práci sme sledovali vplyv komerčného prípravku Aminex na tvorbu špecifických protilátok po vakcinácii. Zaznamenali sme významné zvýšenie hodnôt hladiny protilátok a protekčná hladina bola dosiahnutá rýchlejšie u skupiny s aplikáciou Aminexu. Podobné štúdie na zvieratách taktiež zaznamenali zvýšenie adaptívnosti antigén-špecifickej imunity (Tani et al., 2000). Vo všeobecnosti môžu kationické peptidy priamo alebo nepriamo podporovať tvorbu neutrofilov, monocytov, žírnych buniek, T-buniek a eozinofilov (Bowdish et al., 2005). Kulkarni et.al. (1994) uvádzajú, že absencia nukleotidov spôsobuje významný pokles v mnohých špecifických a nešpecifických imunologických reakciách. Kombinácia nukleotidov a peptidov sú rýchlo rozvíjajúce sa potenciálne nové liečivá, ktoré môžu priamo usmrtiť patogény a/alebo modifikovať imunitnú odpoveď (Mookherjee et al., 2012).

*Práca vznikla za podpory VEGA 1/0835/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- BOWDISH, D.M. et. Al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. In *J. Leukocyte Biol.* ISSN 0741-5400, 2005, vol.77. no. 4, p.451-459.
- GIL A (2001): New additions to infant formulas. In: *Pediatric Gastroenterology and Nutrition in Clinical Practice*, ed. C Lifschitz, pp 113–135. New York: Marcel Dekker.
- GREENE, C. E. et al. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders, 2006. 1376 s. ISBN 1416061304.
- KULKARNI, A. D. et. Al. The role of dietary sources of nucleotides in immune function: a review. In *J Nutr.* ISSN 0022-3166, 1994, vol. 124, no.8 Suppl., p., 1442-1446.
- MOOKHERJEE, N., CHOW, L.N.Y., HANCOCK, R.E.W.: Immunomodulatory Cationic Peptide Therapeutics: A New Paradigm in Infection and Immunity. In: *Small Wonders: Peptides for Disease Control*; Rajasekaran, K., et al.; ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC, 2012.
- TANI, K. et.al. Defensins act as potent adjuvants that promote cellular and humoral immune response in mice to a lymphoma idiotype and carrier antigens. In *Int.Immunol.* ISSN 0953-8178, 2000, vol.12, no.5, p.691-700.



# HPLC V ANALÝZE REZÍDUIÍ KOKCIDIOSTATÍK V POTRAVINÁCH ŽIVOČÍŠNEHO PŮVODU

Maďarová M., Kožárová I.

*Katedra hygieny a technológie potravín, UVL a F v Košiciach*

## ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo priblížiť historický vývoj vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie s rôznymi typmi detektorov používaných v analýzach rezíduí kokcidiostatík v živočíšnych produktoch. V minulosti boli často používané metódy vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie spojenej s spektrofotometrickým detektorom alebo s fluorescenčným detektorom, ale v súčasnosti najpoužívanejšou technikou je kombinácia kvapalinovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou pre jej schopnosť stanoviť rezíduá veterinárnych liečiv rôznych skupín vedľa seba jedným analytickým postupom.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: HPLC, vývoj, kokcidiostatiká

## ÚVOD

Kokcidióza je nákazlivé infekčné ochorenie, ktoré postihuje mnoho druhov hospodárskych zvierat, najmä hydinu. Niektoré jej príznaky sú hnačka, spomalenie rastu, zníženie produkcie až smrť. Aj mierna forma tohto ochorenia má negatívny vplyv na hydinárske priemysel, obzvlášť na veľkých farmách s intenzívnym chovom, kde môžu byť ekonomické straty veľmi veľké. Prevenciou tohto ochorenia sa významne prispieva k ochrane zdravia zvierat a starostlivosti o zvieratá (Huet a kol., 2013).

Na liečbu a prevenciu tohto ochorenia sa používajú kokcidiostatiká, ktoré sú buď kokcidiostatické zastavujúce rast intracelulárnych štádií kokcií alebo kokcidiocídne devitalizujúce kokcie počas ich vývoja (Váczi, 2008). Z hľadiska pôvodu sa delia do dvoch skupín: biosyntetické látky (antibiotiká polyetérového typu), ako je monenzín, narazín, salinomycín, lasalocid, maduramycín a semduramycín a syntetické látky a deriváty prírodných látok, ako je dekokochinát, robenidín, halofuginón, nikarbazín, diklazuril, sulfónamidy a iné (Šnirc a kol., 2007). Používanie kokcidiostatík je spojené s rizikom výskytu rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu, preto kokcidiostatiká je potrebné používať v predpísaných koncentráciách a počas určitého časového intervalu ako pre brojlerov, tak aj pre mladé kurčatá (Mortier a kol., 2005). Dodržiavaním ochranných lehôt sa môže zabrániť prestupu rezíduí kokcidiostatík do potravinových produktov (Kan a kol., 2007). Pri výrobe krmív, ktoré obsahujú kokcidiostatiká, ako doplnkové látky, môže dôjsť ku krížovej kontaminácii kokcidiostatík z cieľového krmiva do necieľových krmív pri použití rovnakých výrobných liniek. Príliš vysoká koncentrácia kokcidiostatík v necieľových krmivách by mohla poškodiť zdravie ako necieľových druhov zvierat, tak aj zdravie spotrebiteľa (Vincent a kol., 2011). Preto v záujme ochrany zdravia ľudí platia aj pre kokcidiostatiká nasledovné právne predpisy: Smernica Rady č. 96/23/ES o monitorovaní určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch, nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 o stanovení postupov Spoločenstva na určenie maximálnych limitov rezíduí farmakologicky účinných látok v potravinách živočíšneho pôvodu a rozhodnutie Komisie č. 2002/657/ES týkajúceho sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov.

## HISTORICKÝ VÝVOJ HPLC

Analýza rezíduí zlúčenín v potravinách živočíšneho pôvodu je relatívne mladou disciplínou. V Beneluxe (Belgicko, Holandsko a Luxembursko) analýzy rezíduí veterinárnych liečiv začali koncom 60. rokov a na začiatku 70. rokov 20. storočia. Výskum rezíduí veterinárnych liečiv a kontroly po porážke zvierat vo väčšine európskych krajín začal neskôr. V skorých 70. rokoch 20. storočia sa chromatografia na tenkej vrstve (TLC) používala pre kvalitatívnu



detekciu zakázaných látok (tyreostatiká a niektoré anaboliká) (De Brabander a kol., 2009). Najviac používanou bola chromatografia na tenkej vrstve s mikrobiologickou detekciou (TLC/B), napr. bakteriálnym kmeňom *Bacillus subtilis*, ktorou bolo možné zvýšiť citlivosť a špecifickosť tejto metódy (Tkáčiková, 2010). TLC bola použitá na stanovenie ako polyéterových ionofórov, tak aj chemických kokcidostatík v krmivách a v živočíšnych produktoch.

Historicky najviac metód popísaných na analýzu kokcidostatík predstavujú metódy kvapalinovej chromatografie s spektrofotometrickým detektorom (HPLC-UV/VIS) a kvapalinovej chromatografie s fluorescenčným detektorom (HPLC-FLD), ale s obmedzeným počtom stanovenia kokcidostatík (max. štyri) v živočíšnych produktoch jedným analytickým postupom. HPLC s UV/VIS detekciou bola využívaná v polovici 70. rokov 20. storočia, ale prvé zariadenia boli drahé. Stanovenie niektorých rezíduí kokcidostatík, napr. diklazurilu, nikarbazínu, robenidínu, halofuginónu a lasalocidu technikou HPLC-UV/VIS je možné priamo bez chemickej predúpravy analytu, ale stanovenie ostatných polyéterových ionofórov nie je možné priamo. Je potrebná ďalšia chemická úprava, napr. derivatizácia, nakoľko na dosiahnutie absorpcie v UV oblasti je nutná napr. väzba chromofóru. HPLC s FLD detekciou bola aplikovaná neskôr. Techniku HPLC-FLD je možné použiť bez chemickej predúpravy analytu len pri stanovení lasalocidu. Ostatné kokcidostatiká sú detekovateľné touto technikou len po ich derivatizácii (Toldrá a kol., 2006, Tkáčiková, 2010).

Počas 90. rokov 20. storočia sa objavuje na trhu cenovo prístupná plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS). Prechod z TLC a HPLC na GC-MS metódu je značný (De Brabander a kol., 2009). Hoci plynovej chromatografii chýba u rezíduí kokcidostatík vysoká rozlišovacia účinnosť, je schopná separovať zlúčeniny so širokým rozsahom chemických a fyzikálnych vlastností (Rokka a kol., 2007). Na konci 90. rokov 20. storočia kvapalinová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS) patrí k štandardným zariadeniam v laboratóriách (De Brabander a kol., 2009). Nastupujú predovšetkým hmotnostné spektrometre s jednoduchým kvadrupólom, neskôr tandem hmotnostná spektrometria s hmotnostnými analyzátormi typu kvadrupól, potom prvá generácia iónových pascí a nakoniec vysoko rozlišovacie hmotnostné spektrometre ako napr. Time-of-Flight (TOF) s rôznymi typmi ionizačných zdrojov napr. (ESI, APCI, MALDI a iné), ktoré umožňujú stanovenie viacerých polyéterových ionofórov a chemických kokcidostatík jedným analytickým postupom vedľa seba. Wang a kol. (2000) na analýzu kokcidostatík v krmive pre hydinu použili techniku matrix-assisted laser ionization Time-of-Flight hmotnostnú spektrometriu (MALDI-TOF-MS).

Najnovší vývoj v oblasti kvapalinovej chromatografie patrí vývoju nových menších kolón so zmenšenou veľkosťou stacionárnej fázy, ako aj použitie vyšších tlakov, čo umožňuje značné zníženie elučných časov, čím sa výrazne zvýši počet analyzovaných vzoriek za deň. Napr. ultra vysoko účinná kvapalinová chromatografia s tandem hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-MS/MS) je založená na princípe využitia stacionárnej fázy obsahujúcej častice menšie ako 2,5  $\mu\text{m}$  (kým HPLC kolóny obsahujú častice vo veľkosti 3 až 5  $\mu\text{m}$ ) patrí medzi tieto nové techniky pri analýze rezíduí kokcidostatík v živočíšnych produktoch. Známa je aj kombinácia ultraúčinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC) s TOF hmotnostným analyzátorom pre multireziduálnu analýzu poskytujúcu maximálne a jednoznačné potvrdenie pozitívnych nálezov rezíduí kokcidostatík v živočíšnych produktoch (Huet a kol., 2013).

Výhody vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie sú: citlivosť, špecifickosť v závislosti od detektora, krátky čas získania výsledku a automatizácia systému vedúca k vyššej produktivite. Nevýhody sú: dôsledná potreba prípravy vzorky (napr. aj derivatizácia), vyššia počiatková investícia na zariadenie, vyššie náklady na kolóny, obmedzené stanovenie viacerých kokcidostatík vedľa seba jedným analytickým postupom a potrebná odbornosť. Výhody

kvapalinovej chromatografie s tandem hmotnostnou spektrometriou je jednoznačná identifikácia prítomnosti analytov, schopnosť stanoviť viaceré rezíduá kokcidiostatík rôznych fyzikálnych a chemických vlastností vedľa seba jedným analytickým postupom, jednoduchšia príprava vzorky, významné zníženie času analýzy a zvýšenie počtu analyzovaných vzoriek (napr. použitím novších kolón).

*Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠ SR č. 1/0939/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- De Brabander H F, Noppe H, Verheyden K, Vanden Bussche J, Wille K, Okerman L, Vanhaecke L, Reybroeck W, Ooghe S, Croubels S. Residue analysis: Future trends from a historical perspective. *Journal of Chromatography A*. 2009; 1216: 7964-76.
- Huet A C, Bienenmann-Ploum M, Vincent U, Delahaut P. Screening methods and recent developments in the detection of anticoccidials. *Anal Bioanal Chem* DOI 10.1007/s00216-013-7035-6.
- Kan C A, Meijer G A L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 133: 84-108.
- Mortier L, Daeseleire E, Peteghem C V. Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B*. 2005; 820: 261-70.
- Nariadenie Európskeho Parlamentu a Rady (ES) č. 470/2009 z 6.mája 2009 o stanovení postupov Spoločenstva na určenie limitov rezíduí farmakologicky účinných látok v potravinách živočíšneho pôvodu. In: *Úradný vestník Európskej únie* 2009; L 152/11: 1-12.
- Rokka M, Jestoi M, Eerola S. Liquid chromatography with conventional detection. In: Picó Y. *Food Toxicants Analysis: Techniques, Strategies and Developments*. Netherlands : Elsevier. 2007; 475-508.
- Rozhodnutie Komisie č. 2002/657/ES z 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov. In: *Úradný vestník Európskych spoločenstiev* 2002; L 221/8: 1-29.
- Smernica Rady (ES) č. 96/23 z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch. In: *Úradný vestník Európskych spoločenstiev* 1996; L 125/10: 1-32.
- Šnirc J, a kol. Antikokcidiká. In: *Klinická veterinárna farmakológia*. Martin : Neografie. 2007; 166-81. ISBN 978-80-88892-75-5
- Tkáčiková S. Využitie metódy HPLC pri stanovení hladín rezíduí vybraných moderných antikokcidík v potravinovom reťazci. Dizertačná práca. Košice : UVLF v Košiciach. 2010; 126 s.
- Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science and Technology*. 2006; 17: 482-89.
- Váczi P. Antiprotozoiká. In: Čonková E, a kol. *Veterinárska farmakológia*. I. diel. 1. vyd. Košice: Vienala s.r.o., 2008; 132-43. ISBN 978-80-8077-102-7
- Vincent U, Ezerskis Z, Chedin M, Von Holst CH. Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011; 54: 526-34.
- Wang J, Sporns P. MALDI-TOF-MS Quantification of Coccidiostats in Poultry Feeds. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 2000; 48: 2807-11.

# VARIÁCIE ODTOKU LYMFY Z *LYMPHOCENTRUM MESENTERICUM CAUDALE* U KRÁLIKA

Maloveská M., Krešáková L., Vdoviaková K.

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

## ABSTRAKT

V našej práci sme sa sústredili na sledovanie odtoku lymfy z uzlín tvoriacich *lymphocentrum mesentericum caudale*, ktoré odvádzajú miazgu z *colon descendens* a väčšej časti *recta* u králika. Podrobné štúdium toku miazgy na animálnom modeli môže pomôcť pri získavaní poznatkov o lymfatickej drenáži v humánnej medicíne. Oblasť hrubého čreva a konečníka patrí medzi najčastejšie malignitami postihnuté úseky tráviaceho ústrojenstva u ľudí. Lymfogénnej disseminácii sa v ostatnom čase prikladá stále väčší význam a zistenie stupňa postihnutia regionálnych lymfatických uzlín je kľúčovým znakom pre tvorbu liečebného plánu ako aj významným prognostickým faktorom.

Po intersticiálnej injekcii tušu do črevnej steny (bohatá sieť lymfatických kapilár je v podslizničnom väzive) sme boli schopní pozorovať prívodné ako aj odvodné lymfatické cievy kaudálnych okružových uzlín. Zistili sme, že *vasa lymphatica efferentia* vystupujúce z *lnn. mesenterici caudales* v 11 prípadoch (91,7%) vstupovali priamo do *trunci lumbales*. Z toho v šiestich prípadoch (54,5%) ústili do *trunci lumbales* v oblasti vstupu v *testicularis dextra* do *v. cava caudalis*. V piatich (45,5%) prípadoch bolo vyústenie posunuté kraniálnejšie. U jedného králika (8,3%) viedli *vasa efferentia* lymfu kaudálnym smerom do *lnn. iliaci mediales*. Zistili sme 2 *trunci lumbales* prebiehajúce po pravej a ventrálnej ploche v *v. cava caudalis*.

Ani v jednom prípade sme nezaznamenali priamy vstup lymfy do *cisterna chyli*.

## ÚVOD

Teória mechanizmu vzniku lymfy popísaná austrálskymi morfológmi John R a Judith R Casley – Smith v roku 1967 je uznávaná dodnes (Nickel R., 1981). Tkanivový mok, ktorý z interstícia nebol vstrebaný venóznymi kapilármi vstupuje do slepo zakončených lymfatických kapilár a stáva sa lymfou. Lymfa je odvádzaná sieťou lymfatických kapilár a následne lymfatickými cievami do lymfatických kmeňov. Lymfatické kmene sa spájajú a tvoria dva hlavné miazgovody – *ductus thoracicus* a *ductus lymphaticus dexter*, prostredníctvom ktorých lymfa vstupuje do žilového systému (Lešník, Danko, 2005). Do priebehu lymfatických ciev sa zaraďujú lymfatické uzliny. Podľa smeru toku lymfy k miazgovej uzline, alebo od nej rozlišujeme aferentné (prívodné) a eferentné (odvodné) lymfatické cievy (König – Liebich, 2002). Lymfatická uzlina, alebo skupina lymfatických uzlín, ktoré sa konštantne nachádzajú v rovnakej oblasti a prijímajú lymfu z jedného regiónu u všetkých druhov zvierat sa označuje ako lymfocentrum (Constantinescu M. G. a Schaller O., 2007).

Kaudálne okružové uzliny (*lnn. mesenterici caudales*) je skupina uzlín uložených v závese *colon descendens*, v oblasti rozvetvovania sa *a. mesenterica caudalis* na *a. rectalis cranialis* a *a. colica sinistra* (Popesko P., 1992). Ich tributárna oblasť zahŕňa *colon descendens* a podstatnú časť rekta.

Cieľom tejto práce bolo pozorovať odtok lymfy z kaudálnych okružových miazgových uzlín u králika (*Oryctolagus cuniculus*), ktorý je aj v dnešnej dobe najbežnejšie používaným laboratórnym zvieratom využívaným na výskumné účely v oblasti fyziológie, farmakológie a experimentálnej patológie (Barone R., 1973). Záujem u štúdium tejto skupiny lymfatických uzlín nadväzuje na skutočnosť, že *lnn. mesenterici inferiores* u človeka patria k spádovým lymfatickým uzlinám pri nádoroch hrubého čreva a konečníka u ľudí (Lešník, Danko, 2005). Frekvenciou výskytu a úmrtnosťou patria zhubné nádory hrubého čreva a konečníka medzi 3

najčastejšie sa vyskytujúce malignity (Pleško I. a kol., 2012). Chirurgická liečba pozostáva z resekcie určitého úseku čreva s tumorom a regionálnymi lymfatickými uzlinami. Rozsah resekcie vo veľkej miere ovplyvňuje aj lymfatická drenáž. Nedostatočná disekcia lymfatických uzlín pri primárnej operácii môže viesť k lokálnym recidívam (Kroupa K., 2006).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili 12 králikov samčieho pohlavia vo veku 12 –14 týždňov. Eutanázia bola vykonaná embutramidom (T 61) v dávke 0,3ml/kg i.v. Incíziou vedenou priečne cez *m. biceps femoris* sme sprístupnili zákolennú lymfatickú uzlinu uloženú v malom množstve tukového tkaniva, nad hlavami *m. gastrocnemius* v uhle medzi *a. et v. caudalis femoris* a *v. saphena lateralis* (Popesko a kol., 1990). Preparáciu vykonáme opatrne, aby došlo čo k najmenšiemu poškodeniu okolitého tkaniva, najmä lymfatických kapilár a ciev. Rovnako si sprístupníme *ln. popliteus* aj na druhej panvovej končatine. Keďže sieť lymfatických kapilár a ciev je voľným okom takmer neviditeľná je nevyhnutné na ich zvýraznenie použiť kontrastnú látku. Do vypreparovaných zákolenných uzlín pomaly injikujeme farbivo (tuš). Tento úkon smeruje k zviditeľneniu priebehu driekových kmeňov (*trunci lumbales*) a chylovej nádržky (*cisterna chyli*). Následne otvoríme brušnú dutinu a v okruží zostupného kolónu vyhľadáme lymfatické uzliny a popíšeme ich tvar a veľkosť. Prevedieme intersticiálny nástrek zostupného kolónu a hornej časti konečníka. Postup tušu nám umožňuje sledovať postup lymfy. Výsledky priebežne dokumentujeme digitálnym fotoaparátom CANON – POWER SHOT SX 40 HS a operačným mikroskopom LEICA M 320. Pri pomenovaní jednotlivých anatomických štruktúr použijeme posledné vydanie NAV (Danko a kol., 2011).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kaudálne okružové miazgové centrum (*lymphocentrum mesentericum caudale*) je u králika tvorené skupinou 2 až 4 lymfatických uzlín, oválneho tvaru (Obr. č. 1) v najdlhšom rozmere 3 – 4 mm veľké (Barone R., 1996).

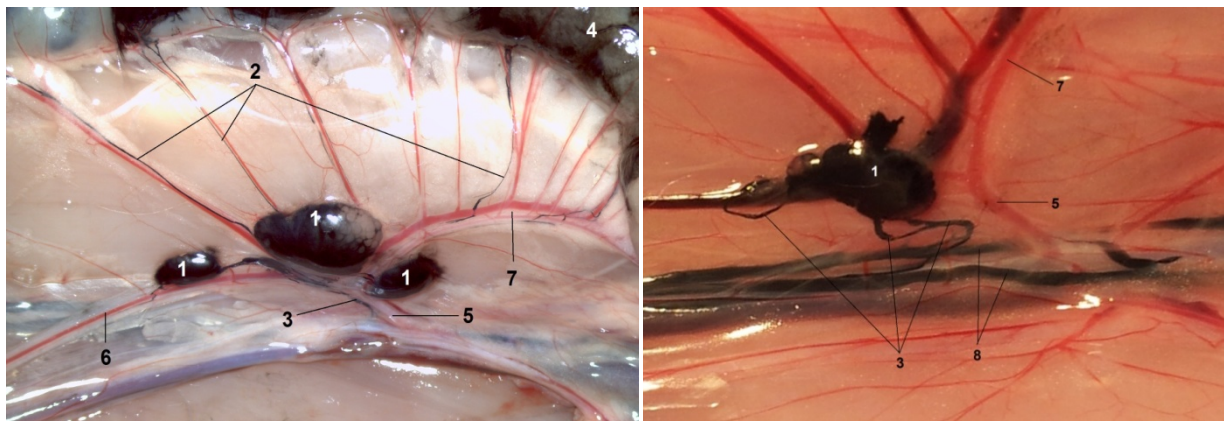
Podľa autorov Barone (1996) a Nejedlý (1965), sa u králika *vasa efferentia* z *lnn. mesenterici caudales* konvergentne zbiehajú a vlievajú do kaudálneho konca chylovej nádržky. Autori Kočíšová M. a kol. (1988) popisujú postup odvodných lymfatických ciev do *trunci lumbales*. Len z kaudálnej časti konečníka vyúsťovali do prístredných bedrových miazgových uzlín (*lymphonodi iliaci mediales*).

Z našich pozorovaní vyplynulo nasledovné.

Lymfatické uzliny spomínaného lymfocentra sa vyskytovali u králikov v počte 3 – 4, vo veľkosti šošovice až malej fazule (max. dĺžka 8 mm). Dva driekové lymfatické kmene prebiehali paralelne s *v. cava caudalis* a *aorta abdominalis* a na mnohých miestach boli poprepájané (Obr. č. 2). Zároveň sme dospeli k záveru, že *vasa lymphatica efferentia* vystupujúce z *lnn. mesenterici caudales* v 11 prípadoch (91,7%) vstupovali priamo do *trunci lumbales*. Z toho v šiestich prípadoch (54,5%) ústili do *trunci lumbales* v oblasti vstupu *v. testicularis dextra* do *v. cava caudalis*. V piatich (45,5%) prípadoch bolo vyústenie posunuté kraniálnejšie. U jedného králika (8,3%) viedli *vasa eferentia* lymfu kaudálnym smerom do *lnn. iliaci mediales*, uložených v mieste terminálneho rozvetvenia brušnej aorty. Ani v jednom prípade sme nezaznamenali priame vyústenie *vasa efferentia* do *cisterna chylii*, alebo iných lymfatických kmeňov v brušnej oblasti. Z pozorovaní môžeme konštatovať, že lymfa je zo sledovanej oblasti v 91,7% prípadov privádzaná do dobre vyvinutých lymfatických kmeňov bez prechodu ďalšími nadradenými lymfatickými uzlinami.



*Inn. mesenterici caudales* uložené v mieste vetvenia sa *a. mesenterica cranialis* so zobrazením prívodných (Obr. č. 1) a odvodných (Obr. č. 2) lymfatických ciev.



1. *Inn. mesenterici caudales*
2. *vasa lymphatica afferentia*
3. *vasa lymphatica efferentia*
4. *colon descendens*

5. *a. mesenterica caudalis*
6. *a. colica sinistra*
7. *a. rectalis cranialis*
8. *trunci lumbales*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Vigot Frères Paris. 1996; 853.
- Barone R, Pavaux C, Blin P.C, Cuo P. Atlas D'Anatomie du Lapin. Masson et cie. Paris. 1973;1–143.
- Constantinescu G, Schaller O. Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature. 3<sup>rd</sup> revised edition. Enke Verlag Stuttgart. 2012; 402.
- Danko J, Šimon F, Artimová J. Nomina Anatomica Veterinaria. UVLF Košice. 2011
- Kočíšová M, Schmidtová K, Munka V, Gregor A. Regionálne lymfatické uzliny orgánov panvy kráľíka. Folia Fac. Med. Univ. Safarikianae cassoviensis. 1988; 15: 33–39
- Kroupa K. Zásady a možnosti chirurgickej liečby kolorektálneho karcinómu. Onkológia. 2006; 1: 42–50.
- König H. E, Liebich H.-G. Anatomia domácich cicavcov, 2. Hajko & Hajková Bratislava, 1999; 196.
- Lešník F, Danko J. Medicínska lymfológia. Hajko & Hajková Bratislava. 2005.
- Nejedlý K. Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Státní pedagogické nakladatelství Praha. 1965; 473.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E. The Circulatory System, the Skin and the Cutaneous Organs of the Domestic Mammals. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg. 1981; 298.
- Pleško I, Hlava P, Safaei Diba Ch. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2007. NZCI Bratislava 2012;
- Popesko P. Anatomia hospodárskych zvierat. Príroda Bratislava. 1992;410.
- Popesko P, Rajtová V, Horák J. Atlas anatomie malých laboratórných zvierat 1. Príroda Bratislava. 1990; 133.

# ZMENY SÉROVÝCH PROTEÍNOV U JAHNIAT V PRIEBEHU PRVÉHO MESIACA ŽIVOTA

Nagyová V., Šoltéssová H., Tóthová Cs., Nagy O.  
*Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Sérové proteíny plnia v organizme mnoho dôležitých funkcií a ich koncentráciu ovplyvňuje viacero fyziologických a patologických faktorov. Len málo stavov ovplyvňuje koncentráciu všetkých bielkovín, preto je výhodné sledovať zmeny v jednotlivých frakciách. Cieľom tejto štúdie je stanoviť fyziologické hodnoty celkových bielkovín, ako aj jednotlivých frakcií sérových proteínov u jahniat do 1. mesiaca života. V experimente bolo použitých 7 jahniat vo veku od 0 do 30 dní. Vzorky krvi boli odoberané punkciou *vena jugularis* v čase 0 (pred napitím kolostra), 24, 48 hodín, 7, 14 dní a 1 mesiac po narodení. Vzorky boli centrifugované a zo séra bola stanovená koncentrácia celkových bielkovín spektrofotometricky a metódou elektroforézy (EF) v agarózovom géli jednotlivé frakcie sérových proteínov. Pomocou EF sa bielkoviny rozdelili do piatich frakcií - albumín,  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -globulíny. Vyhodnotením získaných výsledkov sme zistili štatisticky významné rozdiely v koncentrácii celkových bielkovín, tiež vo všetkých frakciách ako aj v pomere Albumín/Globulíny počas sledovaného obdobia. Vekovo špecifické referenčné intervaly sérových proteínov a ich frakcií môžu napomôcť pri laboratórnej diagnostike niektorých ochorení u jahniat. Je však potrebné rozšíriť tento experiment na väčší počet zvierat a širšie časové obdobie.

## ÚVOD

Prevažná časť sérových bielkovín je syntetizovaná v pečeni a odtiaľ sú secernované do krvi. Ďalšie druhy proteínov séra sa tvoria predovšetkým v lymfocytoch, enterocytoch a pod. (Turecký a kol., 2002). Sérové bielkoviny plnia rôzne funkcie. Podieľajú sa na udržiavaní onkotického tlaku krvi, pôsobia ako transportné molekuly minerálov, lipidov a katabolitov, zabezpečujú špecifickú ako aj nešpecifickú obranu proti infekciám, chránia organizmus pred voľnými radikálmi. Patria sem tiež enzýmy a inhibítory enzýmov (Racek, 2006). Viaceré ochorenia môžu spôsobiť zmeny v koncentrácii albumínu a globulínov. Jedným z cenných diagnostických prostriedkov na vyšetrenie sérových proteínov je metóda elektroforézy (EF). EF motilita sérových proteínov je závislá od viacerých faktorov (druh zvierat, vek, výživa a pod.), preto je nevyhnutné stanoviť fyziologické hodnoty EF frakcií u jednotlivých druhov prežúvavcov v závislosti od veku a jednotlivých produkčných a reprodukčných fáz (Alberghina a kol., 2010).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 7 jahniat vo veku od 0 do 30 dní. Ustajnené boli spoločne s matkami v priestoroch Kliniky prežúvavcov UVLF v Košiciach. Všetky zvieratá boli klinicky zdravé. Vzorky krvi boli odoberané punkciou *vena jugularis* v čase 0 (pred napitím kolostra), 24, 48 hodín, 7, 14 dní a 1 mesiac po narodení a následne centrifugované pri 3600 ot/min po dobu 30 minút. Koncentrácia celkových bielkovín (CB) bola stanovená Biuretovou metódou spektrofotometrickým biochemickým analyzátorom Alizé (Lisabio, France), použitím komerčných diagnostických testov (Randox). Bielkoviny krvného séra boli rozdelené na jednotlivé frakcie metódou zónovej elektroforézy na pufrovaných agarózových géloch pri pH 8,8. EF bola vykonaná automatickým elektroforetickým systémom Hydrasys (Sebia Corporate, France) použitím komerčných diagnostických testov Hydragel 7 Proteine (Sebia Corporate, France). Hodnotenie elektroforetogramov, ako aj identifikácia a kvantifikácia jednotlivých bielkovinových frakcií boli vykonané denzitometricky počítačovým programom Phoresis verzia 5,50 (Sebia Corporate, France). Bielkoviny krvného séra boli rozdelené do 5



frakcií - albumín,  $\alpha_1$ - globulíny ( $\alpha_1$ -glob),  $\alpha_2$ - globulíny ( $\alpha_2$ - glob),  $\beta$ - globulíny ( $\beta$ - glob) a  $\gamma$ - globulíny ( $\gamma$ -glob). Hodnotené boli relatívne (%) a absolútne koncentrácie (g/l) jednotlivých frakcií, ako aj pomer albumínu ku globulínom (A/G). Štatistické vyhodnotenie získaných výsledkov bolo vykonané v programe GraphPad - Prism hodnotením aritmetických priemerov a smerodajných odchýlok jednotlivých sledovaných parametrov ( $x \pm SD$ ). Na vyhodnotenie významnosti zmien hodnôt sledovaných parametrov počas hodnoteného obdobia bol použitý Friedmanov test analýzy rozptylov (F-Anova) s následným Dunnovým post testom na hodnotenie významnosti rozdielov medzi jednotlivými odbermi.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V percentuálnom zastúpení jednotlivých frakcií sme počas sledovaného obdobia zaznamenali signifikantné rozdiely (Tab. 1).

Po prijatí kolostra sme pri albumíne a  $\alpha_2$ - glob sledovali tendenciu k vzostupu relatívnych hodnôt. Naopak  $\alpha_1$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -glob mali tendenciu postupne klesať. Pri sledovaní absolútnych hodnôt jednotlivých parametrov sme tiež zistili štatisticky významné rozdiely počas sledovaného obdobia (Tab. 2). Kým u CB,  $\alpha_1$ -, a  $\gamma$ -glob sme po prijatí kolostra zaznamenali postupný pokles hodnôt, parametre albumín,  $\alpha_2$ -,  $\beta$ - glob a A/G mali tendenciu stúpať.

**Tab. 1:** Zmeny v pomernom zastúpení sledovaných frakcií sérových proteínov (%) u jahniat do veku 1 mesiaca

Parameter		Sledované obdobie						P
		0 hod.	24 hod.	48 hod.	7 dní	14 dní	1 mes.	
albumín	x	69,1 <sup>aA</sup>	47,3 <sup>xBa</sup>	49,7 <sup>yA</sup>	57,2	60,7 <sup>x</sup>	64,1 <sup>yB</sup>	<0,001
	SD	1,0	9,7	9,4	6,8	6,2	4,1	
$\alpha_1$ - glob	x	15,0 <sup>x<sup>A</sup>a</sup>	12,0 <sup>y<sup>B</sup>b</sup>	11,2	7,5 <sup>x</sup>	6,3 <sup>y<sup>A</sup>a</sup>	6,1 <sup>Ba</sup>	<0,001
	SD	2,2	3,6	2,4	1,7	0,7	0,7	
$\alpha_2$ - glob	x	11,5 <sup>AB</sup>	11,3 <sup>CD</sup>	12,7	14,7	15,6 <sup>AC</sup>	15,4 <sup>BD</sup>	<0,001
	SD	0,8	1,0	0,6	0,6	1,0	1,0	
$\beta$ - glob	x	1,8 <sup>x<sup>AB</sup>a</sup>	5,1	4,8	4,9 <sup>x</sup>	5,1 <sup>A</sup>	5,3 <sup>B</sup>	<0,001
	SD	0,3	6,0	5,2	3,5	2,0	2,0	
$\gamma$ - glob	x	2,6 <sup>x<sup>ab</sup>a</sup>	26,8 <sup>y<sup>ac</sup>b</sup>	23,6 <sup>z<sup>b</sup>c</sup>	17,0 <sup>x</sup>	12,8 <sup>y</sup>	9,3 <sup>z<sup>c</sup>c</sup>	<0,001
	SD	0,8	12,7	11,5	8,2	6,2	3,8	

Rovnaké indexy v riadkoch znamenajú významnosť rozdielov hodnôt medzi jednotlivými odbermi: x,y,z -  $P < 0,05$ ; A,B,C,D -  $P < 0,01$ ; a,b,c -  $P < 0,001$  ( $P$ -hladina významnosti F-Anovy)

Koncentrácia CB bola najnižšia v hodine 0, najvyššia 24 hodín po narodení a potom postupne klesala, čo koreluje s pohybom frakcie  $\gamma$ -glob. U prežúvavcov novorodené mláďatá majú minimálne hodnoty imunoglobulínov, pretože tieto neprechádzajú cez placentu. Preto aj hodnoty celkových proteínov sú u nich nízke, stúpajú až po prijatí kolostra a potom klesajú v priebehu 1 až 5 týždňov, kedy je kolostrum metabolizované (Latimer, 2003). V našom experimente sme zaznamenali postupný nárast koncentrácie albumínu, čo môže súvisieť s príjmom mledziva a mlieka. Výsledky experimentu realizovanom u novorodených prasiatok ukázali, že zvýšený príjem aminokyselín potravou zvýši produkciu albumínu pečenoú (Davis a kol., 1998). Najvyššiu koncentráciu  $\alpha_1$ - glob sme zistili 24 hodín po narodení. Potom ich hodnoty postupne klesali. Počas intrauterinného vývoja fetálne pečenoé bunky plodu produkujú  $\alpha_1$ - fetoproteín (Kaneko, 1997). Jeho koncentrácia u novorodených mláďat klesá a v dospelosti sa zvýšená koncentrácia považuje za tumorový marker (Racek, 2006). Vo frakcii  $\alpha_2$ - a  $\beta$ - glob sme zaznamenali nárast hladín od prvého dňa po narodení. Podobné výsledky prezentoval Piccione a kol. (2011) u kozliat. Tieto frakcie obsahujú proteíny akútnej fázy, ktorých zvýšenie súvisí s reakciou na infekčné agensy a stresové stavy (Kaneko, 1997). U iných druhov prežúvavcov reakcia na enviromentálne podmienky zvyšuje produkciu

proteínov akútnej fázy (Lomborg a kol., 2008). Najnižšiu hodnotu A/G sme zaznamenali 24 hodín po narodení, pravdepodobne vďaka náhlemu vzostupu  $\gamma$ -glob po prijatí kolostra, potom hodnoty A/G postupne stúpali, čo súviselo s poklesom  $\gamma$ -glob a vzostupom koncentrácie albumínu.

**Tab. 2:** Zmeny sérových koncentrácií celkových bielkovín, jednotlivých frakcií sérových proteínov a pomeru albumín/globulíny (A/G) u jahniat do veku 1 mesiaca

Parameter		Sledované obdobie						P
		0 hod.	24 hod.	48 hod.	7 dní	14 dní	1 mes.	
CB	x	44,6 <sup>xAA</sup>	66,5 <sup>a</sup>	63,8 <sup>A</sup>	59,0	60,0 <sup>x</sup>	57,7	<0,001
	SD	4,8	14,2	12,6	10,6	7,4	6,3	
albumín	x	30,5 <sup>x</sup>	30,3 <sup>AA</sup>	30,7 <sup>y</sup>	33,1	35,4 <sup>AA</sup>	36,8 <sup>xy</sup>	<0,001
	SD	2,5	1,4	1,5	2,2	2,3	2,1	
$\alpha_1$ - glob	x	6,5	7,5 <sup>xab</sup>	6,6 <sup>y</sup>	4,3 <sup>xz</sup>	3,7 <sup>yz</sup>	3,5 <sup>b</sup>	<0,001
	SD	1,0	0,7	0,8	0,5	0,2	0,5	
$\alpha_2$ - glob	x	5,1 <sup>ABa</sup>	7,4 <sup>x</sup>	6,1	8,7 <sup>A</sup>	9,2 <sup>xa</sup>	8,9 <sup>B</sup>	<0,001
	SD	0,8	1,2	1,4	1,4	1,1	1,1	
$\beta$ -glob	x	0,8 <sup>ABa</sup>	1,9	1,8 <sup>x</sup>	3,2 <sup>A</sup>	3,6 <sup>B</sup>	4,0 <sup>xa</sup>	<0,001
	SD	0,2	0,8	0,7	2,9	2,7	2,9	
$\gamma$ -glob	x	1,2 <sup>xab</sup>	19,3 <sup>yac</sup>	16,3 <sup>zb</sup>	10,8 <sup>x</sup>	7,8 <sup>y</sup>	5,5 <sup>zc</sup>	<0,001
	SD	0,5	12,8	10,7	6,9	4,3	2,7	
A/G	x	2,24 <sup>AA</sup>	0,95 <sup>xab</sup>	1,05 <sup>yA</sup>	1,38	1,60 <sup>x</sup>	1,82 <sup>yb</sup>	<0,001
	SD	0,11	0,35	0,37	0,36	0,41	0,34	

Rovnaké indexy v riadkoch znamenajú významnosť rozdielov hodnôt medzi jednotlivými odbermi: x,y,z - P<0,05; A,B - P<0,01; a,b,c - P<0,001 (P – hladina významnosti F-Anovy)

Z nášho sledovania vyplýva, že fyziologické koncentrácie sérových proteínov sa s vekom menia, pričom u mláďat je táto zmena veľmi výrazná. Stanovenie ich referenčných hodnôt môže napomôcť pri laboratórnej diagnostike niektorých ochorení. Je však potrebné rozšíriť experiment na väčší počet zvierat a širšie časové obdobie.

*Práca bola realizovaná v rámci projektov VEGA 1/0812/12 a APVV-0475-10.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alberghina D, Casella S, Vazzana I., Ferrantelli V, Giannetto C, Piccione G. Analysis of serum proteins in clinically healthy goats (*hircus*) using agarose gel electrophoresis. *Vet Clin Pathol.* 2010; 39:317 - 321.
- Davis T A, Burrin D G, Fiorotto M L, Reeds P J, Jahoor F. Roles of insulin and amino acids in the regulation of protein synthesis in the neonate. *J Nutr.* 1998; 128:347-350.
- Kaneko J J. *Clinical biochemistry of domestic animals*, 5th Ed. Academic Press. London. UK. 1997; 117-138.
- Latimer K S, Mahaffey E A, Prasse K W. *Duncan and Prasse's Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology.* 4th Ed. Iowa State Press. 2003; 162-171.
- Lomborg S R, Nielsen L R, Heegard P M H, Jacobsen S. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Comm.* 2008; 32:575-582.
- Piccione G, Scianó S, Messina V, Casella S, Zumbo A. Changes in serum total proteins, protein fractions and albumin-globulin ratio during neonatal period in goat kids and their mothers after parturition. *Ann Anim Sci.* Vol 11. 2011; 2:251-260.
- Racek J. *Klinická biochemie*, 2. vydání. Praha. Galén. 2006; 59-68.
- Turecký L. *Lekárska biochémia* 2. Asklopis Bratislava. 2002; 177-189.

## CHLAMYDIÓZA U EXOTICKÝCH VTÁKOV

Novotná D.<sup>1</sup>, Bálent P.<sup>1,2</sup>, Valenčáková, A.<sup>1</sup>, Molnár L.<sup>3</sup>, Halánová, M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra biológie a genetiky, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava

<sup>3</sup>Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF, Košice

<sup>4</sup>Ústav verejného zdravotníctva, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

Aviárna chlamydióza je zoonotické ochorenie vtákov spôsobované intracelulárnou baktériou *Chlamydophila psittaci*. U ľudí spôsobuje psitakózu alebo ornitózu, ktorá je významnou zoonózou a v neliečených prípadoch môže viesť až k smrti pacienta. Infekcia je najčastejšia u papagájovitých a holubovitých vtákov. Papagájovité vtáky chované v zajatí sú hlavným rezervoárom psitakózy ľudí. Z dôvodu zoonotickej povahy ochorenia je dôležitá rýchla a presná diagnostika u nakazených vtákov. Možnosti rýchlej a presnej detekcie chlamýdií sa výrazne zlepšili zavedením molekulových metód diagnostiky, najmä polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), ktorá poskytuje definitívnu diagnózu priamou detekciou chlamýdiovej DNA. Cieľom našej práce bola priama detekcia chlamýdiovej DNA vo vzorkách odobraných od 29 exotických vtákov. Odobraté výtery z kloaky a choán boli vyšetrené pomocou PCR s použitím primerov zachytávajúcich všetky druhy čeľade *Chlamydiaceae*. Chlamýdiová DNA bola detegovaná v piatich vzorkách.

### ÚVOD

*Chlamydophila psittaci* je obligátne, intracelulárna, gram-negatívna baktéria, schopná infikovať vtáky, u ktorých je pôvodcom aviárnej chlamydiózy, a cicavce vrátane človeka, u ktorého spôsobuje psitakózu alebo ornitózu. Zoznam druhov vtákov, u ktorých sa vyskytuje infekcia *Chlamydophila psittaci*, sa stále rozširuje. Dodnes bola potvrdená u 465 druhov vtákov zahrnutých v 30 radoch, pričom minimálne 153 vnímavých druhov patrí do radu *Psittaciformes* (Vanrompay et al., 2007). Známym je 8 sérovarov *Chlamydophila psittaci*, označených A až F, WC a M56. Sérovary A až F infikujú vtáky, sérovary WC a M56 boli izolované z hovädzieho dobytku a ondatry (Smith et al., 2011). Vtáacie sérovary sú relatívne druhovo špecifické. Sérovary A a B sú obvykle izolované z papagájovitých vtákov a holubov, sérovar C z husí a kačíc a sérovar D z moriek. Sérovar E postihuje najširšie spektrum druhov, bol izolovaný z holubov, pštrosov, kačíc a moriek. Sérovar F bol izolovaný z papagájov a moriek. Všetky sérovary sú považované za zoonotické (Harkinezad et al., 2009). Prevalencia chlamydiózy u papagájovitých vtákov varíruje od 16% po 81% a mortalita je často vyššia ako 50% (Vanrompay et al., 2007). Papagájovité vtáky chované v zajatí a ako domáci miláčikovia sú hlavným rezervoárom psitakózy ľudí (Longbottom a Coulter, 2003). Chlamydióza môže mať u papagájovitých vtákov chronický alebo akútny priebeh. Infikované vtáky zostávajú často bez klinických prejavov, ktoré vypuknú, keď je vták stresovaný (hniezdenie, prevoz, manipulácia...). Najčastejšími klinickými príznakmi sú anorexia, letargia, našuchorené perie, serózný alebo mukopurulentný výtok z očí a nosových otvorov, strata hmotnosti a dýchacie ťažkosti rôzneho stupňa. Vyskytuje sa tiež konjunktivitída a hnačka so žltozeleným sfarbením trusu. U chronicky infikovaných vtákov je rekurentná konjunktivitída často jediným príznakom ochorenia. U papagájovitých vtákov sú tiež pomerne časté neurologické prejavy a u niektorých vtákov sa môžu vyskytnúť poruchy rastu peria (CFSPH, 2009). Medzi vtákmi sa chlamydióza šíri prachom z vysušeného trusu a sekrétov z očí a dýchacieho traktu, požitím kontaminovaného materiálu, kŕmením mláďat a krv cicajúcim hmyzom. Človek sa nakazí vdychnutím kontaminovaného prachu pri manipulácii s postihnutými vtákmi alebo pohybe v kontaminovanom prostredí (West, 2011). Klinické príznaky psitakózy u ľudí bývajú podobné chrípke, infekcia však môže viesť aj

k závažným pneumóniám a multiorgánovému zlyhaniu. Pre jej zoonotický potenciál je dôležitá rýchla definitívna diagnostika u nakazených vtákov (Elder, Brown, 1999).

Definitívnu diagnózu získame identifikáciou pôvodcu mikroskopickým vyšetrením ofarbených náterov, detekciou chlamýdiového antigénu pomocou imunofluorescencie alebo metódy ELISA, alebo detekciou chlamýdiovej DNA pomocou PCR. Zavedením PCR sa možnosti diagnostiky chlamydióz výrazne zlepšili, keďže umožňuje priamu identifikáciu pôvodcu v klinických vzorkách, ako aj diferenciaciu jednotlivých druhov chlamýdií (Rodolakis a Mohamad, 2010).

## MATERIÁL A METODIKA

Vyšetřili sme výtery z kloaky a choán od 29 papagájovitých vtákov druhov neofema tyrkysová (*Neophema pulchella*), korela chochlatá (*Nymphicus hollandicus*), amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*), lori mnohofarebný (*Trichoglossus haematodus*), papagáj červenokrídly (*Aprosmictus erythropterus*), papagáj kráľovský (*Alisterus scapularis*) a papagáj alexandrin (*Polytelis alexandrae*).

Vtáky boli pred odberom klinicky vyšetrené. Vzorky boli odobrané sterilnými vatovými tampónmi do 1,5 ml uzatvárateľných plastových skúmaviek so sterilným fyziologickým roztokom a do izolácie DNA boli uskladnené pri -20 °C.

Izolácia DNA bola vykonaná pomocou štandardného izolačného kitu DNA sorb-B (AmpliSens, Francúzsko), izoláty boli do PCR vyšetrenia uskladnené pri -20 °C.

DNA bola amplifikovaná pomocou primerov 23S1GR a U23F, zachytávajúcich všetky druhy čeľade *Chlamydiaceae*.

PCR produkty boli vizualizované pomocou elektroforézy.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z 29 vyšetrených vtákov malo pri klinickom vyšetrení 7 jedincov (24,1%) klinické príznaky, ktoré by mohli poukazovať na infekciu *Chlamydophila psittaci* (respiračné ťažkosti, anorexia, letargia, hnačka, poruchy rastu peria, neurologické poruchy).

Z celkového počtu 29 vyšetrených bola u 5 vtákov (17,2%) PCR vyšetrením dokázaná chlamýdiová DNA. Všetky tieto vtáky mali klinické príznaky.

Pozitívne vtáky patrili k druhom papagáj alexandrin (2x), neofema tyrkysová (1x), papagáj červenokrídly (1x) a papagáj kráľovský (1x). Pozitívne jedince druhu papagáj alexandrin pochádzali z jedného chovu a mali klinické príznaky vo forme dýchacích ťažkostí, nezvyčajného zafarbenia peria a neurologických prejavov (tremor svalstva, ataxia). Papagáj červenokrídly a papagáj kráľovský pochádzali takisto z jedného chovu. Obidva vtáky mali klinické príznaky vo forme poruchy rastu peria a nekvalitnej rohoviny zobáka a pazúrov, u papagája kráľovského bola tiež pozorovaná mierna apatia, anorexia, dýchacie ťažkosti a mukopurulentný výtok z nosových otvorov. U pozitívneho jedinca druhu neofema tyrkysová boli zistené výrazné klinické príznaky – dýchacie ťažkosti, výtoky z nosových otvorov a očí, hnačka, apatia a anorexia. Ďalších 16 vtákov rovnakého druhu z toho istého chovu nemalo žiadne klinické príznaky a pri PCR vyšetrení boli negatívne na prítomnosť *Chlamydophila psittaci*.

Z piatich pozitívnych jedincov mal typické klinické príznaky aviárnej chlamydiózy len jeden, u ostatných vtákov boli pozorované len mierne alebo nešpecifické príznaky ochorenia. Predpokladá sa, že mnoho prípadov chlamydiózy ako u vtákov, tak aj u ľudí, ostáva z dôvodu variabilnej klinickej manifestácie a často subklinického priebehu nerozoznaných. Vanrompay et al. sledovali vo svojom výskume v roku 2007 prevalenciu chlamýdiových ochorení u exotických vtákov a ich chovateľov v Belgicku. Zistili, že pozitivita chovateľov exotického vtáctva bola síce vyššia ako u bežného obyvateľstva, chovatelia však mali len veľmi mierne nešpecifické príznaky ochorenia. Napriek tomu ale viac ako 25% chovateľov uviedlo, že

krátko po tom, ako začali s chovom exotických vtákov, prekonalí pneumóniu, čo je výrazne vyššia prevalencia, ako u bežnej populácie.

*Práca bola riešená v rámci grantových úloh VEGA MŠ SR č. 1/0623/11; 1/0390/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

ELDER, J. - BROWN, C. 1999. Review of techniques for the diagnosis of *Chlamydia psittaci* infection in psittacine birds. In *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, ISSN 1943-4936, 1999, vol 11, no. 6, p. 539-541.

HARKINEZAD, T. et al. 2009. *Chlamydophila psittaci* infections in birds: A review with emphasis on zoonotic consequences. In *Veterinary Microbiology*, ISSN 0378-1135, 2009, vol 135, no. 1-2, p. 68-77.

[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis\\_avian.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/chlamydiosis_avian.pdf)

LANGBOTTOM, D. – COULTER, L. J. 2003. Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. In *Journal of Comparative Pathology*, ISSN 0021-9975, 2003, vol. 128, no. 4, p. 217-244.

RODOLAKIS, A. – MOHAMAD, K. Y. 2010. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. In *Veterinary Microbiology*, ISSN 0378-1135, 2010, vol. 140, no. 3-4, p. 382-391.

SMITH, K. A. et al. 2011. Infection Among Humans (Psittacosis) and Pet Birds (Avian Chlamydiosis), 2010 National Association of State Public Health Veterinarians (NASPHV). In *Journal of Exotic Pet Medicine*, ISSN 1557-5063, 2011, vol. 20, no. 1, p. 32-45.

VANROMPAY, D. et al. 2007. *Chlamydophila psittaci* Transmission from Pet Birds to Humans. In *Emerging Infectious Diseases*, ISSN 1080-6040, 2007, vol. 13, no. 7, p. 1108-1110.

WEST, A. 2011. A Brief Review of *Chlamydophila psittaci* in Birds and Humans. In *Journal of Exotic Pet Medicine*, ISSN 1557-5063, vol. 20, no. 1, p. 18-20.



# GENETICKÁ VARIABILITA *A. PHAGOCYTOPHILUM* V STREDNEJ EURÓPE VO VZŤAHU K VEKTOROM A REZERVOÁROVÝM HOSTITEĽOM

Pangrácová L.<sup>2\*</sup>, Baráková I.<sup>1,3\*</sup>, Carpi C.<sup>3,4</sup>, Stanko M.<sup>1,2</sup>, Mošanský L.<sup>2</sup>, Kraljik J.<sup>2</sup>,  
Peťko B.<sup>2</sup>, Rizzoli A.<sup>3</sup>, Derdáková M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav zoológie SAV, Dúbravská cesta 9, Bratislava, Slovensko

<sup>2</sup> Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, Košice, Slovensko

<sup>3</sup> Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige, Trento, Taliansko

<sup>4</sup> Pensylvánska štátna univerzita, Oddelenie biochémie a molekulárnej biológie, USA

\* Obe autorky prispeli k práci rovnakým podielom

## ABSTRAKT

Drobné cicavce sú dôležitými rezervoárovými hosťiteľmi v cirkulácii kliešťami prenášaných patogénov v prírodných ohniskách. Granulocytárna anaplazmóza reprezentuje kliešťami prenášané zoonózne ochorenie vyvolané intracelulárnou baktériou, *Anaplasma phagocytophilum*. Najvýznamnejším vektorom *A. phagocytophilum* v Európe je kliešť *Ixodes ricinus*, aj keď do jej cirkulácie v prírodných ohniskách sú v menšej miere zapojené aj ďalšie druhy kliešťov, napr. *Ixodes trianguliceps* a *Dermacentor marginatus*. Cieľom práce bola analýza genetickej variability *A. phagocytophilum* v strednej Európe vo vzťahu k ekológii tohto patogéna cez špecifické väzby na rezervoárových hosťiteľov a vektorov. Odber materiálu trval v rokoch 2011, 2012. Na Slovensku bol odchyt drobných cicavcov realizovaný na modelových lokalitách východného Slovenska, v Taliansku boli vzorky odoberané z provincie Trento, oblasť Valle Dei Laghi. Materiál bol molekulárnymi metódami vyšetrený na prítomnosť baktérii *A. phagocytophilum*. V oblastiach bez výskytu *I. trianguliceps* nebola prítomnosť *A. phagocytophilum* v drobných cicavcoch pozorovaná. Fylogenetickým analýzám na viacerých lokusoch (*msp4*, *groEL*, *DOV*) sme podrobili pozitívne vzorky získané zo Slovenska a Talianska z kliešťov z vegetácie a kliešťov cicajúcich na drobných cicavcoch, psov, vysokej zveri, ovciach, vtákoch, ako aj vzorky krvi a biopsií hosťiteľov. Analýzy odhalili, že genotypy *A. phagocytophilum* z kliešťov *I. ricinus* z vegetácie, psov, koní, prežúvavcov a ľudí sú odlišné od genotypov z drobných cicavcov a *I. trianguliceps*, ktoré patrili do samostatného kladu. Naša štúdia potvrdila, že kmene *A. phagocytophilum* majú špecifické asociácie s vektormi a rozdielnymi rezervoárovými hosťiteľmi. Na rozdiel od USA, v Európe sú hľadavčie genotypy prenášané len kliešťami *I. trianguliceps*, a preto tieto kmene pravdepodobne nie sú pre ľudí patogénne.

## ÚVOD

Drobné cicavce sú dôležitými rezervoárovými hosťiteľmi v cirkulácii kliešťami prenášaných patogénov v prírodných ohniskách (Piesman a Gern, 2004). *A. phagocytophilum* je gram-negatívna obligátne intracelulárna baktéria z radu Rickettsiales, čeľade Anaplasmataceae a rodu *Anaplasma*. Infikuje granulocyty a spôsobuje granulocytárnu anaplazmózu u ľudí, koní a psov a pastevnú horúčku u domácich prežúvavcov a koní. Anaplazmóza je najčastejšia kliešťami prenášaná zoonóza domácich a voľne žijúcich prežúvavcov v Európe. Klinické príznaky u ľudí sú charakteristické horúčkou, bolesťami hlavy, nepokojom, nechutenstvom, bolesťou svalov, pri vysokom počte baktérii aj leukopéniou či trombocytopéniou (Dumler a kol., 2005). Nedávne štúdie ukazujú, že vnútrodrohová variabilita zohráva v jej ekológii dôležitejšiu úlohu ako sa pôvodne predpokladalo. Bola dokázaná biologická a ekologická variabilita, existencia ekotypov/variantov (Paulauskas a kol., 2011). V USA sú známe 2 varianty izolované z kliešťov *Ixodes scapularis*. Ap - variant, kde rezervoárovými hosťiteľmi sú voľne žijúce prežúvavce, je nepatogénny pre človeka. Ap - ha variant, izolovaný z ľudí, psov, koní a drobných cicavcov, ktorí sú zároveň aj rezervoároví hosťitelia, je patogénny pre človeka (Massung a kol., 2002; 2006). V Európe je ekologická asociácia zatiaľ nejasná.



Väčšina izolátov (aj z ľudí) patrí k prežúvavčím genotypom, sú však omnoho variabilnejšie a rezervoároví hostitelia sú hlavne voľne žijúce prežúvavce a drobné cicavce. Najvýznamnejším vektorom *A. phagocytophilum* v Európe je kliešť *I. ricinus*, aj keď do jej cirkulácie v prírodných ohniskách sú v menšej miere zapojené aj ďalšie druhy kliešťov, napr. *I. trianguliceps* a *D. marginatus* (Bown a kol., 2009; de la Fuente a kol., 2005). Cieľom práce bola analýza genetickej variability *A. phagocytophilum* v strednej Európe vo vzťahu k ekológii tohto patogéna cez špecifické väzby na rezervoárových hostiteľov a vektorov.

## MATERIÁL A METODIKA

Odber materiálu trval v rokoch 2011, 2012. Na Slovensku bol odchyt drobných cicavcov realizovaný na 4 modelových lokalitách výhodného Slovenska. Čermeľ a Hýľov, lokality s vyššou nadmorskou výškou, kde sa vyskytujú oba druhy kliešťov (*I. ricinus*, *I. trianguliceps*). Botanická záhrada a Rozhanovce sú lokality s nižšou nadmorskou výškou a absenciou kliešťa *I. trianguliceps*. V Taliansku boli vzorky odoberané z provincie Trento, severovýchodná oblasť Valle Dei Laghi, s bežným výskytom kliešťa *I. trianguliceps*. Vzorky krvi a biopsií boli odoberané z rôznych hostiteľov od drobných cicavcov cez vtáky, psy, ovce až po vysokú zver. V oboch častiach, aj na Slovensku, aj v Taliansku, boli zároveň odoberané aj kliešte z hostiteľov a kliešte z vegetácie. Vzorky boli molekulárnymi metódami (PCR, RealTime PCR) vyšetrené na prítomnosť baktérii *A. phagocytophilum*. Vnútrodruhovú variabilitu druhu *A. phagocytophilum* a fylogenetické analýzy boli študované na základe DNA sekvencií lokusov *msp4* (de la Fuente a kol., 2005), *groEL* (Liz a kol., 2000) a *DOV1* (Bown a kol., 2009).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*A. phagocytophilum* na Slovensku bola detekovaná v kliešťoch *I. ricinus* z vegetácie na všetkých modelových lokalitách, v kliešťoch *I. trianguliceps* cicajúcich na drobných cicavcoch a tiež v nekropsiách z ušnic a slezín (*M. glareolus*, *A. flavicollis* a *A. agrarius*). V oblastiach bez výskytu *I. trianguliceps* prítomnosť *A. phagocytophilum* v drobných cicavcoch nebola pozorovaná. Rovnako ani v kliešťoch *I. ricinus* cicajúcich na drobných cicavcoch sme nezistili prítomnosť *A. phagocytophilum*, hoci cicali na infikovaných drobných cicavcoch. V Taliansku bola *A. phagocytophilum* detekovaná v krvi drobných cicavcov, v kliešťoch *I. ricinus* z vegetácie a z rôznych hostiteľoch. Fylogenetickým analýzám na viacerých lokusoch (*msp4*, *groEL*, *DOV*) sme podrobili pozitívne vzorky získané zo Slovenska a Talianska. Fylogenetické analýzy odhalili, že genotypy *A. phagocytophilum* z kliešťov *I. ricinus* z vegetácie, psov, koní, prežúvavcov a ľudí sú odlišné od genotypov z drobných cicavcov a *I. trianguliceps*, ktoré patrili do samostatného kladu. Rovnaké výsledky prezentoval aj Bown a kol. (2009), že geneticky odlišné subpopulácie *A. phagocytophilum* cirkulujú v 2 oddelených enzootických cykloch. Naša štúdia potvrdila, že kmene *A. phagocytophilum* majú špecifické asociácie s vektormi a rozdielnymi rezervoárovými hostiteľmi. Na rozdiel od USA, v Európe sú hlodavčie genotypy prenášané len kliešťami *I. trianguliceps*, a preto tieto kmene pravdepodobne nie sú pre ľudí patogénne.

Práca vznikla na základe podpory projektov VEGA 2/0055/11, APVV-0267-10, EU grantu FP7-261504 EDENext a ITMS: 26220220116 na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Bown KJ, Lambin X, Begon M, Telford G, Woldehiwet Z, Birtles RJ. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1948-54.

- De La Fuente J, Torina A, Naranjo V, Caracappa S, Di Marco V, Alongi A, Russo M, Maggio AR, Kocan KM. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a seronegative patient in Sicily, Italy: Case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrobiol*. 2005; 4: 15.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11:1828-34.
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 1002-07.
- Massung RF, Mather TN, Levin ML. Reservoir competency of goats for the Ap-Variant 1 Strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect Immun*. 2006; 74: 1373-75.
- Massung RF, Mauel MJ, Owens JH, Allan N, Courtney JW, Stafford III KC, Mather TN. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila* Rhode Island and Connecticut. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8: 467-72.
- Paulauskas A, Radzijeuskaja J, Rosef O. Molecular detection and characterization of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *Comp Immunol Microb*. 2012; 35: 187-95.
- Piesman J, Gern L. Lyme borreliosis in Europe and North America. *Parasitology*. 2004; 129: 191-220.

## NÁČRT PRÍBUZENSKÝCH VZŤAHOV VYSOKOHORSKÝCH ZÁSTUPCOV

Paučulová L., Šemeláková M., Varcholová K., Panigaj L.

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

### ABSTRAKT

Rod *Erebia* je asi najviac kontroverzným rodom motýľov (Lepidoptera), rozšíreným v Holarktickej oblasti Zeme. Cieľom práce bola fylogenetická analýza vysokohorských druhov rodu *Erebia* v pohoriach strednej Európy. Výsledky štúdia príbuzenských väzieb zástupcov tohto rodu získané molekulárnymi metódami môžu byť vhodne doplnené o výsledky obsiahnuté porovnaním morfológických znakov motýľov. Na základe daných výsledkov môžeme určiť príbuzenské vzťahy vybraných zástupcov študovaného rodu, vznik druhov vzhľadom k centru šírenia, s čím súvisí aj fylogeografia rodu *Erebia*. Fylogenetická analýza rodu *Erebia* bola uskutočnená študovaním mitochondriálnych génov COI a bude doplnená štúdiom génov ND5. Sekvencie boli získané štandardnými technikami molekulárnej biológie, ostatné sekvencie boli použité z Génovej banky. Príbuzenské vzťahy zástupcov rodu *Erebia* boli odvodené použitím programu MEGA 5.2. Z vykonštruovaných fylogenetických stromov vyplývajú jednotlivé vývojové línie rodu a ich evolučná história, taktiež bola potvrdená príbuznosť dvoch najbližších druhov v rámci rodu a to druhov *Erebia euryale* a *Erebia ligea*. Významom analýz bolo doplniť informácie o príbuzenských vzťahoch zástupcov rodu *Erebia* a podporiť ich morfológické zaradenie do systému na genetickom základe. Doplnením morfológických a fylogeografických záverov sa prispeje k celkovému preštudovaniu tohto rodu v oblasti strednej Európy.

### ÚVOD

Fylogénéza umožňuje odhalenie evolučnej histórie určitej populácie a ponúka náhľad príbuzenských vzťahov zástupcov rodu z hľadiska ich spoločného predka (Harrison a Langdale, 2006). Príbuzenské vzťahy hlavných skupín motýľov sú stále pomerne nedostatočne preskúmané a fylogénéza mnohých rodov je prakticky neznáma (Peña a kol., 2006). Ešte pred fylogenetickými analýzami na báze molekulárno-cytologických metód sa využíval postup porovnávania morfológických znakov až do konca päťdesiatych rokov (Albre a kol., 2008). Porovnávali sa napríklad samčie pohlavné orgány ako pri druhu *Erebia manto* (Cupedo, 1997). Rozvojom molekulárnych metód pre štúdium rôznych génov (hlavne génov mitochondriálnej DNA) sa zlepšila aj oblasť fylogénézy a systematiky druhov.

Rod *Erebia* (Dalman, 1816) patrí do čeľade Nymphalidae, podčeľaď Satyrinae. Rozmanitosť zástupcov tohto rodu je vysoká, podľa literatúry je v ňom zahrnutých zhruba 100 druhov s mnohými poddruhmi. Ich výskyt bol zaznamenaný v celom Holarktickom regióne, pričom najviac im vyhovujú chladnejšie a suchšie podmienky prostredia a vyššia nadmorská výška (Albre a kol., 2008). Glaciálne obdobia, ktoré prebiehali v Pleistocéne pozmenili šírenie rodu *Erebia* a jeho zástupcov, prispeli k vzniku nových druhov a poddruhov. Jednotlivé populácie sa od seba oddelili a preživali roztrúsené na územiach refúgií (Hewitt, 2000). Evolúciu druhov rodu *Erebia* ovplyvnili hlavne horské systémy v Európe, ktoré predstavovali geografické bariéry. Rozmanitosť rodu vyplýva aj z faktu, že v období Pleistocénu dochádzalo k časovým aj geografickým obmedzeniam jedincov v rámci týchto oblastí, čo sa odzrkadlilo na vzniku veľkého počtu endemických druhov (Martin a kol., 2000). Použitím fylogenetických analýz je možné odhaliť príbuznosť zástupcov rodu v určitej vymedzenej oblasti a objasniť tak ich evolučnú históriu, vyvodiť vývojové línie a určiť spoločného predka.

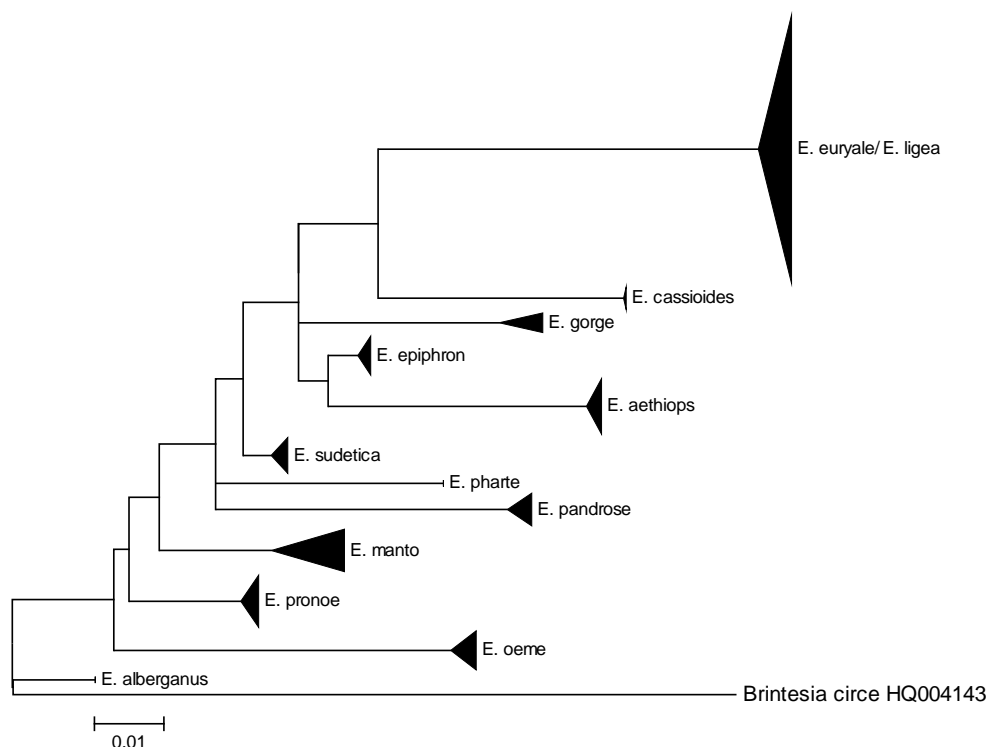
## MATERIÁL A METODIKA

Zber vzoriek prebiehal vo viacerých lokalitách Slovenska a v rôznych lokalitách Európy (Rumunsko, Česká Republika, Rakúsko) počas rokov 2012-2013. Druh *Erebia euryale* bol podrobený aj kompletnej fylogeografickej analýze. Vzorky ďalších druhov ako *E. epiphron*, *E. pandrose*, *E. manto*, *E. pluto*, *E. styx*, *E. aethiops*, *E. gorge* boli spracované metodikami molekulárnej biológie a budú zaslané na sekvenáciu. Počas letných mesiacov v roku 2013 sa plánujú dozberať ďalšie druhy a doplniť tak analýzy a výsledky pre kompletnú fylogenezu a fylogeografiu rodu *Erebia* v strednej Európe. DNA motýľov bola získaná izoláciou z abdominálnej časti použitím kitu GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit. Polymerázová reťazová reakcia génu COI prebiehala v 25 µl objeme a pozostávala z počiatočnej denaturácie DNA pri teplote 92 °C po dobu 5 minút, z 35 opakovaní nasledujúcich cyklov: 30 sekúnd pri 92 °C, 30 sekúnd pri 37 °C, 30 sekúnd pri 72 °C a konečného dosyntetizovania po dobu 5 minút pri 72 °C. Použité primery CI13 a CI14, publikované Banom a kol. (2007) mali nasledovné sekvencie: CI13: 5' - ATAATTTTTTTTATAGTTAT - 3'; CI14: 5' - GTTCTTTTTTTCCTCTTTC - 3'. Po ukončení elektroforetickej analýzy a prečistení PCR produktov použitím kitu GeneJET PCR Purification Kit, boli vzorky zaslané na sekvenáciu. Na fylogenetické analýzy európskych zástupcov rodu *Erebia* boli okrem sekvencií génu COI získaných izoláciou použité aj všetky dostupné sekvencie COI uvedené v Génovej banke, usporiadané podľa ClustalW funkcie programu MEGA 5.2 (Tamura a kol., 2011) a boli podrobené analýzám na vytvorenie fylogenetických stromov a určenie evolučných vzdialeností medzi jednotlivými druhmi.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzám bolo podrobených celkovo 191 sekvencií génu COI vrátane sekvencie COI „outgroup“ vzorky *Brintesia circe*. Z výsledkov prvej analýzy bol spracovaný rozsiahly fylogenetický strom použitím Maximum Likelihood (ML) analýzy (Obr. 1), na ktorom boli demonštrované príbuzenské vzťahy študovaného rodu.

Obr. 1. Príbuznosť 13 vysokohorských druhov rodu *Erebia* na základe ML analýzy sekvencií COI génu a outgroup sekvencie druhu *Brintesia circe*.



Preskúmaním stromu sa zistilo, že druhy *E. euryale*, *E. ligea* a *E. cassioides* a taktiež druhy *E. aethiops* a *E. epiphron* sú blízko príbuzné v porovnaní s ostatnými druhmi zahrnutými do analýz. Druh *E. alberganus* sa v rámci stromu vymedzuje do samostatnej vetvy a príbuzenský vzťah k ostatným druhom nebol potvrdený. Podobne aj podľa práce od Martina a kol. (2010) sa tento druh vymedzuje od ostatných študovaných druhov rodu *Erebia* na základe viacerých analýz. Druhy *E. euryale* a *E. ligea* vytvorili spoločnú vetvu stromu, sú teda najviac príbuznými druhmi, čo bolo preukázané morfológicky (Warren, 1936) a použitím molekulárnych analýz (Martin a kol., 2010). Rovnaké závery boli získané aj použitím Neighbor Joining (NJ), Maximum Parsimony (MP) a Minimum Evolution (ME) analýz (neuvádzame v práci). Evolučná diverzita rodu *Erebia* zo študovaných vzoriek dosiahla hodnotu 0,068 (Fst hodnota  $p \geq 0,050$  je štatisticky významná), čím sa na základe vzoriek vysokohorských zástupcov potvrdil fakt o rozmanitosti rodu. Evolučné vzdialenosti medzi jednotlivými druhmi vypočítané pomocou „maximum composite likelihood“ modelu programu MEGA 5.2. potvrdzujú výsledky získané zostavením fylogenetických stromov. Warren (1936) rozdelil druhy rodu *Erebia* do 15 skupín, kam ich zaradil na základe morfológiej príbuznosti, ktorú odhaľujú molekulárne analýzy porovnávaných génov mitochondriálnej DNA. Výsledky budú doplnené o fylogenetické analýzy aj na základe génu ND5 (NADH dehydrogenáza, podjednotka 5) pre vybrané európske vysokohorské druhy rodu *Erebia*.

Práca bola podporená grantom VVGS-PF-2013-113 a grantom VEGA 1/1025/12.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Albre J, Gers Ch, Legal L. Molecular phylogeny of the *Erebia tyndarus* (Lepidoptera, Rhopalocera, Nymphalidae, Satyrinae) species group combining CoxII and ND5 mitochondrial genes: A case study of recent radiation. *Mol Phylogenet Evol.* 2008; 47:196-210.
- Ban U, Sekiguchi M, Nakatani T, Itoh T, Usami S, Itino T. Phylogeography of Japanese alpine butterfly *Erebia nipponica* (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyridae) inferred from mitochondrial gene sequences. *N Entomol.* 2007; 56:1-7.
- Cupedo F. Die geographische Variabilität und der taxonomische status der *Erebia manto* subgruppe, nebst beschreibung einer neuen unterart (Nymphalidae: Satyrinae). *Nota Lepid.* 1997; 20:3-22.
- Harrison CJ, Langdale JA. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *Plant J.* 2006; 45:561-72.
- Hewitt G.M. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature.* 2000; 405: 907-13.
- Martin JF, Gilles A, Descimon H. Molecular phylogeny and evolutionary patterns of the European satyrids (Lepidoptera: Satyridae) as revealed by mitochondrial gene sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 2000; 15:70-82.
- Peña C, Wahlberg N, Weingartner E, Kodandaramaiah U, Nylin S, Freitas AVL, Brower AVZ. Higher level phylogeny of Satyrinae butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on DNA sequence data. *Mol Phylogenet Evol.* 2006; 40:29-49.
- Schmitt T. Biogeographical and evolutionary importance of the European high mountain systems. *Front Zool.* 2009; 6:9.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731-39.
- Warren BCS. Monograph of the genus *Erebia*. London: British Museum. 1936; 409s.



# RÝCHLOTESY, AKO JEDEN Z EFEKTÍVNYCH SPÔSOBOV STANOVENIA REZÍDUI ANTIBIOTÍK V POTRAVINÁCH ŽIVOČÍŠNEHO PÔVODU

Poláková, Z., Kožárová, I., Gondová, Z.

*Ústav hygieny a technológie mäsa, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

## ABSTRAKT

Bezpečnosť potravín predovšetkým z pohľadu prítomnosti rezíduí antimikrobiálnych látok je v súčasnosti jedna z nosných tém zamestnávajúca širokú verejnosť. S ohľadom na zdravotné riziká, ktoré vyplývajú z konzumácie potravín živočíšneho pôvodu s výskytom rezíduí antibiotík sa zaviedli jednoduché metódy na rýchle stanovenie prítomnosti týchto antimikrobiálnych látok v živočíšnych produktoch. Ich hlavnou úlohou nie je určiť množstvo rezíduí, ale zachytiť ich prítomnosť v potravinách živočíšneho pôvodu a zabrániť ohrozeniu zdravia konzumentov. Tento rýchly screening, prevažne v oblasti prvovýroby a spracovania mlieka, umožňujú tzv. „*rýchlotesty*“.

## ÚVOD

Vyšetrovanie potravín z hľadiska prítomnosti patogénov, cudzorodých látok, antibiotík, ich zloženia a ďalších parametrov je dôležitou úlohou z pohľadu ich bezpečnosti a kvality. Jednou z oblastí testovania potravín, ktorej význam v posledných rokoch stúpa, je sledovanie prítomnosti rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu. Intenzívne podávanie antibiotík vo veterinárnej praxi spôsobuje kontamináciu potravín týmito zlúčeninami (Grexa a Károlyi, 2012).

Zdravotné riziká z príjmu potravín s obsahom rezíduí antibiotík vyplývajú najmä z príjmu malých dávok antibiotík. Antibiotiká v potravinách môžu vyprovokovať alergické reakcie u hypersenzitívnych jedincov a môžu ohroziť ich imunitný systém. Dôležitým aspektom zostáva skutočnosť, že prítomnosť antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu počas dlhej doby vedie k problémom s výskytom rezistentných patogénnych bakteriálnych kmeňov. Technologické riziká z prítomnosti antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu, najmä v mlieku, spočívajú v nekvalitnom technologickom procese výroby fermentovaných výrobkov a syrov (Blasco a kol., 2007; <http://www.mpsr.sk>).

## RÝCHLOTESY

Zdravotná bezpečnosť potravín je v posledných rokoch považovaná za nosnú tému potravinárstva. Systém kontroly rezíduí antibiotík v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu má svoje pravidlá, ktoré sú povinné pre všetky členské štáty Európskej únie. Monitoring sa zameriava na kontrolu všetkých zakázaných látok u zvierat produkujúcich potraviny a v produktoch živočíšneho pôvodu, ako aj na kontrolu maximálnych limitov rezíduí (MRL) veterinárnych liečiv (<http://www.mpsr.sk>).

Stanovenie rezíduí antibiotík si vyžaduje uplatnenie trojstupňového systému. Prvý krok vo všeobecnosti spočíva v screeningu. Toto stanovenie sa väčšinou vykonáva mikrobiologickými metódami. Druhým krokom je post-screening a nakoniec uplatnenie konfirmačných metód (Gaudin a kol., 2004; Sokol a kol., 2007).

Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES jasne rozlišuje screeningové a konfirmačné metódy. Screeningové metódy môžu zachytávať prítomnosť látok alebo skupiny látok v hladinách záujmu a väčšinou zahŕňajú bioanalýzy, zatiaľ čo konfirmačné metódy poskytujú kompletne doplňujúce informácie umožňujúce jednoznačnú identifikáciu, ale aj kvantifikáciu látok (Blasco a kol., 2007).

Screeningové testy zabezpečujú rýchlu a cenovo prístupnú kontrolu prítomnosti rezíduí antibiotík. V závislosti od rýchlosti získavania výsledkov ich možno rozdeliť na *pomalé*

a *rýchle*. Pomalé testy sú založené na princípe mikrobiálnej inhibície, pričom tieto testy patria medzi najuniverzálnejšie spôsoby dôkazu prítomnosti širšieho spektra antibiotík. Rýchle testy sú metódy na rýchle stanovenie skupiny antibiotík (<http://www.mpsr.sk>). Sú založené na rozličných princípoch a poskytujú výsledky v priebehu niekoľkých minút, ale bez možnosti kvantifikácie (<http://www.dsm.com>).

Počas posledných rokov sa zvýšil záujem o rýchle vizuálne testy. Tzv. „*dipstick*“ testy poskytujú vizuálne hodnotiteľný výsledok farebnou zmenou testovacieho prúžku. Sú relatívne lacné, ideálne na testovanie „na mieste“ minimálne školeným personálom. Ich hlavným obmedzením je poskytovanie len kvalitatívneho výsledku. Predstavujú však vhodnú metódu na vylúčenie negatívnych vzoriek ešte pred použitím finančne náročnejších screeningových testov (Kandimalla a kol., 2007).

V súčasnosti je dostupných niekoľko druhov rýchlotestov na screening rezíduí antibiotík, ktoré sa vo všeobecnosti klasifikujú podľa ich princípu na imunologické alebo enzymatické. Najčastejšie sú to testy prenosné, teda použiteľné aj v terénnych podmienkach (Wang a kol., 2011). Väčšina komerčne vyrábaných testov je určených pre mlieko, z dôvodu potreby spracovateľov mlieka (Žvirdauskienė a Šalomskienė, 2007; <http://www.dairysafe.vic.gov.au>). Sú zamerané hlavne na stanovenie beta-laktámov, ale niektoré sú špecifické zvlášť pre penicilíny a nezachytávajú prítomnosť cefalosporínov (<http://www.uni-ulm.de>).

Jedným z rýchlych testov je ***Penzym test*** (vyvinutý začiatkom 80. rokov minulého storočia). Má dve verzie, *Penzym* a *Penzym S*, ktoré sa od seba odlišujú dĺžkou inkubácie a citlivosťou. Test bol prvotne vyvinutý pre beta-laktámové antibiotiká, je však extrémne citlivý aj na cefalosporíny. Princípom testu je zamedziť rast a pomnožovanie baktérií inhibíciou aktivity enzýmu DD-karboxypeptidázy (Navrátilová, 2008).

***LacTek Test*** je uvedený na trh na stanovenie antimikrobiálnych rezíduí v mlieku, bol však validovaný aj pre stanovenie rezíduí antibiotík v tkanivách. Jeho výhodami sú rýchlosť, jednoduchosť, schopnosť identifikácie špecifickej skupiny antibiotík a ich zachytenie v tkanivách na úrovni MRL (Mitchell a kol., 1998).

***Delvo-X-PRESS  $\beta$ L test*** je kvalitatívny kompetitívny receptor viažuci test. Aj keď je v zásade podobný imunochemickým metódam, nevyužíva protilátky na špecifickú väzbu k beta-laktámom, takže sa nemôže klasifikovať ako imunochemická metóda (Navrátilová, 2008). Funguje na rovnakom princípe ako LacTek test. Má tubovú formu a je určený pre laboratórne podmienky. Deteguje penicilíny a cefalosporíny (<http://www.uni-ulm.de>). Pozitívny výsledok sa meria fotometricky porovnaním optickej hustoty vyšetrovanej vzorky a štandardu (Navrátilová, 2008).

***IDEXX SNAP test*** je enzýmom značený receptor viažuci test, pri ktorom sú beta-laktámové antibiotiká zachytávané proteínom na pevnú fázu matice umiestnenej na lisovanom plaste (Navrátilová, 2008). Bol prvý z testov, ktorý využíva princíp nasávania vzorky a testovacích činidiel cez imobilizované protilátky. Pozostáva z testovacej tuby a jednorázovej plastovej jednotky, tzv. „SNAP“ zariadenia, ktoré obsahuje testovacie činidlá. Toto umožňuje jeho použitie ako v laboratórnych, tak aj v terénnych podmienkach. Je vhodný na kombinované stanovenie penicilínov a cefalosporínov, ale aj na samostatné stanovenie tetracyklínov, sulfónamidov a gentamycínu (<http://www.uni-ulm.de>).

***SNAP ST test*** je rýchlejšou a jednoduchšou modifikáciou pôvodného SNAP testu, ktorý pozostáva z dvoch krokov s nutnosťou použitia termobloku a umožňuje odčítanie výsledku za 9 minút. Nový SNAP ST test nevyžaduje inkubáciu a výsledok je možné odčítať už po 6 minútach (<http://www.dairyreporter.com>).

***$\beta$ -STAR Test*** bol vyvinutý na stanovenie beta-laktámových antibiotík. Výsledok je hodnotený vizuálne porovnávaním vzniku intenzity zafarbenia prebehnutéj reakcie. Na podobnom princípe je založený aj ***Charm MRL Test*** určený pre beta-laktámové antibiotiká. Výsledok môže byť zhodnotený vizuálne alebo s použitím readra (Sokol a kol., 2007).

Rýchlotesty uvedené na trh už v 80. rokoch minulého storočia umožňujú jednoduchý screening prítomnosti rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu. Ich možnosť použitia aj v terénnych podmienkach, bez predošlej úpravy vzorky i málo školeným personálom umožňuje rýchle a jednoduché stanovenie rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu a vylúčenie týchto potravín z potravinového reťazca ešte pred využitím časovo i finančne náročnejších metód.

*Spracovanie príspevku bolo podporené grantom MŠ SR VEGA č. 1/0939/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Blasco, C., Torres, C., M., Picó, Y.: Progress in analysis of residual antibacterials in food. Trends in analytical chemistry, 26, 9, 2007, 895 – 913.
- Gaudin, V., Maris, P., Fuselier, R., Ribouchon, J.-L., Cadie, N., Rault, A.: Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotics residues in milk. Food additives and Contaminants, 21, 5, 2004, 422 – 433.
- Grexa, O., Károlyi, L.: Potreba vyšetovania potravín a niektoré súčasné trendy v diagnostických metódach. In: Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie „Hygiena Alimentorum XXXIII“, Štrbské Pleso, Vysoké Tatry, 9.-11.5.2012. Bratislava: Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky, 2012, 71 – 72. ISBN 978-80-7148-063-1.
- <http://www.dairyreporter.com>: New antibiotic residue test cuts out incubation step.
- <http://www.dairysafe.vic.gov.au>: Antibiotic residue screening test methods.
- <http://www.dsm.com>: Antibiotic detection methods in milk.
- <http://www.mpsr.sk>: Riziko výskytu inhibičných látok v mlieku.
- <http://www.uni-ulm.de>: Monitoring antibiotics in milk – the changing world of test methods.
- Kandimalla, V., B., Kandimalla, N., Hruska, K., Franek, M.: Detection of sulfamethazin in water, milk and pig manure by dipstick immunoassay. Veterinarni medicina, 52, 10, 2007, 445 – 450.
- Mitchell, J., M., McNab, W., B., Yee, A., J., Griffiths, M., W., McEwen, S. A., Spilsbury, L., Boison, J. O.: Characteristics of the LacTek test as applied to tissue samples: Assessment of performance using incurred field samples. Journal of food protection, 61, 8, 1998, 1018 – 1022.
- Navrátilová, P.: Screening methods used for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. Czech J. Food Science, 26, 2008, 393 – 401.
- Sokol, J., Šnirc, J., Kozárová, I.: Farmakológia – špecifické aspekty jej uplatňovania pri produkcii potravín. In: ŠNIRC, J., SOKOL, J., SEGINKO, J., HERA, A. a kol.: Klinická veterinárna farmakológia. Martin: Neografia a.s., 2007, 60 – 73. ISBN 978-80-88892-75-5
- Wang, J., Macneil, J. D., Kay, J. F.: Rapid test kits. In: Chemical analysis of antibiotic residues in food. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2011, 164 – 174. ISBN 978-1-118-06718-5.
- Žvirdauskienė, R., Šalomskienė, J.: An evaluation of different microbial and rapid tests for determining inhibitors in milk. Food control, 18, 2007, 541 – 547.

# STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV Z MÄSA BAŽANTA OBYČAJNÉHO (*PHASIANUS COLCHICUS*) VOČI VYBRANÝM ANTIBIOTIKÁM

Regecová I.<sup>1</sup>, Pipová M.<sup>1</sup>, Jevinová P.<sup>1</sup>, Marušková K.<sup>1</sup>, Kmeť V.<sup>2</sup>, Koréneková B.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Katedra hygieny potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

<sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Slovenská akadémia vied, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť u druhovo identifikovaných koaguláza-negatívnych stafylokokových izolátov zo stehennej svaloviny bažanta obyčajného (*Phasianus colchicus*) voči siedmim antibiotikám, a to s použitím agarovej dilučnej metódy.

Všetky izoláty stafylokokov boli podrobené rodovej identifikácii založenej na analýze PCR produktu získaného z DNA cieľa 16S ribozomálnej DNA a druhovej identifikácii pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF. Citlivosť jednotlivých izolátov stafylokokov na vybrané antibiotiká sa zisťovala pomocou agarovej dilučnej metódy (CLSI M07-A8, 2009). Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mäsa bažanta obyčajného sa získalo 41 izolátov stafylokokov, u ktorých bola pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF vykonaná druhová identifikácia, na základe ktorej bolo určených 17 kmeňov ako *S. epidermidis*, 8 kmeňov ako *S. warneri*, 5 kmeňov ako *S. haemolyticus*, 4 kmene ako *S. hominis*, 3 kmene ako *S. xylosus*, 2 kmene ako *S. vitulinus*, 1 kmeň ako *S. pasteurii* a 1 kmeň ako *S. arlettae*. U stafylokokových izolátov bola agarovou dilučnou metódou najčastejšie potvrdená rezistencia voči penicilínu. Naopak najväčšia citlivosť bola zaznamenaná voči vankomycínu. U všetkých stafylokokových izolátov bola agarovou dilučnou metódou preukázaná súčasná rezistencia na viac ako jedno testované antibiotikum.

## ÚVOD

Koaguláza-negatívne stafylokoky (KNS) tvoria hlavnú časť normálnej mikroflóry kože a slizníc (Eiff a kol., 2002). Okrem toho môžu byť rezervoárom génov rezistencie voči antibiotikám, ktoré sú následne prevedené na *S. aureus* (Perreten a kol., 1998). U KNS zároveň dochádza v poslednom období k explozívne nárastu rezistencie na antibiotiká. Miera ich rezistencie k antibiotikám sa výrazne líši medzi jednotlivými druhmi stafylokokov. Vysoký podiel rezistentných kmeňov sa vyskytuje najmä u druhov a poddruhov, ktoré sú najčastejšími pôvodcami nozokomiálnych infekcií. (Droženová a Petráš, 2000).

Práve preto, cieľom práce bolo stanoviť citlivosť u druhovo identifikovaných koaguláza-negatívnych stafylokokových izolátov zo stehennej svaloviny bažanta obyčajného (*Phasianus colchicus*) voči siedmim antibiotikám (penicilín, oxacilín, erytromycín, tetracyklín, ampicilín, gentamicín, vankomycín), a to s použitím agarovej dilučnej metódy.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie boli odobraté zo stehennej svaloviny 4 vzoriek bažanta obyčajného (*Phasianus colchicus*) pochádzajúcich zo spoločnej poľovačky vo zvernici Účelového zariadenia pre chov a choroby zveri, rýb a včiel UVLF v Rozhanovciach. Odber vzoriek na mikrobiologické vyšetrenie sa vykonal v súlade s požiadavkami STN ISO 3100-2; základná suspenzia a ďalšie desaťnásobné riedenia sa pripravili podľa pokynov STN EN ISO 6887-3/O1. Z odobratých vzoriek sa stafylokoky izolovali v zmysle pokynov STN EN ISO 6888-1/A1. Všetky izoláty stafylokokov sa podrobili skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúške (STAFYLO PK, IMUNA, Šarišské Michaľany) a potvrdeniu príslušnosti k rodu *Staphylococcus* pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF. Citlivosť jednotlivých izolátov stafylokokov na vybrané antibiotiká sa zisťovala pomocou agarovej dilučnej metódy (CLSI M07-A8, 2009). Získané výsledky boli vyhodnotené podľa kritérií stanovených CLSI

(NCCLS) pre mikrodilučnú metódu (CLSI M100-S21, 2011), na základe ktorých boli jednotlivé izoláty zaradené medzi citlivé (C), intermediárne citlivé (I) alebo rezistentné (R).

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mäsa bažanta obyčajného sa získalo 41 izolátov stafylokokov. Všetky izoláty boli na základe výsledkov skúmkovkovej plazmokoagulázovej skúšky koaguláza-negatívne. Pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF bola ďalej u týchto izolátov vykonaná druhová identifikácia, na základe ktorej bolo určených 17 kmeňov *S. epidermidis*, 8 kmeňov *S. warneri*, 5 kmeňov *S. haemolyticus*, 4 kmene *S. hominis*, 3 kmene *S. xylosus*, 2 kmene *S. vitulinus*, 1 kmeň *S. pasteurii* a 1 kmeň *S. arlettae*. Všetky kmene boli následne podrobené stanoveniu citlivosti voči siedmim antibiotikám pomocou agarovej dilučnej metódy.

Ako vyplýva z tabuľky 1, u všetkých izolátov *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. vitulinus*, *S. pasteurii* a *S. arlettae* bola zistená rezistencia voči penicilínu a erytromycínu. U kmeňov *S. xylosus* bola potvrdená rezistencia voči penicilínu a oxacilínu, avšak nebola potvrdená rezistencia voči erytromycínu.

**Tab. 6** Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokov (*S.*) z mäsa bažanta obyčajného voči penicilínu, oxacilínu a erytromycínu

Druh	Počet izolátov	Penicilín			Oxacilín			Erytromycín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S. epidermidis</i>	17	17	0	0	16	0	1	17	0	0
<i>S. warneri</i>	8	7	0	1	6	0	2	8	0	0
<i>S. haemolyticus</i>	5	5	0	0	4	0	1	5	0	0
<i>S. hominis</i>	4	2	0	2	3	0	1	3	0	1
<i>S. xylosus</i>	3	3	0	0	3	0	0	0	2	1
<i>S. vitulinus</i>	2	2	0	0	1	0	1	2	0	0
<i>S. pasteurii</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
<i>S. arlettae</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0

Pri hodnotení citlivosti 41 izolátov stafylokokov zo svaloviny bažanta obyčajného voči ďalším štyrom antibiotikám (Tab. 2) bol u kmeňov *S. epidermidis* zaznamenaný najväčší počet izolátov rezistentných voči tetracyklínu, ampicilínu a gentamicínu. U druhov *S. warneri*, *S. haemolyticus* a *S. hominis* bola potvrdená najväčšia rezistencia voči gentamicínu. Ani u jedného z identifikovaných stafylokokových izolátov sa nepotvrdila rezistencia voči vankomycínu.

**Tab. 2** Prehľad počtu citlivých (C), intermediárne citlivých (I) a rezistentných (R) izolátov stafylokokov (*S.*) z mäsa bažanta obyčajného voči tetracyklínu, ampicilínu, gentamicínu a vankomycínu

Druh	Počet izolátov	Tetracyklín			Ampicilín			Gentamicín			Vankomycín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S. epidermidis</i>	17	15	0	2	15	0	2	15	1	1	0	0	17
<i>S. warneri</i>	8	5	0	3	3	0	5	8	0	0	0	0	8
<i>S. haemolyticus</i>	5	3	0	2	2	0	3	5	0	0	0	0	5
<i>S. hominis</i>	4	2	0	2	1	0	3	3	1	0	0	0	4
<i>S. xylosus</i>	3	3	0	0	3	0	0	3	0	0	0	0	3
<i>S. vitulinus</i>	2	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	2
<i>S. pasteurii</i>	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>S. arlettae</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1



V zmysle interpretačných kritérií pre agarovú dilučnú metódu (CLSI M100-S21, 2011) bola u všetkých 41 kmeňov stafylokokov izolovaných zo stehennej svaloviny bažanta obyčajného potvrdená najčastejšie rezistencia voči penicilínu (38 kmeňov) a naopak najväčšia citlivosť bola zaznamenaná voči vankomycínu (38 kmeňov). U všetkých stafylokokových izolátov (41 kmeňov) bola preukázaná antimikrobiálna rezistencia na 2 a viac testovaných antibiotík súčasne. Na podobné skutočnosti poukazujú aj viacerí autori, u ktorých percentuálny podiel výskytu rezistencie a multirezistencie na uvedené antibiotiká je na poprednom mieste. Mártonová a kol. (2008) testovali 138 kmeňov stafylokokov izolovaných zo vzoriek bažanta obyčajného. Touto štúdiou bola potvrdená najväčšia rezistencia voči erytromycínu (48,3%), penicilínu (45,0%) a ampicilínu (41,7%). Všetky stafylokokové izoláty boli citlivé na vankomycín. Al-Thani a Al-Ali (2012) izolovali 90 kmeňov stafylokokov z hospodárskych zvierat žijúcich na rôznych farmách v Katare a následne u nich stanovili percentuálny podiel rezistencie na jednotlivé antibiotiká. Najväčšiu rezistenciu zaznamenali voči penicilínu (66,66%) a naopak 100% -nú citlivosť voči cefalotínu. Ako vyplýva z našich dosiahnutých výsledkov, u stafylokokových izolátov zo svaloviny bažanta obyčajného sa najčastejšie zaznamenala rezistencia na penicilín a bola tiež preukázaná rezistencia na viac ako jedno antibiotikum.

*Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore z grantovej úlohy KEGA 010 UVLF-4/2011.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Al-Thani RF, Al-Ali F. Incidences and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus* species isolated from animals in different Qatari farms. *Afr J Microbiol Res.* 2012; 48:7454-8.
- CLSI document M07 – A8. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard, 8th edn. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2009; 65s.
- CLSI document M100 – S21. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-first informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA. 2011; 172s.
- Drozenová J, Petráš P. Vlastnosti koagulázo-negatívnych stafylokoků izolovaných z hemokultur. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2000; 49: 51-8.
- Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Infect Dis.* 2002; 11:677-85.
- Mártonová M, Pipová M, Jevinová P. Antibiotic resistance of staphylococci from hares, pheasants and poultry products in East Slovakia and North-East Austria. *J Food Nutr Res.* 2008; 47:163-9.
- Perreten V, Giampa N, Schuler-Schmid U, Teuber M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. *System Appl Microbiol.* 1998; 21:113-20.
- STN EN ISO 6887-3/01. Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 3: Špecifické pokyny na úpravu rýb a rybných výrobkov. SÚTN Bratislava, SR. 2003; 16s.
- STN EN ISO 6888-1/A1. Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda stanovenia počtu koagulázopozitívnych stafylokokov (*Staphylococcus aureus* a ďalšie druhy). Časť 1: Metóda s použitím Bairdovho-Parkerovho agarového média. SÚTN Bratislava, SR. 2004; 14s.
- STN ISO 3100-2. Mäso a mäsové výrobky. Odber vzoriek a príprava analytických vzoriek. Časť 2: Príprava analytických vzoriek na mikrobiologické skúšanie. SÚTN Bratislava, SR. 1999; 10s.

# ABUNDANCIA A SEZÓNNA DYNAMIKA POTENCIÁLNYCH VEKTOROV EHDV NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

Sarvašová A.<sup>1</sup>, Kočišová A.<sup>1</sup>, Csank T.<sup>2</sup>, Bhide K.<sup>2</sup>, Sopoliga I.<sup>3</sup>

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

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

<sup>3</sup>ÚZ pre chov a choroby zveri, rýb a včiel, Rozhanovce

## ABSTRAKT

Cieľom entomologického prieskumu bolo potvrdenie prítomnosti vektorov patogénov v chovoch hospodárskych a voľne žijúcich zvierat na východnom Slovensku. Súčasne sme pakomáriky vyšetrili metódou *real-time* PCR na prítomnosť vírusu epizootickej hemoragickej choroby. Vo vzorkách krvného séra zvierat zo sledovaných fariem sme zisťovali prítomnosť protilátok proti EHD ELISA metódou. Zo 45882 pakomárikov z rodu *Culicoides*, odchytených počas rokov 2011–2012, takmer 47 % tvorili potenciálne vektory *C. obsoletus/C. scoticus*. Na prítomnosť vírusu sme vyšetrili 36 poolov obsahujúcich 1851 samičiek *C. obsoletus/C. scoticus*. Výsledky PCR boli negatívne, podobne ako aj sérologické vyšetrenie.

## ÚVOD

Epizootická hemoragická choroba (EHD) je infekčné nekontagiózne ochorenie domácich a voľne žijúcich prežúvavcov prenášané pakomárikmi z rodu *Culicoides*. Pôvodca – *Epizootic haemorrhagic disease virus* (EHDV) patrí do čeľade *Reoviridae*, rod *Orbivirus* podobne ako aj pôvodca Bluetongue. Klinické prípady priebehu choroby boli popísané v Severnej Amerike, Austrálii, Ázii, Afrike a po roku 2000 aj v oblasti Stredozemného mora, konkrétne v Izraeli, Maroku, Alžírsku, Tunisku a Turecku. V Európe zatiaľ prípady EHD neboli potvrdené (Savini a kol., 2011).

Z pakomárikov najdôležitejšími vektormi vírusov v Európe sú druhy z *Obsoletus* komplexu – *C. obsoletus/C. scoticus*, ktoré patria k najrozšírenejším druhom v celej Palearktiskej oblasti a vírusy cirkulujúce v Európe Bluetongue a Schmallenberg vírus boli izolované v prevažnej väčšine zo samičiek spomínaných druhov (De Liberato a kol., 2005; Savini a kol., 2004; Mehlhorn a kol., 2007; De Regge a kol., 2012; Rassmusen a kol., 2012). Predpokladá sa, že na prenose EHD vírusu sa podieľajú tie isté druhy pakomárikov ako na prenose Bluetongue vírusu (Savini a kol., 2011).

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť abundanciu a sezónnu dynamiku *C. obsoletus/C. scoticus* v chovoch hospodárskych a voľne žijúcich zvierat na východnom Slovensku a vyšetriť ich na prítomnosť vírusu epizootickej hemoragickej choroby *real-time* PCR metódou.

## MATERIÁL A METODIKA

Pakomáriky sme odchyťovali v dvoch chovoch hovädzieho dobytku v Michal'anoch (okres Trebišov) a Tulčíku (okres Prešov) a v obore s danielou a muflónou zverou v Rozhanovciach (okres Košice-okolie). Po druhovej determinácii na základe morfológických znakov (Delécolle, 1985; Mathieu, 2012) sme samičky rozdelili podľa fyziologického stavu do štyroch kategórií, na: *nulliparous*, *parous*, *gravid* a *engorged*. Z *parous* a gravidných samičiek *C. obsoletus/C. scoticus* sme pripravili 36 poolov po 10–100 samičiek a vyextrahovali z nich RNA pomocou High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche). Real time PCR na detekciu EHD vírusu s TaqVet Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Kitom sme urobili podľa návodu výrobcu s prídavkom bovinného séra ku každej vzorke. Zároveň sme odobrali krv danielov (6 ks), muflónov (37 ks), hovädzieho dobytku (39 ks) a oviec (10 ks). Sérum sme vyšetrili komerčným kitom LSIvet EHDV Blocking Kit.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas entomologického prieskumu v rokoch 2011 a 2012 sme odchytili spolu 45882 kusov pakomárikov. Z 39 druhov bola najvyššia abundancia druhov *C. obsoletus/C. scoticus* (46,9%, n = 21529). Tieto druhy tvorili najvyšší podiel z celkovo odchytených pakomárikov na severovýchode Slovenska na farme v Tulčíku (67,82-88,41 %), v Rozhanovciach 65,0-68,0 % a najnižší na juhovýchode Slovenska v Michal'anoch (23,47-33,02 %). V jednotlivých oblastiach sme nezaznamenali výraznejšie zmeny v abundancii týchto druhov. *C. obsoletus/C. scoticus* sú aktívne v našom klimatickom pásme od začiatku apríla do začiatku novembra. Počas tohto obdobia dosahujú 1 až 4 vrcholy aktivity v závislosti od geografickej polohy, teploty prostredia, relatívnej vlhkosti a ďalších faktorov. V roku 2011 sme pozorovali 3 vrcholy aktivity vo všetkých sledovaných lokalitách súčasne a to v polovici mája, koncom mája a koncom júna. V Michal'anoch sme ešte zaznamenali štvrtý vzostup aktivity v polovici júla. V roku 2012 boli *C. obsoletus/C. scoticus* aktívne v jednotlivých oblastiach v rozdielnom období s nižším počtom generácií počas sezóny. V Rozhanovciach to boli 2 vrcholy aktivity (koncom mája a začiatkom augusta), podobne v Tulčíku (koncom júla a koncom augusta) a v Michal'anoch iba jeden (v polovici júna). Real-time PCR metódou sme vyšetrili celkovo 36 poolov obsahujúcich 1851 *parous* a gravidných samičiek *C. obsoletus/C. scoticus*. Všetky vyšetrené vzorky boli negatívne. Podobný bol aj výsledok sérologického vyšetrenia 92 vzoriek krvi hovädzieho dobytká, oviec, muflónov a danielov.

Napriek tomu, že výsledky vyšetrení pakomárikov na EHDV ako aj výsledky sérologické boli negatívne, sme touto štúdiou potvrdili vysokú abundanciu potenciálnych vektory *C. obsoletus/C. scoticus* nielen v chovoch hospodárskych zvierat ale aj v prírode pri voľne žijúcej zveri.

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- De Liberato C, Scavia G, Lorenzetti R, Scaramozzino P, Amadeo D, Cardeti G, Scicluna M, Ferrari G. Identification *Culicoides obsoletus* (Diptera: Ceratopogonidae) as a vector of bluetongue virus in central Italy. *Vet Rec.* 2005; 156: 301–304.
- De Regge N, Deblauwe I, De Deken R, Vantieghem P, Madder M, Geysen D, Smeets F, Losson B, van den Berg T, Cay A B. Detection of Schmallenberg virus in different *Culicoides* spp. by real-time RT-PCR. *Transbound Emerg Dis.* 2012; 59: 471–475.
- Delécolle J C. Nouvelle contribution à l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (Diptera : Ceratopogonidae) du Nord-Est de la France. Thesis, 1985; Université Louis Pasteur de Strasbourg, 229.
- Mathieu B, Cêtre-Sossah C, Garros C, Chavernac D, Balenghien T, Carpenter S, Setier-Rio ML, Vignes-Lebbe, Ung V, Candolfi E, Delécolle J-C. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasites & Vectors* 2012; 5:137, doi:10.1186/1756-3305-5-137
- Mehlhorn H, Walldorf V, Klimpel S, Jahn B, Jaeger F, Eschweiler J, Hoffmann B, Beer M. First occurrence of *Culicoides obsoletus*-transmitted Bluetongue virus epidemic in Central Europe. *Parasitol Res.* 2007; 101: 219–28.
- Savini G, Goffredo M, Monaco F, Di Gennaro A, de Santis P, Meiswinkel R, Caporale V. The isolation of bluetongue virus from field populations of the *Obsoletus* Complex in central Italy. *Vet Ital.* 2004; 40: 286–91.
- Savini G, Afonso A, Mellor P, Aradaib I, Yadin H, Sanaa M, Wilson W, Monaco F, Domingo M. Epizootic haemorrhagic disease. *Res Vet Sci.* 2011; 91: 1–17.
- Rasmussen LD, Kristensen B, Kirkeby C, Rasmussen TB, Belsham GJ, Bødker R. *Culicoides* as vectors of Schmallenberg virus. *Emerg Infect Dis* [serial on the Internet]. 2012. DOI: 10.3201/eid1807.120385

## DIAGNOSTIKA A VÝSKYT KVASINIEK RODU *MALASSEZIA* SPP. U PSOV

Sihelská Z.<sup>1</sup>, Váczi P.<sup>2</sup>, Čonková E.<sup>2</sup>, Holoda E.<sup>1</sup>, Badlík M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach*

<sup>2</sup>*Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach*

### ABSTRAKT

Taxonómia a nomenklatúra kvasiniek rodu *Malassezia* bola sporná desiatky rokov a až do roku 1990 boli známe len tri druhy malassezií, a to *M. pachydermatis*, *M. furfur* a *M. sympodialis*. Až s využitím molekulárnych metód boli objavené nové druhy a do roku 2011 bolo identifikovaných 14 druhov. V súčasnosti je diagnostika založená na fenotypovej a genotypovej identifikácii. Fenotypová identifikácia zahŕňa mikroskopické vyšetrenie, kultiváciu na selektívnych živných pôdach a biochemické vyšetrenie. Genotypová diagnostika je založená na molekulárnych metódach. Cieľom našej práce bola druhová identifikácia malassezií pomocou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) a reštrikčnej analýzy (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism) u klinicky zdravých a chorých psov. Zároveň bola vyhodnotená prevalencia malassezií.

### ÚVOD

Do rodu *Malassezia* patria lipofilné kvasinky, ktoré osídľujú zdravú kožu rôznych zvierat a sú diagnostikované pri dermatitídach a otitídach. V súčasnosti rod *Malassezia* obsahuje 14 druhov: *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. obtusa*, *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*, *M. dermatis*, *M. pachydermatis*, *M. caprae*, *M. equina*, *M. nana* a *M. cuniculi*, z ktorých posledné štyri boli izolované len z domácich zvierat (Cabañes a kol., 2011). *M. pachydermatis* je lipofilný, ale nie lipid-dependentný druh, zatiaľ čo ostatné druhy sú závislé na lipidoch. *M. pachydermatis* sa vyskytuje najčastejšie na koži, najmä v oblasti uší, ako u zdravých, tak aj klinicky chorých jedincov a bola izolovaná z rôznych druhov zvierat (Chen a Hill 2005). Je bežne prítomná na koži a slizniciach psov a mačiek, ale nie je súčasťou bežnej mikroflóry ľudí. U psov bol okrem *M. pachydermatis* zaznamenaný výskyt aj *M. furfur* (Crespo a kol, 2000; Duarte a kol., 2002) a veľmi zriedkavo *M. obtusa* v kombinácii s *M. furfur* (Crespo a kol, 2000).

### MATERIÁL A METODIKA

Z celkového počtu 180 psov bolo 87 prípadov klinicky chorých a 93 prípadov klinicky zdravých. Vzorky boli odobraté výterovým tampónom s transportným médiom (Fungi-Quick, Dispolab, Žilina, SR) z uší od zdravých psov a u chorých psov z postihnutých miest (vonkajší zvukovod, obsah análnych včkov, interdigitálny priestor a kožné lézie postihnuté dermatitídou). Následne boli inkubované po dobu 5 dní pri teplote 32 °C na špeciálnych médiách určených pre diagnostiku malassezií a diferenciaciu kvasiniek: Sabouraudov agar s chloramfenikolom, Sabouraudov agar s Tweenom, Hichrome Candida agar, Modifikovaný Dixonov agar, Modifikovaný Leeming and Notman agar. Identifikácia malassezií bola vykonaná na základe makro- a mikroskopického vzhľadu.

Zo vzoriek s výskytom *Malassezia* spp. bola izolovaná DNA z čistých 96 hodinových kultúr varom. Izoláty boli vyšetrené PCR metódou (upravenou podľa Gaitanis a kol., 2002) s primermi ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') a ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), pomocou ktorých sa amplifikuje časť 5.8S, kompletný ITS2 región a časť 28.S fungálneho rDNA génového komplexu. Reakčný PCR mix s objemom 50 µl obsahoval 1× PCR tlmivý roztok, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,15 µM z primerov ITS3 a ITS4, 0,1 mM dNTPs, 2,5 U *Taq* polymerázy a 2 µl templátovej DNA. Termálny profil reakcie bol nasledovný: iníciačná denaturácia (95 °C, 3 min.), 40 cyklov amplifikácie s denaturáciou (95 °C, 1 min), annealing (50 °C, 1 min), extenzia (72 °C, 1 min) a finálna



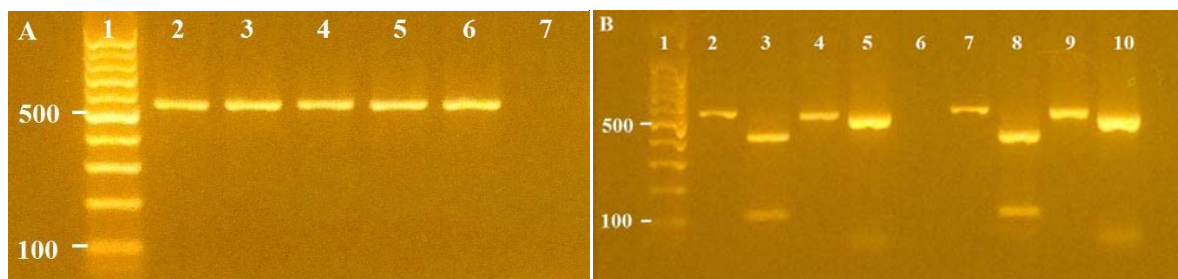
extenzia (72 °C, 10 min). PCR amplikóny boli analyzované elektroforézou v 1,5 % agarózovom géle. Z dôvodu podobných veľkostí PCR produktov jednotlivých druhov malassezií boli vzorky štiepené reštrikčnými endonukleázami *AluI*, *BanI* a *MspAII* (Gaitanis a kol., 2006). RFLP prebiehala v podmienkach uvedených v protokole výrobcu (BioLabs, New England) počas 4 hodín. DNA fragmenty boli elektroforeticky oddelené v 1,5 % agarózovom géle.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z klinicky chorých psov sme mykologickou diagnostikou v 29 prípadoch zaznamenali prítomnosť *Malassezia* spp. Z klinicky zdravých sme pozitívitu zistili pri 30 psoch. V tomto súbore sa vyskytlo navyše 21 kultivačne a mikroskopicky odlišných izolátov. V 20 vzorkách sa objavili súčasne dva typy kolónií a jedna vzorka obsahovala 3 rôzne kolónie, ktoré boli analyzované ako samostatné vzorky. Predpokladali sme výskyt rozdielnych druhov *Malassezia* spp., resp. rozdielnych morfológických typov kolónií popisovaných pri *M. pachydermatis* (Huag a kol., 1993) alebo dva (Kiss a kol., 1996), resp. tri mikroskopické typy buniek (Galuppi a Tampieri, 2008). V deviatich vzorkách boli kolónie aj bunky identické. Vo vzorkách získaných od chorých psov sme nenašli žiadne odlišnosti v morfológii kolónií alebo buniek.

Z dôvodu nejasnosti a nepresnosti fenotypových metód sme na diagnostiku využili PCR metódu a RFLP. Metódou PCR sme potvrdili rodovú príslušnosť kvasiniek (Obr. 1A), kým reštrikčnou analýzou sme ich rozlíšili aj druhovo (Obr. 1B, Tab. 1). Po PCR vznikli amplikóny o dĺžke 529 bp. Po štiepení enzýmom *AluI* vznikli fragmenty 412 bp a 117 bp, po reakcii s *MspAII* fragmenty s veľkosťou 499 a 30 bp, zatiaľ čo reštrikčný enzým *BanI* neštiepil ani jednu vzorku. Všetkých 80 terénnych izolátov sme diagnostikovali ako *M. pachydermatis*, ktorú sme potvrdili aj vo vzorkách s odlišnou morfológiou buniek a kolónií. Tieto výsledky poukazujú na to, že sa nejedná o rozdielne druhy, ale môže ísť o rozdielne morfológické typy, prípadne o genotypovú heterogénnosť, ktorú možno potvrdiť inou molekulovou metódou, napr. RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) (Castellá a kol., 2005).

Prevalencia *M. pachydermatis* u zdravých (32 %) a chorých psov (33 %) je podobná. Z pohľadu plemenného zastúpenia bola detekcia najčastejšia pri plemenách Yorkshirsky teriér, kokeršpaniel a pudel. Najväčší záchyt *M. pachydermatis* bol v skupine chorých psov s diagnózou chronická otitída vonkajšieho zvukovodu. V skupine zdravých psov bola *M. pachydermatis* najčastejšie diagnostikovaná vo veku 2 - 6 rokov a v skupine chorých psov vo veku 3 - 6 rokov.



**Obr. 1. PCR a RFLP, A:** PCR produkty ITS 3/4: 1 – 100 bp ladder; 2 – referenčný kmeň *M. pachydermatis* CBS 1879; 3; 4; 5; 6 – terénne vzorky; 7 – negatívna kontrola (destilovaná voda); **B:** 1 – 100 bp ladder, 2 – neštiepený PCR produkt *M. pachydermatis* CBS 1879; 3 – štiepenie s *AluI*; 4 – štiepenie s *BanI*; 5 – štiepenie s *MspAII*; 6 – medzera; 7 - neštiepený PCR produkt terénnej vzorky; 8 – štiepenie s *AluI*; 9 – štiepenie s *BanI*; 10 – štiepenie s *MspAII*



Posúdenie klinickej úlohy jednotlivých druhov malassezií je komplikované ich problematickou izoláciou, kultiváciou a identifikáciou. Aj keď sú molekulové metódy na vysokej úrovni, ešte stále nie je genóm malassezií úplne preskúmaný.

**Tab. 1. Veľkosti PCR produktov ITS 3/4 jednotlivých druhov malassezií a veľkosti ich fragmentov po RFLP (Gaitanis a kol., 2006)**

Druh	ITS3/4 bp	AluI	BanI	MspAII
<i>M. furfur</i>	557	306/251	389/168	525/32
<i>M. obtusa</i>	554	*	396/158	*
<i>M. pachydermatis</i>	529	412/117	*	499/30
<i>M. japonica</i>	528	394/134	199/188/146	498/30
<i>M. slooffiae</i>	505	385/120	*	472/33
<i>M. globosa</i>	477	240/221/16	*	447/30
<i>M. yamatoensis</i>	470	*	*	*
<i>M. restricta</i>	463	*	277/186	432/31
<i>M. nana</i>	428	*	240/188	286/110/32
<i>M. sympodialis</i>	420	*	*	281/109/30
<i>M. dermatis</i>	416	*	230/186	192/109/85/30

*Práca bola podporená projektom APVV 0357-07.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cabañes FJ, Vega S, Castellá G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med Mycol.* 2011; 49:40-8.
- Castellá G, Hernández JJ, Cabanes FL. Genetic typing of *Malassezia pachydermatis* from different domestic animals. *Vet Microbiol.* 2005; 108:291-6.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2383-85.
- Duarte ER, Lachance MA, Hamdan JS. Identification of atypical strains of *Malassezia* spp. from cattle and dog. *Can J Microbiol.* 2002; 48:749-52.
- Gaitanis G, Velegriaki A. Verifiable single nucleotide polymorphisms of the internal transcribed spacer 2 region for the identification of 11 *Malassezia* species. *J Dermatol Sci.* 2006; 43:214-7.
- Gaitanis G, Velegriaki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, Katsambas A, Legakis NJ. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin Microbiol Infect.* 2002; 8: 162-73.
- Galuppi R, Tampieri MP. Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. *Parasitologia.* 2008; 50:73-6.
- Huang HP, Little CJL, Fixter LM. Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. *Res Vet Sci.* 1993; 55:119-23.
- Chen TA, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol.* 2005; 16: 4-23.
- Kiss G, Radvanyi S, Szigeti G. Characteristics of *Malassezia pachydermatis* strains isolated from canine otitis externa. *Mycoses.* 1996; 39: 313-21.

# SLEDOVANIE PROBIOTICKÝCH VLASTNOSTÍ U *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* A *LACTOBACILLUS PLANTARUM* IZOLOVANÝCH Z MLIEKA A MLIEČNYCH VÝROBKOV

Straková E.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom tohto projektu je analýza funkčných vlastností kyslomliečnych baktérií s cieľom identifikovať nové probiotické kmene. Dosažené výsledky budú slúžiť v aplikovanom výskume vo veterinárnych ako aj humánných laboratóriách pri identifikácii nových potenciálnych probiotických kmeňov.

24 kmeňov izolovaných z mlieka a mliečnych výrobkov identifikovaných pomocou MALDI-TOF ako *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus plantarum* bolo podrobených vylučovaciemu skríningu v rámci ktorého bola analyzovaná citlivosť na príslušnú referenčnú škálu antibiotík, schopnosť kmeňov prežiť pasáž tráviacim traktom (pH 2,5, 0,3% oxgall), enzymatická aktivita, stanovená bola aj schopnosť tvorby biofilmu a antimikrobiálna aktivita voči vybraným intestinálnym patogénom.

Všetky vyšetované kmene vykazovali dobrú prežívateľnosť v podmienkach simulujúcich podmienky v tráviacom trakte (prežívateľnosť po 4 hodinovej expozícii bola v rozmedzí 74-99%). S výnimkou 3 kmeňov *L. plantarum* 1915, 19110 a 1814 s *non wilde-type* ECOFF hodnotami pre klindamycin alebo gentamicin, boli všetky ostatné testované kmene citlivé na referenčnú škálu antibiotík. Z vyšetovaných kmeňov iba 3 kmene *L. rhamnosus* G10, 183, 65 a 3 kmene *L. plantarum* 1711, 1813 a 1614 nemali nežiadúcu  $\beta$ -glukozidázovú a  $\beta$ -glukuronidázovú aktivitu a zároveň tvorili biofilm. U týchto kmeňov bola analyzovaná ich antimikrobiálna aktivita voči vybraným intestinálnym patogénom agarovým spot testom. 2 kmene (*L. rhamnosus* 183a *L. plantarum* 1813) vykazovali výraznú inhibičnú aktivitu voči všetkým vybraným intestinálnym patogénom (*E.coli* NB 2007 vt1 a vt2 pozit, *E.coli* T12 EsBL, *Salmonella sp.* H9812).

Na základe získaných výsledkov kmene *L. rhamnosus* 1813 a *L. plantarum* 183 môžu byť vhodnými kandidátmi na ďalšie *in vivo* testy a možnosť ich využitia ako probiotické kmene.

## ÚVOD

V posledných rokoch vzrástlo celosvetovo používanie probiotických kmeňov baktérií pre ich pozitívne účinky na zdravotný stav. Je známe, že ciele použítie takýchto mikroorganizmov s vhodnými vlastnosťami má pozitívny vplyv na zdravie ľudí a zvierat. Primárna selekcia nových probiotických kmeňov je založená sérii *in vitro* testov, pri ktorých sa vylúčia kmene s nežiadúcimi parametrami ako napríklad získaná rezistencia na antibiotiká alebo nežiadúca enzymatická aktivita.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky boli naočkované na MRS agar a kultivované 48 hod pri 37°C. Po extrakcii proteínov pomocou kyseliny mravčej a acetonitrilu boli identifikované pomocou MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) hmotnostnej spektrometrie (Bessede et al., 2011) ako *L. rhamnosus* a *L. plantarum*.

Stanovenie citlivosti izolátov na gentamicin, kanamycín, streptomycín, neomycín, tetracyklín, erythromycín, klindamycín, chloramphenikol, ampicilín, penicilín, vankomycín, virginiamycín, linezolid, trimethoprim, ciprofloxacín a rifampicin bolo prevedené mikrodilučnou metódou pomocou Vet MIC Lact kitu (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, Uppsala, Švédsko) podľa ISO 10932 (2010). Sledovanie prežívateľnosti v podmienkach simulujúcich tráviaci trakt bolo uskutočnené podľa metodiky, ktorú popísal Anderson et

al.(2010) vo svojej práci. Cez noc kultivované laktobacily boli naočkované na MRS bujón obsahujúci 0,3% oxgall (Difco) a na kontrolný MRS agar ( $10^6$  CFU/ml), prežítateľnosť bola hodnotená po 4 hod expozícii pri anaeróbných podmienkach a  $37^{\circ}\text{C}$  naočkováním 100  $\mu\text{l}$  na MRS agar. Na stanovenie enzymatickej aktivity bol použitý API ZYM systém (BioMérieux, Francúzsko), po 4 hod anaeróbnej inkubácii bol stupeň enzymatickej aktivity odčítaný podľa farebnej škály (1-5), ktorej intenzita korešponduje s množstvom hydrolyzovaného substrátu v rozsahu od 0-40 nanomol (Arora et al.,1990). Schopnosť tvoriť biofilm na abiotických povrchoch (Nunc, Dánsko) bola analyzovaná spektrofotometricky (Bujnakova, 2012) pri 570 nm Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA). Pri hodnote  $> 0,1$  sa tvorba biofilmu hodnotí ako slabá, od 0,1- 0,2 ako stredná a pri hodnotách  $< 0,2$  sa tvorba biofilmu považuje za silnú. Inhibičný potenciál voči vybraným intestinálnym patogénom (*E.coli* NB 2007 vt1 a vt2 pozit, *E.coli* T12 EsBL, *Salmonella sp. H9812*) bol hodnotený pomocou agarového spot testu (Schillinger, 1989)

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

24 kmeňov izolovaných z mlieka a mliečnych výrobkov identifikovaných pomocou Maldi-TOF ako *Lactobacillus rhamnosus* a *Lactobacillus plantarum* bolo podrobených *in vitro* vylučovaciemu skríningu, kde boli sledované ich funkčné probiotické vlastnosti. Životaschopnosť a tolerancia k žľčovým kyselinám je jedným zo základných vyšetřovaných parametrov pri identifikovaní nových probiotických baktérií. Všetky z testovaných kmeňov vykazovali vysokú prežítateľnosť po 4 hod anaeróbnej kultivácii v podmienkach simulujúcich tráviaci trakt ,pri pH 2.5 od 74-91% a pri 0.3% oxgall od 89-99% . Na referenčnú škálu antibiotík boli citlivé všetky testované kmene s výnimkou *L. plantarum* 1915, 19110 a 1814s *non wilde-type* ECOFF hodnotami pre klindamycin a gentamicin. Z vyšetřovaných kmeňov iba 3 *L. rhamnosus* G10, 183, 65 a 3 kmene *L. plantarum* 1711, 1813 a 1614 nemali nežiadúcu  $\beta$ - glukozidázovú a  $\beta$ - glukuronidázovú aktivitu, ktorá je spájaná so škodlivými účinkami v hrubom čreve a tvorbou karcinogénov (Tab.1). Tieto vyššie spomínané kmene zároveň tvorili biofilm (Tab.2), táto vlastnosť je dôležitá z hľadiska dlhodobého udržiavania skladby a funkčnosti intestinálnej mikroflóry ako aj prevencie a terapie chorôb. Najvyššia antimikrobiálna aktivita bola zaznamenaná u *L. plantarum* 1813 a *L. rhamnosus* 183, ktoré inhibovali rast verotoxigénnej *E.coli* NB2007 (vt1, vt2 pozitívna), *E. coli* T12 EsBL ako aj *Salmonella* H9812 (Tab.3).

Na základe našich výsledkov možno zhodnotiť, že spomínané kmene *L. rhamnosus* 183 a *L. plantarum* 1813 sú vhodnými kandidátmi vzhľadom na svoje vlastnosti pre ďalší výskum a potenciálne probiotické využitie.

Tab. 1 Enzymatická aktivita analyzovaná pomocou API-ZYM systému

Kmene	Enzyomy												
	Naphptol-Phosphohydrolase	AS-Phosphohydrolase	Acidophosphatase	Esterase (C4)	Esterase-Lipase (C8)	Leu- Arylamidase	Val- arylamidase	Cys- arylamidase	$\alpha$ - Galactosidase	$\beta$ - Galactosidase	$\beta$ - Glucuronidase	$\alpha$ - Glucosidase	$\alpha$ - Fucosidase
<i>L. rhamnosus</i> G1	10	10	5	20	40	40	5	40	40	5	40	5	40
<i>L. rhamnosus</i> G4	20	30	20	20	30	30	5	0	40	5	40	20	
<i>L. rhamnosus</i> G10	10	10	10	10	20	20	5	5	40	0	0	0	
<i>L. rhamnosus</i> LC705	20	20	20	30	30	40	5	0	30	5	30	10	
<i>L. rhamnosus</i> 7039	5	10	20	20	20	40	5	0	5	0	30	20	
<i>L. rhamnosus</i> ALC01	20	20	10	20	40	40	10	30	30	5	10	5	
<i>L. rhamnosus</i> 65	5	5	5	5	40	40	5	40	40	0	0	5	

<i>L. rhamnosus</i> 81	10	20	0	20	40	40	10	40	40	5	30	10
<i>L. rhamnosus</i> 183	10	10	10	10	40	40	5	40	40	0	0	5
<i>L. plantarum</i> 1711	10	10	5	20	≥40	≥40	5	≥40	0	0	0	30
<i>L. plantarum</i> 1714	20	30	20	20	30	30	5	0	5	20	≥40	5

<sup>a</sup>Enzymatická aktivita meraná ako množstvo hydrolyzovaného substrátu (nanomol) počas 4h inkubácie

<sup>b</sup>Nežiadúca enzymatická aktivita

Tab. 2 : Kvantifikácia schopnosti tvoriť biofilm ( crystal violet assay)

Kmene	Crystal violet assay
	(A <sub>570</sub> )
<i>L. rhamnosus</i> G10	0,195±0,015
<i>L. rhamnosus</i> 65	0,164±0,025
<i>L. rhamnosus</i> 183	0,174±0,022
<i>L. plantarum</i> 1711	0,295±0,015
<i>L. plantarum</i> 1813	0,264±0,025
<i>L. plantarum</i> 1614	0,274±0,022

Hodnoty pre blank (sterilné medium) boli odčítané, uvedené sú priemerné hodnoty z meraní ôsmich replikátov ± štandardná odchylka, A<sub>570</sub>- absorbanca pri λ = 570

Tab. 3: Inhibičný potenciál *L. rhamnosus* a *L. plantarum* voči intestinálnym patogénom

Kmene	<i>E. coli</i> NB2007 (vt1, vt2 pozitívny)	<i>E. coli</i> T12 (ESBLs)	<i>Salmonella</i> sp. (H9812)
<i>L. rhamnosus</i> G10	++	-	-
<i>L. rhamnosus</i> 65	++	-	-
<i>L. rhamnosus</i> 183	++	+	++
<i>L. plantarum</i> 1711	++	-	-
<i>L. plantarum</i> 1813	++	++	++
<i>L. plantarum</i> 1614	-	-	+/-

(-) žiadna inhibícia, (+/-) inhibícia s nejasnou zónou inhibície, (+) zóna inhibície v rozsahu 2-5 mm okolo jamky, (++) zóna inhibície väčšia ako 5 mm

Táto práca je výsledkom projektu Č. 26220220152 podporovaného Výskumným a vývojovým operačným programom financovaného ERDF

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anderson R.C., Cookson A.L., McNabb W.C., Kelly W.J., Roy N.C., *Lactobacillus plantarum* DSM 2648 is a potential probiotic that enhances intestinal barrier function, FEMS Microbiol. Lett. 2010, 309:184-192.
- Arora G., Lee B.H., Lamoureux M., Characteristic of enzyme profiles of *Lactobacillus casei* species by rapid API-ZYM system, J. Dairy Sciences. 1990, :264-273.
- Bujnakova D., Kmet V., Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Folia microbiologica. 2012, 57: 263- 267
- Bessedé E., Angla-gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Ménard A., Mégraud F., Matrix- assisted laser-desorption/ionization Biotyper: experience in the routine of a University hospital, Clin. Microbiol. Infect. 2011, 17: 533- 538.
- International standard ISO 10932: Milk and milk products- determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non- enterococcal lactic acid bacteria (LAB), 2010
- Schillinger, U., and F. K. Lücke. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 1989, 55:1901-1906.

## IZOLÁT V6 Z DRENÁŽNEJ VODY SKLÁDKY HNEDEHO KALU V ŽIARI NAD HRONOM – PRAVDEPODOBNE NOVÝ DRUH RODU *BREVUNDIMONAS*

Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Vandžurová, A.<sup>1</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

Jedinými predstaviteľmi gramnegatívnych baktérií v bakteriálnej populácii drenážnej vody skládky hnedého kalu z výroby hliníka v závodoch SNP v Žiari nad Hronom sú prakticky identické izoláty V6 a V7. Tieto izoláty sa nepodarilo v našej predchádzajúcej práci identifikovať pomocou MALDI TOF analýzy (Stramová a kol., 2012). Izolát V6 sme podrobnejšie charakterizovali kombináciou molekulárnych a mikrobiologických metód. Na základe porovnania 16S rRNA sekvencií sme tento izolát zaradili do rodu *Brevundimonas*. Táto baktéria je schopná rásť v prítomnosti 1% NaCl, pri teplote 25°C, a aj keď je schopná rásť pri pH 10, pH optimum pre rast sa pohybuje v neutrálnej oblasti. Na základe porovnania vlastností izolátu V6 s ostatnými druhmi rodu *Brevundimonas* môžeme predpokladať, že V6 izolát je predstaviteľom nového druhu rodu *Brevundimonas*.

### ÚVOD

V predchádzajúcej práci (Stramová a kol., 2012) sme identifikovali viaceré izoláty z drenážnej vody skládky odpadového kalu z výroby hliníka v závodoch SNP v Žiari nad Hronom. Drenážna voda je extrémne alkalická (pH=13) a má relatívne vysoký obsah ťažkých kovov. Pomocou kultivačných metód sme z tohto prostredia získali 12 izolátov, ktoré sme charakterizovali pomocou MALDI-TOF analýzy proteínových profilov. V bakteriálnej populácii drenážnej vody skládky hnedého kalu dominujú predovšetkým grampozitívne baktérie ako napríklad *Bacillus megatherium* a *Micrococcus luteus*. Jedinými predstaviteľmi gramnegatívnych baktérií sú prakticky identické izoláty V6 a V7, ktoré sa nepodarilo identifikovať pomocou MALDI TOF analýzy. Cieľom tejto práce bolo presnejšie identifikovať izolát V6 izolovaný z drenážnej vody skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom.

### MATERIÁL A METODIKA

*Pôvod a spracovanie vzoriek:* Izolát V6 sme získali počas predchádzajúcich experimentov (Stramová a kol., 2012). Izolát sme kultivovali po dobu 40 hod. pri teplote 25°C v tekutom TSB (Tryptone Soya Broth, Becton Dickinson, USA) médiu, alebo na tuhých TSA médiách (Tryptone Soya Agar) toho istého výrobcu.

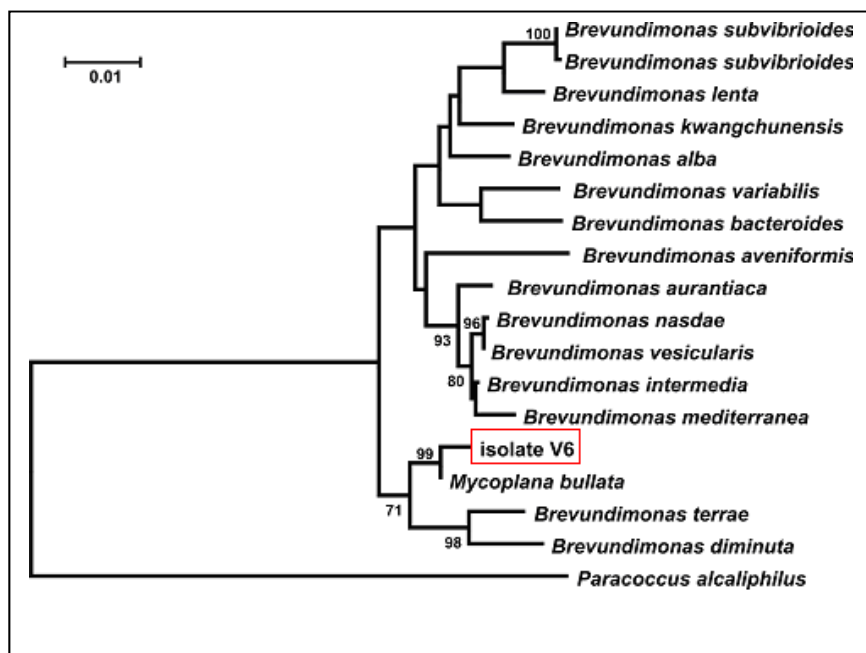
*Fylogenetická charakterizácia izolátu:* Chromozomálnu DNA izolátu V6 sme izolovali pomocou GenElute Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, Germany) z 20 ml kultúry rastúcej 40 hod. pri 25°C. Izolovanú DNA (50 ng) sme použili ako substrát v PCR reakcii so 16S rRNA špecifickými eubakteriálnymi primérmí fD1 a rP2 (Weisburg a kol., 1991). Amplifikovaný PCR produkt sme klonovali a následne sekvenovali. Sekvencie sme taxonomicky klasifikovali pomocou blastn analýzy voči databáze 16S rRNA sekvencií typových kmeňov baktérií a archea, dostupnej na stránke <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>. Sekvencie vykazujúce najvyššiu podobnosť sme použili pre konštrukciu fylogenetického stromu príbuznosti izolátu V6 s využitím algoritmov clustalw a neighbor-joining implementovaných v programe MEGA 5 (Tamura a kol., 2011). Pri konštrukcii fylogenetického stromu sme ako outgroup použili sekvenciu génu pre 16S rRNA *Paracoccus alcaliphilus* (prístupové číslo v GenBank databáze AY014177)



*Biochemická a mikrobiologická charakterizácia izolátu:* Ďalšie vlastnosti izolátu V6 sme stanovili klasickými biochemickými a mikrobiologickými postupmi.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou sekvencií 16S rRNA sa nám podarilo identifikovať izolát V6 ako baktériu rodu *Brevundimonas* (Obr. 1). Izolát V6 vytvára spolu s druhmi *Mycoplana bullata*, *B. terrae* a *B. diminuta* samostatnú fylogenetickú vetvu, ktorá je geneticky vzdialená od ostatných kmeňov rodu *Brevundimonas*. 16S rRNA sekvencia izolátu V6 vykazuje najvyššiu podobnosť k sekvencii *M. bullata* (99,5 %), fylogenetická vzdialenosť medzi sekvenciami izolátu V6 a typovým kmeňom *M. bullata* je však vyššia než je vzdialenosť napr. medzi druhmi *B. nasdae* a *B. vesicularis* (Obr. 1), čo naznačuje, že izolát V6 je predstaviteľom nového, doteraz nepopísaného druhu rodu *Brevundimonas*.



Obr. 1: Fylogenetický strom dokumentujúci podobnosť 16S rRNA sekvencie izolátu V6 (zvýraznená obdĺžnikom) k ostatným druhom rodu *Brevundimonas*

Baktérie rodu *Brevundimonas* sa bežne vyskytujú vo vodnom prostredí, ale boli izolované aj z pôdy a viaceré kmene aj z klinických vzoriek. *B. vesicularis* je známy aj ako pôvodca nozokomiálnych infekcií. Rod *Brevundimonas* zahŕňa štrnásť druhov, medzi ktoré patria napr. *B. diminuta*, *B. vesicularis*, *B. alba*, *B. aurantiaca*, *B. bacteroides*, *B. intermedia*, *B. subvibrioides*, *B. variabilis*, *B. nasdae*, *B. mediterranea*, *B. terrae*, *B. vesicularis*, (Ryu a kol., 2007). Do tohto rodu sa zaraďuje aj *Mycoplana bullata* (Kang a kol., 2009), ktorá bola preklasifikovaná na *Brevundimonas bullata*. Ide o gramnegatívne baktérie tyčinkovitého tvaru so zaoblenými koncami, vyskytujúce sa samostatne a v pároch. Tieto baktérie sú schopné rásť bez prítomnosti NaCl avšak optimálne hodnoty NaCl pre rast týchto mikroorganizmov sú v rozmedzí 0,5 – 2% NaCl. Optimálna teplota kultivácie je 28 – 30°C a niektoré druhy sú schopné rásť pri teplote 37°C či dokonca 42°C (*B. diminuta*). pH optimum týchto baktérií sa pohybuje v neutrálnej oblasti (pH = 5 – 9) (Poindexter, 1989). Aj keď niektoré druhy boli izolované z alkalického prostredia; napr. *B. terrae* a *B. kwangchunensis* (Yoon a kol., 2006), nie sú známe žiadne alkalofilné druhy tohto rodu.

V nasledujúcich experimentoch sme klasickými biochemickými a mikrobiologickými postupmi stanovili vlastnosti izolátu V6 a porovnali sme ich s vlastnosťami vybraných kmeňov rodu *Brevundimonas* (Tabuľka 1). Podobne ako ostatné druhy rodu *Brevundimonas* aj izolát V6 utilizuje len obmedzený počet uhlíkatých zlúčenín. Aj napriek tomu, že izolát V6

bol izolovaný z vysoko alkalického prostredia (pH = 13) s vysokým obsahom solí (4% NaCl) (Stramová a kol., 2012), v podmienkach *in vitro* bol schopný rásť v prítomnosti len 1% NaCl, ale nie v prítomnosti 4% NaCl. Izolát V6 rástol pri pH = 9 aj 10, ale pH optimum pre rast sa pohybovalo v neutrálnej oblasti (pH = 7).

Tabuľka 1: *Utilizácia vybraných zdrojov uhlíka izolátom V6 a vybranými druhmi rodu Brevundimonas*

Substrát	<i>B. terrae</i>	<i>B. diminuta</i>	<i>M. bullata</i>	V6
D-maltóza	-	-	-	+
Cellobióza	-	-	-	+
L-ramnóza	-	-	-	+
L-histidín	-	-	-	+
Tween 40	+	+	-	+
Kyselina $\alpha$ -ketomaslová	-	-	+	-
Kyselina octová	-	+	-	+

Pri raste na TSA médiu izolát V6 produkoval hnedý difuzibilný pigment. Podobný pigment je schopný produkovať kmeň *B. diminuta*, ale nie *M. bullata* (Yoon a kol., 2006). Podobne sme pri štúdiu biochemických vlastností izolátu V6 pomocou Biolog systému (Biolog, USA) pozorovali viacero odlišností v biochemických vlastnostiach oproti kmeňu *M. bullata* a ostatným kmeňom rodu *Brevundimonas* (Tabuľka 1), a teda môžeme predpokladať, že izolát V6 je novým druhom rodu *Brevundimonas*. Pre overenie tohto predpokladu sú potrebné ďalšie experimenty a porovnania medzi izolátom V6 a ďalšími kmeňmi rodu *Brevundimonas*.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Garrity, G. M. a kol., *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2005; 2: 208-316
- Kang, S. J. a kol., *Brevundimonas naejangsanensis* sp. nov., a proteolytic bacterium isolated from soil, and reclassification of *Mycoplana bullata* into the genus *Brevundimonas* as *Brevundimonas bullata* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009; 59:3155-3160
- Li, Y. a kol., *Sphingomonas yabuuchiae* sp. nov. and *Brevundimonas nasdae* sp. nov., isolated from the Russian space laboratory Mir. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54: 819–825.
- Poindexter, J. S. Genus *Caulobacter* Henrici and Johnson 1935. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1989; 3: 1924–1939.
- Ryu, S. H., a kol., *Brevundimonas aveniformis* sp. nov., a stalked species isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2007; 57: 1561–1565.
- Stramová, Z. a kol. Bakteriálne spoločenstvo drenážnej vody skládky hnedého kalu v Žiari nad Hronom. Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu. VII. Ročník, Košice, 10.-11. september 2012.
- Tamura, K. a kol., MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28: 2731-2739.
- Weisburg, W. G. a kol., 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 1991; 173: 697-703.
- Yoon, J. H. a kol., *Brevundimonas terrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006; 56: 2915–2919.

## STRATA DRUHOVEJ IDENTITY ŽIVORODÝCH RÝB

Šmiga L.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Koščo J.<sup>2</sup>, Lazar P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra výživy, dietiky a chovu zvierat, Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied PU, Prešov

### ABSTRAKT

Množstvo medzidruhových krížení rýb bolo realizovaných za účelom docielenia požadovaných fenotypových vlastností. Z tohto dôvodu sa aj dnes stretávame v komerčnom chove s vytváraním hybridov jednotlivých druhov a to nielen živorodých rýb. Ako dôsledok chýbajúceho vhodného genetického materiálu, nezodpovednosti akvaristov pri chove a šľachtení rýb, ako aj neustála potreba chovateľov vytvárať nové tvarové a farebné formy sú hybridy často nachádzané aj u neprofesionálnych akvaristov (Dokoupil, 1981). Determinované ryby na základe zvolených morfometrických a plastických determinačných znakov pochádzali z komerčných chovov, alebo výstav. Zaznamenali sme až 70 % zastúpenie hybridov druhov *Poecilia velifera* a *Poecilia latipinna* a až 11 % výskyt krížencov *Xiphophorus maculatus* a *Xiphophorus variatus* v komerčných chovoch, ale aj u neprofesionálnych akvaristov. Oveľa menšie iba 22 % zastúpenie fenotypovo odlišných jedincov od spomínaných druhov molnézii sme determinovali na výstavách a len zanedbateľné množstvo hybridov spomínaných plát. Tento fakt súvisí s vyššou erudovanosťou a profesionalitou chovateľov zaoberajúcich sa chovom šľachtených živorodiek za účelom vystavovania. Cieľom tejto práce je šírenie osvetu v tejto problematike medzi profesionálnymi a hobby akvaristami. Vytváraním hybridov vážne ohrozujeme genofond pôvodných, často v prírode kriticky ohrozených druhov. Výskyt početných malformácií u hybridov je jednou z foriem týrania zvierat a malo by byť predmetom záujmu predovšetkým veterinárnych lekárov.

### ÚVOD

Problematika hybridov je momentálne veľmi aktuálnou témou aj medzi ichtyológmi zaoberajúcimi sa ichtofaunou voľne žijúcich populácii rýb (Janko et al., 2012; Maresova, Luskova, Lojkasek, 2012; Oke et al., 2013). Medzidruhovým krížením živorodých rýb sme dosiahli mnohé atraktívne farebné a tvarové formy, ktoré sú predmetom komerčnej akvaristiky, ale aj špecializovaných výstav v rámci tejto skupiny rýb. V USA dochádza v poslednom období takýmto spôsobom k ohrozeniu genofondu niektorých druhov predovšetkým rodu *Xiphophorus* zo skupiny označovanej pracovne, ako „PMH group“, ktorá zahŕňa druhy zoologicky ešte dostatočne nepreskúmané (Levine, 2013). Cieľom práce bolo zmapovať výskyt čistých foriem skúmaných druhov živorodých rýb a ich hybridov a oboznámiť ichtyologickú spoločnosť, veterinárnych lekárov, ako aj laickú verejnosť s touto problematikou.

### MATERIÁL A METODIKA

V priebehu rokov 2008 – 2013 sme sledovali percentuálne zastúpenie rýb čeľade Poeciliidae, konkrétne *Poecilia velifera*- živorodky veľkoplutvej (rod *Poecilia*) a *Poecilia latipinna*- živorodky širokoplutvej (rod *Poecilia*) a hybridov týchto druhov, ako aj *Xiphophorus maculatus*- platy škvrnitej (rod *Xiphophorus*) a *Xiphophorus variatus*- platy pestrej (rod *Xiphophorus*) a ich hybridov. Skúmané jedince sme rozdelili do dvoch skupín. Jedince rodu *Poecilia*, dosahovali veľkosť najmenej 60 mm, ryby rodu *Xiphophorus* 30 mm. Pri rode *Poecilia* boli všetky jedince základného tvaru, rovnako ako aj pri rode *Xiphophorus*. Skúmané jedince oboch rodov boli rôzneho základného a krycieho sfarbenia (farebnej a čiernej kresby) a pigmentácie očí.

Prvú skupinu tvorili jedince pochádzajúce z výstav, druhú skupinu tvorili jedince pochádzajúce z chovov, ktoré sa nezúčastňovali výstav (komerčné chovy, akavapredajne, hobby akvaristi). Pri niektorých temperamentnejších jedincoch, alebo z iných dôvodov bola k posúdeniu znakov použitá anestéza (pomocou oxidu uhličitého), alebo fotodokumentácia. Druhovú determináciu

bola vykonávaná na základe FishBase, prác Sterbu (1959), Dokoupila (1981) a Interstandardu Xipho – Molly 2001 (ISXM 01, 2004). Druhovú determináciu bola vykonávaná na základe odlišnosti v plastických druhových znakoch, konkrétne počtu lúčov *pinna dorsalis* (pričom sa bral do úvahy počet všetkých lúčov- rozvetvených, nerozvetvených, mäkkých a tvrdých). Z morfometrických determinačných znakov sme využívali pomer výšky a dĺžky *pinna dorsalis* k dĺžke tela a šírky chvostového násadca k dĺžke tela. Z ostatných determinačných znakov sme posudzovali sfarbenie tela a plutiev (pri základnej farbe prírodnej, divoké sfarbenie) a úroveň postavenia *pinna dorsalis* a *pinna pectoralis*. Jedinec, ktorý sa v týchto determinačných znakoch nezhodoval so zoologickým opisom jedných druhov, bol zaradený medzi hybridy. Rovnako boli krížence rozdelené do skupín označených ako jedinec typu *latipinna*, alebo typu *velifera* podľa toho, ku ktorému fenotypu jednotlivých druhov mali bližšie. Pri determinácii sa zohľadňovala mierna fenotypová odlišnosť druhov chovaných v zajatí (po dlhodobom šľachtení) od druhov vyskytujúcich sa v prírode.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo skupiny vystavovaných jedincov bolo determinovaných 112, z komerčných chovov 207 rýb. Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov a ich hybridov je zaznamenané v tabuľke. Na výstavách sa hybridné jedince platy pestrej a škrvnitej vyskytujú veľmi zriedkavo (0,15 %). V obchodnej sieti, alebo v komerčných chovoch tvorili fenotypovo bližšie jedince druhu *P. latipinna* 41 % a fenotypovo bližšie jedince druhu *P. velifera* 29 %. Z fenotypovo bližších jedincov druhu *P. latipinna* bolo až 59 % rýb tvarovej formy „ballon“ molly.

Tabuľka: Percentuálne zastúpenie determinovaných druhov a ich hybridov.

Druh	Percentuálne zastúpenie jednotlivých druhov rýb a ich hybridov	
	výstavy (%)	komerčné chovy (%)
<i>P. velifera</i>	42	12
<i>P. latipinna</i>	36	18
Hybrid <i>P.v.</i> x <i>P.l.</i>	22	70
<i>X. maculatus</i>	65	57
<i>X. variatus</i>	34,5	32
Hybrid <i>X. m.</i> x <i>X.v.</i>	0,5	11

Výrazne vyšší výskyt hybridov v komerčných chovoch súvisí s cieľným krížením niektorých druhov za účelom dosiahnutia fenotypovo „zaujímavejších“ jedincov a s nízkym dopytom čistých foriem týchto druhov. K zníženiu počtu hybridov na výstavách by mohlo dôjsť pozmenením niektorých bodov ISXM 01, pretože hybridy sú posudzované podľa štandardu druhu, ku ktorému majú fenotypovo najbližšie (bod C.4.10; strata minimálneho počtu bodov). V rokoch 1981 až 2001 (v medzinárodných štandardoch ISXM-81 a ISXM-88) nebol druh *P. latipinna* ako taký obsiahnutý a všetky kolekcie *P. latipinna* boli posudzované v súťažnej kategórii *P. velifera*. Aj keď ISXM 01 je vypracovaný, tak že k zaradeniu intermediálnych jedincov by nemalo dochádzať (ISXM 01, 2004).

Minimálna dĺžka tela u oboch rodov rýb bola zvolená z dôvodu výraznejšieho vyvinutia druhových znakov u adultných jedincov a k ich lepšiemu posúdeniu (Dokoupil, 1981). Niektoré morfometrické znaky akými je napríklad dĺžka, šírka tela a ich samotný pomer nie je výrazným determinačným znakom, keďže porovnávané druhy vykazujú v týchto znakoch minimálne rozdiely (Dokoupil, 1981). Rovnako je v akvárijných podmienkach výskyt jedincov s rozmermi rýb z „*locus typicus*“ len ťažko dosiahnuteľný (Norton, 1976). Oba rody a ich hybridy boli v základnom tvarovom štandarde (podľa ISXM 01, 2004, E.4.1. označenie „n - normálny“ typ oplutvenia), pretože pri ostatných tvarových štandardoch (delta, lýra, ihla) je prirodzený tvar, poloha, morfometria a počet lúčov *pinna dorsalis* a *pinna caudalis* značne deformovaný. Najmä pri rode *Poecilia* je tvar chrbtovej plutvy a jej postavenie a poloha v rámci tela dôležitým

determinačným znakom (Dokoupil, 1981). Posudzované boli všetky farebné formy, keďže sa u všetkých druhov molynézií a dvoch druhov plát vyskytuje rovnaké zafarbenie (ISXM 01, 2004). Ryby s divokým základným sfarbením boli pri všetkých druhoch posudzované podľa zoologického opisu jednotlivých druhov, rovnako ako aj ryby farebných mutácií charakteristických pre určitý druh, ako napríklad základné sfarbenie liberty charakteristické pre *P. latipinna*, alebo sfarbenie mutácie hawaii charakteristické pre *X. variatus* (Dokoupil, 1981; ISXM 01, 2004). Nižšie zastúpenie *X. variatus* na výstavách súvisí s náročnejšou prípravou tohto druhu na výstavu spôsobenej vyšším počtom neštandardných jedincov vyskytujúcich sa v chovoch a dlhším rastom (Norton, 1967). Zo skupiny výstavných jedincov bolo determinovaných menej rýb 112, na rozdiel od rýb 207 kusov pochádzajúcich z komerčných chovov. Tento fakt súvisí s pridelením bodov za bonifikáciu za tvar oplutvenia a farbu (bod C.6.7. ISXM 01, 2004), dôsledkom čoho sú jedince prírodného tvaru a sfarbenie znevýhodnené. Preto sú jedince základného tvaru prihlasované na výstavy v menšom množstve ako vysokoplutvé a lýrovité jedince. Až 59 % zastúpenie „ballon“ molly medzi hybridmi súvisí s nesprávnym pohľadom najmä ázijských chovateľov na šľachtenie a vytváranie nových foriem rýb. „Ballon“ molly a „ballon“ platy sú podľa ISXM 01 diskvalifikované, preto sa v skupine výstavných rýb takéto hybridné jedince nevyskytovali.

U hybridných jedincov sme často pozorovali nežiaduce malformácie, ako napríklad deformácie chrbtice (u 12 % hybridov). U 51 % hybridov bol zaznamenaný jednostranný exoftalmus a to najmä u jedincov fenotypovo príbuzných druhu *P. latipinna*. Túto malformáciu sme pozorovali u 51% jedincov a to pred dosiahnutím pohlavnej dospelosti. U väčšiny hybridov bolo pozorované svetlejšie sfarbenie tela, gigantizmus, alebo naopak nanizmus. Niektoré jedince, najmä nadrozmerné samice boli sterilné. Pozorovali sme vyššiu odolnosť krížencov k parametrom vody a pri aklimatizácii na chemizmus vody v novom prostredí najmä v porovnaní s vysoko senzitívnym druhom *P. velifera* (ISXM 01, 2004).

Deformáciu chrbtice sme nezaznamenávali u foriem akými je „Ballon molly“, u ktorej je táto deformácia šľachtením a vyskytuje sa u všetkých jedincov tejto variety (ISXM01, 2004). Gigantizmus a nanizmus sú malformácie, ktoré sú veľmi často zaznamenávané u krížencov molynézií (Bassleer, 1982).

*Výskum bol finančne podporený projektom VEGA 1/0847/13 a APVV 0154 – 07.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dokoupil N. *Živorodky. Technika chovu, biologie druhů, standardy*. Praha: SZN, 1981. ISSN 07-069-81, 264 pp.
- Slovenský zväz chovateľov, Klub chovateľov živorodých rýb: Interštandard Xipho-Molly 2001 „ISXM 01“. Pracovný materiál, verzia z r.2004.
- Oke K, B et al. Hybridization between genetically modified Atlantic salmon and wild brown trout reveals novel ecological interactions. *Proceeding Of The Royal Society B-Biological Sciences*. 2013; 280/ 1763: 31047-31047.
- Sterba G. *Susswasserfische der Welt*. Urania Verlag. Jena-Berlin: Leipzig, 1987. 914 pp.
- Janko, K et al. Dynamic Formation of Asexual Diploid and Polyploid Lineages: Multilocus Analysis of *Cobitis* Reveals the Mechanisms Maintaining the Diversity of Clones. *Plos One*. 2012; 7/ 9
- Maresova E, Luskova V, Lojkasek B. *Hybridization between Cottus gobio and Cottus poecilopus in the Odra River drainage basin (Czech Republic)*. *Biologia*. 2012; 67/4: 788-795.
- Norton, J. *Enjoy your nodern swordtails and platys*. London: Pet. library Ltd., 1976. 301 pp.
- Norton, J. *Fancy platies*. Inc. Jersey City: T.F.H. Publications, 1967. 203 pp.



# ULTRASONOGRAFICKÁ DIAGNOSTIKA RESPIRAČNÝCH OCHORENÍ U TELIAT

Šoltéssová H., Vargová M., Nagyová V., Tóthová Cs., Nagy O.  
*Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo zistiť, či ultrasonografia je vhodnou neinvazívnou diagnostickou metódou na detekciu respiračných ochorení u teliat. Ultrasonografia (USG) pľúc a pleury bola vykonaná u 12 teliat. Z toho boli 2 kontrolné zvieratá so zdravým pľúcny parenchýmom a 10 teliat trpiacich respiračnými poruchami ako je pneumónia, bronchopneumónia a pľúcne abscesy. Ultrasonografia pľúc umožňuje rýchlu klasifikáciu závažnosti, rozsahu a typu pľúcnych lézií a tak dopĺňa klinické vyšetrenie. Pri procesoch, ktoré sú uložené hlboko v pľúcnom parenchýme, je sonografické vyšetrenie nevhodné, pretože ultrasonografické vlny vo väčšej hĺbke sú silne utlmené a spätne odrážané vzduchom. Naproti tomu sonografické vyšetrenie je veľmi vhodné pri periférnych ochoreniach pľúc, kde dochádza k hromadeniu voľnej tekutiny. Aj napriek tomuto problému, ultrazvukové vyšetrenie pľúc je vhodné pre posúdenie klinicky nejasných respiračných ochorení u teliat.

## ÚVOD

V rámci klinických vyšetrovacích metód sa v oblasti veterinárnej medicíny stala ultrasonografia významnou a neoddeliteľnou súčasťou diagnostiky. S rozvojom technologického zdokonaľovania prístrojov sa táto zobrazovacia metóda začala postupne využívať okrem reprodukcie aj v iných oblastiach orgánových ochorení u hospodárskych zvierat ( Buczinski, 2009). S vysokou frekvenciou výskytu ochorení respiračného aparátu u hovädzieho dobytku sa ultrasonografia ukazuje ako významný prostriedok neinvazívneho vyšetrenia pľúc (Babkine a Blond, 2009). Aj keď fyziologicky nezmenené pľúcne tkanivo nemôže byť vyšetrené, sonografia je vhodná na detekciu mnohých patologických stavov vo vnútri hrudnej dutiny (Flöck, 2004). Je to obzvlášť užitočné pre detekciu a charakterizáciu pleurálneho výpotku najmä malých ložísk, povrchových pľúcnych lézií alebo hepatizáciu, atelektázy pľúc a pneumothoraxu (Babkine a Blond, 2009). Na základe sonografického obrazu vzhľadu pľúcneho povrchu a tekutiny v pleurálnej dutine sa dá zistiť hodnotná informácia o rozsahu, závažnosti, ale aj o prognóze ochorenia a môže byť lepšie sledovaný proces uzdravenia (Flöck, 2004).

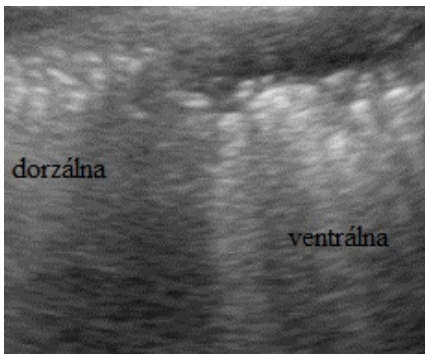
## MATERIÁL A METODIKA

V rámci sledovania bolo vyšetrených 12 teliat vo veku 1- 9 mesiacov, ktoré boli hospitalizované na klinike prežúvavcov UVLF v Košiciach. Všetky zvieratá boli okrem klinického vyšetrenia v rámci tohto sledovania vyšetrené aj pomocou ultrasonografie a u niektorých doplnené aj patologicko-anatomickým nálezom. Bol použitý prístroj firmy Mindray s 5 MHz ultrazvukovou sondou. Použitím ultrasonografického gélu sa zlepšil kontakt medzi vyšetrovanou sondou a povrchom pacienta, čím sa znížilo riziko výskytu artefaktov. Príprava pacientov na vyšetrenie spočívala v oholení a odmastení vyšetrovanej oblasti hrudníka.

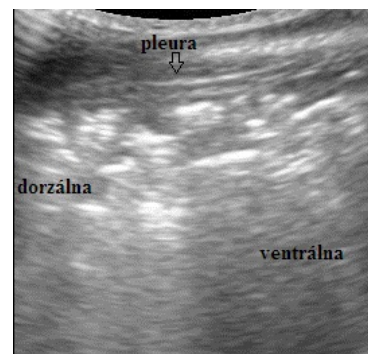
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

U teliat s klinickými príznakmi bronchopneumónie (horúčka, anorexia, mierna apatia, serózný výtok z nosa, prekrvenie spojiviek, dyspnoe, kašeľ ) pri ultrasonografickom vyšetrení boli pozorované na povrchu pľúc, kranio-ventrálnej časti pľúc hyperechogénne zóny veľkosti niekoľkých milimetrov až centimetrov a kométové artefakty objavujúce sa v tvare echogénnych pásov s klesajúcou intenzitou smerom distálne od vyšetrovacej sondy (obr.1). Prevažne v kranioventrálnej lalokoch boli zistené rozsiahle hyperechogénne zóny podobné

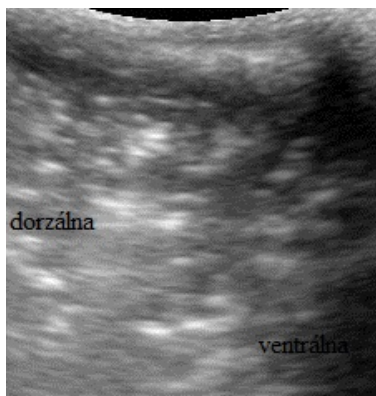
pečeňovému parenchýmu bez dozvuku artefaktov, ktoré boli dobre ohraničené od zdravého tkaniva. Pri pitve boli na povrchu okolo hyperechogénnych a anechogénnych zón zistené alveoly vyplnené tekutinou, zároveň bola pozorovaná hepatizácia pľúcnych lobulov a abscesy (obr.2,3). V kranialných častiach pľúc rozsiahle hyperechogénne zóny predstavovali hepatizované pľúcne tkanivo, ktoré bolo z veľkej časti bez vzduchu(obr.3). Vzduchom vyplnené bronchy boli znázornené ako echogénne lineárne pásy s vetvami a akustickým tieňom alebo ako kométové artefakty. Malé, okrúhle anechogénne steny boli priečne rezy ciev. Tubulárne štruktúry s anechogénnym lúmenom a čiastočne echogénne steny boli bronchy a čiastočne echogénny obsah (mukopurulentný exudát).



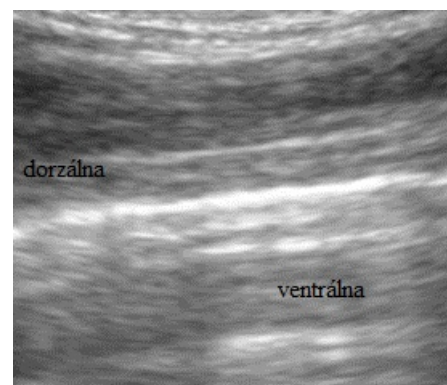
**Obr.1.** Sonogram pľúc teľaťa s bronchopneumóniou ( 10MHz )



**Obr.2.** Sonogram kranialného lobulu pľúc u teľaťa s bronchopneumóniou



**Obr.3.** Sonogram kranioventrálnych pľúcnych lobulov , teľa s pneumóniou



**Obr.4.** Sonogram zdravých pľúc , reverberačné artefakty

Sonografia pľúc sa v humánnej medicíne používa sekundárne, aby sa odlišili röntgenové nálezy (Banholzer, 1993), zatiaľ čo vo veterinárnej medicíne sa táto zobrazovacia metóda začala postupne využívať okrem reprodukcie aj v iných oblastiach orgánových ochorení u hospodárskych zvierat (Buczinski, 2009). Primárna indikácia k USG vyšetreniu respiračného systému je ochorenie pľúc a pleury. Vzduch nachádzajúci sa v pľúcach komplikuje vyhodnotenie ultrazvuku. Ak je však znížený obsah vzduchu a neboli ani žiadne vzduchom vyplnené oblasti medzi snímačom a postihnutou časťou pľúc, možno dosiahnuť užitočné ultrasonografické hodnotenie pľúc (Jung and Bostedt, 2004). Výmena alveolárneho vzduchu s tekutinou spôsobuje, že pľúcne tkanivo sa javí hyperechogénne (Scott,1998). Kométové artefakty vyžarujúce z týchto oblastí sú vytvorené hromadením malého množstva exudátu, krvi, hlienu alebo zjazvením v nadväznosti na predchádzajúcu pneumóniu, alebo pleuritídu. Reef (1998) uvádza, že diagnóza pomocou sonografického vyšetrenia hepatizácie

pľúcneho parenchýmu je založená na detekcii hyperechogénneho pľúcneho parenchýmu. Hepatizácia bola pozorovaná najčastejšie v kranioventrálnych častiach pľúc. Patologické zmeny pľúcneho parenchýmu sa najčastejšie vyskytujú s ťažkou hepatizáciou, čo vedie na ultrazvuku k vzhľadu podobnému pečeni (Reef 1998). Sonografické nálezy kométových artefaktov v tejto práci boli tiež charakteristické pre pľúcny emfyzém. Reverberačné artefakty charakteristické pre zdravé pľúcne tkanivo boli z väčšej časti málo viditeľné.

*Práca bola realizovaná v rámci projektu VEGA 1/0812/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Flöck M. Diagnostic ultrasonography in cattle with thoracic disease. In the Veterinary Journal. 2004; 167:272-280.
- Babkine M., Blond L. Ultrasonography of the bovine respiratory system and its practical application. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2009; 25:633.
- Reef V. B. Thoracic Ultrasonography: Noncardiac Imaging, Equine Diagnostic Ultrasound, 1998; 187-213.
- Scott, P.R. Ultrasonographic examination of the bovine thorax. Cattle Practice. 1998; 6:151-3.
- Jung C., Bostedt H. Thoracic ultrasonography technique in newborn calves and description of normal and pathological findings. Veterinary Radiology and Ultrasound. 2004; 45:331-335.
- Banholzer P. Thoraxwand, Pleura andv Lunge, Sonographische Diagnostik. Urban & Schwarzenberg. 1993; 307-315.
- Buczinski S. Bovine ultrasound. Vet Clin. North Amer.-Food Anim. Pract. 2009; 25, 3.

# PREVALENCIA INTESTINÁLNYCH HELMINTÓZ U DETÍ Z MEDZEVA A OKOLIA

Štrkolcová G., Goldová M.  
Ústav parazitológie, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo sledovať výskyt intestinálnych helmintóz u detí z majoritnej a minoritnej skupiny obyvateľstva. Majoritnú skupinu tvorili zdravé deti bežnej populácie, ktoré podstúpili preventívnu prehliadku u svojho pediatra. Minoritnú skupinu tvorili deti z oblasti s nízkym hygienickým štandardom – rómske deti z Medzeva v Košickom regióne. Obe skupiny detí boli rozdelené podľa veku na 4 podskupiny: 1-5 ročné, 6-9 ročné, 10-14 ročné a viac ako 14 ročné. Vzorky stolice boli vyšetrené flotačno-koncentračnou metódou, boli vykonané perianálne zlepy na *Enterobius vermicularis*. Vajíčka helmintov boli zistené u majoritnej skupiny v 17,07% vzoriek stolice (7/41) a u minoritnej skupiny detí v 68,75% (88/128) vzoriek stolice. V pozitívnych vzorkách sme zaznamenali vajíčka piatich druhov helmintov (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Taenia* spp., *Ancylostoma* spp.).

V majoritnej skupine detí neboli detegované *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma* spp. Vajíčka *Enterobius vermicularis* boli prítomné v 14,63% vzoriek (6/41), v stolici jedného dieťaťa bolo zistené vajíčko pásomnice *Taenia* spp. V minoritnej skupine detí sa najčastejšie vyskytovali vajíčka *Ascaris lumbricoides* v 61,72% vzoriek (79/128), nasledovali vajíčka *Trichuris trichiura* v 17,97% vzoriek (23/128). Nález vajíčok *Enterobius vermicularis* bol v 7,81% vyšetrených vzoriek a *Taenia* spp., *Ancylostoma* spp. boli prítomné v 0,78% vzoriek (1/128). Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bol v skupine 6-9 ročných detí v oboch skupinách. Výskyt intestinálnych parazitárnych infekcií je vyšší v skupine detí s nižším hygienickým štandardom a nízkym socioekonomickým statusom v porovnaní s deťmi bežnej populácie.

## ÚVOD

Aj v 21. storočí predstavujú parazitárne infekcie vážny zdravotný problém. Tieto infekcie postihujú zvyčajne marginalizované komunity ako sú bezdomovci, Rómovia a ľudia žijúci v podmienkach s nízkym hygienickým štandardom a socio-ekonomickým statusom. Osobitnú skupinu parazitóz tvoria helmintózy. Helminty rozdeľujeme na biohelminty, ktoré majú nepriamy vývin cez medzihostiteľa a geohelminty, ktoré majú vývin priamy a ich propagatívne štádia sa vyvíjajú do infekčného štádia vo vonkajšom prostredí (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Ancylostoma* spp.). Rómovia v Medzeve, kde bol vykonaný výskum, žijú v segregovanej osade, kde je zanedbaná osobná a komunálna hygiena. Nemajú vybudovanú kanalizáciu a často defekujú v blízkosti obydli. Ako zdroj vody majú jeden prameň vody tečúci z lúky do dediny. Keďže tieto menované helmintózy sa prenášajú priamo fekálno-orálnou cestou, priamym kontaktom osôb v rodinných a detských kolektívoch, kde sa vajíčka odovzdávajú dotykom rúk a nepriamo kontaminovanou potravou, vodou, pôdou, práve fekálne kontaminované prostredie predstavuje závažný problém pri šírení helmintóz. Deti z týchto osád navštevujú povinnú školskú dochádzku, kde sú zdrojom infekcie v školách.

## MATERIÁL A METODIKA

**Flotačná metóda vyšetrenia ľudskej stolice:** K 3-5 g stolice sme pridali 10-15 ml vody a dôkladne roztrelí v trecej miske. Suspenziu sme prefiltrovali cez sitko do centrifugačnej skúmavky a centrifugovali 2 minúty pri 2500 ot./min. Supernatant sme zliali a do 1/3 skúmavky sme k sedimentu pridali Kozáka a Mágrovej flotačný roztok a dokonale rozmiešali

kovovou tyčinkou a opäť centrifugovali 2 minúty pri 2500 ot./min. Parazitologickou ézou sme zobrali 3 kvapky z povrchu tekutiny na podložné sklíčko a vyšetřovali pod stereomikroskopom.

**Kvantitatívna koncentračná McMasterova metóda-** na stanovenie intenzity infekcie (EPG – eggs per gram = počet vajíčok v jednom grame trusu). Odvážili sme 3 g stolice a pridali k tomu 42 ml vody a rozmiešali na suspenziu, prefiltrovali cez sitko do kadičky. Získaný filtrát sme pretrepali a naplnili jednu centrifugačnú skúmavku a centrifugovali pri 2000ot./2 min. Supernatant sme zliali a k sedimentu sme pridali Kozáka a Mágrovej flotačný roztok do pôvodného objemu (15 ml). Sediment sme dobre premiešali s flotačným roztokom a pomocou Pasteurovej pipety sme naplnili obe počítacie políčka Mc Masterovej komôrky. Spočítali sme vajíčka a vyjadrili ich počet v 1 g stolice podľa nasledovného výpočtu:

3 g trusu v 42 ml vody = 45 ml. Preto 1 g = 15 ml. Objem počítacieho políčka je 0,15 ml, preto počet parazitárnych útvarov v 1 políčku násobíme x 100, ak počítame v dvoch políčkach x 50. Počet vajíčok vyšší než 1000/g poukazuje na silnú infekciu, počet vajíčok okolo 500/g na stredne silnú infekciu.

**Metóda vyšetřenia perianálnych zlepov na dôkaz *Enterobius vermicularis*:**

Vajíčka sa odtlačia z perianálnych rias pomocou priehľadnej lepiacej pásky, ktorú dostal rodič od pediatra. Páska sa lepiacou stranou pritlačí na análnu a perianálnu oblasť a následne nalepí na podložné sklíčko. Rodičia boli poučení, že odber sa vykonáva ráno, najlepšie hneď po zobudení a oblasť konečníka nesmie byť umytá v predchádzajúci večer. Podložné sklíčko sme vyšetřili pod svetelným mikroskopom.

**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Vyšetřili sme 169 detí z Medzeva, ktoré patria do obvodu MUDr. Gajdošovej, z toho bolo 41 detí z majoritnej skupiny obyvateľstva a 128 z minoritnej skupiny obyvateľstva. Vajíčka helmintov boli zistené u majoritnej skupiny v 17,07% vzoriek stolice (7/41) a u minoritnej skupiny detí v 68,75% (88/128) vzoriek stolice. U majoritnej skupiny neboli detegované vajíčka *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiur*, *Ancylostoma* spp. Nález vajíčok *Enterobius vermicularis* bol v 14,63% vzoriek (6/41), u dvoch dievčat a štyroch chlapcov. Vajíčko pásomnice *Taenia* spp. bolo nájdené u jedného päťročného dieťaťa. Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bol v skupine 6-9 ročných detí.

V minoritnej skupine detí sa najčastejšie vyskytovali vajíčka *Ascaris lumbricoides* v 61,72% vzoriek (79/128) a z nich je 83,54% vo silnej infekcii. Nasledovali vajíčka *Trichuris trichiura* v 17,97% vzoriek (23/128). Vajíčka *Enterobius vermicularis* boli prítomné v 7,81% vyšetřených vzoriek a vajíčka *Taenia* spp., *Ancylostoma* spp. sme zistili v 0,78% vzoriek (1/128). Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bol v skupine 6-9 ročných detí, čiže detí na prvom stupni školskej dochádzky.

Tab.1. Vzťah medzi vekom a prevalenciou infekcie intestinálnymi helmintami u minoritnej skupiny detí.

VEK	POZITÍVNE / VYŠETRENÉ	PREVALENCIA (%)
1-5	30/52	57,69
6-9	41/52	78,84
10-14	12/16	75,00
≥14	5/8	62,50

Všetky pozitívne deti boli preliečené antihelmintikom (Vermox), ale keďže sa opäť vracajú do prostredia, kde sa infikovali, je veľmi ťažko znížiť a priam nemožné zastaviť tento kruh



opakovaného nakazenia pokiaľ sa nevykonajú opatrenia na zábranu šírenia týchto helmintóz. Opakovane vyšetrené vzorky stolice po 4-5 mesiacoch opäť potvrdzujú zhodnú infekciu ako pri pilotnom prieskume. Problém rómskych komunít je komplexný celospoločenský problém, ktorý je potrebné riešiť na národnej úrovni.

*Práca je podporovaná grantovou úlohou VEGA č. 1/0831/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Jíra J. Lekařska helmintologie. Helminthoparazitární nemoci. Galen. 1998; 495p.
- Kassai T. Veterinary helminthology. Butterworth-Heinemann. 1999; 260 p.
- Letková V, Goldová M, Csizsmáriková G. Laboratórna diagnostika vo veterinárskej parazitológii. Časť I. Protozoa. 1997; 13-14.
- Miyazaki I. Helminthic zoonoses. 1991; 494p.
- Rudohradská P. Epidemiologické riziká šírenia sa helmintóz v sídlach s nízkym hygienickým štandardom. Dizertačná práca. Parazitologický ústav SAV v Košiciach. 2012
- Soulby E. J. L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Bailliere Tindal 7<sup>th</sup> ed. 1982; 804 p.
- Totková A, Klobušický M, Valent M. Lekárska parazitológia. *Osveta*. 2008; 126-166.
- Totková A. Výskyt črevných parazitov u detí vo veľkomestskej aglomerácii. Dizertačná práca. Parazitologický ústav SAV. Bratislava. 2002
- Urquhart G. M, Armour J, Duncan J. L, Dunn A. M, Jennings F. W. Veterinary Parasitology. Blackwell Science. 1996; 307 p.

# ENTEROKOKY IZOLOVANÉ Z TRÁVIACEHO TRAKTU VČELY MEDONOSNEJ (*APIS MELLIFERA*)

Vaníková S.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Katedra genetiky, UPJŠ, Košice

## ABSTRAKT

Enterokoky sú všadeprítomné grampozitívne baktérie mliečneho kvasenia obývajúce rôzne habitaty, vrátane tráviaceho traktu zvierat, od zástupcov hmyzu až po človeka. Medzi najbežnejšie druhy v tráviacom trakte hmyzu patria *Enterococcus faecium* a *E. faecalis*. Cieľom tejto práce bola charakterizácia populácie enterokokov osídľujúcich tráviaci trakt včiel. Z včiel z 3 úľov sme izolovali 18 bakteriálnych kmeňov patriacich do rodu *Enterococcus*, ktoré boli následne identifikované pomocou MALDI-TOF analýzy. Najviac zastúpené boli druhy *E. faecium* (6) a *E. mundtii* (6), nasledované *E. faecalis* (3), *E. durans* (2) a *E. casseliflavus* (1). Všetky izoláty boli testované na rezistenciu voči vybraným antibiotikám: ampicilín (10 µg/ml), erytromycín (15 µg/ml), chloramfenikol (30 µg/ml), kanamycín (30 µg/ml), streptomycín (300 µg/ml) a tetracyklín (30 µg/ml). Takmer všetky izoláty vykazovali citlivosť voči testovaným antibiotikám, s výnimkou 5 izolátov, ktoré niesli rezistenciu na kanamycín.

## ÚVOD

Sociálne žijúci hmyz poskytuje bohatý zdroj symbiotických mikroorganizmov vďaka veľkému počtu jedincov v kolónii, deliacich sa o potravu (Evans a Armstrong, 2006). Baktérie žijúce v tráviacom trakte hmyzu sa podieľajú na viacerých úlohách v procese trávenia, ako je degradácia jednotlivých zložiek potravy, regulácia pH či syntéza vitamínov. Vzhľadom na viaceré faktory je mikróflóra tráviaceho traktu včiel značne variabilná. Jedným z častých kolonizátorov tráviaceho traktu včiel sú predstavitelia rodu *Enterococcus*. Enterokoky sú celosvetovo rozšírené grampozitívne baktérie obývajúce rozmanité environmentálne habitaty ako sú pôda, voda, sediment, rastlinná vegetácia, ale môžu byť aj súčasťou potravinových výrobkov. Okrem včiel boli zaznamenaní aj v tráviacom trakte iných živočíchov, ektotermných aj endotermných, vrátane človeka (Lauková a kol., 2008). Rod *Enterococcus* v súčasnej dobe tvorí 36 druhov, pričom najznámejšie sú *E. faecalis* a *E. faecium*, ktoré majú dominantné zastúpenie v tráviacom trakte mnohých živočíchov.

Enterokoky patria medzi baktérie mliečneho kvasenia vďaka čomu sú niektoré druhy využívané ako probiotiká. Medzi zástupcami rodu *Enterococcus* sú aj druhy známe ako patogény, ktoré vyvolávajú rôzne infekcie (napr. nozokomiálne, močových ciest, atď.) (Ahmad a kol., 2011).

Pre včely je prítomnosť baktérií mliečneho kvasenia v ich tráviacom trakte prospešná vďaka ich schopnosti produkovať viaceré antibakteriálne látky, ako sú organické kyseliny, peroxid vodíka, rôzne bakteriocíny a špecifické metabolity, ktoré majú inhibičný účinok na niektoré patogény (Olofsson a Vásquez, 2008).

Enterokoky sú známe svojou antibiotickou rezistenciou na široké spektrum antibiotík a preto sú považované za rezervoár génov rezistencie na antibiotiká (Vandžurová a kol., 2012). V tejto práci sme sa zamerali na identifikáciu enterokokov z tráviaceho traktu včiel a ich rezistenciu na vybrané druhy antibiotík.

## MATERIÁL A METÓDY

Enterokoky boli vyizolované z tráviaceho traktu včiel, ktoré pochádzali z 3 rôznych úľov od včelára z Perína (48°32'3.58"N, 21°11'15.29"E). Tráviace trakty boli homogenizované vo fyziologickom roztoku a alikvóty tohto roztoku boli vysiate na platne so selektívnym

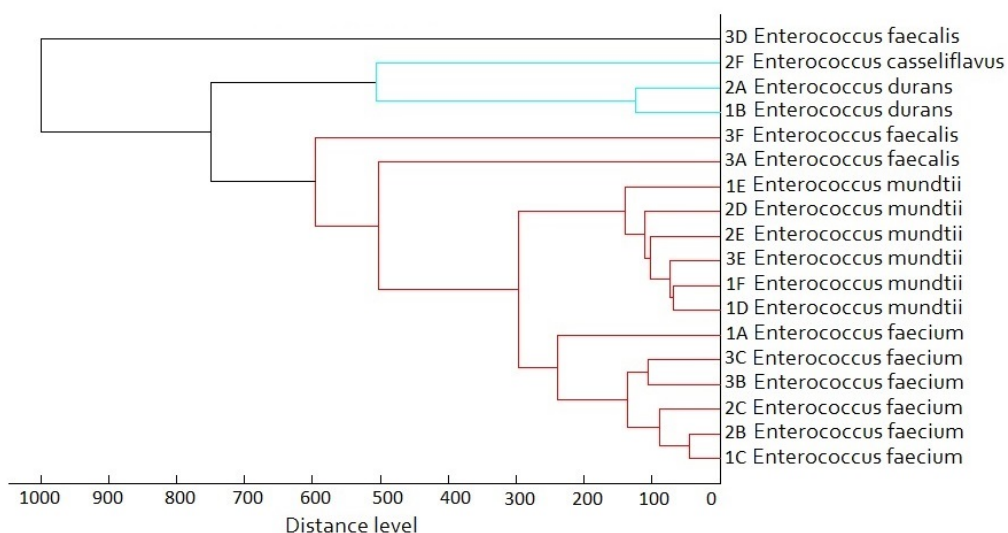
agarom pre enterokoky. Takto naočkované vzorky na Petriho miskách boli kultivované v termostate pri teplote 37°C. Na základe morfológie bolo náhodne vybraných 6 kmeňov enterokokov z každého úľa. Bakteriálne kmene boli identifikované pomocou prístroja MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany).

U všetkých kmeňov bola testovaná rezistencia na vybrané antibiotiká kultivačným testom na Muller-Hintonovej agarovových platniach: ampicilín (10 µg/ml), erytromycín (15 µg/ml), chloramfenikol (30 µg/ml), kanamycín (30 µg/ml), streptomycín (300 µg/ml) a tetracyklín (30 µg/ml). Platne boli inkubované pri 37 °C v teplovzdušnom termostate.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z tráviacich traktov včiel, odchytených z 3 rôznych úľov, bolo vyizolovaných 18 kmeňov enterokokov, ktoré boli identifikované pomocou prístroja MALDI-TOF Biotyper. Izoláty boli priradené do 5 druhov. Najviac zastúpené boli druhy *E. faecium* a *E. mundtii*, ku ktorým patrilo 6 izolátov. S nižšími počtami izolátov boli zastúpené druhy *E. faecalis* (3), *E. durans* (2) a *E. casseliflavus* (1). V tráviacom trakte včiel pochádzajúcich z jedného úľa boli zastúpené minimálne 3 druhy enterokokov. V populácii enterokokov z prvého úľa dominuje druh *E. mundtii* (50 %), zatiaľ čo v ďalších dvoch úľoch je dominantným druhom *E. faecium* (50 %). Na základe podobnosti proteínových profilov získaných pomocou MALDI-TOF analýzy bol skonštruovaný dendrogram znázorňujúci príbuznosť jednotlivých kmeňov (Obr. 1). Na dendrograme je možné vidieť grupovanie samostatných druhov do klastrov, pričom kmeň 3D identifikovaný ako *E. faecalis* sa vyčleňuje a tvorí samostatnú vetvu. Napriek tejto odlišnosti boli všetky druhy spoľahlivo identifikované MALDI-TOF analýzou so skóre nad 2.0, sporný kmeň 3D až nad 2.3 čo vypovedá o vysoko dôveryhodnej identifikácii druhu. Jedine kmeň 3A mal nižšie skóre spoľahlivosti 1.99, ktoré vypovedá o pravdepodobnej identifikácii rodu. Vzhľadom na tieto výsledky je potrebná podrobnejšia charakterizácia kmeňa 3D.

Enterokoky boli už niekoľkokrát vyizolované z tráviaceho traktu nielen včiel ale aj iných predstaviteľov hmyzu (Geiger a kol., 2009; Martin and Mundt, 1972). Najčastejšie zaznamenaným druhom v širokej škále hmyzích predstaviteľov bol *E. faecalis*, za ktorým nasleduje *E. faecium*. Identifikácii mikroorganizmov v tráviacom trakte včiel sa venovalo viacero prác (Audisio a kol., 2011; Kačániová a kol., 2004), avšak doposiaľ neboli publikované štúdie zamerané na identifikáciu a podrobnejšiu charakterizáciu enterokokov.



Obr. 2: Dendrogram znázorňujúci príbuznosť kmeňov enterokokov z tráviaceho traktu včiel skonštruovaný na základe MALDI-TOF analýzy. Číslice 1–3 označujú kmene vyizolované zo včiel pochádzajúcich z jedného úľa.

Kačániová a kol. (2004) stanovili vo svojej práci počty enterokokov z tráviacich traktov zimujúcich včiel, pričom v čreve aj v rekte zaznamenali rovnaký počet  $3,97 \cdot 10^4$  CFU/g. Audisio a kol. (2011) identifikovali jeden kmeň vyizolovaný zo včely medonosnej ako *E. faecium*.

Získané kmene enterokokov sme testovali na rezistenciu voči vybraným antibiotikám. Takmer všetky izoláty vykazovali citlivosť na testované antibiotiká, s výnimkou 5 izolátov, ktoré niesli rezistenciu na kanamycín. Všetky rezistentné kmene patrili do druhu *E. faecium*, označené ako 1C, 2B, 2C, 3B, 3C (Obr. 1). Na dendrograme je možné vidieť, že všetky tieto rezistentné kmene tvoria jeden klaster, ktorý vypovedá o ich príbuznosti, okrem kmeňa 1A. Enterokoky sú známe svojou rezistenciou na viaceré antibiotiká (Rice, 2006), pričom na kanamycín sú prirodzene chromozomálne rezistentné. Citlivosť našich izolátov na väčšinu antibiotík sa nezhoduje s výsledkami, ktoré vo svojej práci uvádza Macovei a Zurek (2006), kde autori preukázali rezistenciu enterokokov z muchy domovej (*Musca domestica*) na viaceré antibiotiká. Možnou príčinou citlivosti enterokokov izolovaných zo včiel je zákaz používania antibiotík vo včelárstve.

V tejto práci sa podarilo vyizolovať viaceré kmene enterokokov z tráviacich traktov včiel, ktoré boli následne po prvýkrát identifikované na úrovni druhu. Ukázalo sa, že napriek nízkemu počtu sledovaných kmeňov je druhové zloženie relatívne pestré a neobmedzuje sa len na druhy *E. faecium* a *E. faecalis*. Vzhľadom na nedostatok informácií v danej oblasti je potrebná podrobnejšia charakterizácia našich izolátov.

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahmad A. et al. Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 23.
- Audisio C.M. et al. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* l. Bee-gut. *Microbiol Res.* 2011; 166 (1): 1-13.
- Byappanahalli M. N. et al. Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012; 76(4):685-697.
- Evans J.D. and Armstrong T.N. Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology.* 2006; 6 (4): 1-9.
- Geiger A. et al. First isolation of enterobacter, enterococcus, and acinetobacter spp. As inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infect Genet Evol.* 2009; 9 (6): 1364-1370.
- Kačániová M. et al. Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiol.* 2004; 49 (2): 169-171.
- Lauková A. et al. Species of *Enterococcus faecalis* associated with free-living rodents. *Folia Microbiol.* 2008; 53: 173-178.
- Macovei L, Zurek L. Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(6): 4028–4035.
- Martin J.D., Mundt J.O. Enterococci in insects. *Appl Microbiol.* 1972; 24 (4): 575-580.
- Olofsson T.C., Vásquez, A.. Detection and identification of a novel lactic acid bacterial flora within the honey stomach of the honeybee *Apis mellifera*. *Curr Microbiol.* 2008; 57(4): 356–363.
- Rice LB, Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Med.* 2006; 119 (61):11-19
- Vandžurová A et al. Antibiotic resistance and restriction endonucleases in fecal enterococci of chamois (*Rupicapra rupicapra* Linnaeus, 1758). *Folia Microbiol.* 2012, 7: 355-358.

# VPLYV NEFOTOAKTIVOVANÉHO HYPERICÍNU NA VÝSKYT „SIDE POPULATION“ A AGRESÍVNY FENOTYP BUNIEK PLÚCNEHO ADENOKARCINÓMU A549

Vargová J., Mikeš J., Mikešová L., Zihovicsová Z., Fedoročko P.

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

## ABSTRAKT

V posledných rokoch sa výskum rakoviny zameriava na odhalenie príčin rezistencie na protinádorovú liečbu a recidívy, ktoré predstavujú najzávažnejšie aspekty nádorových ochorení. Tie sú vo svetle najnovších poznatkov spájané s existenciou malej frakcie buniek, ktoré svojimi vlastnosťami pripomínajú kmeňové bunky. Jednou z metodík pre detekciu populácií obohatených o tzv. kmeňové bunky nádoru (CSC) je technika tzv. „side population“ (SP), založená na schopnosti buniek zbavovať sa xenobiotík. Tento fenomén je po molekulárnej stránke spájaný so zvýšenou hladinou transportných systémov, tzv. ABC-púmp. Hypericín (HYP), látka široko využívaná vo fotodynamicko-terapeutickej terapii, sa preukázala ako stimulant, a zároveň potenciálny substrát týchto transportných systémov. Preto sme sa v našej práci zamerali na preskúmanie účinku nefotoaktivovaného HYP na podiel SP frakcie. V rozpore s vyššie uvedeným, HYP spôsobil úbytok frakcie SP buniek, a to reverzibilným spôsobom. Hoci percentuálne zastúpenie SP populácie pokleslo, klonogénna schopnosť sa účinkom HYP zvýšila. Predpokladáme preto, že hypericín v tme indukuje agresívny fenotyp, čo by mohlo negatívne vplývať na priebeh protinádorovej terapie za súčasného užívania prípravkov s obsahom tejto látky.

## ÚVOD

Kmeňová bunka nádoru (Cancer Stem Cell, CSC) bola definovaná na Workshope Americkej asociácie pre výskum rakoviny ako bunka v nádore, ktorá má kapacitu sebaobnovy, a zároveň dáva vznik heterogénnym líniam, ktoré tvoria nádor (Clarke a kol., 2006). V týchto bunkách bola tiež preukázaná aj rezistencia voči rôznym chemoterapeutikám (Zhang a kol., 2010), či k žiareniu (Phillips a kol., 2006). Z uvedeného možno vyvodíť niekoľko, z hľadiska úspešnosti liečby determinujúcich vlastností CSC, a to rezistenciu voči konvenčnej liečbe, ktorá je primárne namierená voči intenzívne proliferujúcim bunkám nádoru, ďalej transplantovateľnosť a schopnosť rásť v *in vitro* podmienkach (Buick, 1980). Existencia takejto subpopulácie buniek v rámci nádoru tak naberá z hľadiska použitej terapie nový rozmer, kde sa primárnym cieľom stáva vytvorenie selektívneho prístupu umožňujúceho zničenie CSC, resp. zastavenie ich tvorby zo subpopulácie nonCSC buniek. Jeden z prístupov pre detekciu subpopulácie v rámci nádoru, obohatenej o predpokladané CSC, je aj spomenutá technika „side population“ založená na schopnosti určitej frakcie buniek zbavovať sa xenobiotík, vrátane fluorescenčného farbiva Hoechst-u 33342. Po molekulárnej stránke sa tento dej spája so zvýšenou expresiou ABC-transportných proteínov, predovšetkým ABCG2 (BCRP) (Zhou a kol., 2001).

Hypericín (HYP) je látka prírodného pôvodu, bežne sa vyskytujúca v ľubovníku bodkovanom (*Hypericum perforatum*). V súvislosti s protinádorovou liečbou je táto látka využívaná v kombinácii s fotodynamickou terapiou, a to pre svoje fotosenzibilizačné účinky. Existujú však i štúdie, ktoré dokladujú protinádorový efekt aj nefotoaktivovaného HYP (Blank a kol., 2004). V spojitosti s SP fenotypom sa HYP ukázal byť zaujímavým, keďže bol zaradený medzi potenciálne substráty ABC-transportných systémov (MRP1 a BCRP). Zároveň indukuje ich hladinu (Jendželovský a kol., 2009). Preto našim prvotným predpokladom bolo, že HYP bude stimulantom SP fenotypu prostredníctvom indukcie ABC-transportérov.



Účinok nefotoaktivovaného hypericínu na výskyt nádorových kmeňových buniek, či SP populácie nebol doteraz popísaný, preto sme sa rozhodli zamerať na preskúmanie potenciálneho stimulačného vplyvu tejto látky na SP frakciu a tiež celkové správanie sa buniek.

## MATERIÁL A METODIKA

Vo všetkých experimentoch sme pracovali s ľudskou bunkovou líniou odvedenou od pľúcneho adenokarcinómu A549. Bunky boli kultivované v médiu F12K obohatenom o 10% FBS. Kultivácia prebiehala za štandardných podmienok (37°C, 95% vlhkosť a 5% CO<sub>2</sub>).

### Experimentálna schéma

Bunky A549 boli nasadené na Petriho misky (3000 buniek/cm<sup>2</sup>) a po 24 hod k nim bol pridaný 1 μM hypericín, resp. médium so sérom. Po 16 hod bolo v jednej dvojici (kontrola a hypericín) vymenené médium za čerstvé, v druhej, identickej dvojici, bolo ponechané až do analýzy (48 hod).

### Metodika detekcie tzv. bočnej populácie („side population“)

Metodiku „side population“ sme aplikovali na základe štandardného postupu popísaného pracovnou skupinou Goodell-a (1996), s použitím finálnej koncentrácie farbivého roztoku Hoechst-u 33342 5 μg/ml v SP-pufri (HBSs, 2 mM HEPES, 2% FBS). Ako negatívna kontrola slúžil roztok Hoechst-u 33342 spolu s rezerpínom (5 mM), blokátorom ATP-púmp, a tým aj SP-fenotypu. Pred samotným meraním bol ku každej vzorke pridaný propídium jodid pre vymedzenie SP populácie výlučne v rámci žijúcich buniek. Takto pripravené bunkové suspenzie boli vyhodnocované, resp. sortované pomocou prístroja BD FACSAriaII SORP.

### Test klonogenicity

Klonogénna schopnosť buniek A549 bola sledovaná dvojakým spôsobom. V prvom prípade bola použitá technika „FACS“ (fluorescenciou aktivovaný sorting), kedy sme jednotlivé skupiny sortovali metódou 1 bunka/jamku do 96-jamkovej platničky s predpripraveným médiom so sérom. Po 10-dňovej inkubácii bola klonogénna schopnosť vyhodnotená na základe metabolickej aktivity buniek s resazurinom. Druhou použitou bola klasická metodika výsevu 500 buniek/jamku v 6-jamkovej platni. Po 7-dňovej inkubácii bola klonogénna schopnosť vyhodnotená totožne ako v prvom prípade, využitím resazurinu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo preskúmanie efektu nefotoaktivovaného HYP na veľkosť „side population“ a vlastností bunkovej línie A549 odvedenej od pľúcneho adenokarcinómu. Opierajúc sa o výsledky, v ktorých HYP stimuloval hladiny ABC-transportných systémov (Jendželovský a kol., 2009), sme predpokladali, že na zastúpenie SP subpopulácie bude pôsobiť potenciačne, rovnako tak aj na agresívny fenotyp buniek A549, a to v dôsledku stimulácie transportných proteínov MRP1 a BCRP. V súlade s predpokladom sme zistili, že populácia so zníženým obsahom HYP je takmer identická s SP frakciou (88% zhoda). Na strane druhej, výsledky odhalili inhibičný vplyv nefotoaktivovaného HYP na výskyt SP frakcie. Tento efekt bol dávkovo závislý, a zároveň bola preukázaná aj jeho reverzibilita. Predpokladáme, že popísaný dej môže prebiehať prostredníctvom zapojenia dráh, ktoré HYP v tme ovplyvňuje inhibičným spôsobom, a zároveň sa zdajú byť kľúčové aj pre udržanie vlastností typických pre kmeňové bunky nádorov. Ide napríklad o dráhu proteínu Hsp90, ktorý môže byť prepojený s reguláciou SP fenotypu, keďže použitie inhibítora Hsp90, IPI-504, malo inhibičný účinok na kmeňové bunky chronickej myeloidnej leukémie (Peng a kol., 2007). Hsp90 je pritom pôsobením hypericínu v tme ubikvitinovaný, čím dochádza k narušeniu jeho aktivity, a tým destabilizácii mnohých klientskych proteínov (Blank a kol., 2003).

Pre vyhodnotenie vplyvu HYP na klonogénnu schopnosť buniek A549 sme použili dva prístupy, a síce klasický test klonogenicity a „single cell cloning“. Po vyhodnotení oboch metodík sme získali paradoxné výsledky, keď HYP stimuloval klonogénnu schopnosť buniek A549 v klasickom modeli, avšak po vyhodnotení „single cell sorting-u“, klonogenicita v totožnej skupine poklesla, no vytvorené kolónie mali najväčšie rozmery. HYP teda zosilňoval agresívny fenotyp sledovanej bunkovej línie, čo naznačuje možnosť negatívneho ovplyvnenia priebehu protinádorovej terapie za súčasného užívania prípravkov obsahujúcich túto látku, napríklad v čajoch z ľubovníka, ktoré sú používané pri zmiernovaní prejavov depresie. Sledované rozdiely v klonogénnej schopnosti môžu byť vysvetlené zvýšenou závislosťou buniek so získaným agresívnejším fenotypom na faktoroch produkovaných okolitými bunkami, tzv. „niché“ nádoru. Pre potvrdenie relevantnosti tohto tvrdenia budú potrebné ďalšie experimenty.

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Blank M, Lavie G, Mandel M, Hazan S, Orenstein A, Meruelo D, Keisari Y. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. *International journal of cancer*. 2004; 111:596-603.
- Blank M, Mandel M, Keisari Y, Meruelo D, Lavie G. Enhanced ubiquitinylation of heat shock protein 90 as a potential mechanism for mitotic cell death in cancer cells induced with hypericin. *Cancer research*. 2003; 63:8241-7.
- Buick RN. In vitro clonogenicity of primary human tumor cells: quantitation and relationship to tumor stem cells. *Prog Clin Biol Res*. 1980; 48:15-20.
- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*. 2006; 66:9339-44.
- Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1996; 183:1797-806.
- Jendzelovský R, Mikes J, Koval J, Soucek K, Procházková J, Kello M, Sacková V, Hofmanová J, Kozubík A, Fedorocko P. Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2009; 8:1716-23.
- Peng C, Brain J, Hu Y, Goodrich A, Kong L, Grayzel D, Pak R, Read M, Li S. Inhibition of heat shock protein 90 prolongs survival of mice with BCR-ABL-T315I-induced leukemia and suppresses leukemic stem cells. *Blood*. 2007; 110:678-85.
- Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98:1777-85.
- Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett*. 2010; 289:151-60.
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001; 7:1028-34.

## METABOLICKÉ PRODUKTY *MESOCESTOIDES VOGAE* MODULUJÚ FUNKCIE DENDRITICKÝCH BUNIEK *IN VITRO*

Vendelová E.<sup>1</sup>, Nono JK.<sup>2</sup>, Lutz M.<sup>3</sup>, Brehm K.<sup>2</sup>, Hrčková G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice, Slovensko

<sup>2</sup>Univerzita vo Würzburgu, Inštitút pre hygienu a mikrobiológiu, Würzburg, Nemecko

<sup>3</sup>Univerzita vo Würzburgu, Inštitút pre virológiu a imunobiológiu, Würzburg, Nemecko

### ABSTRAKT

Dendritické bunky (DC) sú kritickým činiteľom v prvých fázach interakcie medzi patogénom a imunitným systémom hostiteľa, kedy udávajú smer imunitnej odpovede. Cestódy predstavujú dôležitú skupinu organizmov, ktoré zapríčínajú ochorenia, zahŕňajúc larválne zoonózy, a významne ohrozujú zdravie ľudí a hospodárskych zvierat. Larválne štádiá cestódov sú zvyčajne lokalizované v tkanivách hostiteľa, kde sú priamo vystavené komponentom imunitného systému. V súčasnosti je viac ako zrejmé, že v súvislosti s dosiahnutím dlhotrvajúcej infekcie, tieto cestódy dôkladne manipulujú s imunitnou odpoveďou hostiteľa. V práci sme zisťovali, či metabolické produkty lariev *Mesocestoides vogae* modulujú funkciu DC. Za použitia ko-kultivačného systému sme vystavili DC živým larvám. Po určitých časových intervaloch sme stanovili expresiu povrchových markerov súvisiacich s dozrievaním DC (MHC triedy II, CD86) a markery pre bunkovú smrť prostredníctvom prietokovej cytometrie. Zároveň sme stanovili produkciu cytokínov IL-12p70, IL-10 a IL-6 v supernate pomocou metódy ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). DC po ko-kultivácii s larvami neboli schopné aktivácie (nedozrievali, neprodukovali cytokíny). Ak boli DC pred-inkubované s larvami ich schopnosť aktivácie po stimulácii lipopolisacharidom (LPS) bola výrazne narušená. Schopnosť metabolických produktov modulovať funkcie DC nebola následkom cytotoxického účinku. Tieto výsledky predstavujú prvé dôkazy o schopnosti metabolických produktov *M. vogae* narušiť funkcie DC. Modulácia vnímavosti týchto dôležitých buniek pravdepodobne predstavuje jednu zo stratégií, ktoré si larvy vyvinuli s cieľom zabezpečenia chronickej infekcie.

### ÚVOD

Cestódy predstavujú skupinu plochých červov ohrozujúcich zdravie ľudí a zvierat (napr. *Taenia* spp., *Echinococcus* spp.). Larválne štádiá týchto cestódov zvyčajne zotrvávajú v tkanivách životne dôležitých orgánov, ktoré poškodzujú svojim pomalým a progresívnym rastom tvárou v tvár imunitnému systému. V súčasnosti je dokázané, že tkanivové helminty detailne modulujú imunitnú odpoveď hostiteľa v súvislosti s navodením chronickej infekcie, kedy zároveň potláčajú možnú patológiu. Sofistikovanou kontrolou patológie, ktorá by súvisela s imunitnou odpoveďou, si cestódy zvyšujú šancu dlhodobého prežitia a šancu zkompletizovať životný cyklus (Maizels a kol., 2004). Základom výskumu cestódov je, okrem iného, snaha pochopiť mechanizmy, pomocou ktorých tieto organizmy unikajú imunitnej odpovedi hostiteľa. Poznatky z oblasti imunobiológie hostiteľsko-parazitického vzťahu pri infekciách cestódmi v porovnaní s nematódami a trematódami značne zaostávajú. Dendritické bunky (DC) sú vysoko špecializované antigén-prezentujúce bunky, ktorých dôležitá úloha pozostáva zo stimulácie imunitnej odpovede a následných zápalových procesov. Po ingestii antigénu DC podliehajú dozrievaniu. Dozrievanie je spojené so zvýšenou expresiou kostimulačných molekúl, napr. CD80, CD86, ako aj s expresiou molekúl hlavného histokompatibilného systému, MHC triedy II. K úplnej aktivácii DC, ktoré exprimujú takéto markery musia byť aktivované pomocou tzv. "danger" signálov. Takto aktivované DC produkujú značné množstvá rôznych cytokínov, ktoré sú nevyhnutné pre indukciu špecifického programu diferenciacie T lymfocytov (Th1, Th2, Th17, Treg) (Everts a kol., 2010). Keďže DC zohrávajú kľúčovú úlohu v iniciácii a nasmerovaní imunitnej odpovede,

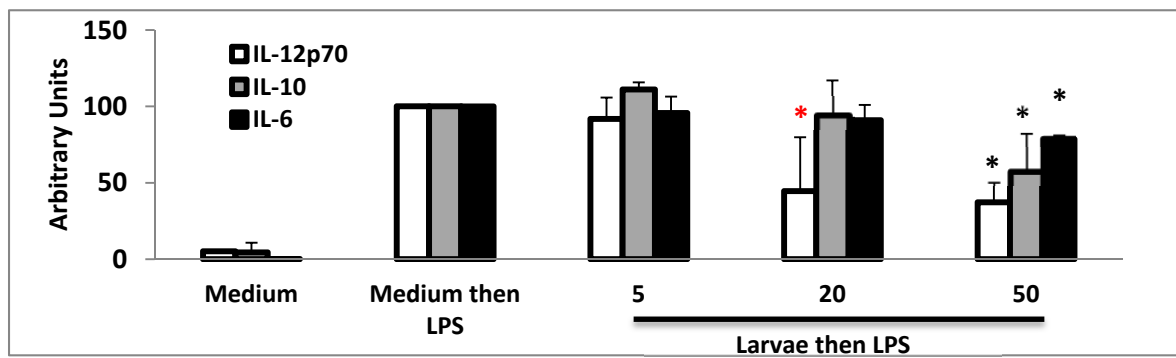
nebolo by prekvapujúce, keby si parazity vyvinuli stratégie, ktorými by pozmenili funkcie týchto buniek. Berúc do úvahy kritickú úlohu DC v iniciácii T-bunkovej odpovede voči patogénom ako *Mesocestoides vogae* (experimentálny model pre výskum biológie cestódo a hostiteľsko-parazitárnych interakcií) vplyv metabolických produktov tetratyridií (druhé larválne štádium) na funkciu DC nebol doposiaľ študovaný.

## MATERIÁL A METÓDY

Tetratyridia *M. vogae* boli udržiavané v ICR outbreďných myšiach resp. v gerbilách. *In vitro* axenická kultivácia bola modifikovaná podľa Spiliotis a Brehma (Spiliotis a Brehm, 2009). DC boli generované z prekursorov kostnej drene C57BL/6 myší podľa Lutz (Lutz a kol., 1999). Bunky kostnej drene boli kultivované v kompletnom RPMI 1640 médiu s GM-CSF (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po ôsmich dňoch inkubácie boli DC (~80% CD11c+) zozbierané, spočítané a použité v experimentoch. DC boli stimulované živými *M. vogae* larvami (0, 5, 20, 50) v špeciálnom ko-kultivačnom systéme (0,4 µm veľkosť pórov, BD Falcon) 24 hodín. V experimentoch s LPS boli larvy odstránené po 24 h a DC boli následne stimulované s 0,1 µg/ml LPS (LPS; *E. coli* 0127:B8; Sigma Aldrich) ďalších 24 h. Po ukončení inkubácie boli DC analyzované prietokovým cytometrom. Na stanovenie stupňa zrelosti boli použité špecifické protilátky voči CD11c, MHC II a CD 86. Pri stanovení apoptózy boli DC značené protilátkou voči aneXinu-V a propidium jodidom. Bunky boli analyzované pomocou cytometra FACSCalibur™ (Becton Dickinson) s použitím CellQuest softvéru. Výsledky boli neskôr analyzované pomocou FlowJo softvéru (Tree Star, USA). Po stimulácii DC bola meraná aj hladina cytokínov IL-12p70, IL-10, IL-6 a pomocou sendičovej ELISY (ELISA, OptEIA kits, BD Biosciences; Ready-SET-Go kit, eBioscience) podľa inštrukcií výrobcov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V súčasnosti je charakterizovaných niekoľko produktov helmintov, ktoré prispievajú k imunosupresii často späté s infekciou (McSorley a kol., 2013). *M. vogae* produkty neboli schopné aktivovať DC *in vitro*. Za použitia LPS ako pozitívnej kontroly, sme pozorovali schopnosť metabolických produktov *M. vogae* indukovať maturáciu DC a zároveň produkciu cytokínov. Ako sme očakávali, DC stimulované LPS exprimovali vysoké hladiny MHC triedy II a CD86. Na rozdiel od toho, expresia markerov pre maturáciu buniek stimulovaných metabolickými produktami lariiev bola podobná ako v prípade kontrolnej skupiny nestimulovaných buniek. DC stimulované LPS produkovali vysoké množstvá IL-12p70, IL-10 a IL-6 cytokínov. DC inkubované s larválnymi sekrétmi neboli schopné produkovať ani jeden z analyzovaných cytokínov. Tieto zistenia sú v korelácii s predošlými štúdiami, ktoré zaznamenali neschopnosť produktov iných helmintov, napr. glykoproteín filárií ES-62, schistozomálny SEA antigén, *Taenia crassiceps* alebo *E. multilocularis* (primárne bunky a vezikuly metacstóda), indukovať maturáciu (Nono et al., 2012). Nastavenie takéhoto programu by jasne zohrávalo úlohu v prospech parazita, keďže to značí, že nie je rozpoznávaný imunitným systémom. Rozoznanie tool-like ligandov prostredníctvom DC receptorov (TLR) zohráva hlavnú úlohu v obrane voči patogénom a prispieva k aktivácii adaptívnej imunitnej odpovede. TLR-4 rozpoznáva motívy LPS, ktoré sú súčasťou bakteriálnej bunkovej steny. Keďže má LPS schopnosť indukovať Th1 typ imunitnej odpovede, zisťovali sme, či sú metabolické produkty lariiev *M. vogae* schopné modulovať DC aktiváciu vyvolanú týmto ligandom. DC boli inkubované s larvami 24h a po odstránení lariiev bolo pridané LPS po dobu ďalších 24h. Analýzou povrchových markerov sme nezistili narušenie schopnosti DC maturácie ako odpoveď na LPS. Avšak na úrovni produkcie cytokínov sme zaznamenali signifikantnú redukciu produkcie pro-zápalového IL-12p70, zatiaľ čo IL-10 a IL-6 boli len mierne ovplyvnené (Obrázok 1). Znížená produkcia pro-zápalových cytokínov môže predstavovať



Obrázok 1. Metabolické produkty *M. vogae* narušujú funkčnosť DC. DC boli vystavené larvám *M. vogae* po dobu 24h a následne stimulované LPS ďalších 24h. DC supernatanty boli zozbierané a analyzované na prítomnosť IL-12p70, IL-10 a IL-6 za použitia ELISY. Zobrazené data predstavujú priemer $\pm$ SD 2-5 experimentov. \*= $p < 0,05$

významný mechanizmus supresie zápalových procesov čo predstavuje výhodu prežitia pre parazita. Keďže IL-12p70 je dôležitým cytokínom, ktorý polarizuje Th1 diferenciáciu, takáto supresia môže vyústiť do viac generalizovanej Th1 supresie, ktorá je pozorovaná pri *M. vogae* infekcii *in vivo*. Ďalšou možnosťou narušenej vnímavosti DC je možná bunková smrť vyvolaná larvami, ako bolo popísané v prípade produktov *E. multilocularis* (Nono et al., 2012). Na zistenie tohto javu boli bunky analyzované na prítomnosť markerov pre bunkovú smrť. Ko-inkubácia DC s larvami nevedla k zníženej viabilite v porovnaní s kontrolou. K tomu, aby sme úplne vylúčili možnosť, že efekt metabolických produktov nie je na základe hladovania buniek spôsobeného prítomnosťou lariev, supernatanty po kultivácii lariev boli zozbierané (po 24h), sterilne filtrované a pridané k DC. Podobne ako samotné larvy, médium, ktoré obsahovalo ich produkty malo rovnakú schopnosť narušiť produkciu cytokínov (hlavne IL-12p70) v prípade LPS stimulovaných DC a neovplynilo ich viabilitu.

Na záver by sme teda mohli zhodnotiť, že predložená práca predstavuje prvú štúdiu o schopnosti metabolických produktov *M. vogae* modulovať funkcie DC, čo by mohlo vysvetliť zaznamenané imunomodulačné schopnosti *in vivo* (Alvarez a kol., 2010). Napriek tomu, že presný imunologický scénar nie je kompletne pochopený, je jasné, že sekrety *M. vogae* udržiavajú DC v nezrelom stave, a tak narušuje ich funkčnosť. Ďalšie štúdie sú potrebné na ozrejenie následnej polarizácie adaptívnej zložky imunity a molekulárnej povahy aktívnych zložiek metabolických produktov.

*Táto práca bola podporená grantovou agentúrou Národný štipendijný fond Slovenskej republiky a programom SPP Hlavička 2012/2013.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alvarez JI, Mishra BB, Gundra UM, et al. Mesocostoides corti intracranial infection as a murine model for neurocysticercosis. Parasitol. 2010; 137: 359-372.
- Everts B, Smits HH, Hokke CH, Yazdanbakhsh M. Helminths and dendritic cells: sensing and regulating via pattern recognition receptors Th2 and T-reg responses. Eur J Immunol. 2008; 40: 1525-1537.
- Lutz M, Kukutsch N, Ogilvie AL, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods. 1999; 233:77-92.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, et al. Helminth parasites--masters of regulation. Immunol Rev. 2004; 201:89-116
- McSorley H, Hewitson JP, Maizels RM. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. Int J Parasitol. 2013; 43:301-310.
- Nono J, Plentinx K, Lutz M, Brehm K. Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. Plos Negl. Trop. Dis. 2012; 6: e1516.
- Spiliotis M, Brehm K. Axenic in vitro cultivation of *Echinococcus multilocularis* metacestode vesicles and the generation of primary cell cultures. Methods Mol Biol. 2009; 470:245-262.



# ORGANICKÉ FORMY MANGÁNU VO VÝŽIVE HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT

Venglovská K.

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

## ABSTRAKT

Mangán (Mn) je esenciálnym prvkom, ktorý je potrebný pre zachovanie dobrého zdravia a produkcie hospodárskych zvierat. Miera absorpcie, depozície ako aj aktivita špecifických Mn-enzýmov môže byť závislá od formy v akej je Mn prijímaný potravou. V súčasnosti sú na trhu preferované organické formy aditív aj keď štúdie ohľadne ich biovyužitelnosti sú značne rozporuplné. Mnohí autori tvrdia, že ich využitelnosť je vyššia ako u anorganických foriem, vzhľadom k menšiemu počtu negatívnych interakcií s inými komponentmi diéty v tráviacom trakte zvierat. Avšak iní autori nezaznamenali žiadne rozdiely medzi anorganickou a organickou formou Mn. Predkladaný súhrn prináša na základe vedecky dokázaných výsledkov prehľad o absorpcii a depozícii Mn z jeho organických zdrojov používaných vo výžive hospodárskych zvierat ako aj o aktivite Mn špecifických enzýmov. Výsledky štúdií naznačujú, že organické formy môžu byť biovyužiteľnejšie ako anorganické, avšak ich využitelnosť je závislá od charakteru komplexu, ktorý vytvárajú. Na základe týchto zistení by bolo potrebné venovať väčšiu pozornosť štúdiu jednotlivých organických foriem Mn, aby sme dokázali správne pochopiť ich metabolický osud v organizme.

## ÚVOD

V súčasnosti je v EÚ schválených 11 zlúčenín Mn ako aditív používaných vo výžive zvierat. Tri z nich sú cheláty: Mn chelát proteínového hydrátu aminokyselín (pochádzajúci z hydrolyzovaných sójových proteínov), Mn chelát glycínu (syntetický) a Mn chelát hydroxylového analógu metionínu (Community Register of Feed Additives). Maximálny povolený celkový obsah Mn v EÚ je 150 mg/kg kompletnej krmnej zmesi pre všetky zvieratá produkujúce potraviny, okrem rýb (100 mg/kg). Potreba Mn pre zvieratá stanovená NRC závisí od druhu a kategórie jednotlivých druhov zvierat (u ošípaných od 4-50 mg Mn/kg krmiva, u hydiny od 17-60 mg Mn/kg krmiva a u prežúvavcov od 3-95 mg Mn/kg krmiva). V kompletných krmných zmesiach sa však v bežnej praxi používajú koncentrácie Mn až do 150 mg/kg. V súčasnosti sa vo výžive hospodárskych zvierat začínajú preferovať hlavne organické aditíva Mn a to hlavne z dôvodu už spomínanej lepšej biovyužitelnosti v porovnaní s anorganickým formami. Čo sa týka zavádzania nových krmných aditív na báze chelátových zlúčenín Mn je však dôležité zdôrazniť, že existujú určité obavy ohľadne bezpečnosti potravín, pretože ich používanie vo výžive zvierat by mohlo viesť k zmenenej depozícii Mn v tkanivách/produktach určených na konzum. Taktiež ešte nemáme dostatok poznatkov o lokalizácii a kinetike disociácie chelátov v organizme zvierat. Výsledky štúdií ohľadne biovyužitelnosti organických zdrojov sú dodnes kontroverzné. Výsledky štúdie Bakera a Halpina (1987) podobne ako výsledky štúdie Flya a kol. (1989) ukázali, že Mn v organickej podobe vykazoval rovnakú biovyužitelnosť ako jeho anorganické formy. Pričom iní autori zaznamenali lepšie výsledky v prípade užívania organických zdrojov Mn (Lu a kol., 2006; Ji a kol., 2006). Taktiež boli zaznamenané zlepšené produkčné parametre a kvalita vajec u nosníc, ktoré prijímali organické zdroje Mn (Sun a kol., 2012), pričom iní autori zmeny nepozorovali (Mabe a kol., 2003).

## ABSORPCIA A DEPOZÍCIA MANGÁNU

Množstvo absorbovaného Mn gastrointestinálnym traktom závisí od jeho prijatého množstva a formy, ale aj druhu živočíchov. Absorpcia Mn u hydiny je menej ako 0,01% pričom u prežúvavcov je to okolo 1% (Hidiriglow, 1979; Turk a kol., 1982). Tradične používané anorganické formy stopových prvkov vo výžive zvierat sa v tráviacom trakte rýchlo disociujú a sú voľné pre interakcie s antagonistami, čo má za následok zníženie schopnosti ich

absorpcie, ktorá je aj tak veľmi nízka (Ashry a kol., 2012). O absorpcii organických foriem existujú dva predpoklady (Ashmead, 1993). Jeden z nich hovorí o tom, že komplexované alebo chelátované stopové prvky sú absorbované v intaktnej forme a atómy kovov zostávajú pevne naviazané a chránené v organických komplexoch počas absorpcie. Na druhej strane sa predpokladá, že komplexovanie môže zabrániť škodlivým účinkom konkurenčných ligandov ako sú fyáty, fosfáty atď., ktoré by mohli naviazať voľné ióny kovov a tým zabrániť ich absorpcii. Niektoré druhy organických aditív sú však stabilné len v zásaditom prostredí, pričom sa tráviacom trakte ľahko rozpúšťajú a uvoľňujú Mn, ktorý sa následne ďalej komplexuje, čo môže ovplyvniť jeho absorpciu (Martin a Scribante, 2000; Brown a Zeringue, 1994). Zdá sa, že biovyužitelnosť Mn z organických foriem závisí aj od ligandu, s ktorým komplex vytvára. Pravdepodobne z týchto dôvodov sú štúdie ohľadne biovyužitelnosti organických zdrojov rozporuplné. Vhodnými indikátormi pre hodnotenie využiteľnosti Mn sú koncentrácie Mn v tibii, pečeni. Berta a kol. (2004) nezaznamenali žiadne významné rozdiely, ani v produkčných parametroch, rovnako ani v depozícii Mn v tibii medzi organickými a anorganickými zdrojmi Mn, na rozdiel od Yan a Waldroup (2006), ktorí zaznamenali zvýšenú depozíciu Mn v tibii brojlerov po prijímaní organických foriem Mn. Ji a kol. (2006) si ako marker pre hodnotenie biovyužitelnosti Mn vybrali obsah Mn v plazme. U brojlerov zistili, že organické formy Mn so silnou pevnosťou komplexu mali za následok významné zvýšenie hladiny Mn v plazme v porovnaní anorganickými formami. Podobné výsledky zaznamenal aj El-Husseiny a kol. (2012) a Brooks a kol. (2012), ktorí zistili výrazný nárast koncentrácie Mn v tibii kurčiat po užívaní organických aditív Mn na rozdiel od Aksu a kol. (2011), ktorí nepozorovali žiadne významné zmeny.

Distribúcia Mn v tkanivách je relatívne homogénna. Zvýšená depozícia je len v tkanivách bohatých na mitochondrie a pigmenty (Keen a Zidenberg-Cherr, 1994). Tkanivá hospodárskych zvierat neakumulujú extrémne vysoké množstvo Mn ani pri jeho zvýšenom prijímaní z krmiva. Jediným odrazom zvýšeného príjmu Mn z anorganických zdrojov je zvýšená koncentrácia Mn v srsti, perí a vlne zvierat (Miller, 1979). Normálna koncentrácia Mn v potravinách a produktoch živočíšneho pôvodu sa pohybuje v rozpätí od 0,1 až 5 mg/kg (vlhkej hmotnosti) s najvyššími koncentraciami v kostiach, pečeni, obličkách, pankrease a nadobličkách, zatiaľ čo svaly vykazujú nízke hladiny Mn. V kostiach sa nachádza až 40% celkového obsahu Mn v tele, ale Mn z kostí nemôže slúžiť ako pohotovostný depozit a nemôže byť ďalej využívaný v metabolických procesoch (McDowell, 2003).

#### BIOLOGICKÉ FUNKCIE MANGÁNU

Prostredníctvom enzýmov sa Mn zapája antioxidantnej ochrany organizmu, je nevyhnutný pre správny rast a vývoj kostí, ako aj pre správnu funkciu nervového a reprodukčného systému a metabolizmus lipidov a sacharidov. Mn je súčasťou 3 metaloenzýmov a to konkrétne Mn-superoxid dismutázy (MnSOD), pyruvát karboxylázy a arginázy, taktiež slúži ako aktivátor mnohých iných enzýmov (McDowell, 2003). Forma v akej je Mn prijímaný z diéty nemá výrazný vplyv na aktivitu špecifických enzýmov. Miera expresie MnSOD sa tiež považuje za jeden z ukazovateľov biovyužitelnosti Mn. Wang a kol. (2012) však nezaznamenali medzi príjmom Mn z jeho organickými a anorganickými zdrojov žiadne významné zmeny v expresii MnSOD v srdci, na rozdiel od Lu a kol. (2006), ktorí zaznamenali významný nárast hladiny mRNA pre MnSOD v skupine s prídavkom aminokyselinového proteínátu.

*Práca bola realizovaná v rámci riešenia projektu VEGA č.2/0045/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aksu T, Ozsoy B, Saripinar Aksu D et al. The effects of lower levels of organically complexed zinc, copper and manganese in broiler diets on performance, mineral concentration of tibia and mineral excretion. *Kafkas. Univ. Vet. Fak. Derg.* 2011; 17:141-146.
- Ashmead HD. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metal salts. *The Roles of Amino Acid Chelates in Animal Nutrition*. Noyes Publishers, Park Ridge, NJ. 1992; p.32-57.
- Ashry GM, Hassan AAM, Soliman SM. Effect of feeding a combination of zinc, manganese and copper methionine chelates of early lactation high producing dairy cow. *Food and Nutrition Sci.* 2012; 3:1084-91.
- Baker DH, Halpin KM. Research note: Efficacy of manganese-protein chelate compared with that of manganese sulfate for chicks. *Poult. Sci.* 1987; 66:1561-3.
- Berta E, Andrásosfzky E, Bersényi et al. Effect of inorganic and organic manganese supplementation on the performance and tissue manganese content of broiler chicks. *Acta Vet. Hung.* 2004; 52:199-209.
- Brooks MA, Grimes JL, Lloyd KE et al. Relative bioavailability in chicks of manganese from manganese propionate. *J. Appl. Poult. Res.* 2012; 21:126-30.
- Brown TF, Zeringue LK. Laboratory evaluation of solubility and structural integrity of complexed and chelated trace mineral supplements. *J. Dairy Sci.* 1994; 77:181-9. Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003.
- El-Husseiny O, Hashish SM, Ali RA et al. Effects of feeding organic zinc, manganese and copper on broiler growth, carcass characteristics, bone quality and mineral content in bone, liver and excreta. *Int. J. Poult. Sci.* 2012; 11:368-77.
- Fly AD, Izquierdo OA, Lowry KR et al. Manganese bioavailability in a Mn-methionine chelate. *Nutr. Res.* 1989; 9: 901-10.
- Hidiroglow M. Manganese in ruminant nutrition. *Can. J. Anim. Sci.* 1979; 59:217-236.
- Ji F, Luo XG, Lu L et al. Effect of manganese source on manganese absorption by the intestine of broilers. *Poultry Sci.* 2006; 85:1947-52.
- Keen CL, Zidenberg-Cherr S. Manganese. Present knowledge of nutrition, Ziegler EE, Filer LJ, eds., 7th ed. Washington, DC: ILSI Press. 1996; 334-343. Lu L, Ji C, Luo XG et al. The effect of supplemental manganese in broilers diets on abdominal fat deposition and meat quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2006; 129:49-59.
- Mabe I, Rapp C, Bain MM et al. Supplementation of a corn-soybean meal diet with manganese, copper, and zinc from organic or inorganic sources improves eggshell quality in aged laying hens. *Poultry Science.* 2003; 82: 1903-13.
- Martin R, Scribante P. Evaluating metal-methionine complexes. *Feed Int.* 2000; 10-14.
- McDowell LR. Manganese. *Minerals in animals and human nutrition*. 2nd ed. Elsevier Science, BV Amsterdam, Netherlands. 2003; 335-56.
- Miller WJ. *Dairy Cattle Feeding and Nutrition*. Academic Press, New York. 1979. Sun Q, Guo Y, Li J et al. Effects of methionine hydroxy analog chelated Cu/Mn/Zn on laying performance, egg quality, enzyme activity and mineral retention of laying hens. *The Journal of Poultry Science*, 2012; 49:20-5.
- Turk DE, Gunji DS, Molitoris P. Coccidial infection and manganese absorption. *Poult. Sci.* 1982; 61:2430-4.
- Wang F, Lu L, Li S et al. Relative bioavailability of manganese proteinate for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Biol. Trace Elem. Res.* 2012; 146:181-6.
- Yan F, Waldroup PW. Evaluation of mintrex manganese as a source of manganese for young broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2006; 5:708-13.

## OVULAČNÝ POMER U SÚK

Vitková T., Hajurka J.

*Klinika malých zvierat, UVLF, Košice*

*Oddelenie chirurgie, ortopedie, röntgenológie a reprodukcie, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo hodnotiť ovulačný pomer u súk jednotlivých hmotnostných kategórií. V štúdiu bolo celkovo zahrnutých 69 súk vo veku od 7 mesiacov do 12 rokov, živej hmotnosti 2- 36 kg. Suky boli rozdelené do 4 hmotnostných kategórií. Miniaturne (1-5 kg), malé (5,1-10 kg), stredné (10,1-25 kg) a veľké (25,1-50 kg) plemená. Ovulačný pomer bol u súk stanovený po ovariohysterektómii, ako počet žltých teliesok prítomný na oboch vaječníkoch. Z celkového počtu 69 súk 48 bolo významných z hľadiska prítomnosti diestru. Stredná hodnota ovulačného pomeru u miniaturných plemien na pravom vaječníku bola  $1,0 \pm 0,8$ , minimálna 0 a maximálna 2. Na ľavom vaječníku bola  $2 \pm 0,8$ , minimálna 1 a maximálna 3. U malých plemien stredná hodnota ovulačného pomeru na pravom vaječníku bola  $2,0 \pm 2,1$ , minimálna 0, maximálna 6. Na ľavom vaječníku  $3,0 \pm 2,0$ , pričom minimálny počet bol 0, maximálny 7. U stredne veľkých plemien bol stanovený ovulačný pomer na pravom vaječníku  $3,0 \pm 2,1$ , minimálny počet žltých teliesok bol 2 a maximálny 8, na ľavom vaječníku bol  $3,0 \pm 1,7$ , minimálne 0, maximálne 5. U veľkých plemien stredná hodnota ovulačného pomeru na pravom vaječníku bola  $5,0 \pm 2,4$  s minimálnym počtom 3 a maximálnym 10, pre ľavý vaječník boli stanovené hodnoty  $4,5 \pm 2,0$  s minimom 0 a maximom 6 žltých teliesok. Štatisticky významné boli rozdiely v ovulačnom pomere pri porovnávaní jednotlivých hmotnostných kategórií. Najväčšia významnosť bola pozorovaná medzi skupinami miniaturných a veľkých plemien, kde  $P= 0,0057$ , medzi malými a veľkými skupinami s  $P= 0,0081$  a medzi miniaturnými a strednými skupinami plemien s  $P= 0,0105$ . Štatistická významnosť bola preukázaná aj pri hodnotení počtu žltých teliesok na pravých vaječníkoch všetkých hmotnostných kategórií súčasne, a to ANOVA metódou s výslednou hodnotou  $P= 0,003$ . Počítanie žltých teliesok po ovariohysterektómii súk patrí k najpresnejším metódam stanovenia ovulačného pomeru a výsledky hodnotenia sú jedným z určujúcim ukazovateľom embryonálnej mortality a veľkosti vrhu.

### ÚVOD

Domestikáciou vlka a ďalším šľachtením domácich psov došlo k zmenám reprodukcie v podobe rozdielov ovulačného pomeru, veku pri puberte, sezonality reprodukcie, embryonálnej mortality, dĺžke gravidity, veľkosti vrhu a laktačnej anestrii (Hajurka, 2012). U polyovulatórných zvierat nachádzame nesúlad medzi počtom ovulácií (ovulačný pomer) a počtom mláďat pri pôrode. Počet mláďat vo vrhu je ovplyvnený viacerými faktormi, ale najmä ovulačným pomerom, počtom oplodnených oocytov a prežívaním embryí aj plodov (Beuning a kol., 2006). Mnoho domácich druhov zvierat má ovariálnu cyklickú aktivitu s istým počtom rastu folikulových vln v priebehu jedného cyklu. Počas tejto periódy sa vyvíja určitý počet vybraných folikulov. Zo zásoby folikulov na vaječníkoch sa určité množstvo vyberie doposiaľ neznámym mechanizmom a tieto pokračujú v raste a vývoji až do ovulácie (England a kol., 2009). Počet folikulov, ktoré narastú do momentu ovulácie, je vo veľkej miere závislý aj na genetických vplyvoch. Šľachtením jednotlivých plemien sa fixovala genetická informácia o stimulácii rastu folikulov a počte ovulácií v rámci rôznych hmotnostných kategórií (<http://www.royalcanin.us/library/littersizeindogs.aspx> Litter size in dogs). Ovulačný pomer, rovnako ako veľkosť vrhu je variabilný v závislosti od plemena (Reynaud a kol., 2006). Ďalším faktorom ovplyvňujúcim ovulačný pomer je vek a počet pôrodov suky. Vo všeobecnosti je akceptované, že veľmi mladé, ale aj staré suky, porodí menší počet šteniat ako je všeobecný priemer plemena (Garvilovic a kol., 2008, Mutembei a kol., 2002). Ovulačný pomer ovplyvňuje taktiež výživa. Suplementácia stopovými prvkami

ovplyvňuje funkcie späť s reprodukciou, vrátane ovulácie a maturácie oocytov. Početné štúdie preukázali vplyv výživy na vývoj folikulov a ovuláciu. Stopové prvky, ako je zinok a meď, zohrávajú úlohu ako antioxidanty a minerálna suplementácia by mohla znížiť výskyt „starých oocytov“ a zvýšiť kvalitu a obnovu maturovaných oocytov u psov (Kim a kol., 2012).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 69 klinických pacientov, súk, u ktorých bola vykonaná ovariohysterektómia. Po následnej preparácii vaječníkov sa vykonalo makroskopické hodnotenie. Skúmané boli ovariálne štruktúry a následne bol zaznamenaný počet žltých teliesok. U 48 súk boli pozorované žlté telieska. Získané hodnoty boli následne porovnávané t- testom a ANOVA testom. Cieľom bolo : a, určenie minimálnej, strednej a maximálnej hodnoty žltých teliesok pre pravý a ľavý vaječník pre každú hmotnostnú kategóriu súk; b, zistiť rozdiel v počte žltých teliesok na pravom a ľavom vaječníku; c, porovnať celkový počet žltých teliesok jednotlivých hmotnostných kategórií súk navzájom pre pravý a ľavý vaječník; d, porovnať celkový počet žltých teliesok všetkých váhových kategórií súčasne pre pravý a ľavý vaječník.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stredná hodnota ovulačného pomeru u miniatúrnych plemien na pravom vaječníku bola  $1,0 \pm 0,8$ . Na ľavom vaječníku bola stredná hodnota  $2 \pm 0,8$ . U malých plemien stredná hodnota ovulačného pomeru na pravom vaječníku bola  $2,0 \pm 2,1$ . Na ľavom vaječníku bolo  $3,0 \pm 2,0$  žltých teliesok. U stredne veľkých plemien bol stanovený ovulačný pomer na pravom vaječníku hodnotou  $3,0 \pm 2,1$ , na ľavom vaječníku bolo  $3,0 \pm 1,7$  žltých teliesok. Stredná hodnota ovulačného pomeru na pravom vaječníku bola  $5,0 \pm 2$ , na ľavom vaječníku boli stanovené hodnoty  $4,5 \pm 2,0$ . Minimálne a maximálne hodnoty žltých teliesok sú zhrnuté v tabuľke č.1. Pri porovnávaní jednotlivých hmotnostných kategórií navzájom štatisticky významný bol rozdiel medzi skupinami miniatúrnych ( $n=4$ ) a veľkých plemien ( $n=10$ ) s  $P=0,0057$  (a- a). Potom medzi malými ( $n=16$ ) a veľkými plemenami s  $P=0,0081$  (b- b) a miniatúrnymi a strednými skupinami plemien ( $n=18$ ) s hodnotou  $P=0,0105$  (c- c). Pri porovnaní celkového počtu žltých teliesok na pravých vaječníkoch všetkých váhových kategórií súčasne štatistická významnosť bola stanovená hodnotou  $P=0,003$ .

Výsledky sledovania sú zhrnuté v tabuľke č.1

Tab. č.1: Ovulačný pomer u súk rôznych hmotnostných kategórií.

Hmotnostné kategórie plemien	Vaječník	Ovulačný pomer		
		Minimálna hodnota	Stredná hodnota $\pm$ štandardná odchýlka	Maximálna hodnota
Miniatúrne (1,0- 5,0 kg)	Pravý	0	$1,0 \pm 0,8$ a, c	2
	Ľavý	1	$2,0 \pm 0,8$	3
Malé (5,1- 10 kg)	Pravý	0	$2,0 \pm 2,1$ b	6
	Ľavý	0	$3,0 \pm 2,0$	7
Stredné (1,1- 25 kg)	Pravý	2	$3,0 \pm 2,1$ c	8
	Ľavý	0	$3,0 \pm 1,7$	5
Veľké (25,1- 50 kg)	Pravý	3	$5,0 \pm 2,4$ a, b	10
	Ľavý	0	$4,5 \pm 2,0$	6



t-test  $P \geq 0,05$ ; a-a  $P= 0,0057$ ; b-b  $P=0,0081$ ; c-c  $P= 0,0105$ ; ANOVA pre pravé vaječníky u všetkých kategórií  $P= 0,003$

Ovulačný pomer sa môže stanoviť viacerými spôsobmi. Ultrasonografická metóda predstavuje percento veľkých folikulov identifikovaných v priebehu estru, s následnou tvorbou žltých teliesok zistených na 25. deň po ovulácii (England a kol., 2009). Avšak v niektorých prípadoch môžeme touto metódou podhodnotiť alebo nadhodnotiť realitu, obzvlášť, ak je prítomný veľký počet folikulov (Concanon, 2009). Odhadnúť ovulačný pomer je možné aj hodnotením veľkosti vrhu. Ide však len o nepresný odhad, pretože veľkosť vrhu nezohľadňuje embryonálne a fetálne straty. Ovulačný pomer je preto najvhodnejšie určiť po ovariektómii a to počítaním žltých teliesok prítomných na oboch vaječníkoch. Takouto metódou sa zistil ovulačný pomer v rozmedzí od  $5,7 \pm 0,3$  (  $n= 22$  súk) (Tsutsui a Shimizu, 1975) alebo  $6,0 \pm 0,1$  ( $n= 192$  súk) (Shimizu a kol., 1990) do  $7,1 \pm 0,6$  ( $n= 44$  súk) (Reynaud a kol., 2006). Ovulačný pomer rovnako ako veľkosť vrhu je variabilný v závislosti od plemena. V inej vzorke s počtom 44 súk bola vykonaná ovariektómia krátko po ovulácii. Suky malých plemien ( $n= 13$ ) mali značne nižší ovulačný pomer ako suky veľkých plemien ( $n=11$ ). To znamená, že celkový počet žltých teliesok u malých plemien bol  $5,5 \pm 0,7$ , kým u stredných ( $n=20$ ) a veľkých plemien  $7,8 \pm 0,7$  a  $10,1 \pm 1,4$  (Reynaud a kol., 2006). V našej štúdiu sme navyše určili ovulačný pomer u miniatúrnych plemien, ktorý bol  $1,0 \pm 0,8$  na pravom a  $2,0 \pm 0,8$  na ľavom vaječníku. Rovnako sme stanovili počet žltých teliesok na oboch vaječníkoch. Výsledky sledovaní porovnané s touto štúdiou mali v priemere nižšie hodnoty ovulačného pomeru .

*Moje poďakovanie patrí MVDr. Mihálymu, MVDr. Kredatusovej a MVDr. Hubovi zo súkromných veterinárnych ambulancií za poskytovanie materiálu pre toto sledovanie.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beuning R, Jansen, N, Brand, H. Analysis of fertility in canine populations in respect to genetic and environmental influences. *In: proceedings of the 5th biannual EVSSAR congress.2006; 60-4.*
- Concanon PW. Endocrinologic Control of Normal Canine Ovarian Function. *Reproduction Domestic Animals. 2009; 2: 3-15.*
- England, GCW, Russo M, Freeman SL. Follicular Dynamics, Ovulation and Conception Rates in Bitches. *Reprod Dom Anim. 2009; 44: 53-8*
- Gavrilovic BB, Andersson K, Linde FC. Reproductive patterns in the domestic dog- a retrospective study of the Drever breed. *Theriogenology.2008; 70: 783-94.*
- Hajurka J. Čo ovplyvňuje počet šteniat v jednom vrhu? *Veterinárství.2012; 1: 7-10.*  
<http://www.royalcanin.us/library/littersizeindogs.aspx> (Litter size in dogs.)
- Kim M J, Oh HJ a kol. Effects of mineral supplements on ovulation and maturation of dog oocytes. *Theriogenology. 2012; 78: 110–115.*
- Mutembei HM, Mutiga ER, Tsuma VT. An epidemiological survey demonstrating decline in reproductive parameters in German shepherd bitches in Kenya. *J S Afr Vet Assoc.2002; 73: 36-7.*
- Reynaud K, Fontbonne A a kol. In vivo canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: A review. *Theriogenology. 2006; 66:1685–93.*
- Shimizu T, Tsutsui T, Murao I, Orima H. Incidence for transuterine migration of embryos in the dog. *Jpn J Vet Sci. 1990; 52: 1273–5.*
- Tsutsui T, Shimizu T. Studies on the reproduction in the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. *Jpn J Anim Reprod.1975; 21: 65–9.*

# POROVNANIE BACHOROVEJ FERMENTÁCIE VYBRANÝCH MEDICINÁLNYCH RASTLÍN – PREDBEŽNÁ ŠTÚDIA *IN VITRO*

Wencelová M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice*

## ABSTRAKT

V posledných rokoch sa vyvíja intenzívne úsilie na využitie fytogénnych látok ako potenciálnych prírodných alternatív pre zvýšenie produktivity hospodárskych zvierat. Cieľom experimentu bolo sledovať a porovnať vplyv vybraných druhov medicínálnych rastlín, ktoré sa bežne vyskytujú v oblastiach strednej Európy a majú karminatívny a protizápalový účinok, na niektoré bachorové fermentačné parametre a počet bachorových ciliát po 24 hod inkubácie *in vitro*. Ako substrát pre fermentáciu sme použili vňať z ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum*), rebríčka obyčajného (*Achillea millefolium*), žihľavy dvojdomej (*Urtica dioica*) a čakanky obyčajnej (*Cichorium intibus*), kvet z nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis*), koreň z púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale*) a puškvorca obyčajného (*Acorus calamus*). Fermentácie ovplyvnili stráviteľnosť substrátov *in vitro*, ktorá bola najvyššia pri *T. officinale* a najnižšia pri *A. millefolium* a *C. intibus* ( $P=0,005$ ). Pomer acetátu k propionátu pri substrátoch kolísal medzi 3,35 až 4,45. Koncentrácia metánu pozitívne korelovala s vodíkovou návratnosťou  $r=0,571$  ( $P=0,001$ ) a celkovým počtom protozoí  $r=0,461$  ( $P=0,001$ ). Predbežné výsledky ukázali, že jednotlivé použité medicínálne rastliny mali signifikantne rozdielnu stráviteľnosť *in vitro* a niektoré bachorové fermentačné parametre navzájom signifikantne korelovali.

## ÚVOD

Na udržanie vysokej produktivity malých aj veľkých prežúvavcov v živočíšnej výrobe sa používajú vysokoenergetické diéty, ktoré môžu spôsobovať zdravotné problémy a tým znižovať produkciu zvierat. Vplyvom nepriaznivých podmienok v bachore dochádza k zmenám v populácii mikroorganizmov, a tým k poruchám trávenia a využívania živín zvieratám. Fytogénne aditíva môžu byť využité k zmierneniu týchto negatívnych javov. Hlavnými účinnými zložkami fytogénnych aditív sú silice, saponíny, horčiny, flavonoidy, taníny, polyfenoly, slizy. V súčasnosti boli hlavne testované koncentrované extrakty účinných látok so zameraním na ich antimikrobiálne účinky (Bodas a kol., 2012; Calsamiglia a kol., 2007) Prežúvavce na pastve si dokážu vyhľadať zdraviu prospešné byliny (Waller a kol., 2001), avšak intenzifikácia živočíšnej produkcie túto ich schopnosť potláča. Ako alternatíva sa javí doplnenie kŕmnych dávok zmesou vybraných medicínálnych rastlín, ktoré môžu simulovať prirodzené podmienky na pastve, zlepšovať zdravotný stav zvierat, byť lacnejšou náhradou za drahé extrakty a zároveň obohatiť kŕmnu dávku o vlákninu, ktorá je nevyhnutne potrebná pri stimulácii bachorovej činnosti a tvorbe slín, pri prežúvaní a peristaltike čriev. Cieľom tejto predbežnej štúdie bolo porovnať vplyv vybraných druhov medicínálnych rastlín na niektoré fermentačné parametre a ciliátovú protozoálnu populáciu v bachore oviec v podmienkach *in vitro*.

## MATERIÁL A METODIKA

Bachorová tekutina (inokulum) bola získaná od troch baranov (zošľachtená valaška; vek 1 rok; hmotnosť  $21,0 \pm 0,5$  kg) pred ranným kŕmením v priebehu troch po sebe nasledujúcich dní. Kŕmna dávka baranov pozostávala z 800 g sušiny lúčneho sena a 300 g sušiny mletého jačmeňa, rozdelená do dvoch dávok za deň. Získaná bachorová tekutina bola precedená cez štyri vrstvy gázy, zmiešaná v pomere 1:1 s McDougallovým pufrom v množstve 35 ml bola automaticky dávkovaná do 120 ml NTS fliaš s vopred naváženým substrátom v množstve 0,25 g. Po prebublání s  $\text{CO}_2$  boli fermentačné fľaše uzatvorené a umiestnené do termostatu.

*In vitro* inkubácia trvala 24 hod, pri teplote  $39 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Ako substrát boli použité medicínálne rastliny z komerčných zdrojov (Tabuľka č. 1).

Tabuľka č. 1 Názvy medicínálnych rastlín, použité časti a ich chemické zloženie (g/kg DM)

Názov	Časť	DM (g/kg)	NDF	ADF	CP	N	Popol
<i>Taraxacum officinale</i>	Koreň	897	100	90	100	16	106
<i>Acorus calamus</i>	Koreň	867	273	146	97	15	63
<i>Calendula officinalis</i>	Kvet	893	242	220	202	33	141
<i>Hypericum perforatum</i>	Vňať	916	410	366	119	20	64
<i>Achillea millefolium</i>	Vňať	911	580	557	67	11	79
<i>Urtica dioica</i>	Vňať	904	354	287	269	43	178
<i>Cichorium intibus</i>	Vňať	914	524	427	115	19	103

DM, sušina; NDF, neutrálna detergentná vlákna; ADF, acidodetergentná vlákna; CP, hrubý proteín

*In vitro* experiment prebiehal v troch opakovaníach v priebehu troch po sebe idúcich dní. Chemické zloženie rastlín bolo stanovené podľa oficiálne všeobecne platných metód analýz. Acidodetergentná a neutrálne detergentná vlákna boli stanovené použitím Fibertecu 2010 (Tecator Comp., Höganäs, Sweden). Koncentrácia krátkoreťazcových mastných kyselín (SCFA) a koncentrácia metánu bola stanovená vo vyprodukovanom plyne pomocou plynového chromatografu Perkin - Elmer Clarus 500 (Perkin - Elmer, Inc. Shelton, Connecticut, USA). Objem celkového vyprodukovaného plynu a stráviteľnosť *in vitro* (IVDMD) boli stanovené použitím fermentačných techník *in vitro*. Výsledky boli štatisticky spracované pomocou analýzy variancie (Graphpad Instat, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvyššia IVDMD spomedzi všetkých medicínálnych rastlín bola zaznamenaná pri koreni *T. officinale* a naopak najnižšie hodnoty stráviteľnosti boli pozorované pri vňati *A. millefolium* a *C. intibus* (Tabuľka č. 2). Dôvodom je pravdepodobne prítomnosť dobre stráviteľných zásobných polysacharidov ako napr. inulínu, v koreňoch rastlín (Schütz a kol., 2006; Yarnell a Abascal, 2009). Ostatné sledované parametre nevykazovali signifikantné zmeny medzi jednotlivými medicínálnymi rastlinami. Zaznamenali sme pozitívnu koreláciu  $r=0,571$  ( $P=0,001$ ) medzi vodíkovou návratnosťou a koncentráciou metánu (Tabuľka č. 3). Koncentrácia SCFA vykazovala negatívnu koreláciu s návratnosťou vodíka ( $P=0,001$ ). Tieto zistenia poukazujú na prevahu metanogenézy oproti acetogenéze v inkubáciách *in vitro*. Pozitívnu koreláciu sme zistili medzi celkovým počtom bachorových ciliátových protozoí a koncentráciou SCFA ( $P=0,002$ ), koncentráciou metánu ( $P=0,001$ ) a koncentráciou *n*-butyrátu ( $P=0,011$ ). Nedávne štúdie naznačujú pokles metanogenézy pri použití medicínálnych rastlín s obsahom sekundárnych rastlinných metabolitov v *in vitro* fermentačných pokusoch (Wanapat a kol., 2012; Zmora a kol., 2012). V našich výsledkoch sme nezaznamenali výrazný pokles koncentrácie metánu, napriek prítomnosti metán znižujúcich tanínov vo všetkých použitých rastlinách. Naša predbežná štúdia ukázala, že fermentácie jednotlivých medicínálnych rastlín v bachorovej tekutine boli rozdielne v stráviteľnosti *in vitro*, avšak nevykázali významné rozdiely v koncentracii metánu a počte bachorových ciliát a niektoré fermentačné parametre navzájom signifikantne korelovali. V budúcnosti sa zameriame na vplyv zmesi týchto rastlín v podmienkach dlhodobých experimentov.

Tabuľka č. 2. Fermentačné parametre medicínálnych rastlín v bachorovej tekutine *in vitro*

Substrát	IVDMD (g/kg DM)	Celk. plyn (ml/g DM)	Metán (%)	SCFA (mmol/l)	2Hrec (%)	Protozoa (n/ml)
<i>Taraxacum officinale</i>	789 <sup>b</sup>	178	9,16	60,2	65,4	383444
<i>Acorus calamus</i>	604 <sup>ab</sup>	182	8,63	58,6	67,1	308333
<i>Calendula officinalis</i>	604 <sup>ab</sup>	184	9,41	54,5	69,2	313444
<i>Hypericum perforatum</i>	419 <sup>a</sup>	186	7,28	49,8	62,1	312556
<i>Achillea millefolium</i>	361 <sup>a</sup>	183	7,19	47,1	64,7	357556
<i>Urtica dioica</i>	570 <sup>ab</sup>	182	6,73	51,2	62,8	382556
<i>Cichorium intibus</i>	404 <sup>a</sup>	183	7,40	46,3	69,2	388000
SEM	60,2	1,8	1,128	8,34	4,65	71600
P-value	0,005	0,219	0,465	0,857	0,880	0,958

IVDMD, stráviteľnosť sušiny; SCFA, krátkoreťazcové masné kyseliny; 2Hrec, vodíková návratnosť. Rozdiely v stĺpci sú medzi priemernými hodnotami s rôznym indexom ( $P < 0,05$ )

Tabuľka č. 3. Pearsonov korelačný koeficient ( $r$ ) (<sup>a</sup>) a  $P$ -hodnoty (<sup>b</sup>) medzi počtom bachorových ciliátových protozoí a nameranými fermentačnými parametrami *in vitro*

	IVDMD	Celk. plyn	SCFA	Metán
Celk. plyn	-0,209 <sup>a</sup> (0,101) <sup>b</sup>			
SCFA	0,193 (0,130)	-0,018 (0,886)		
Metán	0,125 (0,328)	-0,009 (0,944)	0,363 (0,003)	
Acetát	-0,255 (0,044)	0,157 (0,220)	-0,607 (0,001)	-0,365 (0,003)
Propionát	0,362 (0,004)	0,010 (0,941)	0,688 (0,001)	0,101 (0,433)
<i>n</i> -Butyrát	0,399 (0,001)	-0,208 (0,102)	0,399 (0,001)	0,409 (0,001)
2H-návratnosť	-0,014 (0,912)	-0,016 (0,900)	-0,503 (0,001)	0,571 (0,001)
Protozoa	-0,060 (0,643)	-0,126 (0,325)	0,391 (0,002)	0,461 (0,001)

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠ a SAV (VEGA 2/0001/11).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Calsamiglia S, Busquet M, Cardozo PW, Castillejos L, Ferret A. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci.* 2007; 90:2580-2595.
- Schütz K, Muks E, Carle R, Schieber A. Separation and quantification of inulin in selected artichoke (*Cynara scolymus L.*) cultivars and dandelion (*Taraxacum officinale* WEB. ex WIGG.) roots by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20:1295-1303.
- Waller PJ, Bernes G, Thamsborg SM, Sukura A, Richter SH, Ingebrigtsen K, Höglund J. Plants as deworming agents of livestock in the nordic countries: Historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Vet Scand.* 2001; 42:31-44.
- Wanapat M, Kongmun P, Pongchompu O, Cherdthong A, Khejornsart P, Pilajun R, Kaenpakdee S. Effects of plants containing secondary compounds and plant oils on rumen fermentation and ecology. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44:399-405.
- Yarnell E, Abascal K. Dandelion (*Taraxacum officinale* and *T. mongolicum*). *Integrative Medicine.* 2009; 8:35-38.
- Zmora P, Cieslak A, Jedrejek D, Stochmal A, Pers-Kamczyc E, Oleszek W, Nowak A, Szczechowiak J, Lechniak D, Szumacher-Strabel, M. Preliminary *in vitro* study on the effect of xanthohumol on rumen methanogenesis. *Arch Anim Nutr.* 2012; 66:66-71.





Názov: **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2013**  
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu  
VIII. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Rok vydania: 2013  
Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

Počet strán: 148

**ISBN 978-80-971428-0-3**



**ISBN 978-80-971428-0-3**