



# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2014**

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

**IX. ročník**

**Košice, 9. a 10. september 2014**



**Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Bod'ua  
9. a 10. septembra 2014  
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



*Venované*

*Prof. Ing. Ol'ge Ondrašovičovej, CSc. (1951 – 2013)  
dlhoročnej organizátorke seminára a iniciátorke Súťaže o najlepšiu prácu doktorandov*

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Recenzovali: MVDr. Imrich Zeleňák, DrSc., Prof. MVDr. Igor Valocký, PhD.

Neprešlo jazykovou úpravou.

**ISBN 978-80-971428-1-0**

# OBSAH

## 1. FENOTYPICKÁ PLASTICITA U CARYOPHYLLAEUS LATICEPS PALLAS, 1781 (CESTODA: CARYOPHYLLIDEA): JE ZMENA FENOTYPU PARAZITA INDUKOVANÁ HOSTITEĽOM?

Barčák D.<sup>1</sup>, Oros M.<sup>1</sup>, Hanzelová V.<sup>1</sup>, Scholz T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice, <sup>2</sup>Parazitologický ústav, BC AV ČR v.v.i., České Budějovice 9

## 2. VPLYV PROBIOTICKÉHO KMEŇA *E. FAECIUM* AL41 NA PRODUKCIU IGA V SLEZINE, BURSE FABRICII A V ČREVE KURČIAT INFIKOVANÝCH *SALMONELLA ENTERITIDIS* PT4

Bobíková K., Husáková E., Stašová D.

Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice 12

## 3. CRYPTOSPORIDIUM SPP. U SUIS

Danišová, O., Valenčáková, A., Hasajová, A., Kalinová, J.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a genetiky 15

## 4. ANALÝZA GENOTOXICKÉHO ÚČINKU KOMERČNÉHO PESTICÍDNEHO PRÍPRAVKU V LYMFOCYTOCH PERIFÉRNEJ KRVI HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Drážovská M., Šiviková K.

Ústav genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach 18

## 5. VPLYV FEROCÉNOV NA REAKTÍVNE KYSLÍKOVÉ A DUSÍKOVÉ ČASTICE

R. Džurinová, D. Žatko, A. Fejerčáková

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED a.s., Košice 21

## 6. KVALITA VODNÉHO PROSTREDIA PRE CHOV LOSOSOVITÝCH RÝB

Fečkaninová A.<sup>1</sup>, Popelka P.<sup>1</sup>, Sasáková N.<sup>2</sup>, Veszelits Laktičová, K.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF, Košice 24

## 7. ANTIOXIDAČNÝ EFEKT RASTLINNÝCH EXTRAKTOV V PODMIENKACH *IN VITRO*

Fejerčáková A., Vašková J., Vaško L.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED a.s., Košice 27

## 8. DETEKCIA BIOCHEMICKÝCH A ŠTRUKTÚRNYCH ZMIEN POČAS STENÓZY AORTÁLNEJ CHLOPNE

Guľašová Z.<sup>1</sup>, Bilecová-Rabajdová M.<sup>1</sup>, Tomečková V.<sup>1</sup>, Veliká B.<sup>1</sup>, Komanický V.<sup>2</sup>, Artemiou P.<sup>3</sup>, Sabol F.<sup>3</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED a.s., UPJŠ LF, Košice, <sup>2</sup>Ústav fyzikálnych vied, UPJŠ PF, Košice, <sup>3</sup>Klinika srdcovej chirurgie, VÚSCH, a.s., UPJŠ LF, Košice 30

## 9. OVPLYVNĚOVANIE TVORBY BIOFILMOV U VYBRANÝCH LAKTOBACILOV V *IN VITRO* PODMIENKACH

Hádryová Jana, Sližová Magdaléna, Popper Miroslav, Nemcová Radomíra

Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice 33

## 10. MOLEKULOVÁ DIAGNOSTIKA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U DETÍ ZO SLOVENSKA

Hasajová A.<sup>1</sup>, Valenčáková A.<sup>1</sup>, Danišová O.<sup>1</sup>, Ondriška F.<sup>2</sup>, Halánová M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Oddelenie parazitológie, HPL spol. s.r.o., Bratislava, <sup>3</sup>Ústav verejného zdravotníctva, UPJŠ, Košice 36

- 11. VPLYV PODÁVANIA DEPRENYLU NA POČET SPERMIÍ A NA AKTIVITU VYBRANÝCH ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV V SEMENNÍKU POTKANA**  
Františka Horváthová<sup>1</sup>, Viera Danielisová<sup>2</sup>, Jozef Mihalik<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Ústav anatómie UPJŠ LF, Košice, <sup>2</sup>Neurobiologický ústav SAV, Košice 39
- 12. MIGRÁCIA ŽERIAVOV POPOLAVÝCH (GRUS GRUS)- PÔSOBIVÉ DIVADLO ALEBO POTENCIÁLNE NEBEZPEČENSTVO?**  
Hrehová Ľ.<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, <sup>2</sup>Katedra genetiky, UPJŠ, Košice 42
- 13. IN VITRO EXPRESIA CYTOKÍNOV PO APLIKÁCIÍ RÔZNYCH PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A S. ENTERITIDIS SE 147**  
Eva Husáková, Viera Spišáková, Róbert Herich, Dominika Stašová, Mária Levkutová a Mikuláš Levkut  
Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF, Košice 45
- 14. AKTIVITA SUPEROXID DISMUTÁZY A DEPOZÍCIA ZINKU Z JEHO RÔZNYCH ZDROJOV V TKANIVÁCH BROJLEROV**  
Ivanišinová, O.  
Ústav Fyziológie Hospodárskych Zvierat, Sav, Košice 48
- 15. EXPRESIA GLUKOKORTIKOIDOVÝCH RECEPTOROV U OOCYTOV A PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÍ MYŠÍ**  
Janštová Ž.  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 51
- 16. POTVRDENIE INTERAKCIE ERYTROPOETÍNU A JEHO RECEPTORA V NÁDOROVÝCH A2780 A NORMÁLNYCH HUVEC BUNKÁCH**  
P. Kimáková<sup>1</sup>, B. Fecková<sup>1</sup>, L. Hurtuková<sup>1</sup>, M.R. Bhide<sup>2</sup>, P. Solár<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Katedra bunkovej biológie, Prírodovedecká Fakulta, Univerzita P.J. Šafárika, Košice, <sup>2</sup>Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita Veterinárskeho Lekárstva a Farmácie, Košice 54
- 17. KVANTIFIKÁCIA MASTOCYTOV V NÁDOROCH MLIEČNEJ ŽIAZY U POTKANOV VYVOLANÝCH PO EXPOZÍCII N-NITROSO-N-METHYLUREOU**  
Kissová, V., Ševčíková, Z., Revajová, V., Herich, R., Šimaiová, V.  
Ústav patologickej anatómie, UVLF, Košice, Katedra patologickej anatómie a fyziológie 57
- 18. BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO SKLÁDKY LÚŽENCA Z NIKLOVEJ HUTY V SEREDI**  
Kvasnová S.<sup>1</sup>, Pristaš P.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Katedra biológie a ekológie, UMB, B. Bystrica, <sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice 60
- 19. POSTKONDICIONOVANIE BRADYKINÍNOM ZNIŽUJE KONCENTRÁCIU KYSELINY GLUTÁMOVEJ V NERVOVOM TKANIVE PO ISCHÉMII A TOXICKOM POŠKODENÍ TRIMETYLCÍNOM**  
Lalkovičová M., Bonová P., Danielisová V.  
Neurobiologický ústav SAV, Košice 63
- 20. VYUŽITIE VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE S UV DETEKCIU NA STANOVENIE SALINOMYCÍNU V KRMIVE**  
Maďarová M.<sup>1</sup>, Kožárová I.<sup>1</sup>, Kukura V.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, <sup>2</sup>Veterinárny a potravinový ústav v Košiciach 66

- 21. TOPOGRAFICKÁ ANATÓMIA A VARIABILITA *DUCTUS THORACICUS* A *CISTERNA CHYLI (RECEPTACULUM CHYLI)* U KRÁLIKA**  
 Maloveská M., Krešáková L., Petrovová E., Vdoviaková K.  
*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Košice* 69
- 22. STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV Z MÄSA KRÁLIKA DIVÉHO (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) NA VYBRANÉ ANTIBIOTIKÁ**  
 Marušková Katarína<sup>1</sup>, Pipová Monika<sup>1</sup>, Jevinová Pavlína<sup>1</sup>, Kmeť Vladimír<sup>2</sup>, Regecová Ivana<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF v Košiciach,* <sup>2</sup>*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice* 72
- 23. NEOČAKÁVANÉ SPRÁVANIE U NETOPIEROV ODHALENÉ ANALÝZOU ZIMNÉHO GUÁNA**  
 Miková E.<sup>1</sup>, Arrizabalaga A.<sup>2</sup>, Arriolabengoa M.<sup>3</sup>, Zaldibar B.<sup>2</sup>, Boldogh S.<sup>4</sup>, Goiti U.<sup>2</sup>, Uhrin M.<sup>1</sup>, Aihartza J.<sup>2</sup>, Garin I.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>*Katedra zológie, Ústav biologických a ekologických vied, Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach,* <sup>2</sup>*Department of Zoology and Animal Cell Biology, Faculty of Science and Technology, UPV/EHU, Basque Country,* <sup>3</sup>*Department of Minerology and Petrology, Faculty of Science and Technology, UPV/EHU, Basque Country,* <sup>4</sup>*Aggtelek National Park Directorate, Jósvalfő, Hungary* 75
- 24. HODNOTENIE SPRÁVANIA ŠTENIAT NEMECKÉHO OVČIAKA V OPEN FIELD TESTE POČAS ONTOGENÉZY**  
 Miňo, I. , Kottferová, J. , Lešková L. , Kachnič, J. , Haladová E. , Matos, R.  
*Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, UVLF v Košiciach* 78
- 25. ÉTERICKÉ OLEJE V ŽIVOČÍŠNOM ORGANIZME**  
 Ocel'ová V.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 82
- 26. ANGIOTENZÍN II JE DÔLEŽITÝ REGULAČNÝ FAKTOR V CITLIVOSTI NEUROPATICKEJ BOLESTI**  
 Oroszová Z, Hricová E, Lukáčová N, Pavel J.  
*Neurobiologický ústav SAV, Košice* 85
- 27. METABOLIZMUS ORGANICKÝCH KYSELÍN V BACHORE OVIEC *IN VITRO* PRI VYSOKO-KONCENTRÁTOVEJ DIÉTE S PRÍDAVKOM FUMARÁTU STANOVENÝ METÓDOU LC-MS**  
 Pisarčíková J.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 88
- 28. DEKONTAMINÁCIA LABORATÓRNYCH SPF MYŠÍ A ICH VYUŽITIE V GNOTOBIOTICKÝCH ŠTÚDIÁCH**  
 Popper, M., Gancarčíková, S.  
*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice* 91
- 29. VYUŽITIE METODIKY FLUORESCENČNEJ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIE NA HISTOLOGICKÝCH REZOCH (HISTO-FISH), URČENEJ PRE ŠTÚDIUM TVORBY BIOFILMOV V GASTROINTESTINÁLNOU TRAKTE U GNOTOBIOTICKÝCH ZVIERAT**  
 Slížová M., Maďar M., Gancarčíková S., Popper M., Csank T., Pistl J., Hadryová J., Nemcová R.<sup>1</sup>  
*Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach* 95

- 30. INHIBÍCIA TVORBY BIOFILMU KMEŇOV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EXTRACELULÁRNymi METABOLITMI *LACTOBACILLUS MUCOSAE***  
Straková E., Bujňáková D.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* 98
- 31. BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO HNEDEHO KALU SKLÁDKY V ŽIARI NAD HRONOM - IDENTIFIKÁCIA A MOŽNÉ VYUŽITIE PRI BIOREMEDIÁCII**  
Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Kosorínová P.<sup>3</sup>, Júdová, J.<sup>4</sup>, Remenár, M.<sup>4</sup>, Pristaš P.<sup>1,4</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, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice*, <sup>4</sup> *Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica* 101
- 32. CIRKULÁCIA GIARDIÓZY VO VYBRANÝCH SKUPINÁCH DETÍ A PSOV Z OKOLIA KOŠÍC**  
Štrkolcová G.<sup>1</sup>, Goldová M.<sup>1</sup>, Halánová M.<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav parazitológie, UVLF, Košice*, <sup>2</sup> *Ústav verejného zdravotníctva, UPJŠ, Košice* 104
- 33. VZŤAH POLYPLOIDIE A PARAZITÁRNEJ INFEKČIE U RÝB**  
Šmiga Ľ.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Koščo J.<sup>2</sup>, Halačka K.<sup>3</sup>, Manko P.<sup>2</sup>, Ševc J.<sup>2</sup>, Oberhauserová K.<sup>1</sup>, Fedorčák J.<sup>2</sup>, Falatová L.<sup>2</sup>, Oros M.<sup>4</sup>, Barčák D.<sup>4</sup>, Lazar P.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice*, <sup>2</sup> *Fakulta prírodných a humanitných vied, Prešovská univerzita v Prešove, Prešov*, <sup>3</sup> *Ústav biológie obratlovců, Akademie věd ČR, Brno*, <sup>4</sup> *Parazitologický ústav SAV, Košice* 107
- 34. ŠTÚDIUM KARCINÓMU PRSNEJ ŽEAZY POMOCOU FLUORESCENČNÝCH TECHNÍK**  
Špaková I.<sup>1</sup>, Tomečková V.<sup>1</sup>, Bilecová-Rabajdová M.<sup>1</sup>, Urban P.<sup>1</sup>, Fialkovičová V.<sup>2</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> *Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed a.s., Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice*, <sup>2</sup> *Gynekologicko-pôrodnická klinika UPJŠ LF a UN LP, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Košice* 110
- 35. IN VITRO KULTIVÁCIA POTKANÍCH SCHWANNOVÝCH BUNIEK U DOSPELÉHO TKANIVA**  
Tomko P., Vanický I.  
*Neurobiologický ústav Slovenskej akadémie vied, Košice* 113
- 36. GENOTYPIZÁCIA PÔVODCU MORU VČELIEHO PLODU, *PAENIBACILLUS LARVAE***  
Vaníková S.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice; Katedra genetiky, UPJŠ, Košice* 115
- 37. IN VITRO A IN VIVO ŠTÚDIA VPLYVU ZMESI MEDICINÁLNYCH RASTLÍN A SLNEČNICOVÉHO OLEJA NA BACHOROVÝ METABOLIZMUS OVIEC**  
Wencelová M.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice* 118
- 38. POROVNANIE ÚČINNOSTI DIÉTY S PRÍDAVKOM HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÉ PARAMETRE V PLAZME, PEČENI, SRDCI A OBLIČKÁCH**  
Žatko D., Džurinová R.  
*Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED a.s., Košice* 121



# FENOTYPICKÁ PLASTICITA U *CARYOPHYLLAEUS LATICEPS* PALLAS, 1781 (CESTODA: CARYOPHYLLIDEA): JE ZMENA FENOTYPU PARAZITA INDUKOVANÁ HOSTITEĽOM?

Barčák D.<sup>1</sup>, Oros M.<sup>1</sup>, Hanzelová V.<sup>1</sup>, Scholz T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Parazitologický ústav SAV, Košice, Slovenská republika, <sup>2</sup> Parazitologický ústav, BC AV ČR v.v.i., České Budějovice, Česká republika

## ABSTRAKT

Súčasný morfológický a molekulárno-fylogenetický štúdiu naznačili existenciu morfológickej variability a fenotypickej plasticity, t.j. výskytu morfológicky odlišných foriem u *Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (Cestoda, Caryophyllidea), najbežnejšie sa vyskytujúceho druhu pásomnice rýb v Palearktiskej geografickej oblasti. Skúmané jedince z rôznych hostiteľov boli detailne morfológicky charakterizované pomocou svetelného mikroskopu a skenovacieho elektrónového mikroskopu. Na základe týchto zistení boli stanovené druhovo špecifické znaky *C. laticeps* a zároveň boli morfológicky charakterizované jednotlivé morfotypy. Výskyt druhu *C. laticeps* bol potvrdený v Európe a Severnej Afrike u širokého spektra definitívnych hostiteľov (rýb).

## ÚVOD

*Caryophyllaeus laticeps* (Pallas, 1781) (syn. *Taenia laticeps* Pallas, 1781) bol opísaný z pleskáča vysokého (*Abramis brama*) a je široko rozšíreným a najbežnejším druhom u širokého spektra hostiteľov v Palearktiskej geografickej oblasti (Scholz, 1989; Protasova a kol., 1990). Predovšetkým z dôvodu existencie vnútrodruhovej morfológickej variability skolexu a prednej časti tela bol na konci 18. a začiatku 19. storočia parazit nesprávne opísaný pod množstvom odlišných druhových aj rodových názvov. Štúdiom čerstvého biologického materiálu z viacerých druhov kaprovitých rýb bol zistený výskyt niekoľkých morfológicky odlišných populácií, ktoré boli pôvodne považované za tri nové druhy parazitujúce u rôznych hostiteľov (*Ballerus* sp., *Chondrostoma nasus* a *Vimba* spp.). V práci Bazsalovicsovej a kol. (2014) bolo však molekulárnymi metódami zistené, že tieto jedince v skutočnosti predstavujú síce morfológicky odlišné, ale geneticky podobné, čiastočne druhovo špecifické morfotypy polymorfného druhu *C. laticeps*, ktorý parazituje u širokého spektra kaprovitých rýb. V tejto práci sme sa zamerali na redeskripciu druhu *Caryophyllaeus laticeps* a na morfológickú charakterizáciu jednotlivých morfotypov a zároveň sme zhodnotili geografické rozšírenie a hostiteľské spektrum parazita.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci bol morfológicky študovaný materiál z muzeálnych zbierok, ako aj čerstvo získaný biologický materiál zahŕňajúci jedince použité v molekulárno-fylogenetickom štúdiu Bazsalovicsovej a kol. (2014), čo spolu predstavovalo viac ako 500 študovaných jedincov *C. laticeps*. Detailný metodologický postup bol popísaný v práci Barčáka a kol. (2014), pričom najdôležitejší krok zabezpečujúci kvalitu študovaného materiálu predstavuje fixácia čerstvo získaných pásomníc horúcim 4% roztokom formaldehydu (Oros a kol., 2010). Pre štúdium skenovacím elektrónovým mikroskopom (SEM) bol biologický materiál (predné časti tela a skolexy zástupcov 5 morfotypov) spracovaný ako uvádza Oros a kol. (2010).

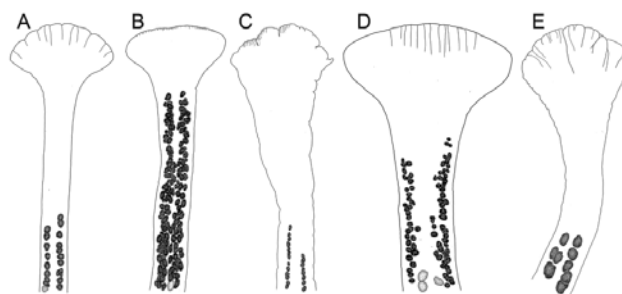
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pásomnice *Caryophyllaeus laticeps* sú charakteristické štíhlym, pretiahnutým telom s maximálnou šírkou v oblasti cirového vaku. Skolex je širší ako zvyšok tela, bez prichytávacích štruktúr (tzv. afossate). Semenníky sú okrúhle až oválne, prekrývajú sa s početnými, nepravidelne tvarovanými a veľkostne variabilnými žltkovými folikulmi, ktoré

siahajú po predný okraj cirového vaku. Semenovod je dlhý, dobre vyvinutý, jeho strednú a zadnú časť neprekrývajú inak laterálne i mediálne situované žltkové folikuly. Postovariálne žltkové folikuly sú prítomné. Vagina sa spája s maternicou a vytvára krátky utero-vaginálny kanál vyúsťujúci na povrch posteriórne od samčieho pohlavného otvoru. Folikulárny vaječník má tvar písmena H. Vajíčka sú oválne, neembryonované, majú hladký okraj a operkulum na póle. U študovaných jedincov bola zistená morfológická variabilita, predovšetkým predných častí tela a skolexov (Obr.1 a 2.) Morfológická charakteristika jednotlivých morfotypov je zhrnutá v Tabuľke 1.



Obr. 1: Mikrofotografie (SEM) skolexov a predných častí tela jednotlivých morfotypov pásomnic *C. laticeps*.



Obr. 2: Perokresby skolexov a predných častí tela jednotlivých morfotypov pásomnic *C. laticeps*.

Morfotyp	Hostiteľ	Telo	Skolex	Krčok	Prvé semenníky	Žltkové folikuly (ŽF)
1*	<i>Abramis brama</i> , <i>Ballerus</i> spp.	štíhle	vejárovitý až lopatkovitý	dlhý, štíhly,	posteriórne od ŽF	malé, siahajú k vaječníku
2	<i>Vimba</i> spp.	robustné	lopatkovitý	krátky, široký	v blízkosti ŽF	siahajú po pohlavné otvory
3	<i>Cyprinus carpio</i>	štíhle	laločnatý	vpredú rozšírený	posteriórne od ŽF	malé, siahajú k vaječníku
4	<i>Chondrostoma nasus</i>	veľké, robustné	lopatkovitý	dlhý, široký	posteriórne od ŽF	malé, siahajú k vaječníku
5	<i>Ballerus sapa</i> , <i>Abramis brama</i>	štíhle	vejárovitý	stredne veľký	posteriórne od ŽF	veľké, siahajú po pohlavné otvory

\* považovaný za "typický" morfotyp opísaný Pallasom (1781) z pleskáča *A. brama*

Tab. 1: Hlavné morfológické znaky odlišujúce jednotlivé morfotypy pásomnic *C. laticeps* z rôznych hostiteľov.

*Caryophyllaeus laticeps* bol opísaný z pleskáča *Abramis brama* Pallasom v roku 1781 ako *Taenia laticeps* pravdepodobne z okolia Petrohradu v Rusku. Podľa literárnych záznamov sa *C. laticeps* vyskytuje v Európe (\*Bulharsko, \*Česká republika, Fínsko, Francúzsko, Írsko, bývalá Juhoslávia, Lichtenštajnsko, Litva, Macedónsko, Maďarsko, \*Nemecko, Nórsko, Poľsko, \*Rakúsko, Rumunsko, \*Rusko, Severné Írsko, \*Slovensko, Španielsko, Švajčiarsko, Švédsko, Taliansko, \*Turecko a \*Veľká Británia), v Palearktickej Ázii (Azerbajdžan, Čína, Irak, Japonsko a Rusko) a v Severnej Afrike (\*Egypt, Maroko) (Obr. 3). Bol zaznamenaný u

32 druhov sladkovodných kaprovitých rýb z podčeľadí Alburninae, Barbinae, Cyprininae, Leuciscinae a Tincinae.



Obr. 3: Geografické rozšírenie *C. laticeps*; kríž - výskyt potvrdený autormi, štvorec - výskyt na základe literárnych údajov

Autormi tejto práce bol potvrdený výskyt parazita v označených krajinách (\*) u pleskáčov *Abramis brama*, *Ballerus ballerus*, *B. sapa*, *Blicca bjoerkna*, podustvy *Chondrostoma nasus*, kapra *Cyprinus carpio* a nosáľov *Vimba melanops* a *V. vimba*. Napriek zistenej fenotypickej plasticite, ktorá ako sa zdá súvisí s odlišnými hosťiteľmi a rozsiahlym geografickým rozšírením, je možné druh *C. laticeps* ľahko odlišiť od ostatných zástupcov rodu *Caryophyllaeus*. Druhovo špecifické morfológické znaky, ktorými sa *C. laticeps* líši od *C. brachycollis* Janiszewska, 1953 (často sa oba druhy zamieňali) a od *C. fimbriceps* Annenkova-Khlopina, 1919 vyskytujúceho sa u kapra *Cyprinus carpio* detailne uvádza Barčák a kol. (2014).

Hoci bol *Caryophyllaeus laticeps* opísaný pred 230 rokmi, dodnes existujú nezrovnalosti v taxonómii tohto druhu spôsobené hlavne existenciou morfológicky odlišných populácií parazitujúcich u rôznych hosťiteľov, ktoré sa len v malej miere líšia svojou genetickou štruktúrou (Bazsalovicsová a kol., 2014). Pre nasledujúce štúdium mechanizmu morfológickej plasticity tejto bazálnej skupiny pásomnic budú použité ďalšie molekulárne metódy (mikrosatelitové markery), ako aj štúdium životného cyklu parazita v laboratórnych podmienkach, ktoré môžu priniesť nový pohľad na danú problematiku.

*Táto práca bola financovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-0653-11 a LPP 0171-09) a grantovou agentúrou VEGA (2/0129/12).*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barčák, D., Oros, M., Hanzelová, V., Scholz, T., 2014. Phenotypic plasticity in *Caryophyllaeus brachycollis* Janiszewska, 1953 (Cestoda: Caryophyllidae): does fish host play a role? *Syst Parasitol* 88, 153-166.
- Bazsalovicsová, E., Kráľová-Hromadová, I., Brabec, J., Hanzelová, V., Oros, M., Scholz, T., 2014. Conflict between morphology and molecular data: a case of the genus *Caryophyllaeus* (Cestoda, Caryophyllidae), monozoic tapeworm of cyprinid fishes. *Folia Parasit* 61, 346-352.
- Oros, M., Scholz, T., Hanzelová, V., Mackiewicz, J.S., 2010. Scolex morphology of monozoic cestodes (Caryophyllidae) from the Palaearctic Region: a useful tool for species identification. *Folia Parasit* 57, 37-46.
- Protasova, E., Kuperman, B., Roytman, V., Poddubnaya, L., 1990. Caryophyllidae of the fauna of the USSR. Nauka, Moskva, 238 pp (In Russian).
- Scholz, T., 1989. Amphilinida and Cestoda, parasites of fish in Czechoslovakia. Academia, Praha, 56 pp.

# VPLYV PROBIOTICKÉHO KMEŇA *E. FAECIUM* AL41 NA PRODUKCIU IGA V SLEZINE, BURSE FABRICII A V ČREVE KURČIAT INFIKOVANÝCH *SALMONELLA* ENTERITIDIS PT4

Bobíková K., Husáková E., Stašová D.

Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice

## ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo sledovať vplyv probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na produkciu sIgA v črevnom obsahu a v orgánoch (slezina a Fabriciova burza) u kurčiat po infikovaní *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis PT4. Porovnali sme 4 skupiny kurčiat: kontrolná skupina (C), skupina obsahujúca probiotický kmeň *E. faecium* AL41 (EFAL41), skupina infikovaná so *Salmonella* Enteritidis PT4 (SE), skupina obsahujúca *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaná *Salmonella* Enteritidis PT4 (EFAL41+SE). Najvyššiu hodnotu sekrečného IgA (sIgA) sme zaznamenali v skorej fáze *S. Enteritidis* infekcie (4 p.i.) v črevnom obsahu u kurčiat ovplyvnených *E. faecium* AL41. V kombinovanej skupine kurčiat (EFAL41+SE) viedlo pôsobenie *E. faecium* AL41 k zvýšeniu sIgA v črevnom obsahu v neskorej fáze infekcie (7 p.i.). Pozitívny efekt probiotického kmeňa *E. faecium* AL41 sa u kurčiat prejavil aj vo Fabriciovej burze v dvoch skupinách (EFAL41; EFAL41+SE), kým v slezine sa hodnota IgA zvýšila len v SE skupine. Výsledky preukázali pozitívny efekt *E. faecium* AL41 na produkciu celkového sIgA v čreve a orgánoch u kurčiat infikovaných *S. Enteritidis* PT4.

## ÚVOD

*Salmonella enterica* sérovar Enteritidis je gramnegatívny fakultatívne intracelulárny črevný patogén, ktorý pôsobí ako významný zdroj otravy jedlom, vedie ku vzniku gastroenteritídy u ľudí (Howard a kol., 2012) a značným nákladom na zdravotnú starostlivosť (Santos a kol., 2011). Probiotiká sú nepatogénne baktérie, ktoré majú blahodárny vplyv na zdravie a fyziológiu (alebo oboje) u hostiteľa (Rajput a kol., 2012). Levkut a kol. (2012) poukázal na schopnosť *Enterococcus faecium* EF55 vplývať na dynamiku produkcie črevného mucínu u vtákov. Probiotiká môžu zvýšiť hladinu IgA produkujúcich buniek v sliznici (Levkut a kol., 2014) a v *lamina propria* (Ohland a kol., 2010). Tieto prospešné baktérie podporujú produkciu sekrečného IgA (sIgA) do slizničnej vrstvy lúmenu čreva (Ohland a kol., 2010). Sekrečné IgA ochraňuje črevný epitel proti kolonizácii a/alebo invázii väzbou patogénnych alebo komenzálnych antigénov (Macpherson a kol., 2007). Predmetom štúdie bolo sledovať vplyv probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na produkciu sIgA v črevnom obsahu a v orgánoch (slezina a Fabriciova burza) u kurčiat po infikovaní *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis PT4. Z tohto dôvodu bola použitá modifikovaná metóda na preplach čreva a metóda pre rozrušenie sleziny a Fabriciovej burzy.

## MATERIÁL A METODIKA

**Zvieratá.** 40 kurčiat plemena Cobb 500 bolo rozdelených do 4 skupín (n=10): C, EFAL41, SE a EFAL41+SE. Probiotický kmeň *Enterococcus faecium* AL41 (poskytnuté: Andrea Lauková, IAP SAS, Košice, Slovakia) bol individuálne *per os* aplikovaný skupinám EFAL41 a EFAL41+SE na 1 – 7 deň pokusu v dávke  $1 \times 10^9$  CFU/0.2 ml PBS. Na 4 deň pokusu bola uskutočnená experimentálna infekcia v SE a EFAL41+SE skupinách individuálnym *per os* podaním *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis PT4 (poskytnuté: František Šišák, VRI, Brno, Czech Republic) v dávke  $1 \times 10^8$  CFU/0.2 ml PBS. Vzorky z čriev pre hodnotenie IgA boli odoberaté na 4 a 7 deň po s infekcií *S. Enteritidis* a z Fabriciovej burzy a sleziny na 7 deň. **Postup preplachu vzoriek čreva.** Pri spracovaní čriev sa postupovalo podľa postupu Holt a kol. (1999) s určitými modifikáciami. Na 4 a 7 deň po infekcii boli kurčatám odoberaté úseky z

ilea a jejuna. Na preplach jednotlivých vzoriek sa použilo 10 ml teplého premývacieho roztoku (1 M tris/glycine buffer with 0.25% Tween 20, pH 7, Sigma Aldrich, USA), ktorý bol do lúmenu čreva aplikovaný s 10-cc injekčnou striekačkou a 18-ga ihlou. Preplachy z čriev boli centrifugované 5 minút pri 12 000 ×g (Hettich Rotina 420R Centrifuge, DJB Labcare, UK) a následne získaný supernatant zmrazený na -20 °C do spracovania ELISA metódou.

*Izolácia buniek sleziny a Fabriciovej burzy.* Tkanivo odobraté do PBS bolo rozrušené s tupým koncom piestu 10-ml injekčnej striekačky a pretlačené cez 70-µm nilónové sitko (BD Falcon, USA) na získanie jednobunkovej suspenzie. Suspenzia bola navrstvená na Histopaque-1077 (Sigma Aldrich, USA) a centrifugovaná 40 minút pri 1600×g (Hettich Rotina 420R Centrifuge, DJB Labcare, UK). Finálne nahromadenie buniek v tvare prstenca viditeľné na rozhraní bolo odobraté a dvakrát premyté v PBS. Bunky získané zo sedimentu oboch orgánov boli homogenizované 30 sekúnd pri 2000×g na MagNA Lyser (Roche, Germany).

*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).* Pre detekciu celkového IgA bol použitý kurací IgA ELISA kit (Kamiya Biomedical Company, USA). Absorbancia jednotlivých vzoriek bola meraná spektrofotometricky pri 450 nm na čítačke mikroplatničiek (Revelation Quicklink, Opsys MR, Dynex technologies, USA).

Na štatistickú analýzu dát bola použitá jednocestná ANOVA a Tukey Cramerov test v programe GraphPad (USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predchádzajúce štúdie poukázali na to, že probiotický kmeň *E. faecium* má vplyv na expresiu IgA<sup>+</sup> buniek v sliznici čreva u vtákov (Revajová a kol., 2013). Nás experiment preukázal najvyššiu koncentráciu sIgA v črevnom obsahu u kurčiat, ktorým bol aplikovaný probiotický kmeň EFAL41 v skorej fáze infekcie *S. Enteritidis* PT4. Výsledok poukázal na to, že liečenie kurčiat s *E. faecium* AL41 podporuje tvorbu sIgA. V neskoršej fáze infekcie došlo k zvýšeniu koncentrácie celkového sIgA u kurčiat ovplyvnených s *E. faecium* AL41 a infikovaných so *S. Enteritidis* PT4, čo je výsledkom pôsobenia oboch baktérií. Je známe, že *E. faecium* disponuje génmi pre produkciu enterocínov A a P a preukázal inhibičnú aktivitu proti mnohým patogénom vrátane *S. enterica* PT4 (Levkut a kol., 2009). Tento poznatok je v súlade so zvýšenou koncentráciou celkového sIgA v črevnom obsahu na 7 deň po infekcii. Aplikácia probiotika *E. faecium* AL41 preukázala priaznivý vplyv na Fabriciovú burzu u oboch skupín (EFAL41; EFAL41+SE). Zvýšená koncentrácia celkového IgA v slezine v SE skupine naznačuje skoré prenikanie salmonely do tohto orgánu a rozvoj systémovej imunitnej odpovede. Zníženie koncentrácie IgA v slezine u kurčiat ovplyvnených *E. faecium* môže byť spojené s imúnnou exklúziou (Tsuji a kol., 2008), alebo produkciou antimikrobiálnych molekúl (Lievin-Le Moal & Servin, 2006). V závere môžeme dodať, že naše výsledky preukázali pozitívny vplyv *E. faecium* AL41 na produkciu celkového sIgA v čreve kurčiat infikovaných *S. Enteritidis* PT4. Priaznivý účinok bol taktiež preukázaný vo Fabriciovej burze. Bola dokázaná možnosť využitia metódy pre hodnotenie IgA v orgánoch.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. VEGA – 1/0313/12, 1/0886/11 a APVV-0302-11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Howard, Z.R., O'Bryan, C.A., Crandall, P.G., & Ricke, S.C. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs: Current issues and prospects for control. *Food Res Internat.* 2012; 45; 755–764.
- Levkut, M. Sr., Pistl, J., Lauková, A., Revajová, V., Herich, R., Ševčíková, Z., Stromfová, V., Szabová, R., & Kokinčáková, T. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* EF55 against *Salmonella* Enteritidis in chickens. *Acta Vet Hung.* 2009; 57; 13–24.
- Levkut, M. Jr., Revajová, V., Lauková, A., Ševčíková, Z., Spišáková, V., Faixová, Z., Levkutová, M., Stromfová, V., Pistl, J., & Levkut, M. Sr. Leukocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers

- protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritidis. Res Vet Sci. 2012; 93; 195–201.
- Levkut, M. Jr., Revajová, V., Levkutová, M., Kolesárová, M., Herich, R., Ševčíková, Z., & Levkut, M. Sr. Mucin expression, IEL and cytokines in the caecum of broilers after administration EF55 and *S. Enteritidis*. J Compar Pathol. ESVP/ECVP Proceedings. 2014; 150; 94
- Lievin-Le Moal, V., & Servin, A.L. The front line of enteric host defence against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. Clin Microbiol Rev. 2006; 19; 3015–337.
- Ohland, C.L., & MacNaughton, W.K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010; 298; 807–819.
- Rajput, I.R., & Li, W.F. Potential role of probiotics in mechanism of intestinal immunity. Pak Vet J. 2012; 32; 303–308.
- Revajová, V., Levkut, M. Jr., Levkutová, M., Levkut, M. Sr., Herich, R., & Ševčíková, Z. 2013, April: Caecal IEL, blood lymphocytes and intestinal mucin study in chickens after probiotic prevention and *S. Enteritidis* infection. Paper presented at the proceedings of the 4th Management Committee Meeting and 3rd Meeting of Working Groups 1, 2 & 3 of COST Action FA 1002. Wageningen Academic Publishers. Farm Anim Proteom. 1.ed, 155-158, ISBN 978-90-8686-222-1.
- Santos, A.C., Roberts, J.A., Cook, A.J., Simons, R., Sheehan, R., Lane, C., Adak, G.K., Speybroeck, N., Imberechts, H., Herman, L., Ducatelle, R., & Dierick, K. Evidence-based semiquantitative methodology for prioritization of foodborne zoonoses. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6; 1083–1096.

## CRYPTOSPORIDIUM SPP. U SUIS

Danišová, O., Valenčáková, A., Hasajová, A., Kalinová, J.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra biológie a genetiky, Komenského 73, 04181 Košice, Slovenská republika; olga.danisova@uvlf.sk

### ABSTRAKT

Štúdia bola zameraná na detekciu patogéna *Cryptosporidium* spp., u prasíat s klinickými príznakmi poukazujúcimi na kryptosporidiózu.

V tejto štúdii sme vyšetrili 55 vzoriek trusu prasíat, ktoré boli zaradených do 3 rôznych vekových kategórií (ciciaky, n = 17; odstavčatá, n = 32; prasnice, n = 6) z chovov Východného Slovenska. Všetky vzorky boli prvotne vyšetrené mikroskopicky po špecifickom farbení podľa Kinyouna a následne bola vykonaná analýza pomocou nested PCR s použitím primérov na amplifikáciu oblasti SSU rRNA génu. Sekundárny PCR produkt po elektroforetickej vizualizácii bol sekvenovaný.

Z 55 vzoriek bol u 4 ciciakov detegovaný druh *C. muris*, u odstavčiat bol identifikovaný druh *C. suis* (2) a *C. scrofarum* (2). *C. scrofarum* bol taktiež identifikovaný aj u jednej prasnice. Nami zistené druhy *C. muris* a *C. scrofarum* nie sú hostiteľsky špecifické, detegované boli aj u ľudí čo nám poukazuje na ich zoonotický potenciál. Z epidemiologického hľadiska by preto bolo žiaduce monitorovať výskyt týchto druhu nie len u zvierat, ale aj v ľudskej populácii.

### ÚVOD

Epidemiologickými a epizootologickými štúdiami sa zistilo, že kryptosporidiózne infekcie ošípaných majú odlišný priebeh ako infekcie u ostatných hospodárskych zvierat alebo ľudí. Hnačky u prasíat sú obvykle multifaktoriálnym problémom, môžu byť spôsobené celým radom patogénov (kokcidie, *Strongyloides* sp., *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, adenovírusy, rotavírusy, cirkovírusy) či už samostatne alebo v kombinácii s oportúnnymi patogénmi (*Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon bieneusi*, *Cryptosporidium* spp.).

Kryptosporidiózne infekcie u odstavčiat a prasíat prebiehajú väčšinou asymptomaticky alebo len s veľmi nízkou intenzitou klinických príznakov. Kryptosporidióza prasíat je najčastejšie spôsobená tromi rozdielnymi črevnými druhmi kryptosporidií: *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium suis*, *Cryptosporidium scrofarum* (*Cryptosporidium* pig genotype II). Ale boli opísané aj „prirodzené infekcie“ prasíat kryptosporidiami špecifickými pre iné druhy hostiteľov. V prasacom hnoji získanom na írskych farmách bola opísaná prítomnosť žalúdočnej kryptosporidié *C. muris* (Xiao et al., 2006). Vo východnej Číne bol z prasacích výkalov izolovaný *C. parvum* myšieho genotypu (Chen, Huang, 2007), ktorého typickými prirodzenými hostiteľmi sú hlodavce (Hůrková, Modrý, 2003). Prirodzene sa vyskytujúca kryptosporidiálna infekcia u prasíat sa najčastejšie objavuje u odstavčiat starších ako 1 mesiac, ale nie starších ako 6 mesiacov veku a menej často sú opisované infekcie u ciciakov mladších než 1 mesiac alebo u dospelých prasíat.

Experimentálnymi infekciami bola dokázaná vnímavosť prasíat k ďalším črevným kryptosporidiám *C. meleagridis* a *C. hominis*.

### MATERIÁL A METODIKA

Odobrané boli vzorky trusu od 55 prasíat zaradených do 3 rôznych vekových kategórií (ciciaky, n = 17; odstavčatá, n = 32; prasnice, n = 6) z chovov Východného Slovenska. Vzorky boli odobrané len od hnačkujúcich zvierat a prvotne vyšetrené mikroskopicky po špecifickom farbení podľa Kinyouna. Následne bola vykonaná analýza pomocou nested PCR s použitím druhových a rodových primérov na amplifikáciu oblasti SSU rRNA génu, kde bol použitý nami modifikovaný protokol (Xiao et al., 1999; Sotiriadou et al., 2006) pre

amplifikáciu oblasti 18SSU rRNA génu. Sekundárne PCR produkty boli analyzované elektroforeticky na 1,5% agarózovom gély a vizualizované pomocou UV žiarenia s vlnovou dĺžkou 312 nm (Xiao et al., 2004). Všetky pozitívne produkty PCR boli sekvenované na potvrdenie totožnosti druhov. Sekvencie boli porovnané so známymi sekvenciami pomocou BLAST-analýzy v databáze NCBI.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej štúdii z 55 vzoriek bola potvrdená prítomnosť druhov *Cryptosporidium* spp. u 9 prasiat skúmanej skupiny (16,36%). Pozitívne PCR produkty boli zaslané na sekvenáciu, ktorá nám potvrdila prítomnosť kryptosporídiovej infekcii. Zo 17 ciciakov bol u 4 detegovaný druh *C. muris*. U odstavčiat (32) bol identifikovaný druh *C. suis* (2) u a *C. scrofarum* (2). *C. scrofarum* bol taktiež identifikovaný aj u jednej prasnice (1/6).

Prevalencia u ošípaných je 30 - 34% s rôznym zastúpením u všetkých vekových kategórií. Celosvetovo sú opísané kryptosporídiové infekcie najčastejšie u prasiat pred odstavom a po odstave vo vekovom rozpätí 1,5 - 3 mesiace (Sanford, 1987; Maddox-Hyttel et al., 2006). U starších jedincov sa kryptosporídióza vyskytuje zriedkavejšie, vo veku 5,5 - 6 mesiacov je prevalencia ochorenia 5 - 12% (Suárez-Luengas et al., 2007). Štúdie pojednávajúce o prítomnosti kryptosporídií u starších prasiat sa rôznia, kde Xiao et al. (1994), Atwill et al. (1997), Maddox-Hyttel et al. (2006) uvádzajú úplnú absenciu tohto ochorenia. Naopak Kváč et al. (nepublikované údaje) zaznamenávajú v Českej republike v roku 2007 - 2008 viac ako 21% prevalenciu a Quilez et al. (1996) zaznamenávajú 30 - 34% prevalenciu u 2 - 6 mesačných prasiat.

Infekcie u prasiat sú primárne lokalizovaná v tenkom alebo hrubom čreve. Oocysty *C. muris* sú lokalizované v žalúdočných žľazách, v ktorých prebieha vývinový cyklus. Vítovec et al. (2006) opisuje v svojej práci podobnosť žalúdočných kryptosporídií *C. muris* a *C. andersoni* s druhom *C. suis*, ktorého oocysty sú lokalizované v žľazách lymphoglanulárneho komplexu v submukóze colonu a recta. U druhu *C. suis* často dochádza k diseminácii do ďalších častí gastrointestinálneho traktu. Okrem GIT postihujú kryptosporídie u prasiat aj príslušné orgány. *C. muris* má široké hostiteľské spektrum zahrňujúce hlavne myši a iné hlodavce, ktoré sú možným rezervoárom kryptosporídiovej infekcie a majú zoonotický potenciál. *C. muris* bol identifikovaný vo výkaloch ošípaných v Českej republike (Kvač et al., 2009a), v Číne (Chen, Huang, 2007), v prasacej hnojovici (Xiao et al., 2006) a v odpadových lagúnach zariadení pre ošípané (Jenkins et al., 2010). Kváč et al. (2012) vo svojej štúdii poukazujú na to, že infekcia druhom *C. muris* u prasiat po odstave nie je aktívna a tým táto skupina zvierat nie je vnímavá na infekciu spôsobenú týmto druhom kryptosporídií, avšak druhy *C. suis* a *C. scrofarum* sú pre prasatá po odstave vysoko patogénne, čo sme dokázali aj v našej štúdii. Infekcia ciciakov druhom *C. muris* môže poukazovať na aktívnu kryptosporídiózu tejto vekovej kategórie v dôsledku pasívnej imunity, a tým zvýšenej vnímavosti na patogény vrátane parazitárnych infekcií. Nami zistený druh *C. scrofarum* bol identifikovaný nie len u odstavčiat, ale aj u jednej z prasnic, čo koreluje s výsledkami štúdií Kváča et al. (2009) a Quileza et al. (1996). Zároveň je potrebné upriamiť pozornosť na fakt, že tento druh bol diagnostikovaný u imunokompetentného človeka (Kvač et al., 2009b), čo potvrdzuje zoonotický potenciál *C. scrofarum*. Z epidemiologického hľadiska by preto bolo žiaduce monitorovať výskyt aj tohto druhu v ľudskej populácii.

*Práca bola riešená v rámci grantových úloh VEGA č. 1/0831/12; 1/0063/13.*



## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Atwill ER, Sweitzer RA, Pereira MG, Gardner IA, Van Vuren D, Boyce WM. Prevalence of and associated risk factors for shedding *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia* cysts within feral pig populations in California. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 3946–3949.
- Hůrková LA, Modrý D. *Cryptosporidium muris* – původce žaludeční kryptosporidiózy hlodavců. *Veterinářství.* 2003; 53: 230–232.
- Chen F, Huang K. Prevalence and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* in pigs in eastern China. *Zoonoses Public Health.* 2007; 54:393–400.
- Jenkins MB, Liotta JL, Lucio-Forster A, Bowman DD. Concentrations, viability, and distribution of *Cryptosporidium* genotypes in lagoons of swine facilities in the Southern Piedmont and in coastal pain watersheds of Georgia. *Appl Environment Microbiol.* 2010 Sep; 76(17): 5757–63.
- Kvác M, Hanzlíková D, Sak B, Kvetonová D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet Parasitol.* 2009 Mar 23;160(3-4):319–22.
- Kvác M, Sak B, Hanzlíková D, Kotilová J, Kvetonová D. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitol Res.* 2009a Jan; 104(2): 425–8.
- Kvác M, Kvetonová D, Sak B, Ditrich O. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg Infect Dis.* 2009b Jun;15(6):982–3.
- Kvác M, Kestránová M, Květoňová D, Kotková M, Ortega Y, McEvoy J, Sak B. *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Exp Parasitol.* 2012 May;131(1):107–10.
- Maddox-Hyttel C, Langkjaer RB, Enemark HL, Vigre H. *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs occurrence and management associated risk factors. *Vet. Parasitol.* 2006; 141: 48–59.
- Quílez J, Sánchez-Acedo C, Clavel A, Del Cacho E, López-Bernad F. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 1996; 67: 83–88.
- Sanford SE. Enteric cryptosporidial infection in pigs: 184 cases (1981- 1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1987; 190: 695–698.
- Sotiriadou I, Leetz AS, Karanis P. Design of a new specific *Cryptosporidium* primers and optimization of PCR conditions for oocyst detection. *Proceedings of ICOPA XI, 11th International Congress of Parasitology.* 2006. Glasgow. Scotland. UK
- Suárez-Luengas L, Clavel A, Quílez J, Goñi-Cepero MP, Torres E, Sánchez-Acedo C, Del Cacho E. Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs in Zaragoza (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 2007; 148:231–5.
- Vítovec J, Hamadejová K, Landová L, Kvác M, Květoňová D, Sak B. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med. B.* 2006; 53: 239–243.
- Xiao L, Herd RP, McClure KE. Periparturient rise in the excretion of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *J. Parasitol.* 1994; 80: 55–59.
- Xiao L, Morgan UM, Limor J, Escalante A, Arrowood M, Shulaw W, Thompson RC, Fayer R, Lal AA. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65, 3386–3391.
- Xiao L, Fayer R, Ryan U, Upton SJ. *Cryptosporidium* Taxonomy: Recent Advances and Implications for Public Health. *Clin. Microb. Rev.* 2004; 17: 72–97.
- Xiao L, Moore JE, Ukoh U, Gatei W, Lowery CJ, Murphy TM, Dooley JS, Millar BC, Rooney PJ, Rao JR. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72: 4461–4463.

# ANALÝZA GENOTOXICKÉHO ÚČINKU KOMERČNÉHO PESTICÍDNEHO PRÍPRAVKU V LYMFOCYTOCH PERIFÉRNEJ KRVI HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Drážovská M., Šiviková K.

*Ústav genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

## ABSTRAKT

Pre hodnotenie potenciálneho genotoxického účinku neonikotínového insekticídu Calypso 480 SC (s aktívnou látkou tiakloprid) sme použili metódu kométového testu (SCGE) a sesterských chromatídových výmen (SCE). Lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytká sme vystavili insekticídu *in vitro* počas 24 a 48 h v koncentráciách 30, 60, 120, 240 a 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Štatisticky významné zvýšenie poškodenia DNA sme zaznamenali kométovou analýzou po 2h expozícii izolovaných lymfocytov testovanému insekticídu v rozsahu koncentrácií od 120 po 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , u oboch donorov ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ). Štatisticky významné zvýšenie SCE ( $p < 0,05$ ) sme po 24h expozícii insekticídu zistili len u donora 2 v koncentráciách 240 a 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . V najvyššej koncentrácii sme zaznamenali aj redukciu proliferačného indexu (PI). Po predĺženej (48h) expozícii lymfocytov periférnej krvi insekticídu bolo štatisticky významné zvýšenie frekvencie SCE zistené v koncentráciách 120 - 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  u oboch donorov, ktoré bolo v korelácii s redukciou PI ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ). Výsledky naznačili mierny genotoxický a cytotoxický účinok testovaného komerčného insekticídneho prípravku.

## ÚVOD

Aplikácia pesticídov je stále najakceptovateľnejší a najúčinnnejší spôsob ochrany rastlín pred škodcami (Bolognesi, 2003). Hoci pesticídy pôsobia selektívne proti niektorým organizmom (Bolognesi a Moraso, 2000), je ťažké zabezpečiť ich absolútnu selektivitu, bez nepriaznivého účinku na iné, necieľové organizmy (Holečková a kol., 2013). Komerčný prípravok Calypso 480 SC s účinnou látkou tiaklopridom, ktorý sme v našej práci testovali, patrí medzi syntetické neonikotinoidy. Keďže pôsobenie tiaklopridu spočíva v jeho agonistickom účinku na nikotínový acetylcholínový receptor, pesticíd má silné neurotoxické účinky. V našej práci sme sa zamerali na zistenie insekticídnom indukovaných jednovláknových zlomov DNA (SCGE) a frekvencií sesterských chromatídových výmen (SCE) v lymfocytoch periférnej krvi hovädzieho dobytká.

## MATERIÁL A METODIKA

Komerčný insekticídny prípravok Calypso 480 SC (účinná látka: tiakloprid;  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{S}$ ) bol rozpustený v purifikovanej vode, v koncentrácii 30, 60, 120, 240 a 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pre experimenty sme použili krv od dvoch zdravých býčkov (Slovenský strakatý dobytok; 6 mesiacov). Na kométovú analýzu sme použili lymfocyty izolované z plnej krvi pomocou separačného média Histopaque. Tie sme inkubovali v kultivačnom médiu a v posledných 2h kultivácie sme ich vystavili pôsobeniu insekticídu a pokračovali sme metódou podľa Fenga a kol. (2005). Ako pozitívnu kontrolu sme použili peroxid vodíka ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Mikrochem, SR; 300  $\mu\text{M}$ ) pre SCGE a mitomycin C (MMC, 0,4  $\mu\text{M}$ ; Sigma) pre SCE. Kultiváciu pre SCE test sme vykonali metódou podľa Šiviková a kol. (2006).

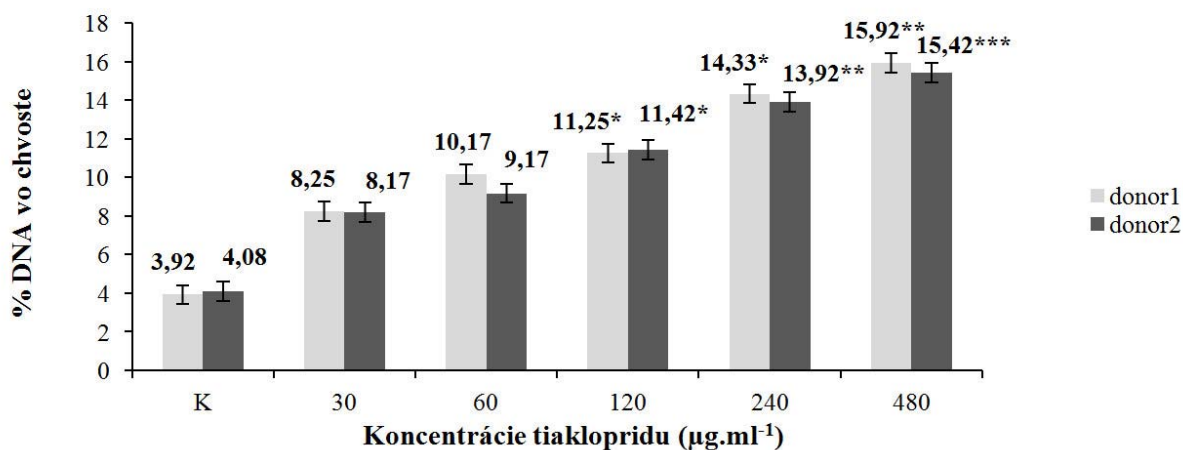
Kométy sme analyzovali fluorescenčným mikroskopom Labophot 2A; 100 komét z každej skupiny sme na základe vizuálneho hodnotenia zaradili do 5 kategórií (0,1,2,3,4; 0 – nulový stupeň poškodenia, 4 – maximálne poškodenie). Pre SCE sme od každého donora a z každej koncentrácie vyhodnotili 50 diferenciallyne ofarbených metafáz; pre určenie  $\text{M}_1$ ,  $\text{M}_2$  a  $\text{M}_3$  fázy mitotického delenia sme analyzovali 100 metafáz. Pre štatistickú analýzu výsledkov sme použili jednoduchú analýzu rozptylu (ANOVA). Následne sme frekvencie výskytu SCE

a stupňa DNA poškodenia medzi kontrolou a testovanými skupinami použili Studentov t-test, pre odhad redukcie PI bol adekvátny  $\chi^2$  – test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po 2h expozícii izolovaných lymfocytov (graf 1) sme kométovou analýzou pozorovali u oboch donorov štatisticky významné zvýšenie poškodenia DNA v rozsahu koncentrácií od 120 po 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

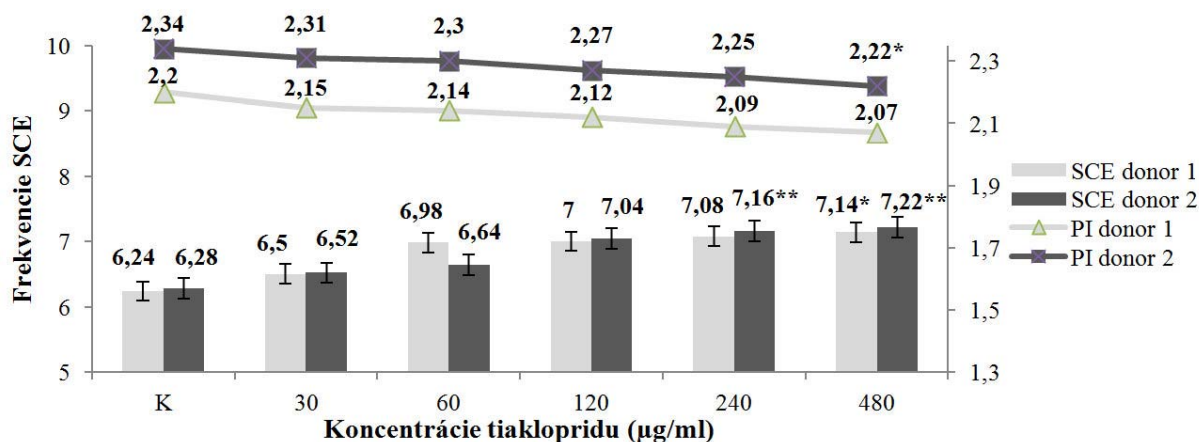
Graf 1, % DNA vo chvoste (% poškodenia DNA) po 2h aplikácii tiaklopridu v lymfocytoch periférnej krvi hovädzieho dobytká.



\* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ ); \*\*\* ( $p < 0,001$ ) – štatisticky významné hodnoty

Po 24h expozícii lymfocytov periférnej krvi býčkov tiaklopridu sme pozorovali mierne štatisticky významné zvýšenie SCE len u donora 2 v koncentráciách 240 a 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ), s redukciou proliferácie (PI) v najvyššej koncentrácii (graf 2). Po predĺženej (48h) expozícii pesticídu sme zistili štatisticky významné zvýšenie frekvencií SCE v koncentráciách od 120 po 480  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a redukciiu PI ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) u oboch donorov. (Graf 3).

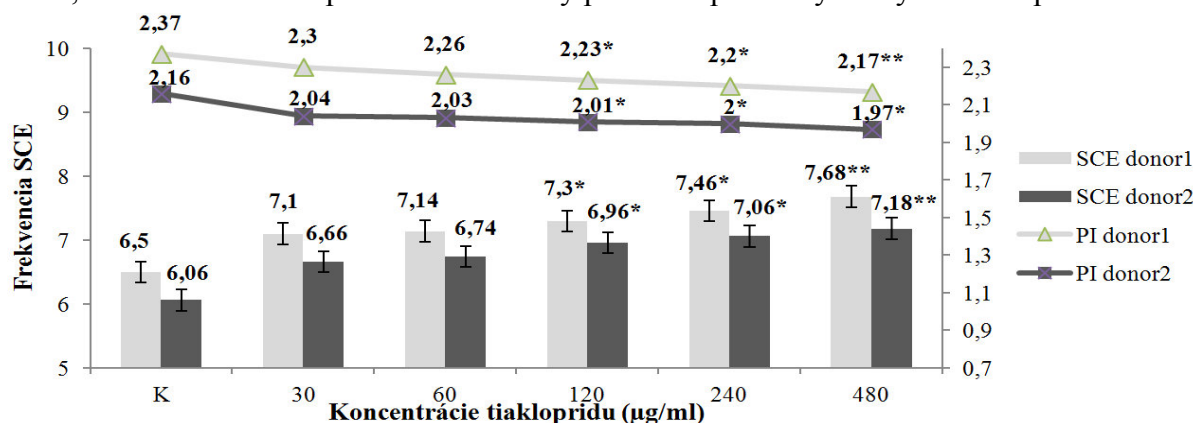
Graf 2, Frekvencia SCE a proliferačné indexy po 24h expozícii lymfocytov tiaklopridu.



\* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) – štatisticky významné hodnoty

Hoci je tiakloprid jeden z najčastejšie používaných neonikotínových insekticidov, informácií o jeho genotoxickom a cytotoxickom účinku je pomerne málo. Genotoxický účinok komerčného prípravku Calypso na humánne lymfocyty periférnej krvi opísali Calderón-Segura a kol. (2012) pomocou kométovej analýzy. Kocaman a kol. (2012) zase na základe štatistiky významného zvýšenia chromozómových aberácií a frekvencií SCE dokumentovali výrazný genotoxický účinok čistého tiaklopridu (cca 100% čistoty) v humánnych lymfocytoch periférnej krvi *in vitro*. Autori tiež pozorovali štatisticky významnú inhibíciu PI, ktorá odzrkadľuje cytotoxicitu tiaklopridu. Výsledky našej práce naznačili mierny genotoxický a cytotoxický účinok insekticídneho prípravku Calypso 480 SC. Podobne mierny genotoxický účinok, zistili autori Şekeroğlu a kol. (2011) po expozícii buniek kostnej drene potkanov prípravku tiaklopridu *in vivo*.

Graf 3, Frekvencia SCE a proliferačné indexy po 48h expozícii lymfocytov tiaklopridu.



\* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) – štatisticky významné hodnoty

Táto práca bola podporená projektom VEGA MŠVVaŠ SR č.1/0117/13.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bolognesi, C., Morasso, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. Trends Food Sci Tech. 2000; 11: 182-187.
- Bolognesi, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. Mutat Res. 2003; 543: 251-272.
- Calderón-Segura a kol. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed *in vitro* to neonicotinoid insecticides news. J Toxicol, 2012; DOI 10.1155/2012/612647
- Feng, S. et al. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes *in vitro* with comet assay and cytogenetic tests. Ecotox Environ Safe. 2005; 61: 239-246.
- Holečková, B. et al. Effect of triazole pesticide formulation on bovine culture cells. J Environ Sci Health [B]. 2013; 48: 1080-1088.
- Kocaman A. Y. et al. *In vitro* investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. Environ. Toxicol. 2012; DOI 10.1002/tox.21790
- Šiviková, K., Dianovský, J. Cytogenetic effect of technical glyphosate on cultivated bovine peripheral lymphocytes. Int J Hyg Environ Health. 2006; 209: 15-20.
- Şekeroğlu, V. et al. Cytogenetic effects of commercial formulations of deltamethrin and/or thiacloprid on wistar rat bone marrow cells. Environ Toxicol. 2011; in press, DOI 10.1002/tox.20746.

# VPLYV FEROCÉNOV NA REAKTÍVNE KYSLÍKOVÉ A DUSÍKOVÉ ČASTICE

R. Džurinová, D. Žatko, A. Fejerčáková

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

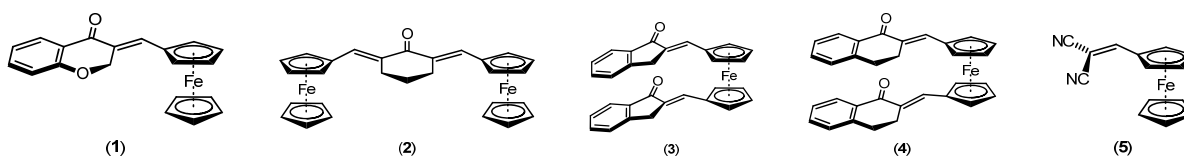
## ABSTRAKT

Ferocény sú redoxne aktívne látky a tieto ich vlastnosti sú využívané vo forme liečiv. Skúmali sme aktivita piatich ferocenylových zlúčenín voči reaktívnym časticiam kyslíka (superoxidový a hydroxylový radikál) a dusíka (NO a peroxyinitrit). Všetky testované zlúčeniny v oboch koncentráciách preukázali významnú schopnosť vychytávať NO a  $\bullet\text{OH}$ . Schopnosť vychytávať  $\text{ONOO}^-$  aj  $\text{O}_2^{\bullet-}$  bola nízka a v niektorých prípadoch dokonca zvyšovala množstvo týchto látok.

## ÚVOD

Voľné radikály sú vysoko reaktívne častice s jedným nespáreným elektrónom. Rýchlo reagujú s inými časticami, pričom im odovzdajú tento nespárený elektrón, alebo prijmu jeden elektrón z inej častice. Tým sa z nich stávajú ďalšie radikály (Vašková a kol., 2012). Môžu však poškodzovať DNA, proteíny a lipidy, čo vedie k vzniku onkologických ochorení, ateroskleróze, či autoimunitným ochoreniam. Poškodenie DNA v zárodočných bunkách môže spôsobovať dedičné mutácie, poškodenie DNA v somatických bunkách môže spôsobovať nádorové bujnenie. Chemické modifikácie aminokyselín v proteínoch vedú k ich rozpoznávaniu ako telu cudzím. Ferocény patria k organokovovým bis(cyklopentadienyl)ovým zlúčeninám s iónom  $\text{Fe}^{2+}$  v sendvičovej štruktúre, ktorý tvorí asi 30 % ich celkovej molekulovej hmotnosti. Vďaka štruktúre sa prejavujú ako donory elektrónu a podliehajú oxidácii. Sú aj zdrojmi reaktívnych kyslíkových častíc, čo ovplyvňuje alebo aj zvyšuje ich biologickú aktivitu (Matei a kol., 2014). V posledných rokoch sú vytvárané nové zlúčeniny so zabudovaným skeletom ferocénu kvôli ich ľahkej chemickej modifikácii, malej veľkosti, relatívnej lipofilite a stabilite vo vodných a aeróbných médiách. Sú súčasťou niektorých liečiv, ako napríklad antibiotík (penicilín a cefalosporíny) alebo liečiv s protinádorovým účinkom (tamoxifén) (Anjo a kol., 2014).

## MATERIÁL A METÓDY

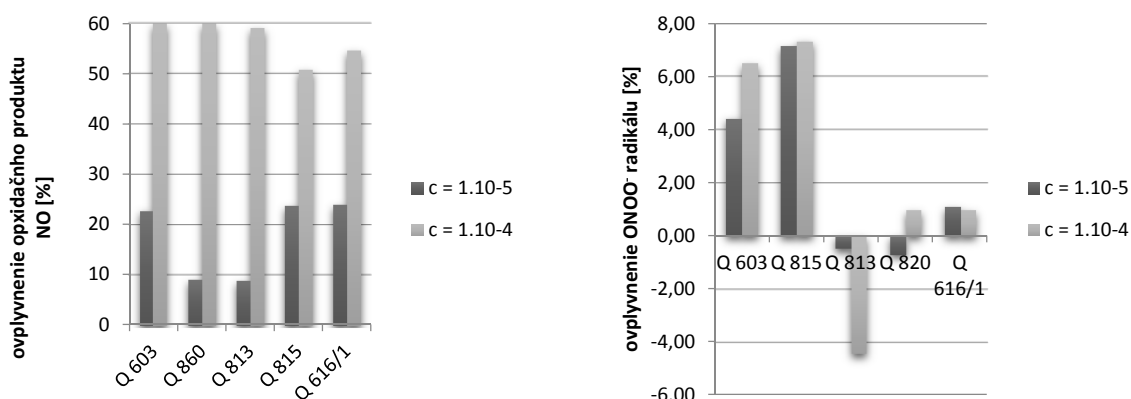


Testovaných bolo 5 ferocenylových zlúčenín, ktoré sme získali od prof. P. Perjésiho (Univerzita v Pécs, Maďarsko): **Q603** (*E*)-3-(ferocenylmetylidén)chromanón (1), **Q616/1** (*2E,6E*)-2,6bis(ferocenylmetylidén)cyklohexanón (2), **Q813** 1,1'-bis[(1-oxoindan-2-ylidén)metyl]ferocén (3), **Q815** 1,1'-bis[(1-oxotetralín-2-ylidén)metyl]ferocén (4) a **Q820** 2-(ferocenylmetylidén)malónidinitril (5). NO bol stanovený nepriamo. Nitroprusid sodný pri fyziologickom pH produkuje NO, ktorý reaguje s kyslíkom za vzniku dusitanov v Griessovej reakcii (Beda a Nedospasov, 2005). Sledovali sme absorbanciu chromoforu vzniknutého diazotáciou sulfanilamidom a následnej kopulácia vzniknutej diazóniovej soli s kopulačným činidlom *N*-(1-naftyl)etyléndiamín dihydrochloridom pri 546 nm. Nitroperoxylový anión ( $\text{ONOO}^-$ ) bol vytvorený zmesou roztokov  $\text{H}_2\text{O}_2$  v HCl,  $\text{NaNO}_2$  a NaOH. Táto zmes roztokov bola počas noci vymrazená pri  $-20^\circ\text{C}$ . Absorbancia bola meraná pri 302 nm (Beckman a kol., 1990). Hydroxylový radikál ( $\text{HO}^\bullet$ ) bol generovaný vo Fentonovej reakcii a schopnosť jeho

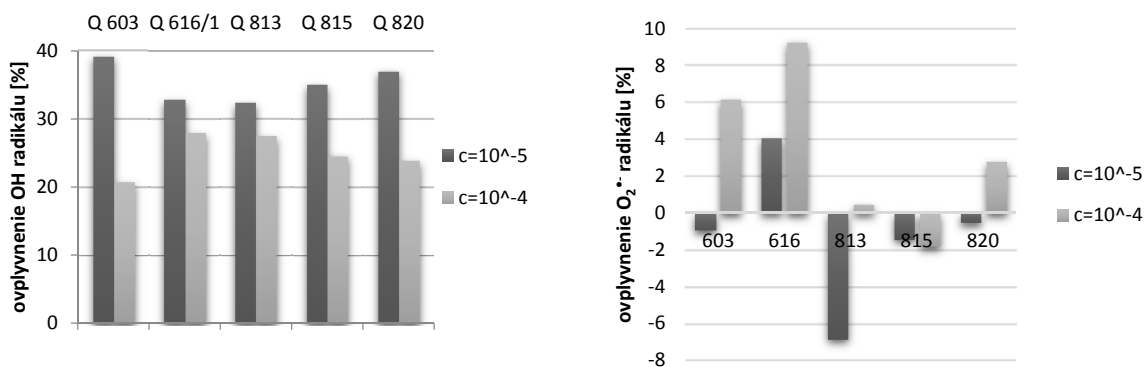
vychytávania bola meraná deoxyribózovou metódou podľa Halliwella a kol. (1987) pri 532 nm. Superoxidový aniónový radikál ( $O_2^{\cdot-}$ ) bol tvorený autooxidáciou pyrogalolu v alkalickom prostredí. Vznikol purpurogalín, ktorý bol detekovaný spektrofotometricky pri 325 nm, pričom pokles v absorbancii znamená zvýšenú inhibíciu superoxidu (Xican, 2012). Merania boli uskutočnené trikrát pre koncentrácie vzoriek  $1.10^{-5}$  a  $1.10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Testované zlúčeniny ferocénov preukázali účinnosť k premene NO na dusitany v rozsahu od 8,85 % pre Q 813 do 23,99 % pre Q616/2 pri koncentrácii vzoriek  $1.10^{-5}$  mol.dm<sup>-3</sup>. Tieto zlúčeniny však preukázali vyššiu aktivitu pri koncentrácii  $1.10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>, ktorá dosahovala až k 60 % pre zlúčeniny Q815 a Q820. Schopnosť ferocénov vychytávať ONOO<sup>-</sup> bola nízka, zlúčenina Q815 len 7,3 % pri koncentrácii  $1.10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup> a 7,2 % pri nižšej koncentrácii.



Zlúčeniny Q813 a Q820 pri nižšej koncentrácii a zlúčenina Q813 pri vyššej koncentrácii spôsobili, že došlo naopak k zvýšeniu množstva ONOO<sup>-</sup>. Všetky testované deriváty ferocénu vykázali značnú schopnosť vychytávať a zneškodňovať hydroxylový radikál od 20% pre zlúčeninu Q603 pri vyššej koncentrácii, až po takmer 40% pre ten istý derivát pri nižšej koncentrácii), pričom vyššiu účinnosť sme zaznamenali vo všetkých prípadoch pri nižšej testovanej koncentrácii.



Voči  $O_2^{\cdot-}$  preukázali testované látky len zanedbateľnú schopnosť. Maximálne zníženie jeho koncentrácie, 9%, vykazovala látka Q616 pri vyššej koncentrácii, pričom zlúčeniny Q603, Q813, Q 815 a Q820 dokonca spôsobovali zvýšenie množstva superoxidu v reakčnej zmesi (maximálne 7% derivát Q813 pri nižšej koncentrácii). Zistené schopnosti vybraných derivátov

voči reaktívnym časticiam kyslíka a dusíka môžu poskytnúť vysvetlenie mechanizmu ich účinkov pozorovaných na nádorových bunkových líniách *in vitro* (Mojžišová, Vašková, 2012).

Preukázali sme schopnosť zlúčenín Q603, Q815, Q616/1 pri nižšej koncentrácii a všetkých zlúčenín pri vyššej koncentrácii premieňať NO na dusitany a tiež schopnosť všetkých testovaných derivátov ferocénu vychytávať  $\cdot\text{OH}$ , pričom vyššia účinnosť bola pozorovaná pri nižšej použitej koncentrácii. Schopnosť vychytávať  $\text{ONOO}^-$  ako aj  $\text{O}_2^{\cdot-}$  bola pre všetky zlúčeniny pri oboch sledovaných koncentráciách nízka.

*Štúdia bola uskutočnené vďaka grantom VEGA 1/1236/12 a 1/0751/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Anjo, C. et al. Synthesis of ferrocene derivatives functionalized with  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -butyrolactone rings. *J. Organomet. Chem.* 2014, 760, 13-23.
- Beckman, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87, 1620-1624.
- Beda, N. – Nedospasov, A. A spectrometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide Biol. Ch.* 2005, 13. p. 93-97.
- Halliwell, B. et al. The deoxyribose method: A simple „test tube“ assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 1987, 165, 215-219.
- Matei, A. et al. Ferrocene, an old molecule with a bright future: Thin films grown by matrix-assisted pulsed laser evaporation for nonlinear optical applications. *J. Organomet. Chem.* 2014, 751, 638-643.
- Mojžišová, G. – Vašková, J. Cytotoxický účinok organokovových komplexov železa. *Acta Chemotherapeutica*, 2012, 21, 94-98.
- Vašková, J. et al. Oxidative Processes and Antioxidative Metaloenzymes, Antioxidant Enzyme, Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), InTech, 2012, 19-40.
- Xican, L. Improved Pyrogallol Autoxidation Method: A Reliable and Cheap Superoxide-Scavenging Assay Suitable for All Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60. p. 6418-6424.

## KVALITA VODNÉHO PROSTREDIA PRE CHOV LOSOSOVITÝCH RÝB

Fečkaninová A.<sup>1</sup>, Popelka P.<sup>1</sup>, Sasáková N.<sup>2</sup>, Veszelits Laktičová, K.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>*Katedra životného prostredia, veterinárskej legislatívy a ekonomiky, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

Kvalita vody hrá veľmi dôležitú úlohu v živote rýb. Je rozhodujúcim faktorom tak pre zdravie rýb, ako aj pre produkciu kvalitných rýb a taktiež má priamy vplyv na rozmnožovanie rýb. Cieľom tejto práce bolo porovnať kvalitu vody zo štyroch odberných miest v rybochovnom zariadení pre chov pstruha dúhového a súčasne porovnať kvalitu vody v jednotlivých odberných miestach vo všetkých ročných obdobiach. Porovnanie sa vykonalo za účelom posúdenia mikrobiálnej kontaminácie a fyzikálno-chemických parametrov vody vplyvom intenzívneho chovu pstruha dúhového. Porovnaním mikrobiologických parametrov vyšetrenia vody z jednotlivých odberných miest môžeme konštatovať, že najvyššia miera mikrobiálnej kontaminácie bola na odtoku zo žľabu, respektíve v chovnom žľabe. Porovnaním vybraných fyzikálno-chemických parametrov boli najväčšie rozdiely medzi odbernými miestami zaznamenané v jarnom období v hodnotách  $CHSK_{Mn}$  na odtoku zo žľabu. Množstvo rozpustných látok bolo podobne ako  $CHSK_{Mn}$  najvyššie v chovnom žľabe a na odtoku zo žľabu. Porovnaním mikrobiologických parametrov vyšetrenia vody vo všetkých odberných miestach v jednotlivých ročných obdobiach môžeme konštatovať, že najvyššia miera mikrobiálnej kontaminácie bola v letnom a jesennom období. Najnižšie počty uvedených baktérií boli v jarnom období, respektíve v zimnom období. Porovnaním vybraných fyzikálno-chemických parametrov vyšetrenia vody (pH,  $NO_3^-$  a  $CHSK_{Mn}$ ) vo všetkých odberných miestach v jednotlivých ročných obdobiach môžeme konštatovať, že najvyššia hodnota dusičnanov bola zistená v zimnom období a najvyššia  $CHSK_{Mn}$  bola nameraná v jarnom období v porovnaní so všetkými ostatnými ročnými obdobiami. Tieto zistenia sa potvrdili aj stanovením množstva nerozpustných látok, ktoré bolo najvyššie v jarnom období. Nasýtenie kyslíkom bolo podobné počas celého roka.

### ÚVOD

Životným prostredím rýb je voda (Le Francois a kol., 2010). Kvalita a množstvo zdroja vody, použitej k napájaniu chovateľských zariadení pre lososovité ryby, zásadným spôsobom ovplyvňuje ich produkčnú kapacitu, technologické postupy a vybavenie potrebné pre udržanie priaznivých podmienok prostredia pre chované ryby, a tým aj ekonomiku chovu (Kouřil a kol., 2008). Pre intenzívnu produkciu rýb v špeciálnych zariadeniach je potrebné zaistiť optimálne podmienky pre vývoj a rast rýb. Dôležité sú hlavne fyzikálno-chemické parametre vody. Jednotlivé faktory prostredia pôsobia na ryby nielen samostatne, ale významne sa aj dopĺňajú (Pokorný a kol., 2003).

### MATERIÁL A METODIKA

V rybochovnom zariadení Diviaky spoločnosti Rybárstvo Požehy s.r.o. boli v jednotlivých ročných obdobiach (jar, leto, jeseň, zima) odobraté vzorky vody zo 4 odberných miest (vzorka č. 1 Rakšiansky potok, vzorka č. 2 akumulčná nádrž, vzorka č. 3 chovný žľab, a vzorka č. 4 výtok vody z chovného žľabu). Vzorky vody boli vyšetrené v súlade s legislatívnymi požiadavkami na fyzikálno-chemické a mikrobiologické ukazovatele povrchových vôd.

#### *Fyzikálne vyšetrenie vody*

Vzorky vody boli posudzované senzorycky pri ich odbere a následne po ich dopravení do laboratória. Zisťovaná bola farba, zákal, pach a chuť. Teplota bola meraná pri odbere vzoriek.



Hodnoty koncentrácie vodíkových iónov boli merané pH-metrom firmy HACH podľa STN ISO 10523.

#### *Chemické vyšetrenie vody*

V odobraných vzorkách bol vykonaný rozbor kvalitatívny a následne kvantitatívny. Stanovená bola kvalitatívna prítomnosť vybraných parametrov: amónne ióny, dusitany, dusičnany, chloridy, železo, fosforečnany a voľný chlór. Kvantitatívne stanovenie vybraných parametrov bolo vykonané len v tých vzorkách, v ktorých kvalitatívna skúška indikovala ich prítomnosť. Vykonané bolo vyšetrenie parametrov, ktorých prekročenie limitných hodnôt môže ovplyvniť zdravotný stav ľudí, ako sú  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$ , ióny vápnika a horčíka, tvrdosť vody a nasýtenie kyslíkom.

#### *Mikrobiologické vyšetrenie vody*

Stanovili sa počty kultivovateľných mikroorganizmov pri 22 °C (KM22) a počty kultivovateľných mikroorganizmov pri 37 °C (KM37) podľa STN EN ISO 6222 zalievacou metódou v objeme 100 ml; počty koliformných baktérií a *Escherichia coli* podľa STN ISO 9308-1 metódou membránovej filtrácie; počty fekálnych streptokokov podľa STN ISO 9308-1 metódou membránovej filtrácie.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Porovnaním mikrobiologických parametrov vyšetrenia vody v jednotlivých odberných miestach môžeme konštatovať, že najvyššia miera mikrobiálnej kontaminácie mezofilnými baktériami bola na odtoku zo žľabu, respektíve v chovnom žľabe. Vyšší počet baktérií v týchto odberných miestach súvisí pravdepodobne s chovom pstruha dúhového, jeho kŕmením a produkciou exkrementov. Koliformné baktérie sa v najvyšších počtoch vyskytovali na jar v zdroji vody – Rakšiansky potok, v letnom období aj v chovnom žľabe.

Porovnaním vybraných fyzikálno-chemických parametrov boli najväčšie rozdiely medzi odbernými miestami zaznamenané v jarom období v hodnotách  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  na odtoku zo žľabu. Vyššie hodnoty  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  na odtoku súvisia pravdepodobne s produkciou exkrementov a následným organickým znečistením vody v chovnom žľabe. Množstvo rozpustných látok bolo podobne ako  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  najvyššie v chovnom žľabe a na odtoku zo žľabu.

Koncentrácia amóniových iónov v našej práci bola po celú dobu sledovania kvality vody v rybochovnom zariadení nižšia ako 0,2 mg.l<sup>-1</sup>. Pre sladkovodné lososovité ryby je rozsah bezpečnej úrovne  $\text{NH}_3$  veľký, a to 0,002 až 0,025 mg.l<sup>-1</sup> (Neori a kol., 2004; Colt, 2006; Crab a kol., 2007). Pre lososovité ryby predstavuje koncentrácia  $\text{NO}_2^-$  prah toxicity zvyčajne okolo 0,2 - 0,3 mg.l<sup>-1</sup>; a niekedy nižšie ako 0,1 mg.l<sup>-1</sup> (Fivelstad a kol., 1993). Kombinácia faktorov kvality vody, ako prítomnosť rozpusteného kyslíka (Foss, Røsnes, Øiestad, 2003), obsah dusitanov (Lemarie a kol., 2004), oxidu uhličitého (Randall a Wright, 1989) a amoniaku, môže spôsobovať zdravotné problémy rýb.

Porovnaním mikrobiologických parametrov vyšetrenia vody vo všetkých odberných miestach v jednotlivých ročných obdobiach môžeme konštatovať, že najvyššia miera mikrobiálnej kontaminácie mezofilnými, koliformnými a fekálnymi baktériami, bola v letnom a jesennom období. Najnižšie počty uvedených baktérií boli v jarom období, respektíve v zimnom období, čo súvisí predovšetkým s nižšou teplotou vody v týchto ročných obdobiach.

Porovnaním vybraných fyzikálno-chemických parametrov vyšetrenia vody (pH,  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$ ) vo všetkých odberných miestach v jednotlivých ročných obdobiach môžeme konštatovať, že najvyššia hodnota dusičnanov bola zistená v zimnom období a najvyššia  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  bola nameraná v jarom období v porovnaní so všetkými ostatnými ročnými obdobiami. Vyššie hodnoty  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  súvisia predovšetkým so spôsobom chovu pstruha dúhového, kedy sa síce v zimnom období znižuje intenzita kŕmenia, ale súčasne sa nevykonáva pravidelné odkalovanie chovných žľabov a výkaly, ktoré sa na dne hromadia

spôsobujú zvýšené organické znečistenie. Taktiež samočistiaca schopnosť zdroja vody a akumulačnej nádrže je z dôvodu nepriaznivých klimatických podmienok (nízke teploty a zamrzanie vodnej plochy) horšia ako v letnom a jesennom období. Tieto zistenia sa potvrdili aj stanovením množstva nerozpustných látok, ktoré bolo najvyššie v jarnom období. Nasýtenie kyslíkom bolo podobné počas celého roka. Nárast koncentrácie celkových nerozpustných pevných látok môže nastať v dôsledku čistenia alebo rybolovnej činnosti na farme. Čistenie obehovej dráhy alebo výlov rýb by mohol vytvoriť významné množstvo znečisťujúcich látok a zaťaženie pre pritekajúcu vodu (Dumas a Bergheim, 2001).

*Práca bola spracovaná s podporou grantu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA 1/0067/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Colt J. Water quality requirements for reuse systems. *Aquacultural Engineering*. 2006; 34:143-56.
- Crab R a kol. Nitrogen removal techniques in aquaculture for sustainable production. *Aquaculture*. 2007; 270:1-14.
- Dumas A, Bergheim A. Effluent treatment facilities and methods in fish farming: A review. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*. 2001; 100:33-8.
- Fivelstad S a kol. Sublethal effects of ammonia in soft water on Atlantic salmon smolts at a low temperature. *Aquaculture International*. 1993; 1:157-69.
- Foss A, Røsnes A B, Øiestad V. Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture*. 2003; 220:607-17.
- Jobling M, Carter C. *Finfish Aquaculture Diversification*. Wallingford: CABI, 2010; 681. ISBN 978-1-84593-494-1.
- Kouřil J a kol. Chov lososovitých druhů ryb, lipana a síhů. 1. vyd. Vodňany: VÚRH JU, 2008; 141. ISBN 978-80-85887-80-8.
- Lemarié G a kol. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*. 2004; 229:479-491.
- Neori A a kol. Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*. 2004; 231:361-391.
- Pokorný J. a kol. *Pstruhařství*. 3. vyd. Praha: Informatorium, 2003; 284. ISBN 80-7333-022-9.
- Randall D J, Wright P A. The interaction between carbon dioxide and ammonia excretion and water pH in fish. *Canadian Journal of Zoology*. 1989; 67:2936-2942.

## ANTIOXIDAČNÝ EFEKT RASTLINNÝCH EXTRAKTOV V PODMIENKACH *IN VITRO*

Fejerčáková A., Vašková J., Vaško L.

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

### ABSTRAKT

V práci sme skúmali vplyv rozličných koncentrácií rastlinných extraktov (0,05 %, 0,1 %, 0,2 %) z repíka lekárskeho, červeného hrozna a horca žltého na aktivitu SOD, GPx, GR a hladín GSH v krvnej plazme a izolovaných mitochondriách z pečene, obličiek a srdca v *in vitro* experimente. Z *in vitro* testovania rozličných koncentrácií extraktov na izolovaných mitochondriách hepatocytov, nefrocytov, kardiomyocytov a v krvnej plazme kurčiat hybrida COBB 500 vyplýva, že príliš vysoká koncentrácia prírodných antioxidantov môže zasiahnuť do oxido-redukčných vzťahov aj negatívne, a to najmä v dôsledku zmien v aktivite sledovaných enzýmov, ktoré vplývajú na endogénnu produkciu peroxidov.

### ÚVOD

Ochrana buniek, tkanív a biologických makromolekúl voči reaktívnym formám kyslíka a dusíka (RONS) má nesmierny význam pre živé organizmy. RONS tvorené v nadmernom množstve sú schopné vďaka svojej vysokej reaktivite poškodzovať bunkové štruktúry, preto je ich tvorba veľmi prísne regulovaná. Ochrana pred ich pôsobením zabezpečujú antioxidantné obranné systémy lokalizované v rôznych bunkových štruktúrach. Ďalšou z možností, ako chrániť organizmus pred vplyvom voľných radikálov, je príjem exogénnych antioxidantov vo forme potravy (Carlsen *et al.*, 2010). Prírodné antioxidanty, v porovnaní so syntetickými, lákajú v súčasnosti čoraz viac pozornosti. Veľký význam sa kladie predovšetkým prítomným polyfenolovým zlúčeninám. Extrakty rastlín používané v medicíne a tradičnom liečiteľstve sú jedným zo zdrojov antioxidantov, ktoré sú schopné deaktivovať voľné radikály. Biologicky aktívne molekuly, ku ktorým zaraďujeme aj prírodné látky flavonoidného typu, zasahujú do biochemických procesov často neznámym mechanizmom. Preto je vhodné sledovať ich efekt na modeli živého systému na báze subcelulárnych častíc (najmä mitochondrií) s možnosťou čo najjednoduchšieho vyhodnotenia biologických a biochemických efektov týchto látok. Flavonoidy tvoria skupinu okolo 10 000 prírodne sa vyskytujúcich látok. Mnohé z nich majú širokú škálu biologických účinkov, vrátane antioxidantného efektu. Zamerali sme sa na štúdium účinku vybraných rastlinných extraktov (repík lekársky, horec žltý, červené hrozno) v izolovaných mitochondriách niektorých tkanív a orgánov prostredníctvom stanovenia aktivít antioxidantných enzýmov.

### MATERIÁL A METODIKA

Mitochondrie boli získané izoláciou z tkanív a orgánov kontrolnej skupiny kurčiat hybrida COBB 500 v počte 40 kusov, ktoré boli kŕmené kŕmnom zmesou (KZ) podľa rastovej fázy (KZ HYD 01, HYD 02, HYD 03). Experiment prebiehal na Klinike vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat UVLF Košice v súlade s etickými požiadavkami welfare a starostlivosti o zvieratá po predchádzajúcom schválení projektu Etickou komisiou a Štátnou veterinárnou správou SR. Jednodňové kurčatá boli privezené priamo od dodávateľa (Mach Hydina Budmerice s.r.o.) a umiestnené na hlbokú podstielku. Spotreba KZ a pitnej vody bola sledovaná samostatne až do konca pokusu vo veku 42 dní. Mitochondrie boli izolované metódou niekoľkonásobnej diferenciálnej centrifugácie v médiu s obsahom sacharózy, TRIS-HCl a EDTA. Centrifugáciou homogenátu pri nízkych otáčkach sa získa sediment obsahujúci bunkové jadrá, čiastočne poškodené a nepoškodené bunky a supernatant s obsahom cytoplazmatickej a mitochondriálnej frakcie. Centrifugáciou získaného supernatantu pri vyšších otáčkach získame sediment mitochondriálnej frakcie (Johnson and Lardy, 1967). V

takto získanej základnej suspenzii mitochondrií bola stanovená koncentrácia celkových bielkovín (Smith *et al.*, 1985). Aktivitu superoxid-dizmutázy (SOD) sme merali prostredníctvom SOD-Assay Kit-WST (Sigma, Fluka). Celková katalytická aktivita enzýmu glutatiónpoxidázy (GPx) bola stanovená spektrofotometricky pri 365 nm (Flohé and Gunzler, 1984). Aktivitu glutatiónereduktázy sme merali upravenou metódou pôvodne popísanou Carlbergom a Mannervikom (1986). Redukovaný glutatión (GSH) sme stanovili modifikovanou metódou podľa Floreani *et al.*, (1997) s použitím Ellmanovho činidla

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V aktivite SOD sme po aplikácii extraktu repíka lekárskeho zaznamenali v izolovaných mitochondriách všetkých tkanív rovnako ako aj v plazme zvýšené hodnoty. Navyiac v mitochondriách obličiek a v plazme sa aktivita zvyšovala s narastajúcou koncentráciou aplikovaného extraktu. SOD ako antioxidantný enzým, je zodpovedný za vychytávanie superoxidového aniónového radikálu jeho premenou na peroxid vodíka a molekulárny kyslík (Martinez-Cayuela, 1995; Ďuračková, 1998). Extrakt červeného hrozna zapríčinil pokles aktivít v izolovaných mitochondriách obličiek a v plazme oproti kontrole. V izolovaných mitochondriách srdca sme však pozorovali nárast aktivity SOD. Mierne zvýšenie bolo zistené aj v mitochondriách pečene v porovnaní s kontrolou. *In vitro* prídavok extraktu horca žltého zapríčinil nárast aktivity SOD v izolovaných mitochondriách pečene, srdca aj obličiek pri použití všetkých koncentrácií, s výnimkou izolovaných mitochondrií obličiek, kde koncentrácie 0,05 % a 0,1 % spôsobili pokles enzýmovej aktivity. Mierny pokles bol rovnako zaznamenaný aj v plazme. Najvyššie koncentrácie sa však už prejavili nárastom aktivity. V izolovaných mitochondriách srdca a pečene sme pozorovali najvyššie aktivity SOD pri 0,05 % koncentrácii extraktu horca žltého.

Prídavok extraktu repíka lekárskeho k izolovaným mitochondriám v koncentrácii 0,2 % sa prejavil nárastom aktivity GPx vo všetkých sledovaných tkanivách ako aj v plazme. 0,1 % koncentrácia spôsobila pokles aktivity GPx v mitochondriách srdca a obličiek. Takmer žiadnu zmenu sme nepozorovali v plazme v porovnaní s kontrolou. V mitochondriách pečene sme pozorovali nárast aktivity GPx, ktorý sa výrazne neodlišoval v závislosti od použitej koncentrácie, pričom rovnaký efekt bol zistený aj po aplikácii extraktu horca žltého. V srdci bol naopak pozorovaný pokles aktivity GPx po *in vitro* prídavku extraktu hrozna aj horca. V mitochondriách obličiek a v plazme bol nárast aktivity GPx koncentračne závislý. Prídavok horca žltého sa prejavil výrazným nárastom enzýmovej aktivity v mitochondriách obličiek a v plazme. GPx v organizme eliminuje peroxidy, pričom vyžaduje prítomnosť GSH, ktorý sa pri detoxikácii peroxidu vodíka alebo aj iných organických hydroperoxidov oxiduje. V katalytickom centre GPx je seleno-cysteín, ktorý môže byť modifikovaný napríklad účinkom NO (Asahi *et al.*, 1995) a ovplyvniť tak aktivitu GPx. Pokles aktivity GPx môže byť znakom schopnosti účinných látok v rastlinných extraktoch znižovať množstvo peroxidov, alebo dokonca inaktivovať samotný enzým (Horáková, 2011).

Aktivita GR bola zvýšená v mitochondriách obličiek, pričom s narastajúcou koncentráciou extraktu mala klesajúci charakter. V plazme sme rovnako pozorovali nárast aktivity GR, avšak už koncentračne závislý. V pečeni po prídavku 0,2 % a 0,05 % extraktu repíka lekárskeho bola aktivita mierne znížená. Naopak, 0,1 % koncentrácia sa prejavila nárastom aktivity GR. Celkom opačný efekt bol pozorovaný v mitochondriách srdca po *in vitro* prídavku extraktu hrozna a repíka. 0,2 % koncentrácia zvýšila aktivitu GR, 0,1 % koncentrácia spôsobila pokles. Extrakt horca žltého spôsobil nárast aktivity GR v pečeni a srdci. V obličkách sme zaznamenali nárast aktivity GR pri 0,05 % koncentrácii extraktu, napoak pri 0,1 % koncentrácii pokles aktivity GR. GR je induktívny enzým a zvýšenie endogénnej antioxidantnej kapacity účinkom rastlinných extraktov zahŕňa aj mechanizmus regulácie expresie GR (Jiang a kol., 2011). Koncentrácia 0,1 % v plazme sa neprejavila

zmenou v aktivite. 0,2 % a 0,05 % koncentrácia spôsobila približne porovnateľný pokles enzýmovej aktivity. Lima a kol., (2005) vysvetľuje tento efekt relatívne nízkou koncentráciou zlúčenín v extraktoch, ktoré zodpovedajú za ich antioxidantnú aktivitu.

Po aplikácii extraktu repíka lekárskeho *in vitro* bol zistený pokles hladín GSH v izolovaných mitochondriách pečene a srdca v porovnaní s kontrolnou skupinou. V mitochondriách srdca hladiny GSH poklesli s narastajúcou koncentráciou použitého extraktu. Pri vysokých koncentráciách rastlinných extraktov v suspenzii mitochondrií môže dochádzať k indukcii bunkovej smrti sprevádzanej vyčerpaním hladín GSH (Lima a kol., 2005). V izolovaných mitochondriách obličiek, rovnako ako aj v plazme, sme zaznamenali takmer 2- násobné zvýšenie hladín GSH v porovnaní s kontrolou. V mitochondriách obličiek sa však hladiny GSH vzájomne neodlišovali. V plazme sme zistili najvyššie hodnoty hladín GSH pri použití najnižšej koncentrácie extraktu repíka lekárskeho. Extrakt červeného hrozna spôsobil rovnako výrazný pokles hladín GSH v mitochondriách pečene a srdca, pričom v srdci poklesli hladiny s narastajúcou koncentráciou. V prípade mitochondrií pečene bol najvýraznejší pokles zaznamenaný pri koncentrácii 0,1 %. Znižovanie hladiny GSH sa pripisuje aj prítomnosti reaktívnych zložiek prítomných v rastlinných extraktoch (Liu, 2004). V izolovaných mitochondriách obličiek sme zistili signifikantný nárast hladín GSH v porovnaní s kontrolou. Obdobný efekt extraktu červeného hrozna sa prejavil aj poklesom hladín GSH v plazme. Extrakt horca žltého zapríčinil pokles hladín GSH v izolovaných mitochondriách pečene po aplikácii 0,1 % koncentrácie. Pokles bol rovnako pozorovaný aj v mitochondriách srdca pri použití koncentrácií 0,2 % a 0,1 %. Najnižšia koncentrácia však mala opačný efekt, a teda, prejavila sa nárastom hladín. Zvýšene hladiny boli následne zistené aj v izolovaných mitochondriách obličiek v porovnaní s kontrolou. Rastlinné extrakty sú schopné reagovať priamo s nukleofilnými zlúčeninami obsahujúcimi -SH skupinu (Dinkova-Kostova *et al.*, 2001), a tak zapríčiniť aj nárast hladín GSH. V plazme sme zistili nárast hladín po aplikácii 0,05 a 0,2 %, kým 0,1 % koncentrácia spôsobila mierny pokles.

*Práca vznikla za podpory grantu 18/GSD/2012 a VEGA 1/1236/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- ASAHI, M. et al. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide. Implication for cytotoxicity. In *J. Biol. Chem.*, 1995, vol. 270, p. 21035-21039.
- CARLBERG, I. – MANNERVIK, B. Reduction of 2,4,6-trini-trobenzenesulfonate by glutathione reductase and the effect of NADP on electron transfer. In *J. Biol. Chem.*, 1986, vol. 261, p. 1629-1635.
- CARLSEN, M. H. et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. In *Nutrition Journal*, 2010, vol. 9, no. 3, p. 1–11.
- DINKOVA – KOSTOVA, A. T. et al. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. In *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, vol. 98, p. 3404–3409.
- ĎURAČKOVÁ, Z. *Volné radikály a antioxidanty v medicíne*. 1.vyd. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998, 285 s. ISBN 80-88908-811-6.
- FLÓHE, L. – GUNZLER, W.A. Assays of Glutathione Peroxidase. In *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press, 1984, p. 114-121. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05015-1
- FLOREANI, M. et al. A comparison between different methods for the determination of reduced and oxidized glutathione in mammalian tissues. In *Free Radical Res.*, 1997, vol. 26, p. 449-455.
- HORÁKOVÁ, E. Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. In *Interdisciplinary Toxicol.*, 2011, vol. 4, no. 3, p. 3114-3124.
- JIANG, H. W. et al. A glutathione S-transferase regulated by light and hormones participates in the modulation of Arabidopsis seedling development. In *Plant Physiol.*, 2010, vol. 154, p. 1646–1658.
- JOHNSON, D. – LARDY, H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In *Methods Enzymol.* 1967, vol. 10, p. 94-101.
- LIMA, C.F. et al. The drinking of *Salvia officinalis* infusion liver antioxidant status in mice and rats. In *J. Ethnopharm.* 2005, vol. 97, p. 383-389.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *J. Nutr.*, 2004, 18 (4),457-465.
- MARTINEZ-CAYUELA, M. Oxygen free radicals and human disease. In *Biochemie*, 1995, vol. 77, no. 3, p. 147 – 161.
- SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. In *Anal. Biochem.* 1985, vol. 150, 76-85.

## DETEKCIA BIOCHEMICKÝCH A ŠTRUKTÚRNYCH ZMIEN POČAS STENÓZY AORTÁLNEJ CHLOPNE

Guľašová Z.<sup>1</sup>, Bilecová-Rabajdová M.<sup>1</sup>, Tomečková V.<sup>1</sup>, Veliká B.<sup>1</sup>, Komanický V.<sup>2</sup>, Artemiou P.<sup>3</sup>, Sabol F.<sup>3</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie a LABMED a.s., UPJŠ LF, Košice, <sup>2</sup>Ústav fyzikálnych vied, UPJŠ PF, Košice, <sup>3</sup>Klinika srdcovej chirurgie, VÚSCH, a.s., UPJŠ LF, Košice

### ABSTRAKT

Stenóza aortálnej chlopne predstavuje ochorenie, pri ktorom dochádza k zmene štruktúry aortálnej chlopne, ktorá sa prejaví aj zmenami v krvi pacientov s daným ochorením. Cieľom tejto práce bola detekcia patologických zmien v krvi a tkanive aortálnej chlopne pacientov s diagnostikovanou stenózou aortálnej chlopne v porovnaní so zdravými jedincami pomocou metódy fluorescenčnej spektrálnej analýzy. Štruktúrne zmeny povrchov vzoriek krvnej plazmy a séra pacientov v porovnaní so zdravými jedincami boli charakterizované metódou atómovej silovej mikroskopie.

### ÚVOD

Jedným z najbežnejších chlopňových ochorení, ktoré postihuje 2 – 3 % populácie vo veku nad 65 rokov, je stenóza aortálnej chlopne resp. zúženie aortálnej chlopne (Ngo a kol., 2012). Pri tomto ochorení aortálna chlopňa spomaľuje prietok krvi z ľavej komory do aorty, čím srdce musí vyvinúť väčšiu aktivitu, aby pretlačilo krv cez zúženú chlopňu. Kým plocha ústia zdravej aortálnej chlopne má rozmer 3 – 4 cm<sup>2</sup>, pri menšej veľkosti už hovoríme o stenóze aortálnej chlopne. Z klinického hľadiska môže ísť o ľahkú (plocha ústia nad 1,5 cm<sup>2</sup>), stredne závažnú (plocha je 1 cm<sup>2</sup> až 1,5 cm<sup>2</sup>) a závažnú formu stenózy aortálnej chlopne (plocha 1 cm<sup>2</sup> a menej) (Vahanian a kol., 2010). Zdravá aortálna chlopňa je zložená z 3 cípov, ktoré charakterizujú 3 vrstvy (*fibrosis, spongiosis ventricularis*), v ktorých sa nachádzajú chlopňové intersticiálne bunky napomáhajúce zachovať štruktúru a funkciu chlopne, ale aj zmes špecifických proteínov (kolagén, elastín, proteoglykány, glykosaminoglykány) a iných mikrofibrilárnych štruktúr (emilíny, fibrilíny) (Hinton a kol., 2011). Počas prestavby mimobunkovej hmoty, remodelácie a zmeny štruktúry tkaniva dochádza k zvýšeniu tvorby makrofágov, T-lymfocytov (Kaden a kol., 2005), matrixových metaloproteináz (Raffetto a Khalil, 2008) a anti-kalcifikujúcich proteínov, ktoré aktivujú biochemicko-metabolické deje: zápal, akumuláciu lipidov, kalcifikáciu (Mohler, 2004). Výsledkom týchto zmien je vznik stenózy aortálnej chlopne.

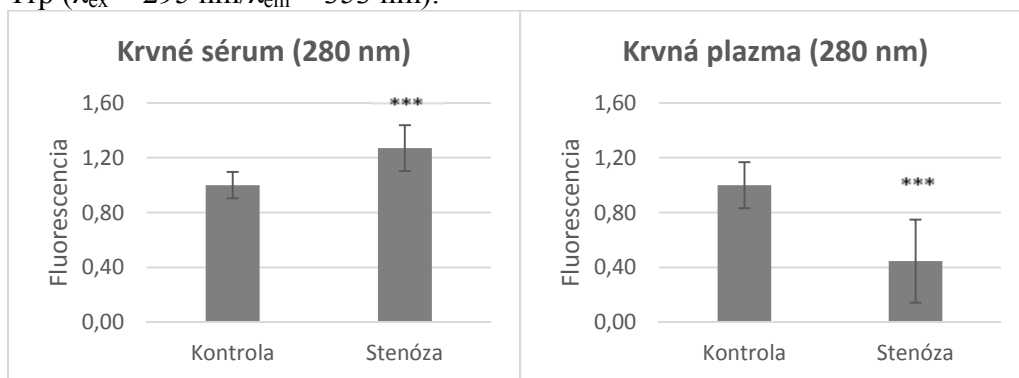
### MATERIÁL A METODIKA

Odobraté vzorky krvnej plazmy a séra (2 ml) boli centrifugované (3 minúty, 3500 otáčok) a použité na spektrálnu analýzu a na detekciu povrchov pomocou atómovej silovej mikroskopie. Jednotlivé vzorky krvného séra (1 µl), plazmy (0,5 µl) a homogenátov tkaniva (10 µl) boli riedené fosfátovým tlmivým roztokom (c = 0,2 mol/l; pH = 7,4) a boli analyzované v kremennej kyvete so šírkou 1 cm a objemom 2,5 ml, pri 25 °C pomocou synchronných fluorescenčných fingerprintov (SFF). Fluorescenčné spektrá boli merané v rozsahu vlnových dĺžok  $\lambda = 240 - 400$  nm. Jednotlivé merania boli graficky spracované do podoby vrstevnicových a trojrozmerných máp SFF pomocou softvéru WinLab. Synchronné excitačné spektrum zdravých jedincov aj pacientov obsahovalo dve maximá pri  $\lambda_{\max} = 280$  nm a  $\lambda_{\max} = 360$  nm. Tieto spektrá vznikli horizontálnym rezom SFF v bode  $\Delta\lambda = 50$  nm, v ktorom sme identifikovali najväčšie rozdiely experimentálnych vzoriek v porovnaní s kontrolnými vzorkami. Hodnoty intenzity fluorescencie kontrolných aj experimentálnych vzoriek boli štatisticky vyhodnotené Student-Newman-Keuls Multiple Comparisons testom.

Krvná plazma (5  $\mu$ l) a krvné sérum (10  $\mu$ l) pacientov a zdravých boli prenesené na povrch podložného sklíčka a následne rovnomerne rozotrené po povrchu formou krvného náteru. K analýze jednotlivých vzoriek bol použitý atómový silový mikroskop Dimension Icon®. Pomocou softvéru Scan Asyst™ bol spracovaný povrch jednotlivých vzoriek do grafickej podoby.

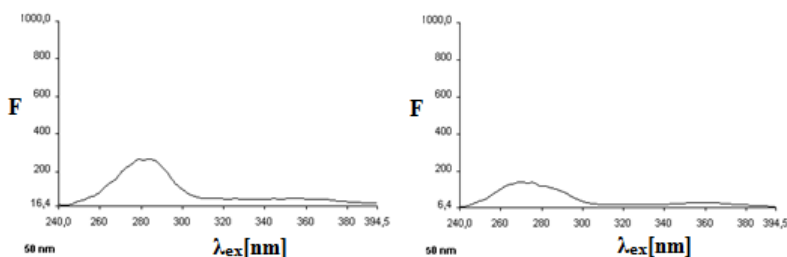
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fluorescenčná spektroskopia je metóda, ktorá slúži k detekcii a stanoveniu obsahu rôznych fluorofórov vo vzorke. Medzi endogénne fluorofóry aortálnej chlopne patria kolagén a elastín, ktoré sa prirodzene vyskytujú v jej štruktúre. Na výslednej autofluorescencii homogenátu aortálnej chlopne, krvnej plazmy a séra sa môžu podieľať aj charakteristické proteíny, koenzýmy a iné látky, ktorých množstvo sa mení u pacientov v porovnaní so zdravými jedincami. Experimentálna skupina vzoriek krvného séra pacientov so stenózou aortálnej chlopne ukázala signifikantné zvýšenie (obr. 1 vľavo) intenzity autofluorescencie v porovnaní so zdravými jedincami, kým v krvnej plazme (obr. 1 vpravo) a vzorkách homogenátov aortálnej chlopne pacientov došlo k štatisticky významnému zníženiu autofluorescencie v porovnaní so zdravými jedincami v oblasti  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm. Táto oblasť je charakteristická pre fluorofóry proteínov a aromatických aminokyselín, ktoré absorbujúce žiarenie v oblasti  $\lambda = 280$  nm. Ide predovšetkým o fenylalanín, tyrozín a tryptofán s charakteristickými excitačnými a emisnými maximami: Phe ( $\lambda_{\text{ex}} = 260$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 282$  nm), Tyr ( $\lambda_{\text{ex}} = 275$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 304$  nm), Trp ( $\lambda_{\text{ex}} = 295$  nm/ $\lambda_{\text{em}} = 353$  nm).



Obr. 1 Porovnanie autofluorescencie krvného séra a plazmy pacientov a zdravých jedincov.

Vo vzorkách krvného séra pacientov bolo detegované mierne zvýšenie autofluorescencie v oblasti  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm a vo vzorkách homogenátov aortálnej chlopne bolo pozorované zníženie autofluorescencie v porovnaní so zdravými jedincami, kým vo vzorkách krvnej plazmy pacientov s daným ochorením došlo k minimálnej zmene autofluorescencie pri  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm v porovnaní s kontrolnou skupinou. Fluorescenčné maximum umiestnené pri  $\lambda_{\text{ex}} = 350 - 360$  nm graficky predstavuje zmes rôznych fluorofórov napr. NADH+H<sup>+</sup>, elastínov, kolagénov, porfyrínov a iných fluorofórov. Signifikantné zvýšenie fluorescenčnej intenzity krvného séra pacientov so stenózou aortálnej chlopne ( $F = 652$ ) v porovnaní so zdravými jedincami ( $F = 362$ ) a štatisticky významné zníženie fluorescenčnej intenzity krvnej plazmy ( $F = 348$ ) a homogenátov ( $F = 174$ ) aortálnej chlopne (obr. 2) pacientov so stenózou aortálnej chlopne v porovnaní so zdravými jedincami ( $F = 793$  – krvné sérum,  $F = 309$  – homogenáty aortálnej chlopne) ukázali aj jednoduché synchronne spektrá s maximom umiestneným pri excitačnej vlnovej dĺžke  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm.



Obr. 2 Jednoduché synchronne fluorescenčné spektrá homogenátov aortálnej chlopne (vpravo) a zdravých jedincov (vľavo).

Metódou atómovej silovej mikroskopie bola detegovaná zvýšená drsnosť, prítomnosť fibríl, globúl a pórovitých útvarov vo vzorkách krvného séra a plazmy pacientov so stenózou aortálnej chlopne v porovnaní so zdravými jedincami.

Sledovanie biochemických a metabolických zmien v krvi a tkanive aortálnej chlopne pacientov so stenózou aortálnej chlopne metódou fluorescenčnej spektroskopie a charakterizácia štruktúrnych zmien povrchov krvnej plazmy a séra pomocou atómovej silovej mikroskopie by mohli napomôcť v ďalšom štúdiu a výskume ochorenia postihujúceho aortálnu chlopňu, stenózy aortálnej chlopne.

*Práca vznikla pri riešení projektu VEGA-1/0115/14.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hinton R B, Yutzey K E. Heart valve structure and function in development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2011; 73:29-46.
- Kaden J J, Dempfle C E, Grobholz R, Fischer C S, Vocke D C, Kilic R, Sarikoc A, Pinol A, Hagl S, Lang S, Brueckmann M, Borggreffe M. Inflammatory regulation of extracellular matrix remodeling in calcific aortic valve stenosis. *Cardiovasc Pathol.* 2005; 14:80-87.
- Mohler E R III. Mechanisms of aortic valve calcification. *Am j Cardiol.* 2004; 94:1396-1402.
- Ngo D T, Sverdlov A L, Horovotz J D. Prevention of aortic valve stenosis: A realistic therapeutic target? *Pharmacol Therapeut.* 2012; 135:78-93.
- Raffetto J D, Khalil R A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75:346-359.
- Vahanian A, Otto C M. Risk stratification of patients with aortic stenosis. *Eur Heart J.* 2010; 31:416-423.



## OVPLYVNĽOVANIE TVORBY BIOFILMOV U VYBRANÝCH LAKTOBACILOV V IN VITRO PODMIENKACH

Hádryová Jana, Slížová Magdaléna, Popper Miroslav, Nemcová Radomíra

Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice,  
[janny.hadryova@gmail.com](mailto:janny.hadryova@gmail.com)

### ABSTRAKT

Jednou z možností zvýšenia efektívnych účinkov probiotických produktov je stabilizácia probiotických baktérií v aplikačnej forme cestou tvorby biofilmu. Alginit a v ňom obsiahnuté humínové kyseliny by mohli byť využité ako skelet pre „solid state“ kultiváciu prospešných baktérií a tvorbu ich biofilmov. Cieľom našej predbežnej štúdie bolo testovanie schopnosti tvorby biofilmov za *in vitro* podmienok u laktobacilov v závislosti od typu média, substrátu, jeho koncentrácie, dĺžky inkubačnej doby a inkubačnej teploty za účelom vytypovania vhodného substrátu pre nasýtenie alginitového nosiča a kultivačných podmienok pre „solid state“ fermentáciu. Schopnosť tvorby biofilmov bola pozorovaná u *Lactobacillus reuteri* 2/6 a *Lactobacillus reuteri* 10/1 - izoláty z trusu prasiat a *Lactobacillus fermentum* 2I3, izolát z čreva hydiny. Ako kultivačné média boli použité MRS bujón, PYG bujón a modifikovaný TS bujón. Použitými substrátmi boli glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, manóza a galaktóza. Najvhodnejším médiom pre tvorbu silných biofilmov bol PYG bujón. Kmeň *L. reuteri* 2/6 tvoril silné biofilmy v prítomnosti laktózy, galaktózy a glukózy. U kmeňa *L. reuteri* 10/1 boli detegované silné biofilmy v prítomnosti laktózy a galaktózy. Kmeň *L. fermentum* 2I3 tvoril silné biofilmy v prítomnosti všetkých testovaných substrátov. Rôzne koncentrácie substrátov (1%-3%-6% a 10%) ovplyvňovali intenzitu tvorby biofilmov, avšak tento efekt bol špecifický v závislosti od použitého substrátu a kmeňa. Znížená inkubačná teplota negatívne ovplyvňovala tvorbu biofilmov u kmeňov *L. reuteri*, u kmeňa *L. fermentum* bol jej vplyv na tvorbu biofilmov zanedbateľný. Dĺžka inkubačnej doby signifikantne znižovala percento živých buniek biofilmu, avšak tento efekt bol špecifický v závislosti od použitého kmeňa a substrátu.

### ÚVOD

Vývoj nových aplikačných foriem probiotických prípravkov s využitím naturálnych látok, vyskytujúcich sa v prirodzenom prostredí, je v súčasnosti pomerne vysoko aktuálnou témou. Jednu z takýchto potencionálnych aplikačných foriem predstavuje biofilm. Výskumný zámer nášho pracoviska sa orientuje na štúdium využitia alginitu a jeho humínových extraktov na stabilizáciu prospešných mikroorganizmov pre potreby vývoja nových aplikačných foriem probiotík. Cieľom našej štúdie bolo testovanie schopnosti tvorby biofilmov u laktobacilov za *in vitro* podmienok v závislosti od typu média, substrátu a jeho koncentrácie, dĺžky inkubačnej doby a teploty, za účelom vytypovať vhodný substrát pre nasýtenie alginitového nosiča a kultivačné podmienky pre „solid state“ fermentáciu laktobacilov na spomínanom nosiči.

### MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch boli použité naše izoláty *Lactobacillus reuteri* 2/6 a 10/1 – z čreva ošípaných a *Lactobacillus fermentum* 2I3 – z čreva hydiny. Použitými kultivačnými médiami boli MRS bujón (na živiny bohaté médium), PYG bujón (jednoduché pomnožovacie médium) a modifikovaný TSB bujón obohatený o enzymaticky natrávený proteín – Bacto Proteose Peptone no.3. Ďalšími testovanými substrátmi boli cukry (glukóza, sacharóza, laktóza, fruktóza, manóza a galaktóza) o koncentracii (1- 3- 6 a 10%). Schopnosť tvorby biofilmov sme monitorovali pri inkubačnej teplote 25 °C a 37 °C a vplyv dĺžky inkubačnej doby sme testovali počas 24, 48 a 70 hodinovej inkubácie. Tvorba biofilmov bola sledovaná

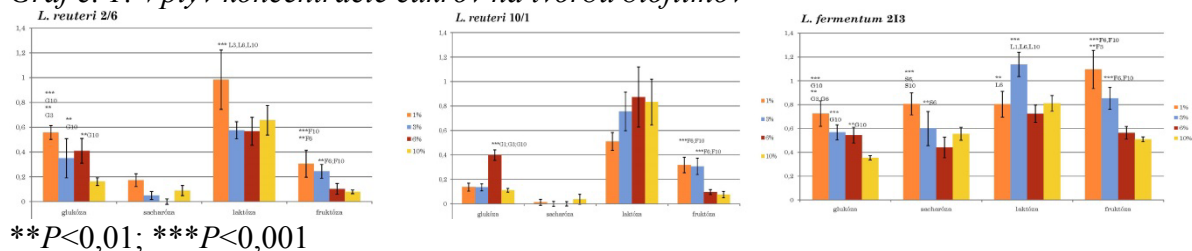
modifikovanou metódou podľa O'Toola a kol. (1999). Za tvorbu biofilmu sa považovala nameraná hodnota absorpcie ( $OD_{570nm}$ ) vyššia ako 0,1. Percento živých buniek vo vytvorenom biofilme sme po ofarbení karboxyfluoresceín diacetátom (cFDA) stanovili pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto™ (BD Biosciences, USA). Kmene boli testované najmenej v troch nezávislých experimentoch, každý s 8 opakovaniami. Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer nameraných hodnôt  $\pm$  smerodajná odchýlka.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvhodnejším kultivačným médiom pre tvorbu biofilmov spomedzi testovaných médií bol PYG bujón ( $0,95 \pm 0,08 - 2,35 \pm 0,41$ ). Podobne, Lebeer a kol. (2007) popísali závislosť tvorby biofilmov od kultivačného média ako aj ďalších environmentálnych faktorov u kmeňa *Lactobacillus rhamnosus* GG. Obmedzenie živín v použitých médiách oproti MRS médiu pravdepodobne stimulovalo tvorbu biofilmu u sledovaných laktobacilov. Extracelulárna polymérna substancia (EPS) je spoločne s bakteriálnymi bunkami v mikrokolóniách základnou stavebnou zložkou biofilmu a výrazne ovplyvňuje jeho vlastnosti (Fleming a kol., 2000). Habibi a kol. (2011) uvádzajú, že z hľadiska vyprodukovaného množstva EPS ako základnej zložky biofilmu, má na jeho tvorbu vplyv typ a koncentrácia substrátu. Na základe našich experimentov v závislosti od typu 1% cukru v PY médiu po 70 hodinovej inkubácii bolo zistené, že *L. reuteri* 2/6 tvoril biofilmy v prítomnosti všetkých testovaných cukrov. Silné biofilmy tohto kmeňa boli detegované v prítomnosti glukózy, laktózy a galaktózy. Kmeň *L. reuteri* 10/1 tvoril silné biofilmy v prítomnosti laktózy a galaktózy. Mierna tvorba biofilmov tohto kmeňa bola zaznamenaná v prítomnosti fruktózy a manózy. V prítomnosti glukózy bola tvorba biofilmov hodnotená ako nízka a v médiu so sacharózou tento kmeň biofilm netvoril. Kmeň *L. fermentum* 213 tvoril silné biofilmy v prítomnosti všetkých testovaných substrátov v PY médiu (absorbancie v rozmedzí 0,7-1,1)

Z hľadiska testovania vplyvu koncentrácie cukrov v médiu na tvorbu biofilmov po 70 hodinách bolo zistené, že v prípade *L. reuteri* 2/6 postupné zvyšovanie koncentrácie cukrov signifikantne znížilo tvorbu biofilmu ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$ ) v porovnaní s 1% koncentráciou. V prípade *L. reuteri* 10/1 zvýšenie koncentrácie laktózy na 3%, 6% a 10% nesignifikantne zvýšilo tvorbu biofilmu oproti 1% laktóze, avšak v prípade fruktózy naopak zvýšenie koncentrácie na 6% a 10% signifikantne znížilo tvorbu biofilmu ( $P < 0,01$ ) oproti jej 1% a 3% koncentrácii. V prítomnosti 1%-3% a 10% glukózy bola zaznamenaná rovnako nízka tvorba biofilmov, ktorá sa však signifikantne zvýšila ( $P < 0,001$ ) pri jej 6% koncentrácii. Postupné zvyšovanie koncentrácie glukózy, sacharózy a fruktózy malo u kmeňa *L. fermentum* 213 za následok signifikantné zníženie tvorby biofilmov ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$ ) v porovnaní s 1% koncentráciou cukrov. Signifikantne zvýšená tvorba biofilmov tohto kmeňa ( $P < 0,001$ ) bola detegovaná v prítomnosti 3% laktózy oproti 1%, 6% a 10% koncentrácii tohto cukru (Graf č.1).

Graf č. 1: Vplyv koncentrácie cukrov na tvorbu biofilmov



Vplyv inkubačnej teploty na tvorbu biofilmov u testovaných laktobacilov bol sledovaný pri 25 °C a 37 °C počas 24 hod. inkubácie v prítomnosti 1% koncentrácie glukózy, sacharózy, laktózy, fruktózy, manózy a galaktózy v PY médiu. Zníženie inkubačnej teploty na 25 °C

malo na tvorbu biofilmov u oboch kmeňov *L. reuteri* negatívny vplyv. *L. fermentum* 213 tvoril približne rovnako silné biofilmy pri 25 °C a 37 °C počas 24 hod. inkubácie v PY médiu s jednotlivými cukrami. Tvorbu biofilmu u kmeňov *L. monocytogenes* v závislosti od inkubačnej teploty popisuje aj Li (2011). Jednotlivé kmene listérií tvorili biofilmy pri rôznych inkubačných teplotách a to v závislosti od použitého kultivačného média a kmeňa.

Percento živých buniek vo vytvorených biofilmoch sme hodnotili po 24 – 48 – 70 hodinách inkubácie v PY médiu obsahujúcom 1 % koncentráciu substrátov - glukóza, laktóza a galaktóza (Tab. č. 1).

Tabuľka č. 1: Percento živých buniek vo vytvorených biofilmoch v prítomnosti glukózy, laktózy a galaktózy

Kmeň	PYG			PYL			PYGAL		
	24 h	48 h	70 h	24 h	48 h	70 h	24 h	48 h	70 h
<b>2/6</b>	69	62	< 1	85	67	67	66	68	27
<b>10/1</b>	63	52	< 10	86	73	41	52	61	14
<b>213</b>	89	46	< 0,3	93	91	< 0,3	98	20	< 0,3

(PYG-PY médium+glukóza; PYL-PY médium+laktóza; PYGAL-PY médium+galaktóza)

Na základe výsledkov tejto štúdie sme zistili, že tvorba biofilmu na abiotických povrchoch u testovaných laktobacilov závisí od použitého kultivačného média. Typ substrátu aj jeho koncentrácia signifikantne ovplyvňujú intenzitu biofilmu, pričom tento efekt je kmeňovo špecifický. Inkubačná teplota môže ovplyvňovať tvorbu biofilmu v závislosti od použitého kmeňa. Dĺžka inkubačnej doby má vplyv na percento živých buniek v biofilme, avšak tento efekt špecificky závisí od použitého kmeňa a substrátu. Získané poznatky použijeme pri výbere vhodných kultivačných podmienok pre „solid state“ fermentáciu za účelom získania biomasy s vysokou organizáciou biofilmu.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0199-11.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- [1] Flemming H.C., Wingender J.G. a Mayer C: Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. Biofilms: recent advances in their study and control. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000; 19–34.
- [2] Habibi N, Soleimanian-Zad S a Sheikh Zeinoddin M: Exopolysaccharides produced by pure culture of *Lactobacillus*, *Lactococcus* and yeast isolated from kefir grain by microtiter plate assay: Optimization and comparison. World App Sci J 2001; 12: 742-750. ISSN 1818-4952.
- [3] Lebeer S, Verhoeven T.L.A., Vélez Perea M, Vanderleyden J a De Keersmaecker S.C.J.: Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. App Environ Microbiol 2007; 73: 6768-6775.
- [4] Li J: Influence of environmental conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. All Theses. Paper 2011; 1211.
- [5] O'Toole G.A., Pratt L.A., Watnick P.I., Newman D.K., Weaver V.B. a Kotler R: Genetic approaches to study biofilms. Meth Enzymol 1999; 310: 91-109.

## MOLEKULOVÁ DIAGNOSTIKA *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. U DETÍ ZO SLOVENSKA

Hasajová A.<sup>1</sup>, Valenčáková A.<sup>1</sup>, Danišová O.<sup>1</sup>, Ondriska F.<sup>2</sup>, Halánová M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Oddelenie parazitológie, HPL spol. s.r.o., Bratislava, <sup>3</sup>Ústav verejného zdravotníctva, UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

V tejto štúdií sme sa zamerali na molekulovú diagnostiku a druhovú identifikáciu kryptosporidií vo vzorkách stolice troch imunokompetentných a dvoch imunosupresovaných detí zo Slovenska. Na základe klinických príznakov boli vzorky vyšetrené mikroskopicky (Ziehl-Neelsena), imunologicky (ELISA) a molekulovo-biologicky (Nested PCR, sekvenácia). Prítomnosť kryptosporidií sme potvrdili vo všetkých vyšetrených vzorkách stolice. Po sekvenácii sme identifikovali druhy *Cryptosporidium muris* u dvoch imunosupresovaných detí a u dvoch imunokompetentných detí a v jednej vzorke imunokompetentného dieťaťa bol diagnostikovaný druh *Cryptosporidium hominis*.

### ÚVOD

Do rodu *Cryptosporidium* zaraďujeme intracelulárne extracytoplazmatické protozoárne parazity spôsobujúce ochorenie - kryptosporidiózu. V humánnej a veterinárnej medicíne je jej venovaná čoraz väčšia pozornosť. U ľudí je táto infekcia zapríčinená prevažne druhmi *C. hominis* a *C. parvum* no identifikované boli aj ďalšie druhy infikujúce človeka: *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. muris*, *C. suis*, *C. andersoni*, *C. pestis*, *C. fayeri* a *C. ubiquitum* (Šlapeta, 2012). Patogén sa prenáša fekálne – orálnou cestou ekologicky odolným infekčnými oocystami z kontaminovaného prostredia, vody alebo kontaminovanou potravou. Kryptosporidióza u imunokompetentných jedincov je zvyčajne akútna, krátkodobá infekcia, ktorá je potlačená imunitným systémom. Avšak môže byť závažná hlavne u detí a imunosupresovaných jedincov (Chen a kol., 2002). Táto skupina hostiteľov vykazuje široké spektrum klinických príznakov, ktoré zahŕňa ťažké vodnaté hnačky, nechutenstvo, malátnosť, podvýživu a obmedzený rast (Meinhardt a kol., 1996). U osôb s poruchami imunity môžu kryptosporídie vyvolať chronické ochorenie s ťažkým, dokonca až fatálnym priebehom (O'Donoghue, 1995). V skupine detí je však prevencia vyššia, a to v dôsledku nezrelosti ich imunitného systému. Ďalej medzi rizikové skupiny pacientov patria pacienti s nádormi, pacienti po transplantácii orgánov, deti s podvýživou a cukrovkou, homosexuáli a pod. (Hunter a kol., 2004).

Diagnostika a charakterizácia druhov kryptosporidií infikujúcich ľudí je nevyhnutná a zásadná pre prevenciu, dohľad a kontrolu kryptosporidiózy na Slovensku.

### MATERIÁL A METODIKA

Vyšetřili sme celkovo 5 vzoriek detskej stolice, ktoré na naše pracovisko boli zaslané z diagnostického laboratória HPL spol.s.r.o. v Bratislave a z LF UPJŠ v Košiciach na molekulovo-biologickú identifikáciu a diferenciaciu druhov *Cryptosporidium* spp.

Na základe klinických príznakov (hnačiek, bolesti brucha a straty hmotnosti) boli vzorky stolice odobrané od 3 imunokompetentných detí a 2 imunosupresovaných detí s transplantovaným orgánom. Vzorky boli prvotne vyšetřené na vyššie menovaných laboratóriách mikroskopicky (farbenie podľa Ziehl-Neelsena) a imunologicky (metódou ELISA na dôkaz koproantigénu *Cryptosporidium* spp.) a následne boli pozitívne vzorky zaslané na naše pracovisko so žiadosťou o molekulovú diagnostiku kryptosporidií. My sme vzorky vyšetřili metódou nested PCR s použitím rodovo špecifických primerov amplifikujúcich úsek génu 18SSU rRNA vhodný ako genetický marker na diagnostiku *Cryptosporidium* spp.

Spracovanie pozostávalo z prvej izolácie DNA zo vzoriek stolice izolačným kitom DNA-sorb-B Nucleic acid Extraction kit (Amplisence) podľa priloženého manuálu. Pred samotnou izoláciou boli vzorky homogenizované pri 6500 ot./90 sek. za použitia lyzačného roztoku a sklenených a zirkónových guľičiek. Vyizolovaná DNA bola uskladnená do ďalšieho spracovania pri -20°C.

Fragment génu 18SSU rRNA bol amplifikovaný metódou nested PCR pomocou primerov VKSSR1/2 a VKSSF1/2 (Leetz a kol., 2007). Vonkajší primerový pár amplifikuje fragmenty o dĺžke 658 – 662bp a vnútorný pár primerov amplifikuje 245 – 250bp fragmenty. Zameranie sa na malú podjednotku rRNA (18SSU rRNA) je výhodné z dôvodu prítomnosti konzervatívnych regiónov s vysoko polymorfnými oblasťami génu, ktoré sa využívajú na rozlíšenie rôznych druhov alebo genotypov kryptosporídií. Hodnoty meltingových teplôt v prvej aj v druhej reakcii boli 60°C.

Amplifikované PCR produkty boli analyzované elektroforeticky na 1.5% agarózovom géli v TAE puffri ofarbenom farbičkou GelRed a pri napätí 100V za 1 hod.

Po vyhodnotení gélu boli pozitívne vzorky zaslané na sekvenáciu a výsledne sekvencie boli porovnané s homológnyimi sekvenciami v génovej banke pomocou programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto štúdií sme potvrdili prítomnosť kryptosporídií vo všetkých vyšetrených vzorkách stolice. Na základe sekvenácie a následného vyhodnotenia vzoriek programom BLAST boli determinované druhy *C. muris* u dvoch imunosuprimovaných detí a u dvoch imunokompetentných detí a v jednej vzorke imunokompetentného dieťaťa bol diagnostikovaný druh *C. hominis*.

Všetky vzorky boli odobrané a následne vyšetrené na základe prvotných klinických príznakov – hnačiek, bolestí brucha a úbytku na hmotnosti. Prítomnosť tejto infekcie bola dokázaná mikroskopicky a imunologicky v laboratóriách v Bratislave a v Košiciach a PCR metódou na našom pracovisku.

Domnievame sa, že u týchto detí, kde sa ich vek pohybuje okolo jedného roku, môže byť výskyt kryptosporídiíovej infekcie zvýšený v dôsledku ešte nedostatočne vyvinutého imunitného systému a následnej neschopnosti odolávať organizmu tejto infekcii, aj keď ide o zdravého jedinca. Riziko nákazy u imunosuprimovaných detí sa ešte viac zvyšuje. Ochorenie u imunokompetentných jedincov je najčastejšie akútne a nedochádza k prechodu na chronickú formu a trvá približne 10 dní. Potom dochádza k samovoľnému vyliečeniu (Hunter a kol., 2004). U imunosuprimovaných jedincov je ochorenie zväčša chronické a nejaví tendenciu k samovoľnému vyliečeniu. Infekcia často diseminuje do ďalších orgánov (respiračný trakt, močový mechúr, žľčovod; Current a Garcia, 1991). Rozšírenie infekcie závisí od stupňa imunodeficitu. U pacientov s transplantovanými orgánmi, ktorí sú pod dlhodobou imunosupresívnou liečbou, ako aj u pacientov s AIDS a onkologických pacientov dochádza v dôsledku hnačiek k dehydratácii až metabolickému rozvratu. Tieto komplikácie sú často príčinou smrti týchto pacientov (Hunter a Nichols, 2002).

Špecifická účinná liečba kryptosporídiózy v súčasnosti neexistuje (Volf a Horák, 2007). Uplatňuje sa však predovšetkým podporná a symptomatická liečba vedúca k zmierneniu následkov infekcie. U imunokompetentných jedincov sa aplikujú rehydratačné roztoky na zamedzenie dehydratácie. U imunodeficientných pacientov je situácia zložitejšia, a tu sa uplatňuje predovšetkým hydratacia organizmu a doplnenie elektrolytov. K zmierneniu hnačiek sa využívajú kaolín a pektín (Thompson a kol., 2005). Ďalšou možnosťou liečby kryptosporídiózy u imunodeficientných pacientov je imunoterapia a podávanie hyperimúnneho kolostra. To síce oddiali disemináciu infekcie do ďalších orgánov, ale samotné ochorenie nevylieči. Táto liečba je však finančne náročná. Paradoxne najlepšie

výsledky boli dosiahnuté u pacientov s infekciou HIV, a to v dôsledku dlhodobého podávania aktívnej kombinovanej antiretrovirálnej liečby (HAART; Zardi a kol., 2005). Zaujímavou možnosťou liečby je použitie laktobacilov pri tlmení, či dokonca pri liečbe kryptosporidiózy. Metabolity *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus reuteri* znižujú schopnosť *C. parvum* a *C. hominis* vyvolať infekciu *in vitro* (Glass a kol., 2004). Úspešná liečba kryptosporidiózy za použitia laktobacilov je opísaná autormi (Pickerd a Tuthill, 2004).

*Táto práca bola riešená za finančnej podpory z grantov: 1/0063/13, 1/0831/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Current WL, Garcia LS. Cryptosporidiosis. Clin Lab Med. 1991; 11: 873 – 897.
- Glass MD, Courtney PD, Lejeune JT, Ward LA. Effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri* cell-free supernatants on *Cryptosporidium* viability and infectivity *in vitro*. Food Microbiol. 2004; 21: 423 - 429.
- Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Raj N, Syed Q, Chalmers RM, Verlander NQ, Goodacre J. Health sequelae of human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. Clin Infect Dis. 2004; 39: 504 - 510.
- Hunter PR, Nichols G. Epidemiology and clinical features of *Cryptosporidium* infection in immunocompromised patients. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 145 – 154.
- Chen XM, Keithly JS, Paya CV, Larusso NF. Cryptosporidiosis. N Engl J Med. 2002; 346: 1723 – 1731.
- Meinhardt PL, Casemore DP, Miller KB. Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. Epidemiol Rev. 1996; 18:118 – 136.
- O'Donoghue P.J. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. Int J Parasitol. 1995; 25: 139 – 195.
- Pickerd N, Tuthill D. Resolution of cryptosporidiosis with probiotic treatment. Postgrad Med J. 2004; 80: 112 - 113.
- Šlapeta J. The name *Cryptosporidium tyzzeri* Ren, Zhao, Zhang, Ning, Jian, Wang, Lv, Wang, Arrowood and Xiao, 2012 is permanently invalid. Exp Parasitol. 2012. 130: 306 – 307.
- Thompson RC, Olson ME, Zhu G, Enomoto S, Abrahamsen MS, Hijjawi NS. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Adv Parasitol. 2005; 59: 77 - 158.
- Volf P, Horák P. Paraziti a jejich biologie. 1. vydání. Praha: Triton, 2007.
- Zardi EM, Picardi A, Afeltra A. Treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised hosts-Still an open question. Chemotherapy. 2005; 51: 193 - 196.
- Leetz AS, Sotiriadou I, Ongerth J, Karanis P. An evaluation of primers amplifying DNA targets for the detection of *Cryptosporidium* spp. using *C. parvum* HNJ-1 Japanese isolate in water samples. Parasitol Res. 2007; 101(4): 951 – 962.

# VPLYV PODÁVANIA DEPRENYLU NA POČET SPERMIÍ A NA AKTIVITU VYBRANÝCH ANTIOXIDAČNÝCH ENZÝMOV V SEMENNÍKU POTKANA

Františka Horváthová<sup>1</sup>, Viera Danielisová<sup>2</sup>, Jozef Mihalik<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav anatómie UPJŠ LF, Šrobárova 2, 041 80 Košice, <sup>2</sup>Neurobiologický ústav SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice, [frantiska.horvathova@student.upjs.sk](mailto:frantiska.horvathova@student.upjs.sk)

## ABSTRAKT

Vo vyspelých krajinách je čoraz viac neplodných mužov a mužov so zníženou plodnosťou. Tiež pribúdajú informácie o pozitívnych účinkoch antioxidantov na rôzne typy buniek. V tejto štúdií sme testovali vplyv deprenylu na aktivitu superoxiddizmutáz (SOD) a katalázy (CAT) v semenníku potkana, pretože je dokázané, že v nízkych dávkach zvyšuje hladiny antioxidačných enzýmov. Počas 30 dní bol zvieratám intraperitoneálne podávaný deprenyl v 2 koncentráciách, nízka dávka (LDD, *low dose of deprenyl*, 0,0025mg/kg na deň), vysoká dávka (HDD, *high dose of deprenyl*, 0,25mg/kg na deň) a kontrola (C, *control*, podávaný fyziologický roztok). Zistili sme, že deprenyl pozitívne ovplyvňuje hladiny antioxidačných enzýmov a zvyšuje počty spermií.

## ÚVOD

Deprenyl, známy aj ako selegilín, je propalgylamínová molekula, ktorá selektívne a ireverzibilne inhibuje monoaminoxidázu B (MAO-B). Využíva sa hlavne v terapii Parkinsonovej choroby, no jeho účinky sú mnohostranné. Redukuje produkciu peroxidu vodíka v procese metabolizmu dopamínu (Olanow a kol., 1995), udržiava integritu mitochondriálnej membrány a redukuje tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (Simon a kol., 2005). Shiva a kol. (2011) zistili závislosť medzi počtom spermií, ich motilitou a hladinou SOD v seminálnej plazme. V ich experimente zvýšené hladiny SOD sprevádzali zvýšené počty spermií. V tejto práci sme skúmali vplyv podávania deprenylu na počty spermií, na aktivitu medeno-zinkovej a mangánovej superoxiddizmutázy (CuZnSOD a MnSOD) a katalázy (CAT) v semenníku potkana.

## MATERIÁL A METÓDY

Samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 3 mesiacov boli náhodne rozdelené do troch skupín: kontrolná skupina (C), nízka dávka (LDD) a vysoká dávka (HDD). Počas 30 dní im bol intraperitoneálne podávaný deprenyl, LDD (0,0025mg/kg na deň), HDD (0,25mg/kg na deň). Kontrolnej skupine bol podávaný fyziologický roztok. Zvieratá mali stravu a vodu *ad libitum*, boli chované v štandardizovaných podmienkach za stálej teploty a pravidelnom svetelnom režime (12h/12h). Po ukončení podávania deprenylu boli usmrtené thiopentalom (40 mg/kg). Manipulácia a experiment so zvieratami bol schválený Etickou komisiou UPJŠ LF aj ŠVPS (Číslo povolenia: Ro-1757/10-221b).

### *Odber a spracovanie vzoriek*

Tkanivo semenníkov z usmrtených zvierat sa využilo na meranie aktivity SOD a CAT. Aktivita SOD bola meraná pomocou modifikovanej nepriamej spektroskopickkej inhibičnej metódy. Prostredníctvom xantín xantínoxidázy bol vo vzorke generovaný superoxid, o ktorý súťažili SOD a nitroblutetrazolium (NBT). NBT je superoxidom redukovaný na modrý formazán, ktorého absorbancia bola vyhodnotená pri 560nm. Získané údaje boli zakreslené do grafu ako inhibícia vs. proteínová koncentrácia. Hodnoty SOD enzýmov sú udávané v jednotkách na g proteínu (U/g proteín), pričom jedna jednotka je definovaná ako množstvo, ktoré redukuje absorbanciu o 50%. Aktivita CuZnSOD bola vypočítaná ako rozdiel medzi aktivitou celkovej SOD a aktivitou MnSOD tak, že aktivita CuZnSOD bola inhibovaná prídavkom 2mM kyanidu sodného. Aktivita CAT bola určená spektrofotometrickou metódou

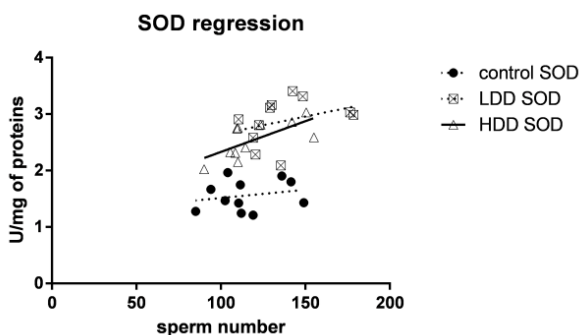
podľa Gótha. Supernatant bol inkubovaný s peroxidom vodíka (substrát). Enzymatická reakcia bola zastavená pridaním 32mM molybdát amónny. Intenzita vzniknutého žltého komplexu (molybdát amónny- peroxid vodíka) bola meraná pri 405nm. Aktivita CAT je udávaná v jednotkách U/g proteínu.

Prisemenníky po odobratí do predhriateho PBS (pH=7,2) boli prenesené do 1ml média 199 s Hanksovými soľami a Hepesom (Gibco, 12340-030). Prisemenníky boli niekoľkokrát nastrihnuté, čím sa spermie uvoľnili do roztoku. Z neho sme odobrali 50 µl a preniesli do 950 µl fixačného roztoku (riedenie 1:20). Fixačný roztok sme pripravili rozpustením 50g NaHCO<sub>3</sub> a 10ml 35% formalínu v 1000ml dH<sub>2</sub>O. Po dokonalom premiešaní sme preniesli po 10 µl pracovného roztoku so spermiami na oba konce Neubauerovej komôrky, kde sme spermie spočítali v 5 štvorcoch (V=4nl, S=0,04mm, h=0,01mm), v mriežke číslo 5. Získané hodnoty boli vynásobené faktorom riedenia 20, čím sme dostali konečný počet spermií v 10<sup>6</sup>/ml.

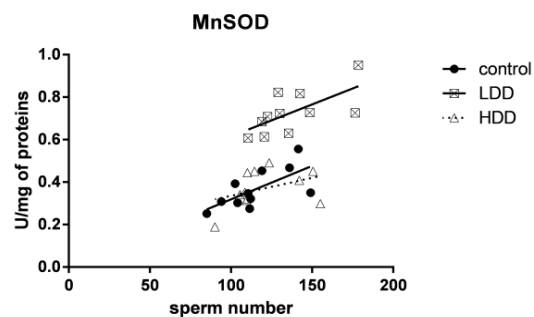
Aktivity enzýmov boli vyhodnotené pomocou Kruskal-Wallis testu. Vzájomný vzťah medzi aktivitou enzýmov a počtom spermií bol určený regresnou analýzou.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

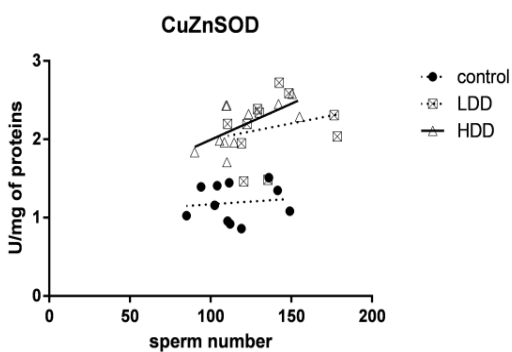
Intraperitoneálne podávanie deprenylu vyvolalo u pokusných zvierat pozitívny antioxidačný status sprevádzaný zvýšeným počtom spermií. Jednoznačne pozitívne účinky na počet spermií má nízka dávka deprenylu. V regresnej analýze sme štatisticky významnú závislosť pri MnSOD zistili v LDD(Obr.3) a pri CuZnSOD v HDD (Obr.2). To, že v regresnej analýze hodnoty celkovej SOD pri LDD(Obr.1) nenadobudli štatistickú významnosť, vysvetľujeme omnoho vyššou aktivitou CuZnSOD proteínu. Negatívny vzťah medzi počtom spermií a CAT (Obr.4) je podmienený takmer dvojnásobne vyššou aktivitou CAT oproti kontrole a minimálnym nárastom tvorby spermií.



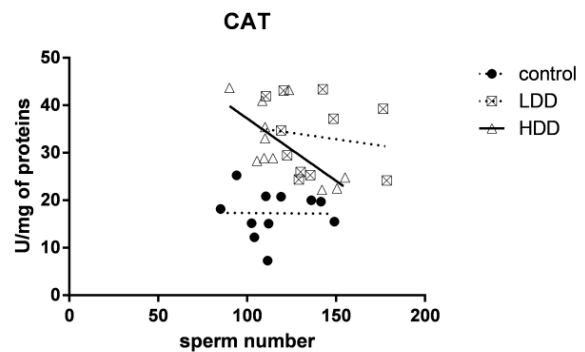
Obr. 1: Regresná analýza celkovej SOD a počtu spermií



Obr. 3: Regresná analýza MnSOD a počtu spermií



Obr. 2: Regresná analýza CuZnSOD a počtu spermií



Obr. 4: Regresná analýza CAT a počtu spermií



**Tab. 1: Hodnoty štatistickej významnosti regresnej analýzy a počtu spermií**

	SOD	CuZnSOD	MnSOD	CAT
C	0,5	0,72	0,022	0,9704
LDD	0,3	0,5	0,028	0,6533
HDD	0,02	0,03	0,23	0,0206

**Tab. 2: Priemerné hodnoty SOD, CAT a spermií v jednotlivých skupinách**

	SOD	CuZnSOD	MnSOD	CAT	počet spermií v miliónoch
C	1,56 ±0,256	1,19±0,169	0,37±0,088	17,29±4,67	115,135
LDD	2,88±0,394	2,15±0,295	0,73±0,098	33,55±6,51	137,545
HDD	2,55±0,308	2,18±0,222	0,37±0,084	32,01±6,55	119,909
Kruskal- Wallis test	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05

Je zaujímavé, že aktivita MnSOD a počet spermií boli najvyššie pri LDD (Tab.2), kde bola jej aktivita zvýšená na dvojnásobok hodnoty nameranej u kontroly. MnSOD je dôležitý mitochondriálny antioxidantný enzým. Jej zvýšená expresia redukuje chromozómovú nestabilitu (van de Wetering, 2008). Riziko zvýšenej aktivity MnSOD nastáva vtedy, ak ňou produkovaný peroxid vodíka (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nie je účinne odstránený, pretože redukuje bunkovú proliferáciu a oddŕaľuje vstup buniek do S fázy (Kim a kol., 2010). Keďže bola v LDD skupine zvýšená aj aktivita katalázy (takmer dvojnásobok), ktorá H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degraduje, nedošlo k narušeniu bunkovej fyziológie a integrity mitochondriálnej membrány (Tab.2). To naznačuje, že antioxidantný mechanizmus závislý na nadväznosti CAT po SOD v zneškodnení H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, je v rovnováhe. Tiež v spermiách, ktorých počet stúpol takmer o 20% (Tab.2), nebola zaznamenaná fragmentácia DNA (výsledky sa spracovávajú).

Podávanie deprenylu v dávke stonásobne nižšej ako sa využíva v terapii neurologických ochorení, vyvoláva pozitívny antioxidantný status a zvyšuje počty spermií. Po testovaní na ľudských dobrovoľníkoch by mohla byť táto schéma zavedená v humánnej medicíne v liečbe mužskej neplodnosti alebo v kryoprotekcii spermií.

*Práca bola čiastočne finančne podporená (30%) agentúrou Ministerstva školstva SR pre štrukturálne fondy z EÚ pre projekt CEMIO ITMS:26220120058 a čiastočne z grantov VEGA 1/0928/11 a 2/0066/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kim A, Joseph S, Khan A, Epstein CJ, Sobel R, Huang TT. Enhanced expression of mitochondrial superoxide dismutase leads to prolonged in vivo cell cycle progression and up-regulation of mitochondrial thioredoxin. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010;1501–1512.
- Olanow CW, Hauser RA, Gauger L, Malapira T, Koller W, Hubble J, Bushenbark K, Lilienfeld D, Esterlitz J.. The effect of deprenyl and levodopa on the progression of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1995;38(5):771–7.
- Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry*, 2011; 319–324.
- Simon L, Szilágyi G, Bori Z, Telek G, Magyar K, Nagy Z. Low dose (–)deprenyl is cytoprotective: it maintains mitochondrial membrane potential and eliminates oxygen radicals. *Life Sci* 2005;78(3):225–31.
- van de Wetering CI, Coleman MC, Spitz DR, Smith BJ, Knudson CM. Manganese superoxide dismutase gene dosage affects chromosomal instability and tumor onset in a mouse model of T cell lymphoma *Free Radic. Biol. Med.*, 44 (2008), pp. 1677–1686.
- Zelko IN, Stepp MW, Folz RJ. A bioluminescent transgenic mouse model: Real-time in vivo imaging of antioxidant EC-SOD gene expression and regulation by interferon gamma. *Gene*, 2013; 75-82.

# MIGRÁCIA ŽERIAVOV POPOLAVÝCH (*GRUS GRUS*)- PÔSOBIVÉ DIVADLO ALEBO POTENCIÁLNE NEBEZPEČENSTVO?

Hrehová L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, <sup>2</sup> Katedra genetiky, UPJŠ, Košice

## ABSTRAKT

Vtáky môžu predstavovať rezervoár a vektor mnohých druhov nepatogénnych, ale aj patogénnych baktérií. Z tohto hľadiska môže byť obzvlášť rizikové migrujúce vtáctvo. V našej štúdii sme sa zamerali na identifikáciu enterokokov a enterobaktérií z tráviaceho traktu žeriava popolavého (*Grus grus*) a na analýzu ich rezistencie voči vybraným antibiotikám. O enteromikroflóre žeriava popolavého nateraz neexistujú žiadne údaje.

Z faeces z troch jedincov žeriava popolavého sme po vysiatí na selektívne médiá pre enterokoky a enterobaktérie izolovali baktérie, ktoré sme ďalej identifikovali pomocou MALDI- TOF analýzy. Enterokoky boli zastúpené výhradne druhom *Enterococcus casseliflavus*. Z enterobaktérií sme identifikovali kmeň *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*, *Serratia liquefaciens* a *Yersinia enterocolitica*. Všetky bakteriálne kmene boli testované voči vybraným antibiotikám dilučnou agarovou metódou (CLSI). Kým enterokoky boli citlivé na všetky antibiotiká. U enterobaktérií sme zaznamenali rezistenciu voči ampicilínu a ampicilín- sulbacatamu.

## ÚVOD

Chránené vtáčie územie (CHVÚ) Senné rybníky (48 41' N, 22 04' E) je najvýznamnejšou lokalitou výskytu žeriava popolavého (*Grus grus*) na Slovensku. Každoročne tam zosadajú desaťtisíce jedincov, ktoré využívajú danú lokalitu ako nocovisko počas migrácie zo svojich zimovísk. Repel et al. (2009) uvádza, že niektoré jedince tu ostávajú hniezdiť. Toto fascinujúce divadlo chodia pozorovať nie len milovníci prírody, ale aj odborníci a vedci z rôznych krajín. Viacerí autori dokázali, že vtáky predstavujú vektory rôznych baktérií, ktoré môžu byť pre človeka patogénne (Benskin et al., 2009). Žeriavy popolavé, podobne ako iné druhy žeriavov počas svojho ťahu vytvárajú početné krdle a vysoká koncentrácia migrujúceho vtáctva a ich exkrementy predstavujú významný zdroj fekálneho znečistenia či už vody, alebo pôdy (Ryu et al., 2012). Exkrementy sú pritom potenciálnym zdrojom aj patogénnych mikroorganizmov.

Pochopenie šírenia bakteriálnych patogénov u voľne žijúcich vtákov môže slúžiť ako užitočný model pre skúmanie šírenia ďalších chorôb organizmov, a to ako medzi vtákmi, tak od vtákov do iných taxónov (Clare et al., 2009).

V tejto práci sme sa zamerali na detekciu a identifikáciu enterokokov a enterobaktérií z gastrointestinálneho traktu žeriavov a na analýzu ich rezistencie voči vybraným antibiotikám.

## MATERIÁL A METÓDY

Baktérie sme izolovali z trusu 3 jedincov žeriava popolavého (*Grus grus*) získaných z lokality CHVÚ Senné počas marca 2014. Faeces sme homogenizovali vo fyziologickom roztoku a alikvótne množstvá tohto roztoku vysiali na Petriho misky so selektívnymi agarom pre enterokoky (Bile Esculin Azid Agar, MERCK, Nemecko) a enterobaktérie (McConkey Agar, MERCK, Nemecko). Misky sme kultivovali v termostate za aeróbnych podmienok pri teplote 37°C 24 hodín. Na základe morfológických znakov sme náhodne vybrali 10 izolátov z každej vzorky a ďalej sme ich charakterizovali. Bakteriálne izoláty sme identifikovali pomocou prístroja MALDI- TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany). Všetky izoláty sme testovali na rezistenciu voči vybraným antibiotikám dilučnou metódou na Müller-Hintonovej agarových platniach. Pri analýze sme použili nasledujúce druhy a limitné koncentrácie antibiotík podľa CLSI pre enterokoky: ampicilín (16 µg/mL), tetracyklín (16 µg/mL),

erytromycín (8 µg/mL), vankomycín (32 µg/mL) a pre enterobaktérie: ampicilín (32 µg/mL), ampicilín-sulbactam (32 µg/mL), tetracyklín (16 µg/mL), kanamycín (25 µg/mL), chloramfenikol (32 µg/mL).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z faeces troch jedincov žeriava popolavého sme získali 30 kmeňov enterokokov a 30 kmeňov enterobaktérií, ktorých druhovú príslušnosť sme určili na základe hmotnostnej spektrometrie MALDI- TOF, pričom jeden izolát sa nám nepodarilo identifikovať. Populácia enterokokov bola u všetkých troch jedincov rovnaká so 100% zastúpením druhu *Enterococcus casseliflavus*. Enterokoky, gram pozitívne fakultatívne anaeróbne koky, ktoré rastú v pároch alebo krátkych reťazkách, sú obvyklými obyvateľmi gastrointestinálneho traktu teplokrvných zvierat, ale boli tiež detegované u hmyzu a rastlín. (Gillespie et al., 2006). Hoci druh *E. casseliflavus* nie je často izolovaný z klinických vzoriek, môže spôsobiť vážne invazívne ochorenia (Reid et al., 2001). Aj u enterobakteriálnej mikroflóry žeriava popolavého sme pozorovali len nízku variabilitu medzi jedincami. Z enterobaktérií mala najvyššie zastúpenie *Pantoea agglomerans* (70 %). Ďalšie bakteriálne izoláty boli identifikované ako *Serratia liquefaciens* (13,3 %), *P. ananatis* (10 %) a *Yersinia enterocolitica* (3 %). Aj Xenoulis et al. (2010) vo svojej práci identifikovali zástupcov enterobaktérií u voľne žijúcich vtákov ako *Pantoea* spp., zatiaľ čo u vtákov žijúcich v zajatí to bola *Escherichia coli*.

*P. agglomerans* býva spájaná s ochoreniami zvierat a ľudí (Engelkirk et al., 2008) a často sa nachádza v pôde a vode (Mukesh et al., 2012). Boli dokumentované prípady výskytu *P. agglomerans* ako patogénneho agens v krvi, abscesoch a kĺboch ľudí (Cruz et al., 2007), ale aj v benígnom nádorovom tkanive (Jain a et al., 2012). Z hľadiska rizík pre ľudí je zaujímavým pozorovaním výskyt druhu *Y. enterocolitica* v truse žeriavov. Táto baktéria vyvoláva ochorenia u domácich zvierat, voľne žijúcich vtákov a niektorých druhov poľovnej zveri (Slanina et al., 1991). U ľudí spôsobuje horúčku, bolesť brucha a hnačku, ktorá často býva hemoragická (Rahman et al., 2011).

O zložení enteromikroflóry žeriava popolavého neexistujú prakticky žiadne informácie. Črevná mikroflóra blízko príbuzného žeriava kanadského (*Grus canadensis*) a žeriava škriekavého (*Grus americana*), chovaných v zajatí bola prevažne tvorená Gram-pozitívnymi kokmi a kolidromnými baktériami, pričom najčastejšie izolovanými bakteriálnymi druhmi u oboch druhov žeriavov boli *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis* (Hoar et al., 2007). Nekultivačné analýzy mikroflóry exkrementov žeriava kanadského zas preukázali dominanciu bacilov a proteobaktérií s neočakávané nízkymi počtami baktérií radov Bacteroidetes a Clostridia (Ryu et al., 2012).

U získaných izolátov sme testovali rezistenciu voči vybraným antibiotikám. Enterokoky izolované z exkrementov žeriava popolavého boli senzitivne voči všetkým testovaným antibiotikám. Zaznamenali sme však výskyt rezistencie voči ampicilínu u druhov *P. agglomerans*, *P. ananatis* a *Y. enterocolitica* a rezistencie voči ampicilín-sulbactamu (inhibítora beta-laktamáz) u *S. liquefaciens* (Tab.1). Vysoký výskyt ampicilín rezistentných yersinií u ľudí a zvierat potvrdil vo svojej štúdií Preston et al. (1994). Multirezistentné kmene *P. agglomerans* detegoval Sharma et al. (2012) v synoviálnej tekutine pacienta, primárne neúspešne liečeného ampicilínom a gentamicínom, ktorému baktéria vyvolala septickú artritídu.

Naše výsledky potvrdzujú, že migrujúce žeriavy popolavé môžu byť zdrojom kontaminácie a ich exkrementy obsahujú baktérie potenciálne nebezpečné pre ľudské zdravie. Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) v roku 2007 uviedla, že 75% nových nákazlivých chorôb ľudí, ktoré sa objavili v priebehu posledných 10 rokov sú zoonózy spôsobené patogénnymi nájdenými u zvierat a v živočíšnych produktoch (Lerner et al., 2008).

Výskyt patogénnych baktérií v exkrementoch žeriava popolavého si vyžaduje rozsiahlejšiu analýzu vzhľadom na riziko spojené s transportom patogénnych baktérií na veľké vzdialenosti ktoré žeriavy pri svojej migrácii prekonávajú.

Tab.1 : Prehľad počtu rezistentných enterobaktérií z exkrementov žeriava popolavého a ich rezistencie voči vybraným antibiotikám

<b>Druh</b>	<b>Počet izolátov</b>	<b>AMP 32 µg/mL</b>	<b>AMS 32µg/mL</b>	<b>TET 16µg/mL</b>	<b>KAN 25µg/mL</b>	<b>CHL 32µg/mL</b>
<b>Enterobaktérie</b>	30					
<i>P. agglomerans</i>	21	1	0	0	0	0
<i>P. ananatis</i>	3	1	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i>	1	1	0	0	0	0
<i>S. liquefaciens</i>	4	2	1	0	0	0
		<b>AMP 16 µg/mL</b>	<b>AMS</b>	<b>TET 16 µg/mL</b>	<b>VAN 32 µg/mL</b>	<b>ERY 8 µg/mL</b>
<b>Enterokoky</b>	30					
<i>E. casseliflavus</i>	30	0	nt	0	0	0

Testované antibiotiká: AMP- ampicilín, AMS- ampicilín-sulbactam, TET- tetracyklín, KAN- kanamycín, VAN- vankomycín, ERY- erytromycín, CHL- chloramfenikol, nt- netestované

*Práca vznikla s podporou grantu VEGA 2/0087/14.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Benskin CMcWH, Wilson K, Jones K et al. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biological Reviews*.2009; 84: 349–373.
- Cruz AT., Cazacu AT, Allen AH et al. *Pantoea agglomerans*, a Plant Pathogen Causing Human Disease, *Clin. Microbiol.* Jun 2007; 45(6): 1989–1992.
- Gillespie SH, Hawkey PM. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* Second Edition. John Wiley & Sons Ltd. 2006; 604 s.
- Hoar BM, Whiteside DP, Ward L et al. Evaluation of the Enteric Microflora of Captive Whooping Cranes (*Grus americana*) and Sandhill Cranes (*Grus canadensis*). *Zoo Biology*. 2007; 26:141–153
- Jain S, Bohra I, Mahajan R et al. *Pantoea agglomerans* infection behaving like a tumor after plant thorn injury: An unusual presentation. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2012; 55 (3): 386-388.
- Lerner BW, Lerner KL. *Infectious Diseases: In context*. The Gale Group. Canada. 2008; 937 s.
- Engelkirk PG, Duben-Engelkirk JL. *Laboratory diagnosis of infectious diseases: essentials of diagnostic microbiology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2008; 754 s.
- Preston MA, Brown S, Borczyk AA et al. Antimicrobial Susceptibility of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* Isolated in Canada from 1972 to 1990. *Antimicrobial agents and therapy*. 1994; 38 (9): 2121-2124
- Rahman A, Bonny TS, Stonsaovapak S et al. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks. *Journal of Pathogens*. 2011; 2011: 11s.
- Repel M, Chrašč P, Pačenovský S et al. Migrácia a prvé doložené hniezdenie žeriava popolavého (*Grus grus*) na Slovensku. *Tichodroma*. 2009; 21: 73–77.
- Reid KC, Cockerill FR, Patel R. Clinical and Epidemiological Features of *Enterococcus casseliflavus/flavescens* and *Enterococcus gallinarum* Bacteremia: A Report of 20 Cases. In *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 32 (11): 1540-1546.
- Ryu H, Jingrang L, Vogel J et al. Development and Evaluation of Quantitative PCR Assay Targeting Sandhill Crane (*Grus canadensis*) Fecal Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78 (12): 4338- 4345
- Slanina I, Sokol J et al. *Vademecum veterinárneho lekára*. Príroda. 1991; 1182 s.
- Sharma M, Dogra BB, Misra R et al. Multidrug Resistant *Pantoea agglomerans* in a Patient with Septic Arthritis-a Rare Report from India. *International Journal of Microbiology Research*. 2012; 4 (6): 263-265.

## IN VITRO EXPRESIA CYTOKÍNOV PO APLIKÁCIÍ RÔZNYCH PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A *S. ENTERITIDIS* SE 147

Eva Husáková, Viera Spišáková, Róbert Herich, Dominika Stašová, Mária Levkutová a Mikuláš Levkut

*Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF, Košice*

### ABSTRAKT

mRNA interleukínu IL-1 $\beta$ , LITAF, iNOS, MIP1- $\beta$  (macrophage inflammatory protein) a K60 bola stanovená v kultúre periférnych mononukleárných buniek PMBCs (peripheral blood mononuclear cells) izolovaných z kurčiat, vystavených *in vitro* pôsobeniu probiotických kmeňov *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1 a infikovaných *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis (SE147). PMBCs boli kultivované 24h a 48 h po infikovaní *S. Enteritidis*. Hladina expresie vybraných cytokínov bola stanovená metódou real-time PCR (RT-PCR). Hladina expresie IL-1 $\beta$  a MIP1- $\beta$  bola zvýšená v skupine EFAL41+SE (*E. faecium* AL41+*S. Enteritidis*) 48h po infekcii v porovnaní s 24h kultiváciou. Podobne expresia LITAF bola zvýšená v skupine EFAL41+SE v porovnaní s kontrolnou skupinou (K) a *S. Enteritidis* (SE) skupinou 48h po kultivácii. Expresia IL-1 $\beta$  a chemokínov K60 a MIP1- $\beta$  bola znížená po 24h kultivácii v skupine EFH31+SE (*E. faecium* H31+*S. Enteritidis*). Zvýšená expresia iNOS bola detekovaná v skupine EFAL41+SE 24h po kultivácii v porovnaní s K a SE skupinami po 48h kultivácii. Tieto výsledky naznačujú, že probiotický kmeň *E. faecium* AL41 pôsobí imunostimulačne na expresiu vybraných cytokínov v kultúre PMBCs u kurčiat po infekcii *S. Enteritidis*.

### ÚVOD

Využitie probiotických kmeňov je potenciálne dôležitá stratégia pre moduláciu infekčných a zápalových reakcií v gastrointestinálnom trakte hostiteľa. Účinky probiotických kmeňov sú rôznorodé a zahŕňajú moduláciu črevného imunitného systému, prostredníctvom interakcie s črevnými epitelovými bunkami a bunkami imunitného systému (Pamer a kol., 2007). Galdeano a kol. (2007) uvádza, že probiotické baktérie sú schopné navodiť zmeny na epitely čreva, ktoré následne vyvolávajú zmeny cytokínovej odpovede. Probiotické kmene *Lactobacillus*, *Enterococcus* a ďalšie, patria do početnej skupiny mikroorganizmov, ktoré pôsobia antibakteriálne na možné patogénne baktérie v *in vivo* aj *in vitro* podmienkach (Heineman a kol., 2012). Testovanie probiotík sa vykonáva na bunkových a zvieracích modeloch. Štúdie *in vitro* môžu poskytnúť cenné informácie o mechanizmoch, zbezpečujúcich účinné imunomodulačné vlastnosti probiotických baktérií. Medzi dôležité cytokíny, ktoré sa podieľajú na iniciácii a modulácii zápalových imunitných procesov u kurčiat patria IL-1 $\beta$ , LITAF, K60, MIP1- $\beta$  a iNOS.

Cieľom našej práce bolo stanoviť hladinu expresie hlavne prozápalových cytokínov IL-1 $\beta$  a LITAF, produkovaných po *in vitro* infekcii *S. Enteritidis* u kurčiat.

### MATERIÁL A METODIKA

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

Z klinicky zdravej hydiny bola krv odoberaná 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  $1 \times 10^7$  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: Dr. Rychlík, VÚVEL, Brno, Česká republika) v počte  $1 \times 10^8$  CFU/ml a 200  $\mu$ l probiotických

kmeňov: *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1 (poskytnuté: Dr. Lauková, ÚFHZ SAV, Košice, Slovensko) v počte  $1 \times 10^9$  CFU/ml. Po pridaní baktérií boli PMBC kultivované 24 a 48 hodín.

#### *Homogenizácia buniek PMBCs 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 (IL)-1 $\beta$ , LITAF, iNOS, MIP1- $\beta$  a K60. 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: počiatková 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 získaných dát bola použitá jednocestná ANOVA, Tukyho test (GraphPad InStat).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Probiotický kmeň *E. faecium* AL41 pôsobil stimulačne na expresiu IL-1 $\beta$  v skupine EFAL41+SE v porovnaní s kontrolou 48h po infikovaní. Rovnako PMBCs kultivované s *E. faecium* H31 prejavili zvýšenú expresiu IL-1 $\beta$  v skupine EFH31+SE v porovnaní s kontrolou a SE skupinou 24h po infekcii. Kaiser a kol. (2000) popísal zníženú expresiu IL-1 $\beta$  po salmonelovej infekcii, vedúcej k rýchlemu zníženiu zápalovej odpovede v čreve, čo následne umožňuje prestup baktérií. Je zaujímavé, že regulácia IL-1 $\beta$  mRNA po aplikácii *E. faecium* H31 a *S. Enteritidis* bola zvýšená 24h po infekcii. 24h pôsobenie *E. faecium* AL41 v kultúre PMBCs nemalo stimulačný efekt na relatívnu expresiu LITAF, ale zvýšenie bolo detekované v skupine EFAL41+SE v porovnaní s K a SE skupinou 48h po infekcii. Je známe, že LITAF má dôležitú úlohu pri iniciácii zápalovej odpovede. Hong a kol. (2006) potvrdil, že expresia LITAF sa zvyšuje po *in vitro* stimulácii makrofágov LPS *S. Typhimurium*. V priebehu nášho experimentu sme zaznamenali zvýšenú expresiu LITAF v skupine EFAL41+SE 48h po infikovaní.

Prvú obrannú líniu proti vstupu patogéna do organizmu zabezpečujú mechanizmy prirodzenej imunity. Dôležitou súčasťou týchto procesov je produkcia nitric oxide synthase (iNOS), ktorý má silné bakteriostatické účinky proti intracelulárnym baktériám (Richardson a kol., 2009). Zvýšenú expresiu iNOS sme zaznamenali v skupine EFAL41+SE 48h po infikovaní, čo naznačuje bakteriostatické účinky probiotického kmeňa *E. faecium* AL41. Mayer a kol. (2007) vo svojej *in vitro* práci potvrdil, že niektoré probiotické kmene stimulujú produkciu chemokínov. Je známe, že probiotiká sa využívajú na kontrolu črevnej kolonizácie pred entero-patogénmi. Chemokíny sú produkované v priebehu infekcie alebo ako odpoveď na

zápalové stimuli a podporujú migráciu leukocytov na miesto poškodenia (Brisbin a kol., 2008). V našom experimente sme zaznamenali zvýšenú expresiu K60 a MIP1- $\beta$  24h po pridaní *E. faecium* H31 a infikovani *S. Enteritidis*.

Naše výsledky naznačujú, že probiotický kmeň *E. faecium* AL41 má najlepšie imunostimulačné vlastnosti zo všetkých testovaných probiotických kmeňov, na hladinu expresie vybraných cytokínov a chemokínov po infekcii *S. Enteritidis*. *In vitro* metóda použitá na selekciu probiotických kmeňov vo vzťahu k ich expresii bola následne použitá na *in vivo* úrovni.

*Táto práca bola financovaná prostredníctvom grantov VEGA-1/0313/12 and APVV-0302- 11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hong, Y.H., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Park, D.W., Lillehoj, E.P. Molecular cloning and characterization of chicken lipopolysaccharide-induced TNF-alpha factor (LITAF). *Dev Comp Immunol.* 2006; 30: 919–929.
- Kaiser, P., Rothwell, L., Galyov, E.E., Barrow, P.A., Burnside, J., Wigley, P. Differential cytokine expression in avian cells in response to invasion by *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Gallinarum. *Microbiol.* 2000; 12: 3217–3226.
- Brisbin, J.T., Gong, J., Parvizi, P., Sharif, S. Effects of *Lactobacilli* on Cytokine Expression by Chicken Spleen and Cecal Tonsil Cells. *Clin Vac Immunol.* 2010; 17: 1337–1343.
- Meyer, A.L., Elmadfa, I., Herbacek, I., Micksche, M. Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. *J Hum Nutr Diet.* 2007; 20: 590-598.
- Richardson, A.R., Soliven, K.C., Castor, M.E., Barnes, P.D., Libby, S.J., Fang, F.C. The Base Excision Repair System of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Counteracts DNA Damage by Host Nitric Oxide. *PLoS Pathog.* 2009; 5: 201-209.
- Pamer, E.G. Immune responses to commensal and environmental microbes. *Nat Immunol.* 2007; 11: 1173–1178.
- Heineman, J., Bubenik, S., McClave, S., Martindale, R. Fighting fire with fire: is it time to use probiotics to manage pathogenic bacterial diseases? *Curr Gastroenterol Rep.* 2012; 14: 343–348.
- Galdeano, M.C., LeBlanc, M.A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M.E., Perdigo'n, G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vac Immunol.* 2007; 14: 485-492.

## **AKTIVITA SUPEROXID DISMUTÁZY A DEPOZÍCIA ZINKU Z JEHO RÔZNYCH ZDROJOV V TKANIVÁCH BROJLEROV (MINIREVIEW)**

Ivanišinová, O.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

### **ABSTRAKT**

Zinok je jeden z dôležitých esenciálnych stopových prvkov potrebný pre množstvo metabolických funkcií prebiehajúcich v organizme. Podieľa sa na správnom fungovaní viac ako 300 enzýmov. Tento súhrn prináša na základe publikovaných výsledkov prehľad o absorpcii a depozícii Zn z jeho organických zdrojov používaných vo výžive hospodárskych zvierat v porovnaní so štandardne používanými anorganickými zdrojmi Zn, ako aj o antioxidačných účinkoch Zn, ktoré vykonáva prostredníctvom superoxid dismutázy (SOD). Názory ohľadom biovyužitelnosti Zn z jeho organických zdrojov sú značne nejednotné až neúplne. Posledné štúdie ukazujú, že Zn v organickej forme je viac biovyužitelný pre brojlerová kurčatá, má za následok zvýšenie aktivity CuZnSOD v pečeni a taktiež môže zlepšovať zootechnické parametre úžitkovosti zvierat. Avšak, iné štúdie poukazujú na to, že suplementácia diét anorganickými formami Zn má porovnateľné účinky ako jeho organické formy. Z tohto dôvodu je potrebné venovať pozornosť štúdiu organických foriem Zn, aby sme dokázali správne pochopiť ich metabolický osud v organizme.

### **ÚVOD**

V súčasnosti je v EÚ schválených desať zlúčenín zinku ako aditív používaných vo výžive zvierat. Z nich 4 sú organické cheláty: Zn chelát aminokyselinového hydrátu, Zn chelát glycinového hydrátu, Zn chelát hydroxylového analogu metionínu a Zn chelát metionínu (Register of Feed Additives). Maximálny povolený obsah Zn v EÚ bol v roku 2014 znížený z 250 mg Zn/kg kompletného krmiva pre spoločenské zvieratá a 150 mg Zn/kg pre všetky druhy hospodárskych zvierat na 150 mg Zn/kg krmiva pre ošípané, králiky, lososovité ryby, psov a mačky, 120 mg Zn/kg pre morky a 100 mg Zn/kg pre všetky ostatné druhy hospodárskych zvierat (EFSA, 2014). Potreba Zn pre zvieratá stanovená NRC sa líši podľa druhu a kategórie zvierat. U brojlerov je to 40 mg/kg krmiva, u nosníc 40-50 mg/kg, u prežúvavcov 30-55 mg/kg a u ošípaných 50-100 mg/kg kompletného krmiva. V praxi sa pred rokom 2014 bežne používali koncentrácie Zn, ktoré sa približovali k maximálnemu povolenému obsahu 150 mg Zn/kg krmiva. Štúdie poukazujú na to, že pre optimálny vývoj a produkciu brojlerových kurčiat postačuje 80 mg Zn/kg krmiva (Huang a kol., 2007). Údaje o biovyužitelnosti organických foriem Zn v porovnaní s anorganickými zdrojmi sa značne líšia. Metabolický osud organických zlúčenín Zn vo forme chelátov, ich interakcie s inými zložkami potravy a tiež ich absorpcia ešte nie je dostatočne preskúmaná. Posledné štúdie ukázali že organické formy zinku sú viac biodostupné (Sahraei a kol., 2013), prispievajú k zvýšeniu aktivity CuZn SOD v pečeni a zlepšujú parametre rastu (Feng a kol. 2010). Avšak, iné štúdie ukázali, že anorganické formy zinku sú porovnateľné s organickými (Feng a kol., 2010). Využitelnosť zinku z rôznych zdrojov sa môže posudzovať na základe aktivity Zn závislých enzýmov a koncentrácie metalotioneínu v telových tekutinách a tkanivách ako aj depozícii zinku v túbii (Wedekind a Baker, 1990). Výsledky niektorých autorov poukazujú na to, že sila chelátovej väzby môže zohrávať dôležitú úlohu pri biovyužitelnosti Zn z jeho rôznych organických zdrojov (Huang a kol., 2013) a najpresnejšie kritérium pre posúdenie využiteľnosti Zn je podľa Huanga a kol. (2009) expresia mRNA metalotioneínu.

### **ABSORPCIA ZINKU**

Absorpcia zinku z čreva prebieha aktívnym transportom a difúziou (Cousins, 1996) a môže sa pohybovať v rozmedzí 15 až 60% (McDowell, 2003). Zinok sa naviaže na nízkomolekulárne



ligandy v lúmene čreva a tak je prenesený do enterocytu prostredníctvom membránových receptorov a následne je uvoľnený do bunky. Na absorpcii zinku sa podieľajú aj Zip proteíny, ktoré sa nachádzajú na apikálnej membráne enterocytov po celej dĺžke tráviaceho traktu. U monogastrických druhov je absorpcia zinku najvyššia v tenkom čreve a to hlavne v duodéne a ileu (McDowell, 2003). Absorpcia zinku a jeho hladina v plazme je regulovaná receptormi enterocytov, metalotioneínmi a Zip proteínmi, pričom absorpcia sa lineárne zvyšuje kým úroveň Zn v krmive nedosiahne 80 mg/kg (Mohanna a Nys, 1999). Absorbovaný Zn je v plazme viazaný hlavne na albumín, makroglobulín, transferín, ceruloplazmín a metalotioneín, ktoré ho transportujú do cieľových tkanív (McDowell, 2003). Pri vyššom príjme Zn dochádza k jeho depozícii v kostiach a pečeni, nadbytok sa vylučuje trusom, naopak pri deficiencii zinku sa zvyšuje jeho absorpcia a znižuje exkrécia (Aggett, 1991). Absorpciu zinku negatívne ovplyvňuje vysoký obsah vápnika, železa, medi a kadmia vzhľadom na to, že majú spoločný transportný proteín o ktorý súťažia na apikálnej membráne enterocytov. Vysoký obsah fyťátov v krmive má tiež negatívny dopad na absorpciu zinku vzhľadom na to, že s ním tvorí nerozpustné komplexy a tak zabraňuje jeho absorpcii. Absorpciu zinku znižuje aj vysoký obsah vlákniny v krmive.

#### DEPOZÍCIA ZINKU V TKANIVÁCH

Približne 85% celkového zinku sa nachádza v kostrovom svalstve a kostiach, zvyšok v koži, pečeni, GIT a pankrease s nepatrným obsahom v iných orgánoch. Približne 80% zinku v krvnom obehú je zastúpeného v erytrocytoch, pričom z toho vyše 85% obsahuje karbonická anhydráza a približne 5% CuZnSOD (Cousins, 1996; NRC, 2005). V pankrease, pečeni, obličkách a slezine dochádza k značnej akumulácii a metabolizmu zinku, ktorý je následne použitý v rôznych biochemických dráhach (McDowell, 2003). Pri zníženom príjme Zn jeho obsah v tkanivách klesá, avšak, hladina v kostrovom svalstve, srdcovom svale a koži ostáva nezmenená (Hess a kol., 2007). Zvýšený príjem zinku vedie k jeho zvýšenej depozícii v pečeni, pankrease, obličkách a najviac v kostiach (Wedekind a kol., 1992). Výskumy ukazujú, že depozícia zinku v túbii brojlerov sa zvyšuje suplementáciou krmiva zinkom z organických zdrojov (Cao a kol., 2002; Ao a kol., 2006), čo autori vysvetľujú ako dôsledok jeho vyššej biovyužitelnosti práve z týchto zdrojov.

#### VPLYV ZINKU NA AKTIVITU SUPEROXID DISMUTÁZY

Superoxid dismutáza patrí do skupiny oxidoreduktáz a je kľúčovým enzýmom, ktorý katalyzuje dismutáciu superoxidových radikálov na peroxid vodíka a molekulový kyslík a tým chráni bunky pred oxidatívnym poškodením. Prídavok zinku do diéty priaznivo ovplyvňuje antioxidačný status zvierat vďaka jeho esencialite pre fyziologické fungovanie cytoplazmatickej SOD. Podľa posledných štúdií prídavkom zinku z organických zdrojov do krmiva stúpa aktivita CuZnSOD v erytrocytoch (Aksu a kol., 2010) a pečeni (Ma a kol., 2010). Avšak zvýšená aktivita CuZnSOD v pečeni bola zaznamenaná aj po pridaní anorganického oxidu zinočnatého do krmiva prasiat (Wang a kol., 2012), čo naznačuje, že anorganické zdroje Zn môžu vykazovať vo výžive zvierat biovyužitelnosť zinku, ktorá je ekvivalentná jeho organickému zdroju.

*Táto práca bola financovaná grantom APVV-0667-12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aggett, P. J. The assessment of zinc status: a personal view. *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 50 (1991), p. 9-17.
- Aksu, D. S., Aksu, T., Özsoy, B., Baytok, E. The Effects of Replacing Inorganic with a Lower Level of Organically Complexed Minerals (Cu, Zn and Mn) in Broiler Diets on Lipid Peroxidation and Antioxidant Defense Systems. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2010; 23 (8):1066–1072.

- Ao, T., Pierce, J.L., Power, R., Dawson, K.A., Pescatore, A.J., Cantor, A.H., Ford, M.J. Evaluation of Bioplex Zn as an Organic Zinc Source for Chicks. *International Journal of Poultry Science*, 2006; 5 (9): 808-811.
- Cao, J., Henry, P.R., Davis, S.R., Cousins, R.J., Miles, R.D., Littell, R.C., Ammerman, C.B. Relative bioavailability of organic zinc sources based on tissue zinc and metallothionein in chicks fed conventional dietary zinc concentrations. *Animal Feed Science and Technology*, 2002; 101:161-170.
- Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003. [http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf)
- Cousins, R. J. Zinc. *Present Knowledge in Nutrition*: ILSI Press, 1996, p. 293 – 306.
- EFSA. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorized maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal*, 2014; 12:3668.
- Feng J., Ma W., Niu H., Wu X. M., Wang Y., Feng J. Effects of zinc glycine chelate on growth, hematological, and immunological characteristics in broilers. *Biological Trace Element Research*, 2010; 133:203-211.
- Hess, S. Y., Peerson, J. A., King, J. C., Brown, K. H. Use of serum zinc concentration as an indicator of population zinc status. *Food and Nutrition Bulletin*, 2007; 28:403-429.
- Huang, Y. L., Lu, L., Li, S. F., Luo, X. G., Liu, B. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strength for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of Animal Science*, 2009; 87:2038-2046.
- Huang, Y. L., Lu, L., Luo, X. G., Liu, B. An optimal dietary zinc level of broiler chicks fed a corn-soybean meal diet. *Poultry Science*, 2007; 86:2582-2589.
- Huang, Y. L., Lu, Xie, J. J., Li, S. F., Li, X. L., Liu, S. B., Zhang, L. Y., Xi, L., Luo, X. G. Relative bioavailabilities of organic zinc sources with different chelation strengths for broilers fed diets with low or high phytate content. *Animal Feed Science and Technology*, 2013; 179:144-148.
- McDowell, L. R.. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. Amsterdam: Elsevier, 2003.
- Mohanna, C., Nys, Y. Effect of dietary zinc content and sources on the growth, body zinc deposition and retention, zinc excretion and immune response in chickens. *British Poultry Science*, 1999; 40:108-114.
- NRC (National Research Council of the National Academies). *Mineral Tolerance of Animals*, 2nd Revised Edition. The National Academies Press, Washington D.C., USA, 2005.
- Sahraei M., Janmmohamadi, H., Taghizadeh, A., Moghadam, G. A., Rafat, S. A. Estimation of the relative bioavailability of several zinc sources for broilers fed a conventional corn-soybean meal diet. *Journal of Poultry Science*, 2013; 50:53-59.
- Wang M.Q., Tao, W.J., Ye, S.S., Du, Y.J., Wang, C. and Shen, S.X. Effect of dietary pharmacological zinc on growth, liver metallothionein, Cu,Zn-SOD concentration and serum parameters in piglets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012; 11: 1390-1394.
- Wedekind K.J., Baker, D.H. Zinc bioavailability in feed-grade sources of zinc. *J. Anim. Sci.* 1990; 68:684-689.
- Wedekind, K.J., Hortin, A.E, Baker, D.H. Methodology for assessing zinc bioavailability: efficacy estimates for zinc-methionine, zinc sulfate and zinc oxide. *Journal of Animal Science*, 1992; 70:178-187.

# EXPRESIA GLUKOKORTIKOIDOVÝCH RECEPTOROV U OOCYTOV A PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÍ MYŠÍ

Janštová Ž.

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

## ABSTRAKT

Glukokortikoidné receptory regulujú rad dôležitých metabolických, homeostatických a kardiovaskulárnych funkcií. Okrem toho bola preukázaná ich významná úloha aj pri vývoji plodu. Úloha a mechanizmus uplatnenia glukokortikoidových receptorov počas materského stresu na preimplantačné embryo nie sú celkom objasnené. V tejto práci sme sa zamerali na detekciu glukokortikoidových receptorov počas najskorších štádií embryonálneho vývinu. Pomocou RT-PCR a imunohistochemickej analýzy (IHC) sme potvrdili, že glukokortikoidové receptory sú produkované u neoplodených oocytov a preimplantačných embryí myši na úrovni mRNA aj proteínu.

## ÚVOD

Mnohé štúdie dokázali, že počas tehotenstva viac ako polovica žien každodenne prežíva stres a trpí depresiou. Negatívny vplyv materského stresu na prenatálny vývin je známy už dlhšie (Mulder, 2002), avšak údajov o možnom vplyve materského stresu na preimplantačný vývin je veľmi málo. Výsledky novších experimentov ukazujú, že už v ranných štádiách embryogenézy sú produkované receptory viažuce stresové mediátory, pričom jedným z takýchto receptorov je glukokortikoidový receptor (Čikoš a kol. 2005, 2007, 2014, Siemieniuch a kol. 2010).

Glukokortikoidy predstavujú steroidné hormóny produkované kôrou nadobličiek. Hlavnými predstaviteľmi sú kortizol u ľudí a kortikosterón u hlodavcov (myš, potkan) (Javorka a kol., 2009). Glukokortikoidy sa viažu na glukokortikoidné receptory a následne ich aktivujú. Glukokortikoidné receptory patria so skupín jadrových receptorov a vyskytujú sa takmer vo všetkých tkanivách (Yamamoto, 1985). Pôsobenie glukokortikoidov v cieľových bunkách závisí od prítomnosti daného receptora a izoenzýmu 11-hydroxysteroid dehydrogenáza (11 $\beta$ -HSD), ktorý reguluje metabolizmus glukokortikoidov. Spomínaný izoenzým sa vyskytuje v dvoch formách: 1.) 11-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 1 (11 $\beta$ -HSD1), ktorý premieňa neaktívny 11-dehydrokortikosterón (u ľudí kortizón) na aktívny kortikosterón (kortizol) a 2.) 11-hydroxysteroid dehydrogenáza typu 2 (11 $\beta$ -HSD2), ktorý redukuje aktívny kortikosterón (kortizol) na neaktívny 11-dehydrokortikosterón (kortizón) (Michael a kol., 2003).

Presná úloha glukokortikoidov počas preimplantačného vývinu nie je známa, avšak zvýšený počet potratov u žien, ktorým boli podávané glukokortikoidy počas prvých troch mesiacoch tehotenstva naznačuje možný negatívny vplyv (Gur a kol., 2004). Na negatívny vplyv glukokortikoidov v prenatálnom období ukazuje aj zníženie pôrodnej hmotnosti, intrauterinná rastová retardácia, preeklampsia (Bloom a kol., 2001; Goland a kol., 1993, 1995).

## MATERIÁL A METÓDY

Neoplodené oocyty a preimplantačné embryá (4-bunkové, 8-16 bunkové a blastocysty) sme získali izoláciu z maternice a vajcovodu superovulovaných ICR myši (Velaz, Praha, Česká republika).

### *RT-PCR*

Celkovú RNA sme získali extrakciou z 80-120 myšacích neoplodených oocytov a preimplantačných embryí. Ako pozitívnu kontrolu sme použili RNA izolovanú z myšacích tkanív (pečeň). Izoláciu RNA sme uskutočnili pomocou TRIzol reagent (Invitrogen Life technologies, Karlsruhe, Nemecko). Kompetentnú cDNA sme syntetizovali pomocou

reverznej transkriptázy Superscript<sup>TM</sup> III (Invitrogen Life Technologies). Do PCR reakcie sme pridali 1  $\mu$ l cDNA. PCR produkt sme detegovali pomocou elektroforetickej analýzy na 2% agarózovom géle. Priméry boli dizajnované tak, aby detegovali všetky známe transkripčné varianty glukokortikoidového receptora.

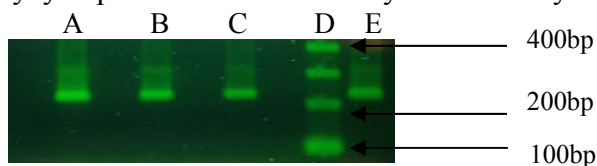
#### Imunohistochemická analýza proteínou glukokortikoidového receptora

Fixované (v 4% paraformaldehyde) neoplodené oocyty a preimplantačné embryá sme vložili do 0,1 M glycínu (Merck, Darmstadt, Nemecko) aby sme vyblokovali voľné aldehydové skupiny. Následne sme ich premyli v roztoku PBS/BSA/SAP (PBS s 1% BSA a 0,05% saponínom; Sigma-Aldrich, Mníchov, Nemecko). Na vyblokovanie nešpecifických väzieb sme použili 10 % roztok kozieho séra (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), v ktorom sme embryá inkubovali 1 hodinu. Potom sme embryá vložili do roztoku s primárnou protilátkou (králičia polyklonálna protilátka; Cell Signalling Technology, USA) a nechali inkubovať cez noc pri 4 °C. Na druhý deň sme embryá po premytí v roztoku PBS inkubovali 30 minút v roztoku so sekundárnou protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 488 (goat anti-rabbit IgG; Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, Nemecko). Po premytí v roztoku PBS sme jadrá embryí farbili s Hoechstom 33342 (bisbenzimid 20  $\mu$ g/ml v PBS; Sigma-Aldrich, Nemecko). Embryá sme potom rozdelili na experimentálne a kontrolné skupiny a následne sme ich preniesli na podložné sklíčka do zalievacieho média (ProLong Gold, Molecular Probes, Invitrogen) a prikryli krycím sklíčkom. Embryá z kontrolných farbení sme rozdelili na tri skupiny: 1) embryá inkubované bez primárnej protilátky, 2) embryá inkubované bez sekundárnej protilátky a 3) embryá s primárnou protilátkou pedsorbovanou prebytkom príslušného imunizačného (blokujúceho) peptidu. Embryá sme fotografovali na konfokálnom mikroskope (Leica Microsystems, Nemecko).

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza expresie mRNA glukokortikoidového receptora pomocou RT-PCR ukázala, že transkript glukokortikoidového receptora je prítomný u neoplodených oocytov, 8-16 bunkových embryí aj u blastocýst. Tieto výsledky naznačujú, že gén glukokortikoidového receptora je transkribovaný tak materským genómom ako aj embryonálnym genómom, krátko po jeho aktivácii.

Obr. 1 Výsledok z RT-PCR analýzy expresie GR mRNA u myšacích embryí

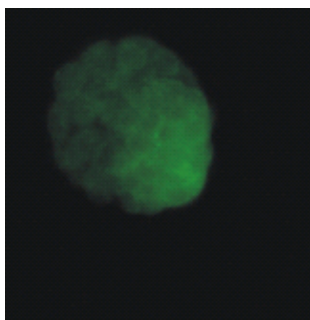


A: blastocysty (RT+, RT-), B: 8-16 bunkové embryá (RT+, RT-), C: neoplodené oocyty (RT+, RT-), D: štandard molekulovej hmotnosti, E: pozitívna kontrola (pečeň)

Na štúdium expresie proteínu glukokortikoidového receptora sme použili techniku imunohistochemie, kde sme okrem experimentálnej skupiny (detekcia so špecifickou primárnou protilátkou) pripravili ďalšie tri kontrolné skupiny na overenie špecifickosti fluorescenčného signálu (detekcia bez primárnej protilátky, bez sekundárnej protilátky a detekcia s primárnou protilátkou pedsorbovanou prebytkom imunizačného peptidu). Expresiu glukokortikoidových receptorov sme analyzovali v rôznych preimplantačných vývinových štádiách (neoplodené oocyty, 4-bunkové štádia, 8-16 bunkové štádia a blastocysty). Porovnanie intenzity fluorescenčného signálu v experimentálnej skupine (výrazný signál) s intenzitou signálu v kontrolných skupinách (žiadny signál, alebo výrazne nižšia intenzita signálu) potvrdilo prítomnosť glukokortikoidového receptora. Homogénne

roztrúsenie signálu po celom embryu ukazuje, že glukokortikoidový receptor je lokalizovaný v cytoplazme.

Obr. 2 Imunohistochemická analýza glukokortikoidového receptora v myšacej blastocyste



Siemieniuch a kol. (2010) detegovali mRNA pre glukokortikoidový receptor v *in vitro* kultivovaných kravských embryách od dvojbunkového štádia po štádium blastocysty. V našej práci sme ukázali, že myšací gén pre glukokortikoidový receptor je transkribovaný už v oocytoch, čo naznačuje jeho expresiu materským genómom. Naše výsledky tiež ukazujú, že u myšacích preimplantačných embryí sú glukokortikoidové receptory prítomné na úrovni mRNA aj proteínu, pričom sú detegované vo všetkých preimplantačných vývinových štádiách.

Aj keď presná úloha glukokortikoidov v preimplantačnom vývine nie je známa, predpokladá sa, že majú úlohu pri hormonálnej regulácii vývinu skorého embrya. Okrem toho, prítomnosť týchto receptorov počas preimplantačného vývinu naznačuje, že glukokortikoidy by mohli pôsobiť priamo v bunkách preimplantačných embryí počas stresových situácií matky.

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bloom S. L., Sheffield J. S., McIntire D. D., Leveno K. J. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. In *Obstet. Gynecol.*, 2001, vol. 97, p. 485–490.
- Čikoš Š., Veselá J., Il'ková G a kol. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. In *Mol Reprod Dev*, 2005, vol. 71, p. 145-153.
- Čikoš Š., Reháč P., Czikková, S a kol. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. In *Reproduction*, 2007, vol. 133, p. 1139-1147.
- Čikoš Š., Czikková S., Chrenek P a kol. Expression of adrenergic receptors in bovine and rabbit oocytes and preimplantation embryos. In *Reprod Dom Anim*, 2014, vol. 19, p. 92-100.
- Goland R. S., Jozak S a kol. Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. In *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1993, vol. 77, p. 1174–1179.
- Goland R. S., Tropper P. J a kol. Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. In *Reprod. Fertil. Dev.*, 1995, vol. 7, p. 1227–1230.
- Gur C., Diav – Citrin O a kol. Pregnancy outcome after first trimester exposure to corticosteroids: a prospective controlled study. In *Reprod Toxicol*, 2004, vol. 18, p. 93-101.
- Javorka K. a kol. *Lekárska fyziológia*. Martin: Osveta, 2009. 408 s. ISBN 80-8063-023-2.
- Michael A. E., Thurston L. M., Rae M. T. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. In *Reproduction*, 2003, vol. 126, p. 425-441.
- Mulder E. J. H., Robles de Medina P. G., Huizink A. C a kol. Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. In *Early Human Development*, 2002, vol. 70, p. 3-14.
- Siemieniuch M. J., Majewska M. a kol. Are glucocorticoids auto- and/or paracrine factors in early bovine embryo development and implantation? In *Reprod Biol.*, 2010, vol. 10, p. 249-256.
- Yamamoto K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. In *Annu. Rev. Genet.*, 1985, vol. 19, p. 209–252.

## **POTVRDENIE INTERAKCIE ERYTROPOETÍNU A JEHO RECEPTORA V NÁDOROVÝCH A2780 A NORMÁLNYCH HUVEC BUNKÁCH**

P. Kimáková<sup>1</sup>, B. Fecková<sup>1</sup>, L. Hurtuková<sup>1</sup>, M.R. Bhide<sup>2</sup>, P. Solár<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Katedra bunkovej biológie, Prírodovedecká Fakulta, Univerzita P.J. Šafárika, Košice*

<sup>2</sup> *Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita Veterinárskeho Lekárstva a Farmácie, Košice*

### **ABSTRAKT**

V tejto štúdií sme sa zamerali na otestovanie interakcie erythropoetínu (Epo) s jeho receptorom (EpoR) v ľudských ovariálnych adenokarcinómových bunkách A2780 a ľudských endoteliálnych bunkách HUVEC. Pozornosť sme venovali aj detekcii izotypov EpoR a rovnako analýze ich funkčnosti v oboch bunkových líniiach. Testovanie interakcie EpoR-Epo ako aj detekciu izotypov EpoR sme uskutočnili imunoprecipitačnými metódami. Okrem toho, prítomnosť EpoR tzv. plnej dĺžky (F-EpoR) sme potvrdili hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF. Navyše, funkčnosť EpoR v HUVEC bunkách sme potvrdili aj zvýšenou fosforyláciou proteínov Erk1,2.

### **ÚVOD**

EpoR je členom rodiny cytokínových receptorov typu I, ktorý je aktivovaný väzbou Epo. Epo je glykoproteínový hormón (Jelkmann W., 1992), ktorý stimuluje tvorbu červených krviniek, teda erytropoézu (Krantz S.B., 1991). Zistenie, že EpoR transkripty môžu byť detegované aj pri nízkych koncentráciách mimo erytroidných kompartmentov naznačuje, že EpoR môže potenciálne účinkovať aj v neerytroidných tkanivách (Hardee M.E. et al, 2006). Mnoho štúdií preukázalo prítomnosť EpoR v nádorových bunkových líniiach. Veľa nádorov obsahuje Epo mRNA transkripty a proteíny, čo poukazuje na potenciál autokrinného a parakrinného rastu pomocou interakcie EpoR-Epo v nádorových bunkách (Acs G. et al, 2001). Okrem toho, prítomnosť EpoR v endoteliálnych bunkách poukazuje na možný účinok Epo na nádorové mikroprostredie, ako je napríklad stimulácia angiogenézy nádorov (Hardee M.E. et al., 2006).

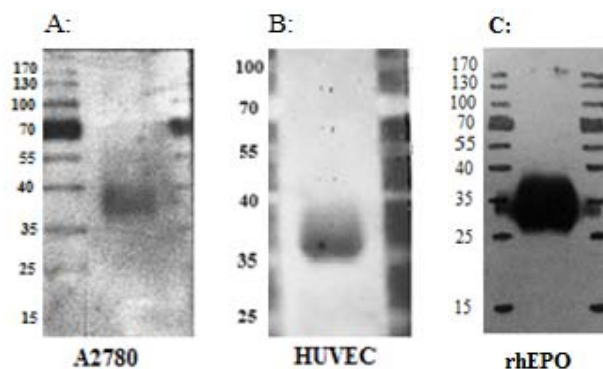
### **MATERIÁL A METODIKA**

Bunkové línie: V experimente sme použili ľudské nádorové bunky A2780 pôvodom z ovariálneho adenokarcinómu a ľudské endoteliálne bunky ciev pupočníka HUVEC, ktoré sme získali z Lekárskej fakulty, Ústav farmakológie, UPJŠ v Košiciach.

Prítomnosť interakcie EpoR-Epo ako aj detekciu izotypov tohto receptora v A2780 a HUVEC bunkách sme uskutočnili pomocou imunoprecipitačných metód a taktiež hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF. Funkčnosť EpoR v HUVEC bunkách sme overili pomocou metódy Western Blot a detekcie fosforylovaných proteínov Erk1,2.

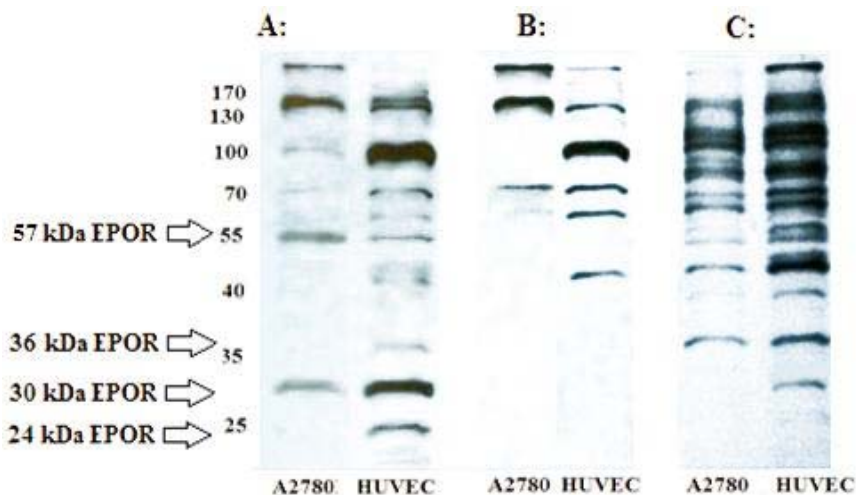
### **VÝSLEDKY**

Prostredníctvom imunoprecipitačných metód sme potvrdili interakciu medzi rhEpo (separovaným na gély a preneseným na PVDF membránu) a EpoR prítomným v lyzátoch A2780 a HUVEC buniek s použitím anti EpoR primárnej protilátky (Obr.1).



**Obr. 1:** Detekcia interakcie rhEpo-EpoR v A2780 (A) a HUVEC bunkách (B). Pozitívnu kontrolu predstavuje rhEpo detekovaný pomocou anti Epo protilátky (C).

Potvrdiť interakciu EpoR-Epo sme sa rozhodli aj prostredníctvom obrátenej imunoprecipitácie, kde lyzáty buniek vyseparované na gély a prenesené na PVDF membránu boli inkubované s rhEpo a následne EpoR-rhEpo interakcia bola potvrdená anti Epo protilátkou. Navyše sme touto metódou získali aj dôkaz existencie rôznych izoformi EpoR v oboch bunkových líniiach. Kým v prípade HUVEC buniek boli všetky izoformy detekované výrazne (24 kDa, 30 kDa, 36 kDa a 57 kDa), v prípade A2780 buniek boli hladiny izoformi oveľa nižšie (Obr.2). Hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF bola analyzovaná vzorka o molekulovej hmotnosti približne 57 kDa, ktorá bola vyhodnotená ako reťazec B, kryštalická štruktúra ľudského Epo v komplexe s EpoR. Hmotnosť EpoR - 57 kDa korešponduje s jeho izoformou plnej dĺžky F-EpoR (Obr.3).



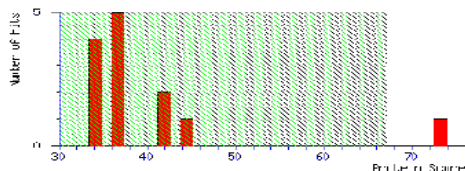
**Obr. 2:** Detekcia interakcie EpoR-Epo v A2780 a HUVEC bunkách s použitím anti Epo protilátky (A). Kontrolné skupiny predstavovali membrány s vyseparovanými A2780 a HUVEC proteínmi a aplikovanou anti Epo (B) alebo anti EpoR protilátkou (C).

## MASCOT Search Results

Search title : 1st spot 57 kDa  
Database 1 : SwissProt 2013\_12 (541954 sequences; 192668437 residues)  
Taxonomy 1 : Homo sapiens (human) (20274 sequences)  
Database 2 : NCBI nr 20140107 (35149712 sequences; 12374887350 residues)  
Taxonomy 2 : Homo sapiens (human) (272406 sequences)  
Timestamp : 23 Jan 2014 at 14:59:18 GMT  
Top Score : 73 for 2:gi|6137384, Chain B, Crystal Structure Of Human Erythropoietin Complexed To Its Receptor At 1.9 Angstroms

### Mascot Score Histogram

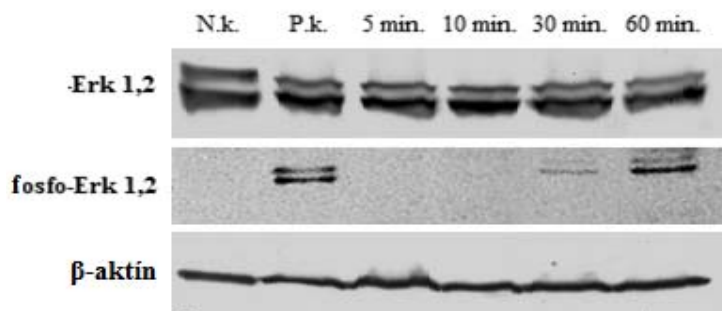
Protein scores greater than 67 are significant ( $p < 0.05$ ).



1. 2:gi|6137384 Mass: 25429 Score: 73 Expect: 0.014 Matches: 6  
Chain B, Crystal Structure Of Human Erythropoietin Complexed To Its Receptor At 1.9 Angstroms

Obr. 3: Potvrdenie EpoR proteínu MALDI-TOF analýzou.

Naše experimenty preukázali funkčnosť interakcie EpoR-Epo v HUVEC bunkách aj zvýšenou fosforyláciou proteínu Erk1,2 už v 30 minúte po aplikácii 5 IU/ml rhEpo. Po hodinovej inkubácii HUVEC buniek s rhEpo dosahovala fosforylácia Erk 1,2 úroveň pozitívnej kontroly.



Obr.4: Western blot analýza Erk 1,2 a fosfo-Erk 1,2 proteínov po inkubácii HUVEC buniek s 5 IU rhEpo/ml. Pozitívnu kontrolu predstavovali HUVEC bunky inkubované 10 min s 20 ng VEGF.

Táto práca bola podporovaná Vedeckou Grantovou Agentúrou Ministerstva Školstva SR prostredníctvom grantu č. VEGA 1/0733/12, Vnútroňým vedeckým grantovým systémom PF UPJŠ č. VVGS-PF-2013-98 a Vnútroňým vedeckým grantovým systémom UPJŠ č. VVGS-2013-102.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- (1) Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production and function. In *Physiological Reviews*. 1992, vol. 72, p. 449-489.
- (2) Krantz S.B. Erythropoietin. In *Blood*. 1991, vol. 77, p. 419-434.
- (3) Hardee M.E., Arcasoy M.O., Blackwell K.L., et al. Erythropoietin biology in cancer. In *Clinical Cancer Research*. 2006, vol. 12, p. 332-339.
- (4) Acs G., Acs P., Beckwith S.M., et al. Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer. In *Cancer Research*. 2001, vol. 31, p. 3561-3565.



# KVANTIFIKÁCIA MASTOCYTOV V NÁDOROCH MLIEČNEJ ŽĽAZY U POTKANOV VYVOLANÝCH PO EXPOZÍCIÍ N-NITROSO-N-METHYLUREOU

Kissová, V., Ševčíková, Z., Revajová, V., Herich, R., Šimaiová, V.

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

## ABSTRAKT

Cieľom práce bola po experimentálnej indukcii nádorov mliečnej žľazy u potkanov chemickým karcinogénom (NMU) detekcia a kvantifikácia mastocytov za účelom zistenia rozdielov v počte týchto buniek medzi jednotlivými typmi malígnych nádorov. Boli pozorované populácie mastocytov vo väčšine prípadov lokalizované perivaskulárne, v rôzne veľkých ložiskách hlavne v spojivovom tkanive nádoru a v mieste rozhrania nádorového a nezmeneného parenchýmu. Signifikantne najvyšší počet mastocytov bol u komedových adenokarcinómov a v kribriformnom type, ktoré majú z hľadiska ich biologickej povahy nepriaznivú prognózu. Na základe týchto skutočností je možné sa domnievať, že mastocyty svojimi pro – nádorovými aktivitami a schopnosťami potenciujú nepriaznivú prognózu týchto nádorov mliečnej žľazy u potkanov.

## ÚVOD

Mliečna žľaza, ktorá je charakteristická pre všetky druhy cicavcov, býva častým zdrojom nádorov. Za najlepší model na štúdium premalígnych a malígnych štádií nádorov mliečnej žľazy sa považuje experimentálna mamárna karcinogéza u samíc potkanov indukovaná najčastejšie N-metyl-N-nitrozoureou (NMU) a 7,12-dimetylbenz(a)antracénom (DMBA) (Kubatka, 2012; Thompson a kol., 1995). Mastocyty prvýkrát popísal Paul Ehrlich v roku 1878 (Ribatti a Crivellato, 2012). Sú to bunky, ktoré majú dôležitú funkciu v širokom spektre biologických procesov od zápalov a imunitných reakcií, cez angiogézu, reparáciu a remodeláciu tkaniva až po nádory (Beaven, 2009).

Cieľom práce bola po experimentálnej indukcii nádorov mliečnej žľazy u potkanov chemickým karcinogénom (NMU) detekcia a kvantifikácia mastocytov za účelom zistenia rozdielov v počte proliferovaných buniek medzi jednotlivými typmi malígnych nádorov.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci boli použité samice potkanov plemena Sprague-Dawley (SD) vo veku 5 týždňov (ANLAB, Česká republika). Po týždni v karanténe boli zvieratá držané vo zverinci Ústavu patologickej anatómie UVLF pri štandardných podmienkach. Potkany boli umiestnené v pevných plastových nádobách s hoblinami po dvoch, pričom jeden bol na chvoste označený vodovzdorným perom. Príjem krmiva (komerčná zmes MP-OŠ-06, Miško P., Snina, SR) a vody bol zabezpečený *ad libitum* počas celého pokusu (18 týždňov).

NMU (Sigma Aldrich) bola rozpustená vo fyziologickom roztoku. Na 42. a 49. deň bola pokusným zvieratám intraperitoneálne aplikovaná (0,5 ml/ zvierat) v dávke 50 mg/kg /ž. h., 15 minút po príprave (Kassayová a kol., 2007). Po 18 týždňoch boli na histologické vyšetrenie odobraté vzorky zo vzniknutých novotvarov, ako aj z mliečnych žliaz kontrolných kusov (t. j. bez aplikácie NMU) o veľkosti 0,5 cm<sup>3</sup> a fixované v 10% roztoku formalínu po dobu 48 hod. Následne boli spracované bežnou technikou zaliatím do parafínu a ofarbené hematoxylin eozínom za účelom histopatologickej diagnostiky (11 ks). Kvantifikácia mastocytov po ofarbení rezov podľa Giemsa - Romanovského bola realizovaná svetelným mikroskopom NIKON Labophot 2, pri 200 násobnom zväčšení, a to dvomi spôsobmi:

a/ Na histologických rezoch bolo vybraných osem polí, ktoré predstavovali plochu kalibrovanej okulárovej mriežky (NE9A; 21 mm, 0,25 mm IxGrD, Graticules LTD, Tonbridge Kent UK). Kalibráciou mriežky pomocou objektívového mikrometra (Carl Zeiss Jena, 0.01) bola určená dĺžka jednej strany okulárovej mriežky (250 μm) a vypočítaný

koeficient (5,92) pre prepočet počtu buniek na  $1\text{mm}^2$ . Každý preparát bol hodnotený v tripletoch.

b/ Z každého histologického preparátu bolo zhotovených 8 mikrofotografií (Nikon LABOPHOT 2, kamerový adaptér DS Camera Control Unit DS-U2, Nikon Japonsko). Mastocyty boli manuálne kvantifikované v grafickom programe MS Office (Skicár) za nasledovných podmienok: a/ zobrazenie pravítka s následnou korekciou veľkosti fotografií na  $1200 \times 800$  px, b/ počítanie buniek v dvoch plochách ( $\bar{a}$   $600 \times 400$  px). Výsledok každého merania predstavuje ich súčet. Každý preparát bol hodnotený duplicitne.

Počty mastocytov boli štatisticky vyhodnotené jednocestným ANOVA testom. Pre porovnanie štatistických rozdielov medzi jednotlivými typmi indukovaných nádorov bol použitý *post hoc* Tukey test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po aplikácii chemického karcinogénu bola po 18. týždňoch makroskopicky zistená prítomnosť novotvarov, ktoré sa vyskytovali ako solitárne alebo ako multicentrické, a to hlavne na abdomino - inguinálnych a cervikálnych žľazách. Nádory boli oválneho tvaru tuhej resp. tuhoelastickej konzistencie, niektoré nekrotizujúce, dosahujúce priemer od 0,5 – 2,5 cm. Histologickým vyšetrením boli klasifikované ako rôzne typy adenokarcinómov; najčastejšie papilárno - cystické (v závislosti od stupňa diferenciácie delené na Grade I (4x) a Grade II (2x) v jednom prípade kribriiformný, ďalej tzv. komedové typy (2x) a solídne karcinómy (2x). Detekcia mastocytov v nádoroch preukázala vo väčšine prípadov ich perivaskulárnu lokalizáciu v rôzne veľkých ložiskách v parenchýme, v spojivovom tkanive nádorov a na rozhraní nádorového a nezmeneného parenchýmu. Vo všetkých typoch indukovaných nádorov sme taktiež pozorovali proliferáciu interstícia miestami s detekciou morfológických zmien na mastocytoch a s depléciou okolitej matrix. Boli detegované zmeny tvaru buniek a ich jadier a strata celistvosti cytoplazmatickej membrány s „únikom“ granúl do extracelulárneho priestoru.

Obidvomi použitými metódami, bol signifikantne najvyšší počet mastocytov, medzi jednotlivými experimentálne indukovanými nádormi zaznamenaný v adenokarcinómoch komedového typu (<sup>ab</sup>  $P < 0.001$ ; <sup>ae</sup>  $P < 0.01$ ) a v kribriiformnom adenokarcinóme (<sup>cd</sup>  $P < 0.001$ ).

Tab.č.1: Histologická klasifikácia a detekcia počtu mastocytov v experimentálne indukovaných nádoroch mliečnej žľazy u potkanov

Histologická klasifikácia nádorov	Kvantifikácia mastocytov v tripletoch; použitie okuliarovej mriežky/ prepočet na $1\text{mm}^2$	Histologická klasifikácia nádorov	Kvantifikácia mastocytov duplicitne; grafický program MS Office /d
Cystický papilárny adenokarcinóm Grade II <sup>b,d</sup>	74,76 71,01 76,24	Cystický papilárny adenokarcinóm Grade II <sup>b,d</sup>	71,38 72,50
Dobre diferencovaný papilárny adenokarcinóm Grade I <sup>b,d</sup>	33,27 34,04 36,29	Dobre diferencovaný papilárny adenokarcinóm Grade I <sup>b,d</sup>	34,13 44,75
Papilárny adenokarcinóm komedový typ <sup>a</sup>	73,29 74,00 68,82	Papilárny adenokarcinóm komedový typ, SCC kože <sup>a</sup>	62,25 65,75
Papilárny adenokarcinóm Grade I <sup>b</sup>	38,48 43,66 40,7	Papilárny adenokarcinóm Grade I <sup>b</sup>	30,75 31,13
Papilárny adenokarcinóm komedový typ <sup>a,d</sup>	86,60 76,96 83,65	Papilárny adenokarcinóm komedový typ <sup>a,d</sup>	80,34 81,28
Cystický papilárny adenokarcinóm, Grade I <sup>b,d</sup>	59,20 49,60 54,05	Cystický papilárny adenokarcinóm, Grade I <sup>b,d</sup>	52,63 31,00
Cystický papilárny adenokarcinóm Grade I <sup>b,d</sup>	47,36 51,09 48,13	Cystický papilárny adenokarcinóm <sup>b,d</sup>	73,00 56,63
Dobre ohraničený solídny karcinóm <sup>b,d</sup>	39,25 38,48 42,21	Dobre ohraničený solídny karcinóm <sup>b,d,c</sup>	43,75 34,00
Dobre ohraničený solídny karcinóm <sup>b</sup>	37,65 38,48 33,33	Dobre ohraničený solídny karcinóm <sup>b,c</sup>	49,63 37,50
Kribriiformný adenokarcinóm <sup>c</sup>	69,56 70,33 74,00	Kribriiformný adenokarcinóm <sup>c</sup>	76,50 73,63

Legenda: d – aritmetický priemer, rozdielne písmená pri názvoch nádorov znamenajú štatisticky významné rozdiely v počte mastocytov: <sup>ab, cd</sup>  $P < 0.001$ ; <sup>ae</sup>  $P < 0.01$

Vysoký počet mastocytov v nekrotizujúcich nádoroch, súvisí pravdepodobne s ich výraznou aj keď nestabilnou neovaskularizáciou, formovanie a rast ktorej je o.i. potencovaný mastocytmi, resp. sekréciou ich rôznych solubilných faktorov. V NMU indukovaných nádoroch mliečnej žľazy u potkanov bolo zistené, že mastocyty sekretovali rastové faktory ako PDGF, (od trombocytov odvodený rastový faktor), SCF (faktor kmeňových buniek) a NGF (nervový rastový faktor). V našej práci sme pozorovali proliferáciu intersticiálneho tkaniva indukovaných nádorov, depléciu extracelulárnej matrix, ako aj morfológické zmeny niektorých mastocytov, súhrnne nazývané degranulácia mastocytov (Samoszuk a kol., 2005). Záverom je možné konštatovať, že v experimentálne NMU indukovaných malígnych nádoroch mliečnej žľazy u potkanov boli pozorované populácie mastocytov vo väčšine prípadov lokalizované perivaskulárne, v rôzne veľkých ložiskách hlavne v spojivovom tkanive nádoru a v mieste rozhrania nádorového a nezmeneného parenchýmu. Po ich kvantifikácii sme zistili signifikantne najvyššie počty mastocytov u komedových adenokarcinómov a v kribriformnom type, ktoré majú z hľadiska ich biologickej povahy nepriaznivú prognózu. Na základe týchto skutočností je možné sa domnievať, že mastocyty svojimi pro – nádorovými aktivitami a schopnosťami potenciujú nepriaznivú prognózu týchto nádorov mliečnej žľazy u potkanov.

*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 a KEGA č. 001UVLF-4/2012: Veterinárna cytológia.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- BEAVEN, M.A. Our perception of mast cells from Paul Ehrlich to now. Eur. J. Immunol, 39, 2009, 11-25.
- KASSAYOVÁ, M. a kol. Effect of prolonged psychoemotional stress and melatonin on experimental mammary carcinogenesis in female rats. In Neoplasma 54, 3, 2007
- KUBATKA, P. a kol. Neoplastické účinky indometacínu v N-metyl-N-nitrosourea indukovanej mamárnej karcinogéze u samíc potkanov. Neoplastic Effect of Indomethacin in N-metyl-N-nitrosourea Induced Mammary Carcinogenesis in Female Rats. 2012, vol. 25, no. 5, p.359-363
- RIBATTI, D.; CRIVELLATO, E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. Biochimica et Biophysica Acta, vol.1822, 2012,2-8
- SAMOSZUK, M. a kol. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumours and evidence that mast cells heparin interferes with the growth of tumour cells through a mechanism involving fibroblasts. BMC Cancer. ISSN 1471-2407, 2005, vol.5, p.121.
- THOMPSON, H.J. et al. Rapid induction of mammary intraductal proliferation, ductal carcinoma in situ and carcinomas by the injection of sexually immature female rats with 1-methyl-1 nitrosourea. In Carcinogenesis. 1995, vol. 16, p. 2407-2411.

## BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO SKLÁDKY LÚŽENCA Z NIKLOVEJ HUTY V SEREDI

Kvasnová S.<sup>1</sup>, Pristaš P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra biológie a ekológie, UMB, Banská Bystrica, <sup>2</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Kultivačnými metódami sme študovali zloženie a dynamiku bakteriálneho spoločenstva z haldy lúženca bývalej Niklovej huty v Seredi. Napriek vysokej koncentrácii kovov v tomto prostredí sme získali viaceré izoláty s početnosťou približne 30000 KTJ/gram lúženca v zimnom období a viac ako 300000 KTJ/gram lúženca v jarnom období. Pozorovali sme výraznú sezónnu dynamiku zloženia bakteriálneho spoločenstva haldy lúženca. Zatiaľ čo v zimnom období prevládali gram-pozitívne psychrofilné aktinobaktérie rodu *Arthrobacter* (*A. sulfureus* a *A. psychrophenicus*), v jarnom období výrazne stúpila variabilita spoločenstva a dominovali najmä mezofilné gram-negatívne druhy rodu *Pseudomonas*. U získaných izolátov sme študovali rezistenciu voči ťažkým kovom. Viaceré izoláty boli schopné rásť v prítomnosti vysokých koncentrácií ťažkých kovov a sú potenciálne využiteľné v bioremediačných procesoch.

### ÚVOD

Znečistenie životného prostredia ťažkými kovmi je vážnym problémom modernej industriálnej spoločnosti. Čistenie kontaminovaných lokalít fyzikálno-chemickými metódami je nielen finančne náročné ale často aj neekologické a preto sa v posledných rokoch pristupuje k vývoju technológií využívajúcich biologické systémy (Dercová a kol., 2005). Potenciálny spôsob riešenia tejto problematiky môže predstavovať práve bioremediácia – proces, ktorý využíva na odstránenie kontaminantov z prostredia metabolickú činnosť mikroorganizmov (Alexander, 1999). V našom výskume sa zameriavame na skládku lúženca bývalej Niklovej huty v Seredi, pretože predstavuje významnú environmentálnu záťaž. Je tvorená odpadom z procesu výroby niklu a kobaltu na báze dovážanej albánskej železniklovej lateritickej rudy s obsahom 1% niklu v tоне (Koudelka a kol. 1985). V chemickom zložení lúženca dominuje najmä Fe (50-80%), Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (2,5-3%), SiO<sub>2</sub> (6-8%) a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6-8%). Doterajšie pokusy o sanáciu tohto územia neboli veľmi úspešné, preto sme sa rozhodli preskúmať možnosti využitia autochtónnej mikróflóry skládky v procese bioremediácie.

### MATERIÁL A METODIKA

Kultivovateľné baktérie zo vzorky lúženca sme získali kultiváciou na neselektívnom TSA médiu (Trypton Soya Agar, Biomark laboratories, India) pri izbovej teplote po dobu 24 hodín. Po kontrole čistoty kultúr a základnej mikrobiologickej charakterizácii sme jednotlivé izoláty identifikovali pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie (Microflex LT, Bruker Daltonics) postupom odporúčaným výrobcom. Jednotlivé izoláty sme podrobili analýze rezistencie voči vybraným ťažkým kovom vo forme solí (ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>) dilučnou metódou. Izoláty sme kultivovali na tuhých TSA (Trypton Soya Agar, Biomark laboratories, India) médiách so zvyšujúcimi sa koncentráciami ťažkých kovov a rast kultúr sme kontrolovali vizuálne po 24 hodinovej kultivácii pri izbovej teplote.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultiváciou na neselektívnom médiu sme zo vzorky lúženca z haldy bývalej Niklovej huty v Seredi odobratej vo februári 2013 získali viaceré bakteriálne izoláty s početnosťou viac ako 30000 KTJ/gram lúženca. MALDI-TOF analýzou sme identifikovali minimálne 5

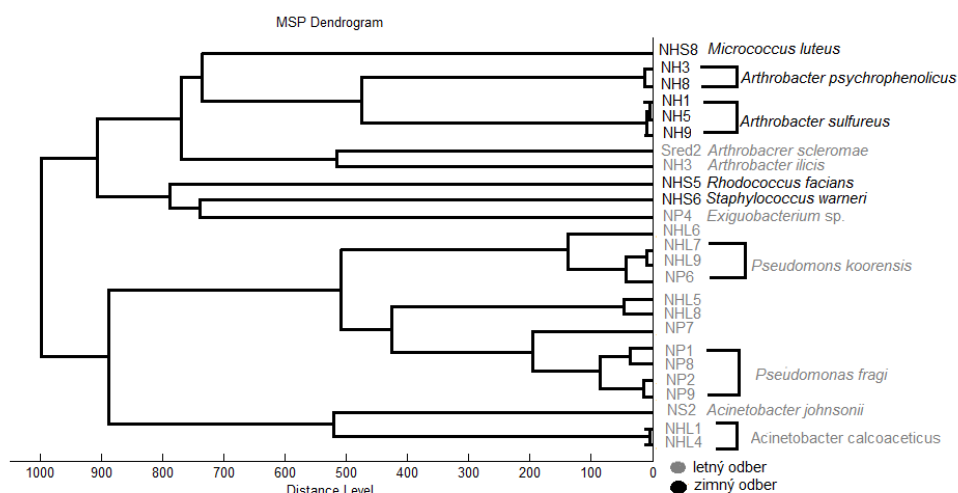
bakteriálnych druhov (Tab. 1.). Dominantnými bakteriálnymi druhmi v tomto odbere boli psychrofilné aktinobaktérie rodu *Arthrobacter* (*A. sulfureus* a *A. psychrophenicus*).

Tab. 1. Základné charakteristiky bakteriálneho spoločenstva lúženca z haldy bývalej Niklovej huty v Seredi v jednotlivých termínoch odberu

Dátum odberu	1. 2. 2013	19. 5. 2014
Teplota vzduchu	3°C	22°C
Teplota pôdy	2°C	20°C
Početnosť kultivovateľných baktérií (KTJ/ gram lúženca)	32000	288000
Shannon diversity index	2,23	3,20
Počet identifikovaných druhov	5	7
Dominantné druhy	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp.,
Pomer mezofily/ psychrofily	1/8	17/4
Pomer G-/G+	0/8	17/4

V odbere v máji 2014 sme pozorovali výrazne vyššiu variabilitu kultivovateľných baktérií. Shannonov index variability stúpol na hodnotu 3,20, v populácii sme detegovali minimálne 7 rôznych druhov a dominantnými druhmi boli najmä mezofilné gram-negatívne druhy rodu *Pseudomonas*, *P. fragi* a *P. koreensis*. Kým *P. koreensis* bol pôvodne izolovaný z pôdy (Kwon a kol., 2003), *P. fragi* je z podobného prostredia neznámy a bol izolovaný z potravinárskych produktov, kde je zodpovedný za znehodnocovanie chladených potravín (Arnaut-Rollier a kol., 1999).

Zhluková analýza podobnosti bakteriálnych populácií na základe MALDI-TOF proteínových profilov jednoznačne potvrdzuje významnú sezónnu dynamiku bakteriálneho spoločenstva lúženca z haldy bývalej Niklovej huty (Obr. 1).



Obr. 1. Zhluková analýza izolátov získaných lúženca z haldy bývalej Niklovej huty v Seredi zostrojená na základe podobnosti MALDI-TOF proteínových profilov

Baktérie rodu *Arthrobacter*, ktoré sú dominantné pri nízkych teplotách prostredia, sú prakticky nahradené druhmi rodu *Pseudomonas* a ďalšími gram-negatívnymi baktériami v teplejšom období.

O mikroflóre lúženca z výroby niklu existuje len minimum údajov. Podobné bakteriálne druhy (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas mendocina*, *Comamonas* spp., *Hafnia alvei*, *Burkholderia* spp., *Arthrobacter aureescens* a *A. ramosus*) boli izolované z prostredia antropogénne kontaminovaných niklom (Stoppel a Schlegel, 1995). Aktinobaktérie patrili k dominantným baktériám rezistentným voči niklu v serpentínových pôdach v strednom Taliansku (Mengoni a kol., 2001)

Aj keď existuje množstvo prác venovaných rezistencii baktérií voči ťažkým kovom, rezistencia voči niklu a kobaltu je relatívne vzácna. Keďže nami získané izoláty pochádzajú z územia s vysokým obsahom týchto ťažkých kovov, rozhodli sme sa získané izoláty podrobiť analýze na rezistenciu voči ťažkým kovom. Dostatočne vysoká odolnosť voči ťažkým kovom je totiž prvým predpokladom pre využitie bakteriálnych kmeňov v bioremediačných procesoch. Táto analýza ukázala, že medzi najodolnejšie izoláty zimného odberu patrí *Rhodococcus fascians*, ktorý ako jediný rástol v médiu s prídavkom síranu meďnatého s koncentráciou 6 mM. *Micrococcus luteus* ako jediný rástol v médiu s koncentráciou 7 mM NiCl<sub>2</sub>. Spomedzi izolátov z letného odberu bol najodolnejší *Pseudomonas koorensis*, ktorý rástol v médiu s koncentráciou 6 mM NiCl<sub>2</sub>. Tento izolát vykazuje vyššiu rezistenciu ako výskum Stoppela (Stoppel a Schlegel, 1995), ktorý uvádza, že ním získané izoláty boli schopné rásť pri 3mM koncentrácii NiCl<sub>2</sub>. Izoláty NHL2 a NHL5, ktoré sa na teraz nepodarilo identifikovať sú schopné rásť v médiu s koncentráciou 2mM CoCl<sub>2</sub>. Viaceré izoláty vykazovali zvýšenú rezistenciu aj voči medi a sú teda potenciálne využiteľné pri bioremediácii.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alexander, M.: Biodegradation and bioremediation, 1999 Academic Press.
- Arnaut-Rollier, I., Vauterin, L., De Vos, P., Massart, D.L., Devriese, L.A., De Zutter, L., Van Hoof, J. A numerical taxonomic study of the *Pseudomonas* flora isolated from poultry meat. J. Appl. Microbiol., 1999, 87: 15-28.
- Dercová, K., Makovníková, J., Barančíková, G., Žuffa, J. Bioremediácia toxických kovov kontaminujúcich vody a pôdy. Chemické Listy, 2005, 99, 682 – 693
- Koudelka, Z. a kol. Zpracování pelet z albánského loužence ve vysoké peci, část II. Hutnické listy, 1985, 11, s. 762 – 767.
- Kwon, a kol. "*Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea". Int J Syst Evol Microbiol. 2003, 53 (Pt 1) (Pt 1): 21–7
- Marczenko, Z. Separation and spectrophotometric determination of elements, John Wiley & Sons, 1983, 678 pp.
- Mengoni, A., Barzanti, R., Gonnelli, C., Gabbrielli, R. & Bazzicalupo, M. Characterization of nickel-resistant bacteria isolated from serpentinite soil. Environmental Microbiology, 2001 3, 691–698.
- Mongodin, E. F.(2006). Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aureescens* TC1. PLoS genetics, 2(12): e214. doi:10.1371/journal.pgen.0020214.
- Stoppel, R., Schlegel, H.G., Nickel-Resistant Bacteria from Anthropogenically Nickel-Polluted and Naturally Nickel-Percolated Ecosystems. Appl Environ Microbiol. Jun 1995; 61(6): 2276–2285.

# POSTKONDITIONOVANIE BRADYKINÍNOM ZNIŽUJE KONCENTRÁCIU KYSELINY GLUTÁMOVEJ V NERVOVOM TKANIVE PO ISCHÉMII A TOXICKOM POŠKODENÍ TRIMETYLCÍNOM

Lalkovičová M., Bonová P., Danielisová V.

*Neurobiologický ústav SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Neuronálne poškodenie vedie k apoptotickej alebo nekrotickej bunkovej smrti a môže mať za následok až nevratné poškodenia. Oneskorená smrť neurónov, ktorá je pozorovaná 2-3 dni po ischémii v CA1 oblasti hipokampu, poskytuje terapeutické okno pre použitie druhého stresora, tzv. postkondicionéra. Pomocou postkondicioningu je možné stimulovať endogénne obranné mechanizmy organizmu. Sledovali sme zmenu koncentrácie kyseliny glutámovej v nervovom tkanive u potkanov kmeňa Wistar. Po ischémii dochádza k výraznému zvýšeniu kyseliny glutámovej v extracelulárnom priestore buniek a tým k vzniku tzv. glutamátovej excitotoxicity. Zároveň boli vykonané behaviorálne pokusy metódami Barnesovho testu, pričom boli použité 2 rôzne stresory. Zvieratá boli najprv podrobené adaptačnej a tréningovej fáze, po ktorých na druhý deň nasledoval test. Koncentrácia kyseliny glutámovej sa po ischemickom aj toxickom poškodení signifikantne zvýšila v CA1 oblasti hipokampu ako aj v gyrus dentatus. Po aplikácii bradykinínu 48 hodín po inzulte koncentrácia kyseliny glutámovej výrazne klesla, v niektorých prípadoch až na kontrolné hodnoty. Tieto výsledky potvrdzujú aj behaviorálne pokusy. Taktiež sme zaznamenali zlepšenie pamäte po podaní bradykinínu.

## ÚVOD

Okrem traumatických poškodení mozgu môže dôjsť aj k poškodeniu neurotoxínmi alebo k neurodegeneratívnym poškodeniam ako napr. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba či mozgová ischémia. Ischémia, ktorá nastáva pri výraznej redukcii alebo úplnom zastavení krvného zásobovania tkaniva, patrí k najzávažnejším mozgovým poškodeniam. Niektoré regióny mozgu sa ukázali byť náchylnejšie k neuronálnemu poškodeniu ako ostatné. Tento fenomén je známy pod pojmom selektívna vulnerabilita a bunky v týchto oblastiach sa nazývajú selektívne vulnerabilné (Brierley J. B. a Graham D. I., 1984).

Hipokampus je rozsiahle študovanou štruktúrou a jeho behaviorálne funkcie u rôznych živočíšnych druhov sú dobre známe. Existuje viacero metód na detekciu dysfunkcie tejto štruktúry, z ktorých väčšina je asociovaná s nejakou formou učenia sa, ktorá je často meraná ako zvládnutie priestorových úloh (Morris a kol., 1982). Nami používaná behaviorálna metóda bol tzv. Barnesov test (Barnes Maze), ktorý sa používa pri testovaní priestorovej pamäti a učenia. Detekcia schopnosti hlodavca zapamätať si lokalizáciu cieľovej oblasti je dobrým indikátorom funkcie priestorovej pamäte hipokampu. Je známe, že jeho poškodenie spôsobuje ťažkosti pri zvládnutí týchto úloh (Fox a kol., 1998). Táto metóda je založená na prirodzenej averzii hlodavcov voči otvorenému priestoru a tým aj k motivácii k hľadaniu tmavého úkrytu.

Ako chemický stresor sme na vyvolanie poškodenia hipokampálnych neurónov použili trimetylcín (TMC). Pre toxicitu TMC je typické, že spôsobuje selektívne poškodenie limbického systému a mozgového kmeňa u ľudí a aj zvierat. Jedná sa o degeneráciu neurónov CA1 oblasti hipokampu s typickými príznakmi, ako je strata schopnosti učenia a pamäte.

Bradykinín je peptid, ktorý spôsobuje cievnú dilatáciu a tým znižuje krvný tlak. Okrem toho spôsobuje kontrakciu hladkého svalstva a vaskulárnu permeabilitu, zvyšuje vnútrobunkovú hladinu vápnika v astrocytoch (Papura a kol., 1994). Naším cieľom je štúdium vplyvu bradykinínu ako postkondicionéra na prežívanie selektívne vulnerabilných buniek CA1 oblasti hipokampu.

Kyselina glutámová a jej soli, tzv. glutamáty sú dôležité neurotransmitery, zohrávajúce významnú úlohu pri učení a tvorbe pamäte. Zistilo sa však, že pri ischemickom aj toxickom poškodení sa koncentrácia glutamátu v extracelulárnom priestore výrazne zvyšuje, čo spôsobuje tzv. glutamátovú toxicitu.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch sme pracovali s potkanmi kmeňa Wistar, ktoré boli tri mesiace staré o priemernej hmotnosti 350 g a boli náhodne rozdelené do skupín podľa použitého stresora. V skupine s ischemickým poškodením bola použitá 10-minútová globálna ischemia s následnou 3, 7 a 28 dňovou reperfúziou, ku ktorej sme použili ako postkondicionér bradykinín (150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.) 48 hodín po ischemickom poškodení. V skupine s chemickou ischemiou bolo poškodenie vyvolané trimetylcínom (8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p.) a na následné postkondicionovanie bol použitý rovnakým postupom bradykinín. Barnesov test bol vykonávaný v deň usmrtenia s tréningovou fázou v predošlý deň. Zvieratá boli umiestnené na kruhovú platformu, na ktorej sú otvory rovnomerne rozmiestnené po celom jej obvode. Pod jedným z nich sa nachádza skrýša skonštruovaná ako zásuvka, takže zviera sa po jej nájdení dá ľahko vybrať. Prvá časť experimentu pozostávala z adaptačnej a učebnej fázy. Zvieratá boli postupne ukladané na platformu a po nájdení a obhliadke komôrky boli vrátené do klietok. Po prvej adaptácii nasledovala druhá, po ktorej zvieratá boli podrobené testovacej fáze nasledujúci deň. Obidve fázy testu boli vykonávané v rovnakých hodinách a za rovnakých podmienok. Na konci experimentu boli zvieratá hlboko anestetizované 10% roztokom chloralhydrátu (300 mg/kg i.p.) a po dekapitácii mozgy z lebky rýchlo vybrané. Následne sme na ľade vypreparovali hipokampus a tkanivo ďalej spracovali. Pre stanovenie koncentrácie kyseliny glutámovej vo vzorkách CA1 oblasti hipokampu a *gyrus dentatus* sme použili enzýmovo-fluorimetrickú detekciu (Graham a Aprison, 1966) modifikovanú pre čítač mikrotitračných platní (Kravcukova a kol., 2009). Vzorka PMS bola vyprecipitovaná rovnakým množstvom ľadovo vychladenej kyseliny perchlórovej. Koncentrácia glutamátu bola určená v supernatante po odcentrifugovaní proteínového precipitátu pri 12000 g (4 °C, 10 min). Celková koncentrácia glutamátu bola vyjadrená na mg proteínov vo vzorke tkaniva ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri behaviorálnom Barnesovom teste bol priemerný výsledný čas nájdenia komôrky u skupiny zvierat, kde bola použitá 10 minútová globálna ischemia s následným 3-dňovým prežívaním 130s. V skupine so 7-dňovým prežívaním výsledný čas bol 135s a s 28-dňovým prežívaním až 142s, čo je takmer päťnásobok v porovnaní s kontrolnou skupinou. Po aplikácii bradykinínu 48 hodín po ischemii bol priemerný výsledný čas zredukovaný u všetkých skupín na takmer kontrolné hodnoty: 29s, 39s a 36 s. Pri použití trimetylcínu ako druhého stresora bez postkondicionéra bol po 3-dňovom prežívaní nameraný čas 99s, pri 7-dňovom 104s a pri 28-dňovom 108s. Po použití bradykinínu sa hodnoty zlepšili na 40s, 38s a 35s.

Pri stanovení koncentrácie glutamátu v mozgovom tkanive sme zaznamenali signifikantné zmeny v CA1 oblasti hipokampu ako aj v oblasti *gyrus dentatus*. Pri skupinách zvierat s ischemickým poškodením sa po podaní bradykinínu signifikantne zlepšili výsledky v CA1 oblasti u skupiny s 3-dňovým prežívaním v porovnaní s kontrolnou skupinou (0,291  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov) z 0,539  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov ( $p < 0.05$ ) na 0,308  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov ( $p < 0.05$ ) po podaní bradykinínu. U skupiny s 28-dňovým prežívaním v CA1 oblasti boli tieto hodnoty 0,888  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov ( $p < 0.001$ ) a 0,287  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  ( $p < 0.001$ ) po postkondicionovaní. V oblasti *gyrus dentatus* sa signifikancia po podaní bradykinínu prejavila u skupiny so 7-dňovým prežívaním. Nameraná hodnota koncentrácie kyseliny glutámovej bola porovnávaná z kontrolnou hodnotou 0,321  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov a po 10-minútovej ischemii bola 0,619  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov ( $p < 0.01$ ). Po postkondicionovaní klesla na 0,259  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  proteínov



( $p < 0.01$ ). Pri zvieratách s 28-dňovým prežívaním boli namerané hodnoty 0,857  $\mu\text{mol/mg}$  po poškodení ( $p < 0.001$ ) a 0,274  $\mu\text{mol/mg}$  po postkondicionovaní ( $p < 0.001$ ). Pri poškodení trimetylcínom a následnom postkondicionovaní bradykinínom sme významné zlepšenie v CA1 oblasti zaznamenali u skupiny s 28-dňovým prežívaním, kde koncentrácia kyseliny glutámovej po chemickom poškodení boli 0,641  $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.05$ ) a následne po podaní bradykinínu 0,146  $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.001$ ). V oblasti *gyrus dentatus* u skupiny so 7-dňovým bolo zlepšenie z 0,596  $\mu\text{mol/mg}$  na 0,259  $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.05$ ). Pri 28-dňovom prežívaní to bolo 0,632  $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.05$ ) po zásahu a 0,280  $\mu\text{mol/mg}$  ( $p < 0.01$ ) po postkondicionovaní. Z našich experimentov možno usudzovať, že selektívne vulnérabilné regióny CA1 oblasti hipokampu môžu získať ischemickú toleranciu po predchádzajúcom strese. Pri tom je dôležitá prítomnosť druhého patofyziologického stresu 48 hodín po poškodení na aktivovanie ischemickej tolerancie. Bradykinín použitý dva dni po ischemickom alebo chemickom poškodení mozgu zlepšil priestorovú pamäť a koncentrácia kyseliny glutámovej sa priblížila ku kontrolným hodnotám v mozgovom tkanive u experimentálnych zvierat. Pri použití 10-minútového ischemického poškodenia bola koncentrácia kyseliny glutámovej v oblasti *gyrus dentatus* pri 28-dňovom prežívaní zvierat dokonca nižšia ako kontrolná hodnota. Tento výsledok sme zaznamenali aj pri poškodení trimetylcínom v oblasti CA1 pri 28-dňovom prežívaní pokusných zvierat a v *gyrus dentatus* pri 7-dňovom a 28-dňovom prežívaní. Postkondicionovanie je nádejným neuroprotektívnym postupom, ktorý by mohol byť úspešne používaný aj v budúcnosti.

*Práca bola podporená grantom VEGA 2/0066/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brierley JB, Graham DI. Hypoxia and vascular disorders of the central nervous system. Greenfield's Neuropathology, 4th edn. 1984; 125207.
- Fox, GB., Fan, L., LeVasseur, RA., Faden, AI. Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. J Neurotrauma. 1998; 15:1037-1046.
- Graham Jr., L.T., Aprison, M.H. Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and gamma-aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. 1966; Anal. Biochem. 15, 487-497.
- Kravcukova, P., Danielisova, V., Nemethova, M., Burda, J., Gottlieb, M. Transient forebrain ischemia impact on lymphocyte DNA damage, glutamic acid level, and SOD activity in blood. 2009; Cell. Mol. Neurobiol. 29, 887-894.
- Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. 1982; Nature. 297:681-3.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęfćinija K, Jęfćinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. 1994; Nature. 369 (6483): 744-7.

## VYUŽITIE VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE S UV DETEKCIOU NA STANOVENIE SALINOMYCÍNU V KRMIVE

Maďarová M.<sup>1</sup>, Kožárová I.<sup>1</sup>, Kukura V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, <sup>2</sup>Veterinárny a potravinový ústav v Košiciach

### ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá stanovením ionofórového kokcidiostatika salinomycínu v krmive s využitím vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC) s UV detekciou pomocou predkolónovej derivatizácie s 2,4-dinitrofenylhydrazínom. Salinomycín bol extrahovaný z krmiva extrakčnou zmesou metanol/voda (9/1 v/v), prefiltrovaný, derivatizovaný a analyzovaný priamo na kolóne Nucleosil C<sub>18</sub> (250 x 4.6 mm) s mobilnou fázou metanol/voda/koncentrovaná kyselina octová (990/99/1 v/v). Separovaný salinomycín bol detegovaný na kvapalinovom chromatografe Hewlett Packard 1050 series s UV detekciou pri vlnových dĺžkach 250 nm a 390 nm. Výťažnosť salinomycínu z krmiva bola 35 - 100 % v koncentračnom rozsahu 0,5 - 25 mg.l<sup>-1</sup>. Salinomycín bol v krmive detegovaný v koncentračnom rozsahu 33 - 68 mg.kg<sup>-1</sup>. Získané výsledky boli potvrdené konfirmačnou metódou kvapalinovej chromatografie s tandem-hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS). Výsledky publikované v tejto štúdií ukázali, že táto metóda s modifikáciou na naše laboratórne podmienky môže byť použitá na rutinnú analýzu salinomycínu v krmive s prijateľnou výťažnosťou, špecificitou a opakovateľnosťou merania.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: salinomycín, krmivo, HPLC-UV, stanovenie

### ÚVOD

Salinomycín patrí do skupiny veterinárnych liečiv označených ako ionofórové kokcidiostatiká, ktorý vzniká prirodzenou fermentáciou *Streptomyces albus* spp., pričom pôsobí proti sporozoitom a včasným aj neskorším nepohlavným formám kokciidií v čreve hostiteľov (Váczi, 2008). Je kŕmnu doplnkovou látkou, ktorá sa celosvetovo podáva proti kokcidióze.

Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady č. 1831/2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat schvaľuje použitie salinomycínu ako kŕmnej doplnkovej látky, ktorá sa do medikovaného krmiva pridáva prevažne ako sodná soľ od 50 do 70 mg účinnej látky na kg v kompletnom krmive s obsahom vlhkosti 12 % v závislosti od živočíšneho druhu. Pre Sacox 120 microgranulate je stanovená jednodňová ochranná lehota. Výnimka platí len pre Kokcisan 120 G určený pre kurčatá na výkrm, kde je ochranná lehota trojdňová. Maximálny limit rezíduí v príslušných potravinách živočíšneho pôvodu je 5 µg.kg<sup>-1</sup> salinomycínu pre všetky čerstvé tkanivá (Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady č. 1831/2003).

Mnohé štúdie založené na screeningu alebo konfirmácií analytickými metódami publikovali stanovenie jedného alebo viacerých ionofórových kokcidiostatík v krmive. Najčastejšie publikované metódy popisujú stanovenie ionofórových kokcidiostatík pomocou postkolónovej derivatizácie, ale metód na stanovenie týchto veterinárnych liečiv pomocou predkolónovej derivatizácie je už menej (Dusi a kol., 1999). Účelom našej štúdie bolo stanoviť koncentračnú hladinu salinomycínu v komerčne vyrábanom krmive použitím úradne schválenej metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (CH 6. 9., 2004) s predkolónovou derivatizáciou s prispôbením na naše laboratórne podmienky.

## MATERIÁL A METODIKA

### *KRMIVO*

Na vyšetrenie bolo použitých 20 vzoriek krmív. Štrnásť vzoriek bolo získaných z Veterinárneho a potravinového ústavu v Košiciach, a šesť vzoriek od firmy Handlowo-Produkcyjna "Barbara" Sp. Z o.o., De Heus a. s. (Poľská republika).

### *CHEMIKÁLIE*

Metanol HPLC grade (Fisher Chemical, Loughborough, Veľká Británia), deionizovaná voda (EASY Pure od Barnstead), kyselina trichlóroctová p. a. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), 2,4-dinitrofenylhydrazín (Fluka Chemika Buchs, Steinheim, Švajčiarsko), koncentrovaná kyselina octová (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika) a štandard salinomycín sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

### *ŠTANDARDY A PRACOVNÉ ROZTOKY ŠTANDARDOV*

Zásobný roztok salinomycínu bol pripravený o koncentrácií 1000 mg.l<sup>-1</sup> v metanole. Z neho boli následne nariadené pracovné roztoky salinomycínu o koncentrácií 100 mg.l<sup>-1</sup> - 0.05 mg.l<sup>-1</sup> metanolu.

### *LC SYSTÉM*

LC systém Hewlett Packard series 1050 pozostáva z autosamplera, degasera, kvartérnej pumpy, UV detektora a softwera (Agilent Technologies 1990-2003 ChemStation Rev. A. 10.01 (1635)). Separácia analytu prebiehala na kolóne Nucleosil C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) pri laboratórnej teplote. Podmienky stanovenia - mobilná fáza: metanol/voda/koncentrovaná kyselina octová (990/99/1 v/v/v), prietok mobilnej fázy: 1 ml.min.<sup>-1</sup>, injekovaný objem: 80 µl a UV detektor: vlnová dĺžka 250 nm a 390 nm.

### *PRÍPRAVA VZORKY*

10 g vzorky bolo zhomogenizované a extrahované v 50 ml zmesi metanol/voda (9/1 v/v) na horizontálnej trepačke 60 minút. Extrakt bol prefiltrovaný cez filtračný papier. 700 µl prefiltrovaného extraktu bolo prenesených do vialky a pridaných 100 µl vodného roztoku kyseliny trichlóroctovej. Zmes bola dôkladne pretrepaná a ponechaná 10 minút stáť pri laboratórnej teplote. Následne bolo pridaných 200 µl metanolického roztoku 2,4-dinitrofenylhydrazínu. Zmes bola opäť dôkladne pretrepaná a zahrievaná 20 minút pri teplote 55 °C. Vychladená zmes bola injekovaná do HPLC.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V dôsledku absencie chromofóru na zlepšenie detekcie salinomycínu je potrebná jeho predkolónová alebo postkolónová derivatizácia. Na analýzu UV aktívnych derivátov salinomycínu s predkolónovou derivatizáciou je možné použiť viaceré derivatizačné činidlá, ako napr. 2,4-dinitrofenylhydrazín, 9-antryldiazometán, danzylchlorid a iné. Použitie postkolónovej derivatizácie je limitované úpravou konvenčného HPLC systému zapojením viacerých prístrojov, ako napr. externej pumpy, reaktora a ohrievača (Blazsek a kol., 2003).

Vzhľadom na naše laboratórne podmienky bol salinomycín v krmive stanovený predkolónovou derivatizáciou pomocou 2,4-dinitrofenylhydrazínu, ako derivatizačného činidla na kvapalinovom chromatografe Hewlett Packard series 1050 s UV detektorom pri vlnovej dĺžke 250 nm a 390 nm, pričom vlnová dĺžka 250 nm bola použitá ako kvantifikačná z dôvodu vyššieho pomeru signál - šum a vlnová dĺžka 390 nm ako identifikačná.

Kalibračná krivka bola zostavená zo šiestich bodov v koncentračnom rozsahu od 0.5 - 25 mg.l<sup>-1</sup> s koreláciou ( $r = 0.99999$ ). Detekčný limit bol stanovený na úrovni 0.05 mg.kg<sup>-1</sup>. V deviatich testovaných vzorkách krmiva bol salinomycín detegovaný v koncentrácií 33 - 68 mg.kg<sup>-1</sup> (Tabuľka 1). Výťažnosť salinomycínu z krmiva bola 35 - 100 %. Obsah salinomycínu v krmive deklarovaný výrobcom bol 60 mg.kg<sup>-1</sup> a 70 mg.kg<sup>-1</sup>. Získané výsledky boli potvrdené konfirmačnou metódou kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (CH 6.26.) na Veterinárnom a potravinovom ústave v Košiciach v

koncentračnom rozsahu 3,1 – 69 mg.kg<sup>-1</sup>. Vzorok krmiva s číslom 4, 5 a 9 boli označené ako negatívne, napriek tomu bol zaznamenaný nález istej koncentrácie salinomycínu. V prípade krmiva s číslom 17 bol touto metódou detegovaný narazín a nikarbazín, ktoré bolo označené dodávateľom ako krmivo podávané v období pred porážkou bez prítomnosti kokcidostatika.

Tab. 1: Koncentračná hladina salinomycínu stanovená v krmive použitím HPLC-UV a LC-MS/MS.

Krmivo	HPLC-UV (250 nm)	HPLC-UV (390 nm)	LC-MS/MS	DEKLAROVANÝ OBSAH VÝROBCOM
1	negatívna	negatívna	negatívna	
2	68 mg.kg <sup>-1</sup>	62 mg.kg <sup>-1</sup>	52 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
3	negatívna	negatívna	negatívna	
4	negatívna	negatívna	3,1 mg.kg <sup>-1</sup>	
5	negatívna	negatívna	3,1 mg.kg <sup>-1</sup>	
6	54 mg.kg <sup>-1</sup>	39 mg.kg <sup>-1</sup>	58 mg.kg <sup>-1</sup>	60 mg.kg <sup>-1</sup>
7	42 mg.kg <sup>-1</sup>	33 mg.kg <sup>-1</sup>	55 mg.kg <sup>-1</sup>	60 mg.kg <sup>-1</sup>
8	50 mg.kg <sup>-1</sup>	47 mg.kg <sup>-1</sup>	66 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
9	43 mg.kg <sup>-1</sup>	39 mg.kg <sup>-1</sup>	69 mg.kg <sup>-1</sup>	
10	negatívna	negatívna	negatívna	
11	negatívna	negatívna	negatívna	
12	negatívna	negatívna	negatívna	
13	negatívna	negatívna	negatívna	
14	negatívna	negatívna	negatívna	
15	66 mg.kg <sup>-1</sup>	57 mg.kg <sup>-1</sup>	67 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
16	54 mg.kg <sup>-1</sup>	40 mg.kg <sup>-1</sup>	64 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
17	negatívna	negatívna	Narazín 1,3 mg.kg <sup>-1</sup> Nikarbazín 1,8 mg.kg <sup>-1</sup>	
18	54 mg.kg <sup>-1</sup>	46 mg.kg <sup>-1</sup>	66 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
19	55 mg.kg <sup>-1</sup>	48 mg.kg <sup>-1</sup>	69 mg.kg <sup>-1</sup>	70 mg.kg <sup>-1</sup>
20	negatívna	negatívna	negatívna	

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Blazsek M, Surovcová A. LC determination of salinomycin in fermentation broths and Premixes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003; 31: 291-8.
- Dusi G, GAMBA V. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A*. 1999; 835: 243–6.
- CH 6. 9. Stanovenie monenzínu metódou HPLC. In: Zoznam úradných metód a metódy laboratórnej diagnostiky potravín a krmív, časť Chémia, Vestník MP SR, XXXVI, čiastka 1, 2004; 121-2.
- CH 6.26. Stanovenie ionofórových a neionofórových kokcidostatík v potravinách živočíšneho pôvodu a krmivách metódou LC/MS/MS. [http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne\\_info/Chemicke\\_analyz.pdf](http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Chemicke_analyz.pdf)
- Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 z 22. septembra 2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. In: Úradný vestník Európskej únie L 268/29. 2003; 1-15.
- Váczi P. Antiprotozoiká. In: Čonková E, a kol. Veterinárska farmakológia. I. diel. 1. vyd. Košice: Viena s.r.o., 2008; 132-43. ISBN 978–80–8077–102–7

## TOPOGRAFICKÁ ANATÓMIA A VARIABILITA *DUCTUS THORACICUS* A *CISTERNA CHYLI* (*RECEPTACULUM CHYLI*) U KRÁLIKA

Maloveská M., Krešáková L., Petrovová E., Vdoviaková K.

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

### ABSTRAKT

Králik patrí aj v dnešnej dobe medzi najpoužívanejšie laboratórne zvieratá čo si vyžaduje absolútnu znalosť anatomických pomerov. Cieľom našej práce bolo vypracovať dôkladný opis dvoch najväčších formácií vaskulárnej zložky lymfatického systému. Na vizualizáciu polohy chylovej nádržky a priebehu hrudníkového miazgovodu sme použili tuše rôznych farieb ako aj RTG metódu s použitím kontrastného média (Urografin). Anatomická variabilita bola prezentovaná rôznym tvarom, veľkosťou a uložením *cisterna chyli*, kým pri *ductus thoracicus* sme sa zamerali na jeho priebeh, (ne)jednotnosť a miesto vyústenie do venózneho systému. Zistili sme, že chylová nádržka bola vo väčšine prípadov (70 %) nejednotná, plexiformná štruktúra uložená na strope brušnej a zasahujúca aj do hrudníkovej dutiny, rozprestierajúca sa medzi 2.–3. dierkovým a 11.–12. hrudníkovým stavcom. Hrudníkový miazgovod (najhrubšia lymfatická cieva tela) sa u všetkých králikov začal formovať v hrudníkovej dutine a prebiehal po dorzolaterálnej, pravej ploche hrudníkovej aorty, ventrálne od *v. azygos dextra* po úroveň 4.–5. rebra, kedy prestáva byť viditeľný z pravej strany. Pod ľavým *m. longus colli* vystupoval z *apertura thoracis cranialis* a do venózneho systému vstupoval jednotne v mieste spojenia *v. subclavia sinistra* s *v. jugularis externa sinistra* približne 1–2 cm kaudálne od ľavej kľúčnej kosti. Ampulovité rozšírenie sme nezaznamenali. V 20% prípadoch prebiehal *ductus thoracicus* na ľavo od *aorta thoracica*.

### ÚVOD

Králik má stále nezastupiteľné miesto v početných experimentoch a výskumných aktivitách v oblasti biológie, fyziológie a medicíny. Napriek tomu sú detailné informácie o topografii *ductus thoracicus* (DT) a *cisterna chyli* (CC) králika nedostatočné. Výsledky získané makroskopickým pozorovaním hrudníkového miazgovodu a chylovej nádržky s použitím rôznych nástrekových hmôt nám umožnia využiť králika ako experimentálny model v hrudníkovej chirurgii pri poruchách cirkulácie lymfy.

*Cisterna chyli* predstavuje vakovitý, často nejednotný a členitý útvar nachádzajúci sa na strope brušnej dutiny, ktorý sa prechodom do hrudníkovej dutiny zužuje a pokračuje kraniálne ako *ductus thoracicus* (Lešník, Danko, 2005). Poruchy lymfatickej cirkulácie v hrudníkovej dutine sú zvyčajne následkom vrodených malformácií, infekčných ochorení, malignít a v neposlednom rade traumy. Lymfatické cievy, na rozdiel od krvných ciev nie sú dobre viditeľné a k ich poškodeniu často dochádza pri chirurgii pažeráka, pľúc, srdca či veľkých ciev (Mand'ák a kol., 2011). Únik lymfy do hrudníkovej dutiny spôsobí chylothorax, ktorý je často opisovaný aj vo veterinárnej medicíne (Kumar a kol., 2007). Chylothorax patrí do skupiny pleurálnych výpotkov s typickými biochemickými ukazovateľmi. Prípadný únik sa neprejavuje okamžitým dôsledkom a klinické príznaky sa objavujú až po zlyhaní kompenzačných mechanizmov (Mallick a kol., 2003). Jedným zo spôsobov terapie chylothoraxu je aj ligácia hrudníkového miazgovodu s prístupom cez hrudníkovú stenu (Fossum, 2011), či perkutánna embolizácia *ductus thoracicus* (Davies a kol., 2011). Dokonalá znalosť chirurgickej anatómie je dôležitá už pri príprave chirurgického poľa. Topografická anatómia a variabilita DT a CC je zdokumentovaná u niektorých druhov hospodárskych zvierat (Popesko, 1992; Duras Gomercic a kol., 2010), psov (De Freitas a kol., 1981; Enwiller a kol., 2003; Duras Gomercic a kol., 2009), mačiek (Eken a kol., 2002). Informácie týkajúce sa anatomickej deskripcie týchto dvoch štruktúr u králika sú v porovnaní

s ostatnými druhmi hospodárskych a spoločenských zvierat pomerne skromné. Vo svojich publikáciách ich čiastočne opisujú Craigie (1948), Nejedlý (1965), Barone (1996) a v anatomických atlasoch Popesko a kol. (1990), Barone a kol. (1973). V dostupných zdrojoch sme našli len jednu novšiu štúdiu (Besoluk a kol., 2001) zaoberajúcu sa makroskopickým skúmaním DT a CC u králika.

## MATERIÁL A METODIKA

V práci sme použili 10 králikov samčieho pohlavia, plemena Novozélandský biely, vo veku 13 –15 týždňov. Eutanáziu sme vykonali embutamidom (T 61) v dávke 0,3ml/kg i.v.. Do ľahko prístupných zákolenných uzlín (*lnn. poplitei*) oboch panvových končatín sme pomaly injikovali tuš za účelom vizualizácie *trunci lumbales* a následne sa ofarbila aj *cisterna chyli*. Otvorili sme brušnú dutinu rezom v *linea alba* a tiež dvoma transverzálnymi rezmi za rebrovými oblúkmi s cieľom maximálne sprístupniť strop brušnej dutiny. DT sme pozorovali po otvorení hrudníkovej dutiny. Uloženie, priebeh a variabilitu lymfatických štruktúr sme pozorovali makroskopicky a dokumentovali digitálnym fotoaparátom (CANON –POWER SHOT SX 40 HS) a operačným mikroskopom (Leica M 320). Pri využití röntgenografie sme postupovali rovnako, ale pre lepšiu optickú kontrolu postupu kontrastnej látky sme ju vopred zmiešali s tušom. RTG snímky sme získali s použitím prístroja DRTECH FDX D 810 (DRTECH Corp., KOREA). Pri pomenovaní jednotlivých anatomických štruktúr sme použili posledné vydanie NAV (Danko a kol., 2011).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Cisterna chyli** sa u králika začína formovať v úrovni druhého až tretieho driekového stavca, v mieste odstupu *a. renalis sinistra* a je umiestnená na pravej, popr. dorzálnej strane brušnej aorty. Bránicou prestupuje v mieste *hiatus aorticus* spolu s aortou, kde pozorujeme mierne zúženie chylovej nádržky. Prestupom do hrudníkovej dutiny sa však opäť rozširuje a od predposledného medzirebrového priestoru pokračuje kraniálne ako *ductus thoracicus*. Jej tvar je značne variabilný. Ako jednotná, elipsovitá, vakovitá štruktúra bola *cisterna chyli* zaznamenaná len 2 prípadoch. V jednom prípade bola kraniálne od bráničných pilierov rozdvojená a zjednotila sa až sformovaním hrudníkoveho miazgovodu. U ostatných siedmych králikov sme pozorovali skôr nejednotný, plexiformný, vretenovitý útvar, niekedy len ťažko odlišiteľný od najdorzálnejšie uložených uzlín kraniálneho okružového miazgového centra. Veľkosť značne varíruje od typu prijímanej potravy a momentálneho stavu naplnenia čriev a jej dĺžka sa pohybuje od dvoch do piatich cm, šírku je veľmi ťažko zhodnotiť najmä pre jej členitosť. Bolo pozorované, že kaudálne prijíma driekové lymfatické kmene, v deviatich prípadoch v počte 2 a v jednom prípade 3 *trunci lumbales*. V úrovni *glandula adrenalis dextra* vstupujú ventrálne do chylovej nádržky nepárové lymfatické kmene privádzajúce lymfu z orgánov tráviaceho systému (s výnimkou odvodných miazgových ciev z *lc.mesentericum caudale*).

**Ductus thoracicus** vzniká podľa našich pozorovaní v hrudníkovej dutine, kde CC prudko zmenší svoj diameter a to približne v úrovni 11. hrudníkoveho stavca. Smeruje priamo, kraniálnym smerom po dorzálnej strane hrudníkovej aorty s miernym posunom vpravo. Hrudníkový miazgovod prebieha v tesnom kontakte s *v. azygos dextra*. V mieste, kde sa *aorta thoracica* prikladá k pažeráku sa DT presúva na vľavo od stredovej roviny hrudníka a nie je viac viditeľný z pravej strany. V mieste *arcus aortae* (2.rebro) leží hrudníkový miazgovod, rovnako ako aj hrudníková aorta ventrálnejšie v porovnaní s ich kaudálnymi časťami. Na tomto mieste stráca DT spojenie so srdcovnicou. Popod ľavý *m. longus colli* opúšťa *apertura thoracis cranialis* a vstupuje do venózneho systému v mieste spojenia *v.subclavia sinistra* s *v. jugularis externa sinistra* približne 1–2 cm kaudálne od ľavej kľúčnej kosti. Ani v jednom prípade sme nepozorovali ampulovité rozšírenie terminálnej časti DT.

Variabilita však bola zaznamenaná v nasledujúcich ukazovateľoch. Po výstupe z CC sa v dvoch prípadoch vyskytlo čiastočné zdvojenie hrudníkového miazgovodu maximálne však po mieste odstupe *m. psoas major*, v troch prípadoch došlo ku vytvoreniu paralelne prebiehajúcej vetvy DT na krátkom úseku (na rovnakej strane), v jednom prípade sme opísali sieťovitý priebeh hrudníkového miazgovodu v mieste jeho prechodu na ľavú plochu *v. azygos dextra*, čo sa následne upravilo spojením všetkých vetiev. U jedného králika dosahoval hrudníkový miazgovod priemer takmer rovnaký ako je priemer pravej nepárovej žily, čo môže byť aj následok bezprostredného nažratia sa pred eutanáziou. U dvoch jedincov sme sledovali priebeh DT na ľavej strane *aorta thoracica*, čo nevyklučujú ani vyššie menovaní autori (Barone a kol., 1973).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barone R. Anatomie comparée des mammifères domestiques. Vigot Frères Paris. 1996; 854-855.
- Barone R., Pavaux C., Blin P. C., Cuo P. Atlas D' Anatomie du Lapin. Masson et cie. Paris. 1973; 99 – 102.
- Besoluk K., Tipirdamaz S., Yalcin H., Eken E. Macroanatomic investigations on the Cisterna Chyli and Thoracic Duct of the White New Zealand Rabbit. Ve. Bil. Derg. 2001;17, 2: 51 – 56.
- Craige E. H. Bensley's Practical Anatomy of the Rabbit. 8<sup>th</sup> ed., Toronto, University of Toronto Press. 1948; 327, 337.
- Danko J., Šimon F., Artimová J. Nomina Anatomica Veterinaria. UVLF Košice. 2011.
- Davies H. E., Rosenstengel A., Gary Lee Y., C. Pokles významu chirurgických výkonov pri ochoreniach pleury. Curr Opin Pulm Med/CS. 2011; 8: 49-56.
- De Freitas V., Pieffer C. R., Zorzetto N. L., Seullner G. Über die Topographie des Ductus thoracicus beim Hund. Anat. Anz. 1981; 149: 451-454.
- Duras Gomercic M., Gomercic T., Skrtic D., Galov A., Lucic H., Vukovic S., Gomercic H. The accessory thoracic duct in a dog. Veterinarski Arhiv. 2009; 79: 157-165.
- Duras Gomercic M., Trbojevic Vukicevic T., Gomercic T., Galov A., Fruk T., Gomercic H. The cisterna chyli and thoracic duct in pigs (*Sus scrofa domestica*). Veterinarni Medicina. 2010; 55 (1): 30-34.
- Eken E., Besoluk K., Tipirdamaz S., Gezici M., Bahar S. Thoracic duct in cats (*Felis catus*). Revue Méd. Vét. 2002; 153;717-721.
- Enwiller T. M., Radlinsky M. G., Mason D. E., Roush J., K. Popliteal and mesenteric lymph node injection with methylene blue for coloration of the thoracic duct in dogs. Vet. Surg. 2003; 32: 359-364.
- Fossum T. W. Novinky a miniinvazivní techniky v hrudní chirurgii, kardiochirurgii a endovaskulární zákroky u malých zvířat. Zborník zo seminára „Endoskopie a miniinvazivní zákroky“. FVL VFU a LF MU Brno. 2011; 5-21.
- Kumar KS, Ramesh P. Chylothorax associated with lung lobe torsion in a dog – a case report. Veterinarski Arhiv. 2007; 77: 561-566.
- Lešník F., Danko J. Medicínska lymfológia. Hajko&Hajková. 2005.
- Mallick A., Bodenham A. R. Disorders of the lymph circulation: their relevance to anaesthesia and intensive care. Br. J. Anaesth. 2003; 91: 265-72.
- Mand'ák J., Habal P., Štětina M., Harrer J. Chylothorax – A rare complication after cardiac surgery (A case report). Acta Medica (Hradec Králove). 2011; 54 (1): 37-39.
- Nejedlý K. Biologie a soustavná anatomie laboratorních zvířat. Státní pedagogické nakladatelství Praha. 1965; 473-474.
- Popesko P. Anatomia hospodárskych zvierat. Príroda Bratislava. 1992.
- Popesko P., Rajtová V., Horák J. Atlas anatomie malých laboratorných zvierat 1. Príroda Bratislava. 1990; 67-78.

# STANOVENIE CITLIVOSTI STAFYLOKOKOVÝCH IZOLÁTOV Z MÄSA KRÁLIKA DIVÉHO (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) NA VYBRANÉ ANTIBIOTIKÁ

Marušková Katarína<sup>1</sup>, Pipová Monika<sup>1</sup>, Jevinová Pavlína<sup>1</sup>, Kmeť Vladimír<sup>2</sup>, Regecová Ivana<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF v Košiciach, <sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť identifikovaných druhov koaguláza-negatívnych izolátov stafylokokov z mäsa králika divého voči siedmim antibiotikám (penicilín, ampicilín, oxacilín, tetracyklín, erytromycín, gentamicín a cefoxitín) s použitím agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy. Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek mäsa z králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) sa získalo 56 izolátov stafylokokov, u všetkých izolátov bola vykonaná druhová identifikácia pomocou zariadenia MALDI BioTyper (Bruker Daltonics Inc, USA), na základe ktorej bolo identifikovaných 29 kmeňov *Staph. warneri*, 20 kmeňov *Staph. epidermidis*, 4 kmene *Staph. capitis*, 2 kmene *Staph. pasteurii* a 1 kmeň *Staph. cohnii* ssp. *cohnii*. Najväčšia citlivosť bola zaznamenaná ku gentamicínu (u 56 kmeňov), cefoxitínu (u 50 kmeňov), oxacilínu (u 47 kmeňov) a penicilínu (u 44 kmeňov). Zároveň bola u všetkých 56 stafylokokových izolátov preukázaná súčasná rezistencia na 2 – 4 testované antibiotiká. Multirezistencia bola najčastejšie potvrdená u kmeňov *Staph. warneri*.

## ÚVOD

Celosvetové, veľmi časté a často nesprávne a nedostatočné užívanie antibiotík počas predchádzajúcich desaťročí viedlo k postupnému a dnes už náhlemu nárastu výskytu mnohých kmeňov baktérií izolovaných od pacientov, pochádzajúcich z nemocničného aj životného prostredia, ktoré sú na tieto antimikrobiálne látky rezistentné (MacPherson a kol., 2009). V podmienkach oslabenej imunity môžu niektoré patogénne kmene stafylokokov spôsobiť vážne infekcie u ľudí a zvierat. Okrem koagulázo-pozitívneho druhu *Staphylococcus aureus* majú klinický význam aj niektoré z koagulázo-negatívnych stafylokokov (KNS), najmä *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* ssp. *saprophyticus* a *S. capitis* (Votava a kol., 2003). Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť identifikovaných druhov koaguláza-negatívnych izolátov stafylokokov z mäsa králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) voči vybraným antibiotikám s použitím agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenie boli odobraté z chrbtovej a stehennej svaloviny králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*) pochádzajúcich z farmového chovu Účelového zariadenia pre chov zverí a rýb v Rozhanovciach (SR). Králiky boli zabitú vykrvením. Základná suspenzia a ďalšie desaťnásobné riedenia sa pripravili podľa pokynov STN EN ISO 6887-2/01. Z odobratých vzoriek boli stafylokoky izolované v zmysle pokynov STN EN ISO 6888-1/A1. Druhová identifikácia bola vykonaná použitím hmotnostnej spektrometrie proteínových profilov vyhodnocovaných systémom MALDI BioTyper<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics Inc, USA). Všetky izoláty stafylokokov boli podrobené skúmkavkovej plazmokoagulázovej skúške (Staphylo PK, Imuna, SR) a testu na produkciu deoxyribonukleázy (DNázy) na DNázovom agare (Oxoid, Veľká Británia). Citlivosť jednotlivých izolátov stafylokokov na vybraných sedem antibiotík (penicilín, ampicilín, oxacilín, tetracyklín, erytromycín, gentamicín a cefoxitín) bola zisťovaná pomocou agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy. Výsledky boli vyhodnotené podľa interpretačných kritérií stanovených CLSI (2012), na základe ktorých boli jednotlivé izoláty zaradené medzi rezistentné (R), intermediárne citlivé (I) alebo citlivé (C).



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením vzoriek z chrbtovej a stehennej svaloviny králikov divých (*Oryctolagus cuniculus*) sa získalo 56 izolátov stafylokokov. Všetky izoláty boli na základe výsledkov skúmavkovej plazmokoagulátovej skúšky koaguláza-negatívne (KNS) a prítomnosť DN-ázy sa u nich nepotvrdila. Pomocou systému MALDI BioTyper™ bola u týchto izolátov vykonaná druhová identifikácia, na základe ktorej bolo identifikovaných 29 kmeňov *S. warneri*, 20 kmeňov *S. epidermidis*, 4 kmene *S. capitis*, 2 kmene *S. pasteurii* a 1 kmeň *S. cohnii* ssp. *cohnii*. Všetky kmene boli podrobené testovaniu citlivosti na vybrané antibiotiká pomocou agarovej dilučnej a diskovej difúznej metódy.

Vychádzajúc z dosiahnutých výsledkov (Tab. 1 a 2) bola u izolátov *S. warneri*, *S. epidermidis* a *S. pasteurii* oboma metódami najčastejšie zaznamenaná citlivosť ku gentamicínu, cefoxitínu a oxacilínu. U kmeňov *S. capitis* bola najčastejšie potvrdená citlivosť ku gentamicínu, cefoxitínu a tetracyklínu. Izolát *S. cohnii* ssp. *cohnii* a bol citlivý na gentamicín, erytromycín a tetracyklín.

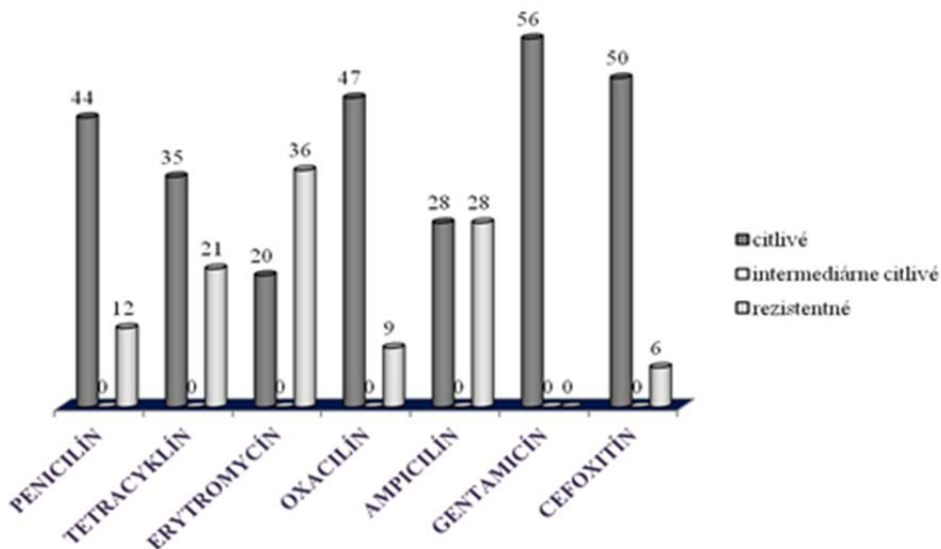
Tabuľka 1: Prehľad počtu rezistentných (R), intermediárne citlivých (I) a citlivých (C) izolátov stafylokokov z mäsa králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) na penicilín, tetracyklín, erytromycín a oxacilín

Druh	Počet izolátov	Penicilín			Tetracyklín			Erytromycín			Oxacilín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S.warneri</i>	29	7	0	22	4	0	25	11	0	18	3	0	26
<i>S.epidermidis</i>	20	0	0	20	15	0	5	20	0	0	4	0	16
<i>S.capitis</i>	4	4	0	0	0	0	4	3	0	1	1	0	3
<i>S.pasteurii</i>	2	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>S.cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

Tabuľka 2: Prehľad počtu rezistentných (R), intermediárne citlivých (I) a citlivých (C) izolátov stafylokokov z mäsa králika divého (*Oryctolagus cuniculus*) na ampicilín, gentamicín a cefoxitín

Druh	Počet izolátov	Ampicilín			Gentamicín			Cefoxitín		
		R	I	C	R	I	C	R	I	C
<i>S.warneri</i>	29	23	0	6	0	0	29	3	0	26
<i>S.epidermidis</i>	20	0	0	20	0	0	20	2	0	18
<i>S.capitis</i>	4	4	0	0	0	0	4	0	0	4
<i>S.pasteurii</i>	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
<i>S.cohnii</i> ssp. <i>cohnii</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0

Z grafu 1 je zrejmé, že z celkového počtu stafylokokových izolátov bola najčastejšie zaznamenaná citlivosť ku gentamicínu (56 kmeňov), cefoxitínu (50 kmeňov), oxacilínu (47 kmeňov) a penicilínu (44 kmeňov). Zároveň bola u všetkých 56 kmeňov bola preukázaná súčasná rezistencia na 2 – 4 testované antibiotiká. Multirezistencia bola najčastejšie potvrdená u kmeňov *S. warneri*.



Graf 1: Citlivosť izolátov stafylokokov z mäsa kráľika divého na vybrané antibiotiká

Uvedené výsledky nie je možné porovnať s podobnými výsledkami iných autorov, pretože tieto v súčasnosti zatiaľ nie sú k dispozícii. Väčšina autorov vo svojich prácach týkajúcich sa stafylokokov izolovaných z mäsa králikov uvádza výsledky štúdia najvýznamnejšieho koaguláza-pozitívneho druhu *S. aureus* (Vancrayenest a kol., 2006; Simonová a kol., 2007).

*Spracovanie príspevku bolo podporené grantom VEGA MŠ SR č. 1/0067/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- CLSI document M100-S22; CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd informational supplement.. Wayne, PA, USA. 2012, 184 s.
- MacPherson, D.W., Gushulak, B.D., Baine, W.B., Bala, S., Gubbins, P.O., Holtom, P., Segarra-Newnham, M.: Population mobility, globalization and antimicrobial drug resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009; 15, s. 1727-1732.
- STN EN ISO 6887-2/01 Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 2: Špecifické pokyny na úpravu mäsa a mäsových výrobkov (ISO 6887-2: 2003).
- 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 (ISO 6888-1: 1999/Amd 1: 2003).
- Simonová, M., Fotta, M., Lauková, A.: Characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from rabbits. *Folia Microbiol.* 2007; 52 (3), s. 291-296.
- Vancrayenest, D., Haesebrouck F, Deplano A, Denis O, Godard C, Wildemauwe C, Hermans, K.: International dissemination of a high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* clone. *J. Vet. Med.* 2006; 53: s. 418 – 422.
- Votava, M. a kol. Lékařská mikrobiologie speciální. *Neptún*, Brno, 2003, 495 s.

## NEOČAKÁVANÉ SPRÁVANIE U NETOPIEROV ODHALENÉ ANALÝZOU ZIMNÉHO GUÁNA

Miková E.<sup>1</sup>, Arrizabalaga A.<sup>2</sup>, Arriolabengoa M.<sup>3</sup>, Zaldibar B.<sup>2</sup>, Boldogh S.<sup>4</sup>, Goiti U.<sup>2</sup>, Uhrin M.<sup>1</sup>, Aihartza J.<sup>2</sup>, Garin I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra zoológie, Ústav biologických a ekologických vied, Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, <sup>2</sup> Department of Zoology and Animal Cell Biology, Faculty of Science and Technology, UPV/EHU, Basque Country, <sup>3</sup> Department of Minerology and Petrology, Faculty of Science and Technology, UPV/EHU, Basque Country, <sup>4</sup> Aggtelek National Park Directorate, Jósvalfő, Hungary

### ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo charakterizovať zloženie gélovitého zimného trusu podkovára južného (*Rhinolophus euryale*), zanalyzovať ho a opísať. Využitím binokulárnej lupy sme morfológicky zhodnotili uniformitu celej analyzovanej vzorky, pričom všetky pelety vzorky boli tvorené mukóznym materiálom zvonka a homogénnou masou vnútri. Genetickými metódami sme potvrdili netopierí pôvod tohto typu trusu, pričom trus neobsahuje žiadne zvyšky koristi, hmyzu. Z cytologického hľadiska trus neobsahuje žiadne bunky, ak, tak len ich fragmenty, naopak je bohatý na mukóznym materiál. Geologickou analýzou sme zistili, že masa vnútri je tvorená ako organickým, tak aj anorganickým materiálom, ktorý po mikroskopickej analýze zodpovedá fosfátu, uhličitanu vápenatému a ílom. Rovnako sme potvrdili aj prítomnosť čiastočiek kremeňa, fytolitov a sferulity tvorené šľaveľanom vápenatým. Využitím difrakcie X-lúčmi sme v anorganickej zložke trusu charakterizovali kremeň, kalcit a íly.

### ÚVOD

Hibernácia, ako stratégia pre prežitie zimného obdobia u temperátnych druhov netopierov je všeobecne prijatý fakt, ktorý však v poslednom čase začína strácať na jednoznačnosti a zdá sa byť systémom omnoho dynamickejšim ako sa predpokladalo. Hibernácia je počas zimy prerušovaná mnohými prebudeniami, ktoré môže sprevádzať lov alebo pitie jedincov (Daan 1973, Ransome 1990, Avery 1985, Brack a Twente 1985, Duvergé a Jones 1994, Zupal a kol. 2005). Zatiaľ nie je známe, čo prebudenia vyvoláva a ktorý faktor je za ne zodpovedný. Posledné tri zimné sezóny sa venujeme analýzám zimného trusu produkovaného druhom podkovár južný (*Rhinolophus euryale*) na území Slovenského a Aggteleckého krasu. V práci Miková a kol. 2013 sme popísali jedinečný typ trusu, ktorý je produkovaný počas celého zimného obdobia a po morfológickej stránke neobsahuje žiadne zvyšky potravy. Morfológicky sa tento trus skladá len z amorfnej gélovitej hmoty a často krát chlupov jeho producentov. V tejto práci sa venujeme bližšej analýze tohto typu trusu z morfológického, genetického, cytologického a geologického hľadiska.

### MATERIÁL A METODIKA

Vzorka netopierieho trusu bola zberaná z fólie umiestnenej pod hibernačnou agregáciou počas jednej noci, z 29. 1. 2014 na 30. 1. 2014 v najväčšom hibernákule druhu *Rhinolophus euryale* v rámci výskytu v regióne Gömör-Turňa, jaskyni Baradla (340 m, 48,5°N, 20,5° E) (Uhrin a kol. 2012). Odobrali sme 180 peletov trusu, po 15 do jednej skúmavky typu eppendorf naplnenej 98% alkoholom. Kolónia je monošpecifická z dlhodobého hľadiska, v čase odberu bolo druhové zloženie vizuálne skontrolované, pričom počet jedincov v čase odberu bol 4231.

Všetky vzorky boli analyzované pod binokulárnou lupou na potvrdenie uniformity celej vzorky, kontrolovali sme prezenciu resp. absenciu organickej a anorganickej zložky a prítomnosť fragmentov potravy. Exaktná analýza trusu zberaného rovnakým spôsobom počas

dvoch zimných sezón (2011-2012 a 2012-2013), bola už prevedená (pozri Miková a kol. 2013 a Miková 2013).

Previedli sme DNA analýzu dvanástich vzoriek (jedna skúmavka / vzorka). DNA bola extrahovaná z vybraných peletov pomocou QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, UK). DNA extrakty boli namnožené využitím forward a reverse primerov amplifikáciou 16s mitochondriálnej DNA na potvrdenie netopierieho pôvodu. Použili sme HotStar Taq Plus Master Mix Kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, UK); PCR mix pre každú vzorku (20 µl) bol: 13 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl 10x Buffer, 0,4 µl MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µl dNTP, 1 µl z forward aj reverse primerov (konečná koncentrácia v reakcii 0,5 µM), 0,12 µl HotStar Taq plus DNA polymerázy a 2 µl z každej vyextrahovanej DNA vzorky. Jedna negatívna a jedna pozitívna kontrola bola zahrnutá do každej PCR. Ako pozitívnu kontrolu sme použili extrahovanú DNA z biopunchu tkaniva *Rhinolophus euryale*. Ďalšiu PCR sme previedli na potvrdenie prezencie hmyzej DNA vo vzorkách trusu. Pomocou primerov ZBJ-Artc sme zmnožili 157bp región COI génu: cytochróm C oxydázová podjednotka I mitochondriálnej DNA. Použili sme Multiplex PCR Kit (Qiagen Ltd., Crawley, West Sussex, UK); PCR mix pre každú vzorku (20 µl) bol: 10 µl 2x Multiplex Buffer, 0,4 µl z forward aj reverse primerov (konečná koncentrácia v reakcii 0,2 µM), 8,2 µl ddH<sub>2</sub>O a 1 µl z každej extrahovanej DNA vzorky. Jedna negatívna a jedna pozitívna kontrola bola zahrnutá do každej PCR. Ako pozitívnu kontrolu sme použili extrahovanú hmyziu DNA zo vzoriek trusu *Rhinolophus euryale* z letnej sezóny. PCR produkty boli vizualizované na 1,5% agarózovom géli.

Anorganické zložky vo vzorke boli stanovené petrografickou analýzou na základe parafínových mikroskopických preparátov pod mikroskopom. Podiel zložiek v anorganickej časti vzoriek bol určený difrakciou X-lúčmi. Prítomnosť uhličitanu vápenatého bola testovaná aplikáciou kyseliny chlorovodíkovej.

Ultratenké rezy parafínových bločkov boli špecificky cytologicky farbené na potvrdenie prítomnosti buniek a mukózneho materiálu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetkých 180 peletov trusu bolo uniformných a morfológicky podobných. Z vonkajšej strany ich tvorí mukózný materiál, vnútri homogénna hmota, hnedo-čiernej farby. Z 10 vzoriek z 12 analyzovaných sme úspešne získali 16s mitochondriálne DNA sekvencie, ktoré boli rovnako kvalitné a dlhé ako pozitívna kontrola pochádzajúca z tkaniva. Zo žiadneho analyzovaného peletu nebola vyzolovaná hmyzia DNA. Cytologická analýza preukázala, že vo vzorke sa nenachádzajú žiadne zachované bunky, len ich fragmenty. Špecifické cytologické farbenie zároveň dokázalo prítomnosť mukózneho materiálu na povrchu. Vnútoraná masa je tvorená fosfátom, uhličitanom vápenatým, organickou hmotou a ílom. Podiel organickej hmoty v pelete je asi 30%. Podiel anorganických zložiek je 24% kremeň, 33% kalcit a 43% íly. Ďalej sme potvrdili prítomnosť čiastočiek kremeňa, fytolity a sferulity šťaveľanu vápenatého. Pri morfológickej analýze bol v truse nájdený aj jeden jedinec kmeňa Nematoda.

Význam produkcie tohto typu trusu je stále nejasný. Existuje niekoľko možných hypotéz, ktoré je však treba ďalej testovať a potvrdiť. V prvom rade samotná produkcia trusu je energeticky náročná, rovnako ako prebudenia z hibernácie, ktoré sú na produkciu potrebné. Jedinec okrem energie stráca aj vodu a minerály a nie je jasné, ako tieto straty kompenzuje. Tento špecifický typ trusu neobsahuje žiadne zložky potravy a preto je jeho funkcia zrejme iná ako vylučovanie nestrávených zvyškov potravy. Vysoký podiel anorganickej zložky naznačuje, že ju netopiere musia aktívne prijímať, keďže produkcia de novo je vylúčená. Otázkou ostáva, či má samotný príjem význam alebo je to vedľajší efekt nejakej inej činnosti. Produkcia trusu bez zvyškov potravy by mohla napomáhať odstraňovať odumreté bunky z gastrointestinálneho traktu alebo udržiavať prechodnosť čreva a predchádzať atrofii. Jedným z možných vysvetlení je aj antiparazitické správanie, keďže bol v truse nájdený jeden jedinec

Nematoda. Vysoký podiel minerálnych zložiek nájdených v truse by mohol naznačovať, že netopiere prijímajú minerály počas zimy na doplnenie výdajov. Nie je jasné, ako môže tento proces prebiehať, jedno z možných vysvetlení je, že netopiere pijú vodu bohatú na minerály v jaskynnej rieke Styx lokalizovanej blízko miesta formovanej hibernačnej agregácie. Jaskynná voda (Styx) je bohatá na kalcium, magnézium a bikarbonáty a má pH 7,8 (podľa Borbás a kol. 2011). Sediment v Baradle pochádza z vonkajšieho prostredia a tvorí ho piesok, štrk a bahno. Borbás a kol. (2011) charakterizoval na základe veľkostí častíc a difrakcie X-lúčmi, že hlavný sediment môže byť kvalifikovaný ako prachovitý piesok. Meranie granulometrického zloženia potvrdilo ako hlavný minerál kremeň. Všetky tieto charakteristiky by zodpovedali anorganickým zložkám obsiahnutým v truse. U juhoamerických druhov netopierov je známe, že pijú vodu v takzvaných collpas, čo sú bahníská naplnené vodou bohatou na minerály, kde si dopĺňajú najmä zásoby vápnika alebo iných limitných živín (Bravo a kol. 2008, Brightsmith a kol. 2008, Emmons a Stark 1979, Voigt a kol. 2007). Zatiaľ nejasná je aj prítomnosť fytolitov a sferulitov šľaveľanu vápenatého, ktoré súvisia s rastlinami; fytolity sú generované biomineralizáciou silíc v bunkách rastlinných pletív, sferulity sú tvorené v čreve viacerých druhov živočíchov s najvyšším podielom u prežúvavcov, nízkym u všežravcov a takmer žiadnym u mäsožravcov (Canti 1999). Existuje teda viacero možných vysvetlení pre samotný jav produkcie trusu počas zimy, zároveň jeho význam je stále nejasný, avšak objasnili sme štruktúru a zloženie trusu, ktoré bolo doteraz neznáme. Ďalší výskum v tejto oblasti je nevyhnutný.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Avery M. I. Winter activity of pipistrelle bats. *J. Anim. Ecol.* 1985; 54:721-738.
- Borbás E., Kovács J., Vid G., Fehér K., Hatvani I. G. Water chemistry analysis in the sediment of Baradla Cave, Hungary. *Central European Geology* 2011; 54/4:367–380.
- Brack V., Twente J. W. The duration of the period of hibernation of three species of vespertilionid bats. I. Field studies, *Can. J. Zool.* 1985; 63:2952-2954.
- Bravo A., Harms K. E., Stevens R. D., Emmons L. H. Collpas: activity hotspots for frugivorous bats (Phyllostomidae) in the Peruvian Amazon. *Biotropica* 2008; 40:203-210.
- Brightsmith D. J., Taylor J., Phillips T. D. The roles of soil characteristics and toxin adsorption in avian geophagy. *Biotropica* 2008; 40:766-774.
- Canti M. G. The production and preservation of faecal spherulites: animals, environment and taphonomy. *Journal of Archaeological Science* 1999; 26/3:251-258.
- Daan S. Activity during natural hibernation in three species of vespertilionid bats. *Neth. J. Zool.* 1973; 23:1-71.
- Duvergé P. L., Jones G. Greater horseshoe bats – activity, foraging behaviour and habitat use. *Br. Wildl.* 1994; 6:69-77.
- Emmons L. H., Stark N. M. Elemental composition of a natural mineral lick in Amazonia. *Biotropica* 1979; 4:311-313.
- Miková E. Potrava a aktivita podkovára južného (*Rhinolophus euryale*) v okrajových častiach sezóny. Diplomová práca, 2013: 58 pp. + prílohy [Depon. in Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice].
- Miková E., Varcholová K., Boldogh S., Uhrin M. Winter diet analysis in *Rhinolophus euryale* (Chiroptera). *Cent. Eur. J. Biol.* 2013; 8: 848-853.
- Ransome R. D. *The Natural History of Hibernating Bats.* Christopher Helm, Kent, 1990.
- Uhrin M., Boldogh S., Bücs S., Paunović M., Miková E., Juhász M., Csösz I., Estók P., Fulín M., Gombkötő P., Jéré C., Barti L., Karapandža B., Matis Š., Nagy Z. L., Szodoray-Paradi F. & Benda P. Revision of the occurrence of *Rhinolophus euryale* in the Carpathian region, Central Europe. *Vespertilio* 2012; 16:289–328.
- Voight C. C., Dechmann D. K. N., Bender J., Rinehart B. J., Michener R. H., Kunz T. H. Mineral licks attract neotropical seed-dispersing bats. *Research Letters of Ecology* 2007; Article ID 34212, doi:10.1155/2007/34212.
- Zukal J., Berková H., Řehák Z. Activity and shelter selection by *Myotis myotis* in the Kateřinská cave (Czech Republic). *Mamm. Biol.* 2005; 70:271-281.

## **HODNOTENIE SPRÁVANIA ŠTENIAT NEMECKÉHO OVČIAKA V OPEN FIELD TESTE POČAS ONTOGENÉZY**

Miňo, I. , Kottferová, J. , Lešková L. , Kachnič, J. , Haladová E. , Matos, R.

*Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, UVLF v Košiciach*

### **ABSTRAKT**

V práci bolo sledovaných 6 šteniat Nemeckého ovčiaka vo veku 5, 7 a 9 týždňov. Testovanie bolo vykonávané v chovnej stanici služobných psov v Moravskom svätom Jáne v experimentálnej miestnosti Open field, ktorá bola vybavená kamerovým systémom. Zo záznamu bola vyhodnocovaná aktivita šteniat, miera vokalizácie a reakcia na zvuk. Výsledky poukazujú na výrazne rozdiely správania počas testu Open field v priebehu ontogenézy.

### **ÚVOD**

Temperament psov sa skúma čoraz intenzívnejšie hlavne za účelom lepšieho spoznania a využitia charakterových vlastností zvierat v praxi. Väčšina štúdií sa zameriava na selekciu šteniat pre umiestnenie psov do vhodných domovov (Campbell, 1975; Fogle, 1990; Van Den Borg et al., 1991; B; Coren, 1995), selekciu vodiacich psov pre nevidiacich alebo terapeutických psov (Pfaffenberger, 1963; Schaffer & Phillips, 1993; Murphy, 1995), určovaním vplyvu genetických predispozícií na správanie psov ( Reuterwall & Ryman, 1973; Greyvenstein, 1982), posudzovaním temperamentu psov v útlkoch (Coren, 1995) a skúmaním či behaviorálne testy môžu byť použité pre výber psov pre rôzne druhy práce a chovateľstvo (Wilsson & Sundgren, 1997). Ostatné štúdie založené na behaviorálnych testoch slúžia k predikcii vhodných služobných psov pre políciu a ozbrojené sily (Reuterwall & Ryman, 1973). Za účelom hodnotenia temperamentu šteniat Nemeckého ovčiaka bolo cieľom našej práce pozorovať správanie šteniat v 5., 7. a 9. týždni veku v experimentálnej miestnosti Open field. V priebehu posledných 40 rokov sa Open field test vyvinul ako bežne používaný nástroj pre meranie správania zvierat. Prvotným autorom Open field testu bol Calvin Hall (Hall 1934; Hall & Ballechey 1932), ktorý používa elimináciu v Open field-e ako index bojzlivosti. Naša práca poukazuje na rozdiely správania šteniat v Open field-e počas ontogenézy.

### **MATERIÁL A METODIKA**

Testovaných bolo 6 šteniat toho istého vrhu, ktoré boli chované v rovnakých podmienkach. Tento vrh pochádzal z chovateľskej stanice policajných služobných psov v Moravskom svätom Jáne. Šteňatá boli testované jednotlivo v 5., 7. a 9. týždni veku. Behaviorálne testovanie bolo realizované podľa presne stanovenej metodiky. V závislosti od typu testu bolo spracované individuálne bodové hodnotenie a celkové hodnotenie správania výberom z vopred zostavenej škály možných reakcií. Nástup vokalizácie sa meral v sekundách. Každé šteňa bolo do testovacej miestnosti vložené samostatne na dobu 5 minút.

Priebeh všetkých testovacích postupov bol zaznamenaný pomocou kamerového systému. Experimentálna miestnosť Open field bola rozdelená na štvorce na základe čoho sa zaznamenávala motorická aktivita - počet prekročených štvorcov (oboma hrudníkovými končatinami). Okrem toho sa meral čas nástupu prvých vokalizačných prejavov od vloženia do miestnosti, hodnotila sa taktiež celková miera vokalizácie počas celej doby pobytu šteňaťa v testovacej miestnosti a reakcia na zvuk (búchanie päťou na dvere). Dosiahnuté výsledky jednotlivých šteniat boli hodnotené z videozáznamu troma nezávislými pozorovateľmi a zaznamenávané do hodnotiaceho formuláru.

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené v programe MedCalc, verzia 13.2. Súbor boli testované na normalitu rozdelenia D'Agostino-Pearson testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dosiahnuté výsledky jednotlivých šteniat v 5., 7. a 9. týždni veku sú zobrazené v tabuľkách číslo 1., 2. a 3.

Tabuľka č. 1

5. týždeň	nástup vokalizácie /s.	vokalizácia celkovo	pohybová aktivita	reakcia na zvuk	Open field celkovo
ŠTEŇA č. 1	27,00	2,00	13,67	2,00	1,33
ŠTEŇA č. 2	14,00	2,00	36,33	2,00	2,00
ŠTEŇA č. 3	50,00	1,33	25,33	2,00	1,33
ŠTEŇA č. 4	10,33	2,00	8,00	4,00	2,00
ŠTEŇA č. 5	14,00	1,33	31,67	2,00	2,00
ŠTEŇA č. 6	15,33	2,00	25,00	2,67	1,00

Tabuľka č. 2

7. týždeň	nástup vokalizácie /s.	vokalizácia celkovo	pohybová aktivita	reakcia na zvuk	Open field celkovo
ŠTEŇA č. 1	5,33	4,00	15,00	2,00	2,00
ŠTEŇA č. 2	3,67	1,33	35,67	2,00	1,00
ŠTEŇA č. 3	15,00	1,67	34,33	2,00	1,33
ŠTEŇA č. 4	5,00	2,00	21,00	2,00	1,67
ŠTEŇA č. 5	25,00	1,00	19,33	2,00	1,00
ŠTEŇA č. 6	30,00	1,00	19,33	1,00	2,00

Tabuľka č. 3

9. týždeň	nástup vokalizácie /s.	vokalizácia celkovo	pohybová aktivita	reakcia na zvuk	Open field celkovo
ŠTEŇA č. 1	1,33	3,33	39,33	1,00	1,33
ŠTEŇA č. 2	14,00	1,67	24,00	1,00	2,00
ŠTEŇA č. 3	5,00	4,00	24,00	1,67	2,00
ŠTEŇA č. 4	5,00	1,67	18,67	2,00	1,67
ŠTEŇA č. 5	24,67	1,00	44,67	2,00	1,00
ŠTEŇA č. 6	10,00	3,33	41,33	1,00	1,00

Výsledky testovania poukázali na individuálne rozdiely medzi jedincami, ale najmä na výrazne rozdiely medzi 5., 7. a 9. týždňom veku. Tieto rozdiely svedčia o rýchlom ontogenetickom vývoji šteniat v tomto období. Testované psy sú s pribúdajúcim vekom aktívnejšie, lepšie reagujú na podnety, znášajú odlúčenie a prejavuje sa u nich menej strachových reakcií pri teste na neznámy zvukový podnet. Nástup prvých vokalizačných prejavov je s pribúdajúcim vekom rýchlejší. Šteňatá v siedmom týždni začínali vokalizovať v experimentálnej miestnosti v priemere o 7,77 sekundy skôr ako pri testovaní v piatom

týždni veku. Rozdiely v nástupe vokalizácie medzi piatym a deviatym týždňom bol v priemere až 11,77 sekundy. Hodnotenie celkovej vokalizácie počas celého pobytu v experimentálnej miestnosti sa zlepšovalo priamo úmerne s vekom šteniat. Motorická aktivita mala narastajúcu tendenciu. Jedince testované v piatom týždni veku prekonalí v priemere 23,33 štvorcov za 5 minút. Pri testovaní v siedmom týždni bola priemerná motorická aktivita 24,11 prekonaných štvorcov a v deviatom týždni až 32 štvorcov. Tento výsledok dokazuje, že šteňatá sú s pribúdajúcim vekom aktívnejšie a prejavuje sa u nich intenzívnejšie exploračné správanie. Reakcia na neznámy zvuk bola hodnotená v škále od 1 do 4 bodov, pričom štyrmi bodmi boli hodnotené psy ktoré vôbec nereagovali na tento zvukový podnet, tri body získali šteňatá, u ktorých sme pozorovali strachové reakcie a odbiehanie, dva body boli udelené šteňatám, ktoré spozorneli a prejavili záujem. Najlepšie hodnotenie, jeden bod získali šteňatá, ktoré reagovali bezprostredne vyskakovaním na dvere. V piatom týždni dosiahli šteňatá priemerné bodové hodnotenie 2,445 bodu, v siedmom týždni 1,833 bodu a v deviatom týždni 1,445 bodu. Z toho vyplýva, že reakcia na neznámy zvukový podnet bola menej výrazná s pribúdajúcim vekom šteniat. Celkové hodnotenie správania v experimentálnej miestnosti Open field bolo bodované na stupnici od 1 do 3 bodov, pričom 1 bod predstavoval intenzívne exploračné správanie, časté vyskakovanie na steny a dvere miestnosti a vzpriamený postoj psa počas väčšiny času stráveného v experimentálnej miestnosti, oproti tomu 3 body predstavovali prítomnosť strachových reakcií, exploračné správanie spojené s chaotickým pobíhaním, stiahnuté uši a chvost. Priemerné bodové skóre dosiahnuté v piatom týždni veku bolo 1,66 bodu. V siedmom a deviatom týždni dosiahli testované šteňatá priemerne 1,5 bodu.

Diederich a Giffroy našli dôkaz, že otázka spoľahlivosti a platnosti behaviorálnych testov ako je aj Open field je nízka obzvlášť pri testoch vykonaných na mladých psoch. (Diederich & Giffroy, 2006). My sa tak isto prikláňame k testovaniu šteniat najskôr v siedmom resp. deviatom týždni. Dôležitým aspektom je aj veľkosť experimentálnej miestnosti. Veľkosť miestnosti závisí na výbere autorov testu. Napríklad 3-4 týždňové šteňatá plemena Basenji, ktoré testoval Stanley & Elliot (1962) mali k dispozícii miestnosť s rozlohou 13,3m<sup>2</sup>. Wright (1983) testoval 5,5-8,5 týždňov staré šteňatá nemeckého ovčiaka a bigla v miestnosti s rozlohou 6,25m<sup>2</sup>. Baudet (1990) testoval 7-16 týždňové šteňatá šiestich plemien vrátane toy pudla a nemeckého vlčiaka v miestnosti s rozlohou 3,35m<sup>2</sup>. Open-field test slúži na vyvolanie emocionálnych reakcií alebo exploračného správania u šteniat a preto by veľkosť miestnosti mala byť prispôbená veľkosti testovaného zvierat'a.

Pri testovaní šteniat môžeme sledovať ich vývoj správania a napredovanie opakovaným testovaním v ďalších obdobiach ich života (Fox & Spencer, 1969; Wright, 1983), čím dlhšie jedince pozorujeme, tým presnejšie môžeme predpovedať aké vlastnosti budú mať v dospelosti a aké by bolo ich najvhodnejšie využitie, napríklad ako vodiace psy (Pfaffenberger & Scott, 1976; Goddard & Beilharz, 1984), policajné psy (Verga, 1983; Fält, 1984), vojenské vyhľadávacie psy (Rooney et al., 2003), alebo psy do domácnosti (Campbell, 1975). Záverom môžeme konštatovať, že testovanie v piatom týždni veku nie je objektívne, u šteniat sa vyskytujú strachové reakcie, exploračné správanie je obmedzené, šteňatá zle reagujú na odlúčenie a výsledky testov v tomto veku nie sú smerodajné. Ďalším testovaním sme dokázali, že behaviorálne testy vo veku 7 a 9 týždňov poukazujú na väčšie individuálne rozdiely a majú väčšiu výpovednú hodnotu.

*Táto práca bola podporená z projektu VEGA 1/0727/12.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Beaudet et al., 1994. Predictive value of activity level and behavioural evaluation on future dominance in puppies. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 40 (1994), pp. 273–284



- Campbell, W.E., 1975. Behaviour Problems in Dogs. American Veterinary Publications, Santa Barbara, CA, pp. 160-165
- Coren S. : The Intelligence of Dogs, New York 1995
- Diederich, C., Giffroy, J-M., 2006. Behavioural testing in dogs: A review of methodology in search for standardization. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 97, 51-72
- Fält, L., 1984. Inheritance of behaviour in the dog. Anderson, R.S. (Ed.), *Nutrition and Behaviour in Dogs and Cats*, Pergamon Press, New York (1984), pp. 183-187
- Fogle, B., 1990. *The Dog's Mind*. Penquin Books, New York, p. 271
- Fox, M.W., Spencer, J.W., 1969. Exploratory behaviour in the dog: experiential or age dependent? *Dev. Psychol.*, 2 (2) (1969), pp. 68-74
- Goddard, M.E. and Beilharz, R.G., 1984. A factor analysis of fearfulness in potential guide dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 12: 253-65
- Greyvenstein, J.M., 1982. Die oorerwing van prakties – belangrike kenmerke by werkshonde. MSc-verhandeling in die Fakultiet Wisen Natuurkunde, Universiteit van Pretoria, Pretoria.
- Hall, CS; Ballachey EL (1932). "A study of the rat's behavior in a field: a contribution to method in comparative psychology." *University of California Publications in Psychology* 6: 1-12
- Murphy, J.A., 1995. Assesment of teh temperament of potential Guide Dogs. *Anthrozoos* 111
- Pffafenberger, J.C., 1963. *The New Knowledge of Dog Behavior*. Howell Book House, New York, pp. 164
- Reuterwall, C., Ryman, N., 1973. An estimate of the magnitude of additive genetic variation of some mental characters in Alsatian dogs. *Hereditas* 73, 277-284
- Rooney et al., 2003. How predictive are puppy tests? Evidence from a puppy walking programme for military search dogs. *Proceedings of the 37th International Congress of the ISAE, Abano Terme, Italy, June 24-28 (2003)*, p. 41
- Schaffer, C.B., Phillips J., 1994. The Tuskagee behaviour test for selecting therapy dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 39 (1994), p. 192
- Stanley, W.C., Elliot, O., 1962. Differential human handling as reinforcing events and as treatments influencing later social behaviour in basenji puppies. *Psychol. Rep.*, 10 (1962), pp. 775-788
- Van Den Borg, J., Netto, W.J., Planta, D.J., 1991. Behavioural testing of dogs in animal shelters to predict problem behaviour. *Applied Animal Behaviour Science* 32, 237-251
- Verga, M., 1983. Relative influence of genetic and environmental factors on the behaviour of German Shepherd dogs and Rottweilers. *The human-pet relationship. Aust. Acad. Sci.* (1983), pp. 89-97
- Wilsson, E., Sundgren, P.-E., 1997. The use of a behaviour test for selection of dogs for service and breeding, I: Method of testing and evaluating test results in the adult dog, demands on different kinds of service dogs, sex and breed differences. *Applied animal behaviour science*, 53 (1997) 279-295
- Wright, J.C., 1983. The effects of differential rearing on exploratory behaviour in puppies. *Appl. Anim. Ethol.*, 10 (1983), pp. 27-34

## ÉTERICKÉ OLEJE V ŽIVOČÍŠNOM ORGANIZME (MINIREVIEW)

Oceľová V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Éterické oleje sú prchavé kvapaliny rastlinného pôvodu zložené zo zmesi lipofilných látok, ktoré pochádzajú zo sekundárneho metabolizmu rastlín. Éterické oleje sú zvyčajne prchavé už pri izbových teplotách a vyparujú sa bezo zvyšku. Aktívne látky sa vyznačujú malou molekulovou hmotnosťou. Keďže sa éterické oleje vyskytujú v potrave ako prirodzená súčasť rastlín, v živočíšnom organizme sa vyvinuli mechanizmy na ich biotransformáciu a elimináciu. Počas týchto procesov sa môže meniť chemická povaha daných látok, čím sa stávajú biologicky aktívnymi a svojimi účinkami môžu ovplyvniť fyziologické procesy živočíšneho organizmu.

### ÚVOD

Po absorpcii rastlinných látok do organizmu, nastáva ich premena. Cesty vstupu jednotlivých zložiek do organizmu môžu byť rôzne (sliznice, koža, gastrointestinálny trakt, inhalácia) a ich metabolizácia môže prebiehať už v danom tkanive, avšak hlavným orgánom biotransformácie týchto látok je pečeň. Zmetabolizované látky sú krvou distribuované do rôznych orgánov alebo sú vylúčené z organizmu.

### BIOTRANSFORMÁCIA ZLOŽIEK ÉTERICKÝCH OLEJOV V ŽIVOČÍŠNOM ORGANIZME

Úlohou biotransformácie je hlavne zmena fyzikálno-chemických vlastností daných látok, čím sa umožní ich vylúčenie z tela. Počas metabolizmu sa mení polarita zložiek a ich rozpustnosť vo vode, čo umožňuje ich elimináciu z organizmu. Hydrofilné zlúčeniny sa z krvi ľahko odstránia a vylúčia sa obličkami.

Biotransformácia zahŕňa všetky procesy metabolickej premeny látok, ktoré sú pre organizmus cudzorodé. V niektorých prípadoch vznikne metabolit, ktorého účinky sú odlišné v porovnaní s pôvodnou látkou. Enzýmy podieľajúce sa na biotransformácii, sa nachádzajú v membránach endoplazmatického retikula buniek pečene, obličiek, tráviacej sústavy, pľúc, kože a iných tkanív. Hlavným orgánom metabolizmu je pečeň, ktorej aciny sú zásobené krvou obsahujúcou živiny a zložky vstrebané do organizmu.

#### I. FÁZA BIOTRANSFORMÁCIE

V prvej fáze biotransformácie prebiehajú najmä redoxné reakcie a hydrolyza. Molekula rastlinnej látky prijíma reaktívne skupiny -OH, -COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH. Prostredníctvom týchto skupín sa molekula môže neskôr zapojiť do konjugovaných reakcií v druhej fáze.

Do prvej fázy sú zahrnuté aj NADPH, NADH, dvojmocné katióny a molekulový kyslík. Pri biotransformácii prvej fázy sa využíva aktivita enzýmov patriacich do skupiny cytochróm P 450 (CYP 450).

Jednotlivé izoformy CYP 450 sa môžu viac alebo menej podieľať na metabolizme konkrétnych zlúčenín. Pri metabolizme tymolu a karvakrolu *in vitro* sa v prvej fáze metabolizmu preukázala aktivita izoforiem CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2B6 a CYP 2A6, pričom ako hlavný enzým pri metabolizme týchto zlúčenín bol identifikovaný CYP 2A6 (Dong, 2012a).

#### II. FÁZA BIOTRANSFORMÁCIE

Konjugácia predstavuje druhú fázu metabolizmu, keď vznikajú konjugáty kyseliny glukuronovej, sírovej, glycínu, glutamínu a glutatiónu. Vznikajú aj rozličné acylderiváty

a metylované zlúčeniny. Medzi enzýmy katalyzujúce reakcie druhej fázy patria glutatión-S-transferáza, UDP-glukuronozyltransferáza, gama-glutamyltranspeptidáza, metylázy a iné.

Doposiaľ bolo u cicavcov stanovených niekoľko izoformiem UDP-glukuronyltransferáz podieľajúcich sa na glukuronidácii. Koncentrácie metabolitu glukuronidu v danom experimente boli najvyššie v pečňových mikrozómoch u potkanov v porovnaní s inými druhmi (gerbil, morča, králik, človek, škrečok, myš). Výsledky poukazujú na fakt, že intenzita metabolizmu a aktivita enzýmov glukuronizácie môže byť rôzna u viacerých živočíšnych druhov (Kanoh a kol., 2011).

Pri pokuse *in vitro*, kde sa skúmala glukuronidácia karvakrolu, bola preukázaná účasť izoformiem UGT 1A3, UGT 1A6, UGT 2B7, UGT 1A9 a UGT 1A7. Za hlavné enzýmy katalyzujúce túto reakciu sa považujú izoformy UGT 1A9 a UGT 1A7. Predpokladá sa, že enzým UGT 1A9 je hlavným enzýmom glukuronidácie karvakrolu v pečeni, pričom katalytická činnosť UGT 1A7 je dôležitá najmä v intestinálnych bunkách (Dong a kol., 2012 a,b).

Pokusy naznačujú, že konkrétne izoformy enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii sa rôznou aktivitou zúčastňujú metabolizmu a ich koncentrácia v jednotlivých tkanivách je rôzna.

Niektoré zložky éterických olejov podstúpia metabolickú premenu pôsobením enzýmov črevnej mikroflóry ešte v tráviacom trakte a až potom sú vstrebávané enterocytmi. Podľa Rubió a kol. (2012) mikrobiálne esterázy pravdepodobne hydrolyzujú esterové väzby aromatických fenolových zlúčenín ako aj kyseliny rozmarínovej pochádzajúcej z rozmarínu.

Podobným spôsobom môžu byť metabolizované viaceré rastlinné zložky, keďže črevná mikroflóra tráviaceho traktu má schopnosť katalyzovať p-dehydroxyláciu polyfenolov s katecholovou skupinou (Wang a kol., 2001).

Dané experimenty čiastočne vysvetľujú vplyv črevnej mikroflóry na metabolizmus a vstrebávanie sekundárnych metabolitov rastlín, čo by mohlo objasniť napríklad nízky biologický účinok týchto látok na organizmus. Pri metabolizme rastlinného polyfenolu resveratrolu sa až 50% prijatej dávky mení vplyvom bakteriálnych enzýmov už v čreve (Walle, 2011).

Po absorpcii xenobiotík do enterocytov nemusí zákonite dôjsť k ich prechodu do krvi, keď zlúčeniny neprejdú cez bazálnu membránu enterocytu. Na apikálnej strane buniek membrán sa nachádzajú „efflux proteíny“ (P-glycoprotein, MRP2), ktoré môžu danú molekulu transportovať späť do lúmenu čreva, čím sa zabráni jej prechodu do krvného obehu. V inom prípade látka v enterocyte môže podstúpiť fázu I a fázu II biotransformácie. Počas tejto metabolizácie môže nastať inaktivácia zlúčeniny, alebo sa tieto látky stanú substrátom pre prenášače a prejdú cez bazálnu membránu. Látky, ktoré sa dostanú do krvi z čreva, sú transportované do pečene. Tam sa môžu ďalej metabolizovať alebo sa exkretujú žľou späť do čreva (Chan a kol., 2004).

Biotransformácia môže prebiehať aj v iných metabolicky aktívnych tkanivách, v ktorých sa nachádzajú potrebné enzýmy. Pri pokusoch sledujúcich koncentrácie resveratrolu a jeho metabolitov v tkanivách, sa najvyššie množstvá namerali práve v tkanivách žalúdka, čreva, pečene a obličiek (Juan a kol., 2010). Výsledky daných pokusov poukazujú na vysoké koncentrácie sledovaných látok v tkanivách, ktoré sa pravdepodobne zúčastňujú absorpcie aj metabolizácie.

Teng a kol. (2012) predpokladajú, že u polyfenolov použitých v danom pokuse prebehla II. fáza metabolizmu práve v črevných enterocytoch. Časť glukuronidov a sulfátov sa vstrebala do krvného obehu, zatiaľ čo časť bola enterocytmi exkretovaná späť do lúmenu čreva. Táto hypotéza podporuje aj výsledky experimentov súvisiacich s efflux transportérmi (Chan a kol., 2004; Suzuki a Sugiyama, 2000).

Výsledky pokusov poukazujú na súčinnosť črevných enzýmov podieľajúcich sa na biotransformácii a črevných transportérov, ktoré zodpovedajú za prenos molekuly xenobiotika cez membránu enterocyту (Suzuki a Sugiyama, 2000; Chan a kol., 2004; Teng a kol., 2012).

Exogénne prijatá molekula, ktorá „unikne“ metabolizmu v enterocyte je pomocou transportéru vylúčená späť do lúmenu čreva. Následne tá istá molekula môže byť znova transportovaná do vnútra enterocyту a znova vylúčená bez zmeny (Benet a kol., 1999; Suzuki a Sugiyama, 2000).

Organizmus sa prostredníctvom týchto procesov pravdepodobne „vyhýba“ niektorým látkam, pričom sa snaží zabrániť ich absorpcii cez sliznice, alebo ak sa absorbujú, snaží sa čo najrýchlejšie ich z tela vylúčiť (pomocou biotransformácie a exkrécie).

*Tento výskum je podporovaný grantovou agentúrou pre podporu vedy VEGA No. 2/0052/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wacher VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J. Control. Release.* 1999; 62:25–31.
- Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Ge GB, Cao YF, Li XB, Hu CM, Yang L, Liu ZY. Identification of CYP isoforms involved in the metabolism of thymol and carvacrol in human liver microsomes (HLMs). *Pharmazie.* 2012a; 67:1002–1006.
- Dong RH, Fang ZZ, Zhu LL, Ge GB, Yang L, Liu ZY. Identification of UDP-Glucuronosyltransferase isoforms involved in hepatic and intestinal glucuronidation of phytochemical carvacrol. *Xenobiotica.* 2012b; 42:1009–2016.
- Chan LMS, Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004; 21:25–51.
- Juan ME, González-Pons E, Planas JM. Multidrug Resistance Proteins Restrain the Intestinal Absorption of trans-Resveratrol in Rats. *J. Nutr.* 2010; 140:489–495.
- Kanoh H, Tada M, Uesawa Y, Mohri K. Bucolome N-Glucuronide Formation: Species Differences and Identification of Human UDP-Glucuronosyltransferase Isoforms. *Pharmacol. & Pharmacy.* 2011; 2:361–369.
- Rubió L, Serra A, Macia A, Borrás X, Romero MP, Motilva MJ. Validation of determination of plasma derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2012; 905:75–84.
- Suzuki H, Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 12:3–12.
- Teng Z, Yuan Ch, Zhang F, Huan M, Cao W, Li K, Yang J, Cao D, Zhou S, Mei Q. Intestinal Absorption and First-Pass Metabolism of Polyphenol Compounds in Rat and Their Transport Dynamics in Caco-2 cells. *PLoS ONE.* 2012; 7:1–9.
- Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann.NY Acad.Sci.* 2011; 1215: 9–15.
- Wang LQ, Meselhy MR, LI Y, Nakamura N, MIN BS, QIN GW, Hattori M. The heterocyclic ring fission and dehydroxylation of catechins and related compounds by *Eubacterium sp.* Strain SDG-2, a Human Intestinal Bacterium. *Chem Pharm Bull.* 2001; 49:1640–1643.

## ANGIOTENZÍN II JE DÔLEŽITÝ REGULAČNÝ FAKTOR V CITLIVOSTI NEUROPATICKEJ BOLESTI

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

*Neurobiologický ústav SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Na objasnenie úlohy angiotenzínu II (Ang II) v regulácii periférnych sensorických systémov sme sledovali vplyv subpresorovej dávky (150 $\mu$ g/kg/min) Ang II na nociceptívne správanie vo vzťahu k neuronálnemu poškodeniu a aktivácii satelitných gliových buniek (SGCs) v miechových dorzálnych gangliách (DRG) po chronickej ligácii sedacieho nervu. Systémové kontinuálne podávanie subpresorovej dávky Ang II po siedmich dňoch ligácie indukovalo taktilnú, tepelnú a chladovú hyperalgéziu. Blokácia AT<sub>1</sub> receptora systémovým podávaním losartanu (2,5mg/kg/deň) zabránila taktilnej hyperalgézii, oslabil chladovú hyperalgéziu, ale nemala vplyv na nociceptívne správanie pri vyšších tepelných podnetoch. ATF3 imunofluorescenčné farbenie ukázalo výrazný nárast počtu veľkých poškodených primárnych aferentných neurónov na ipsilaterálnej strane po podávaní Ang II. Okrem toho, subpresorová dávka Ang II výrazne zvýšila aktiváciu satelitných gliových buniek obklopujúcich tieto veľké primárne sensorické neuróny. Naše výsledky ukazujú, že Ang II prostredníctvom aktivácie AT<sub>1</sub> receptorov je dôležitý regulačný faktor vnímania neuropatickej bolesti a zohráva dôležitú úlohu pri poškodení veľkých sensorických neurónov a v aktivácii satelitných gliových buniek.

### ÚVOD

Symptómy neuropatickej bolesti, ktorá vzniká pri poškodení periférnych nervov, sú celkom dobre popísané, avšak jej patologické mechanizmy sú stále málo známe. Naše predchádzajúce výsledky ukázali, že Ang II prostredníctvom aktivácie svojho receptora AT<sub>1</sub> by mohol byť dôležitým faktorom ovplyvňujúcim prenos sensorickej informácie v DRG za fyziologických aj patologických podmienok (Pavel et al. 2008). Z tohto dôvodu sme v týchto experimentoch sledovali dopad systémového a dlhodobého podávania Ang II na bolestivé správanie po chronickej ligácii sedacieho nervu v korelácii s poškodením spinálnych aferentných neurónov a aktiváciou satelitných gliových buniek.

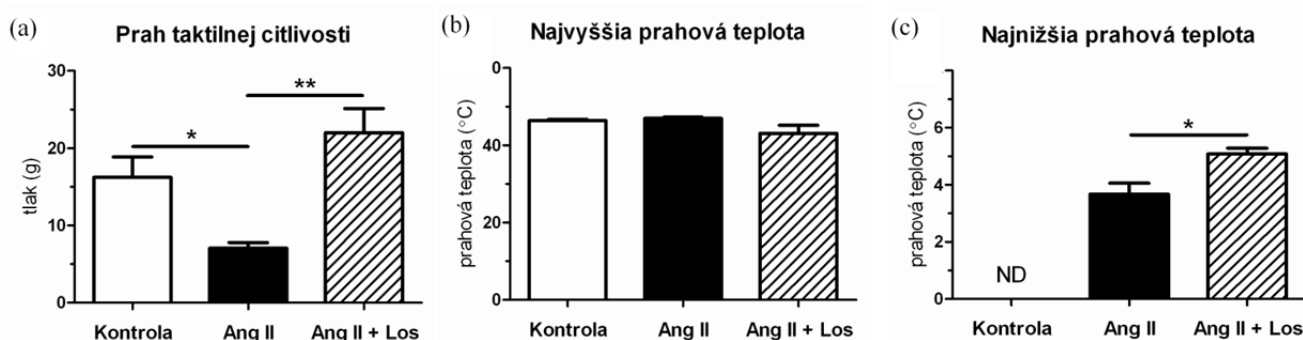
### MATERIÁL A METODIKA

Všetkým experimentálnym zvieratám (dospelé samce potkana kmeňa Wistar o hmotnosti 250 – 320g, n=18) bola urobená unilaterálna ligácia sedacieho nervu podľa Bennett a Xie (1988) s dobou prežívania 7 dní. Následne boli zvieratá rozdelené do troch skupín: (1) kontrolné zvieratá tzv sham-control, ktorým bol podaný fyziologický roztok (i.p., počas 7 dní prostredníctvom Alzet minipumpy), (2) zvieratá, ktorým bol podaný Ang II (150ng/kg/min., i.p., prostredníctvom Alzet minipumpy počas 7 dní), (3) zvieratá, ktorým bol podaný Ang II (150ng/kg/min., i.p., prostredníctvom Alzet minipumpy počas 7 dní) + Losartan (2,5mg/kg/deň s.c., prostredníctvom Alzet minipumpy počas 10 dní). Kvôli efektívnemu blokovaníu AT<sub>1</sub> receptorov v spinálnych gangliách, minipumpy s losartanom boli implantované tri dni pred podávaním Ang II a Ang II bezprostredne po ligácii sedacieho nervu. Behaviorálne testovanie zadnej ligovanej labky bolo vykonané pred ligáciou a sedem dní po ligácii, kedy dochádza k vývoju neuropatickej bolesti. Citlivosť zadnej ligovanej labky na mechanické podnety bola stanovená pomocou „von Frey filaments“. Meranie najnižšej a najvyššej tzv. prahovej teploty pri ktorej sa pozorovalo nociceptívne správanie bolo vykonané na „Hot/Cold Plate“ (Ugo Basile, Taliansko), ktorá pracuje s lineárne rastúcou alebo klesajúcou teplotou. Nociceptívne správanie sa u experimentálnych zvierat prejavovalo lízaním a/alebo zdvíhaním zadnej ligovanej labky. Na základe získaných výsledkov bola

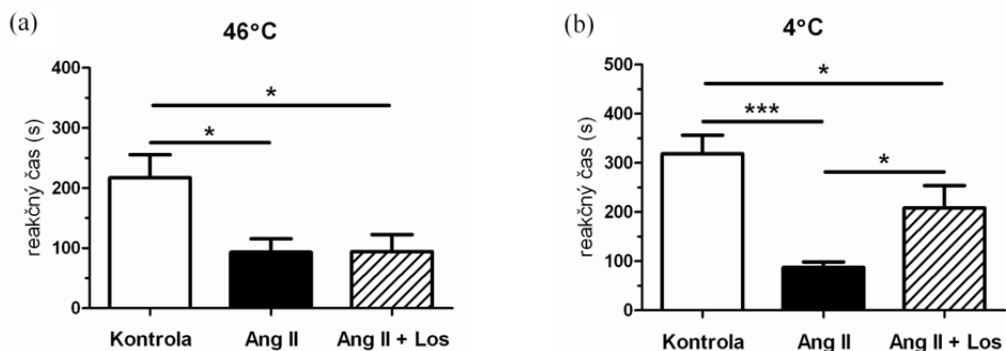
stanovená najnižšia (4° C) resp. najvyššia (46° C) prahová teplota a následne stanovený reakčný čas. Po 7 dňoch ligácie boli zvieratám zo všetkých experimentálnych skupín ipsilaterálne odobrané DRG zodpovedajúce L4-L5 miechovým segmentom. Poškodenie primárnych senzoričných neurónov po ligácii sedacieho nervu bolo stanovené prostredníctvom imunofluorescenčného farbenia s anti-ATF3 protilátkou. Aktivované satelitné gliové bunky boli vizualizované fluorescenčným farbením s anti-GFAP protilátkou. Výsledky boli vyjadrené ako priemer ± SEM zo skupiny šiestich zvierat, ktoré boli merané individuálne. Na zistenie štatisticky významných rozdielov bol v štatistickej analýze použitý nepárový študentov t-test na hladine významnosti  $p < 0,05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

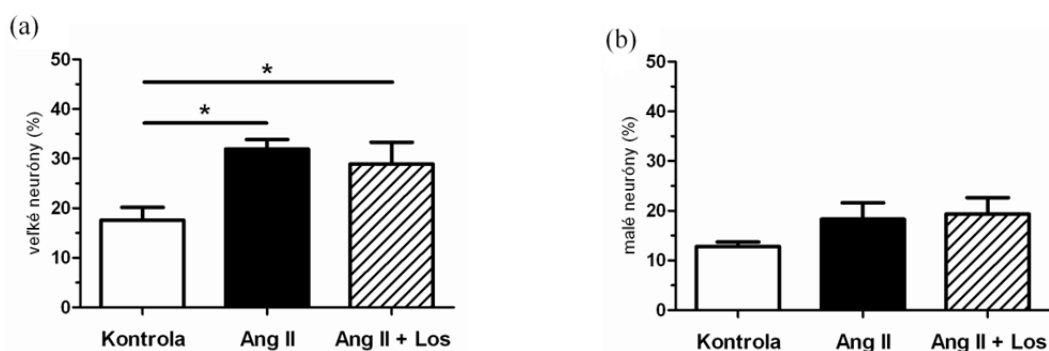
Naše zistenia poukázali na výrazné zvýšenie vnímania bolesti na ipsilaterálnej strane k ligovanému miestu po systémovom podávaní Ang II. Podávaním Ang II došlo k zvýšenej citlivosti na bolestivé stimuly v zadnej ligovanej labke a blokácia AT<sub>1</sub> receptora losartanom zabránila tejto taktilnej hyperalgézii (obr. 1a). Najvyššia tzv. tepelná prahová teplota pri ktorej bolo pozorované nociceptívne správanie bola 46° C, pri tejto teplote nebol zistený žiadny významný rozdiel v nociceptívnych reakciách v jednotlivých experimentálnych skupinách (obr. 1b). Pri prahovej chladovej teplote 4°C boli známky nociceptívneho správania pozorované u potkanov, ktorým bol podaný Ang II (obr. 1c). Po podaní Ang II + Losartan sa zvýšila citlivosť zvierat (obr. 1c). Reakcia zadnej ligovanej labky na tepelný (46°C) alebo chladový (4°C) podnet bola výrazne kratšia u zvierat, ktorým bol podávaný Ang II (obr. 2). Blokovanie AT<sub>1</sub> receptora losartanom znížilo chladovú hyperalgéziu (obr. 2c). Kontinuálne podávanie subpresorovej dávky Ang II výrazne zvýšilo počet poškodených veľkých aferentných neurónov (Obr. 3a), čo znamená, že cirkulujúci Ang II zosilňuje poškodenie aferentných neurónov vyvolané ligáciou sedacieho nervu. Ang II štatisticky výrazne zvýšil aktiváciu satelitných gliových buniek okolo veľkých aferentných neurónov zaznamenanú prostredníctvom GFAP-IR (Obr. 4). Blokácia AT<sub>1</sub> receptorov losartanom bola relatívne schopná potlačiť Ang II-indukované nociceptívne reakcie, to však nezabránilo zvýšenému poškodeniu veľkých aferentných neurónov a aktivácii SGCs v spinálnych gangliách vyvolané kontinuálnym systémovým podávaním Ang II. Výsledky týchto experimentov naznačili, že Ang II (a) prostredníctvom AT<sub>1</sub> receptorov je dôležitým regulačným faktorom v citlivosti neuropatickej bolesti; (b) zohráva dôležitú úlohu pri poškodení veľkých aferentných neurónov a v aktivácii satelitných gliových buniek vyvolané chronickou ligáciou sedacieho nervu.



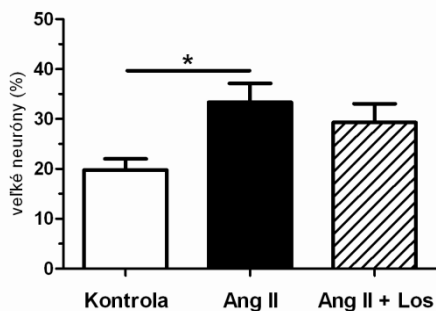
**Obrázok 1.** Behaviorálne testovanie labky po chronickej ligácii sedacieho nervu. (a) prah taktilnej citlivosti, (b) najvyššia prahová teplota, (c) najnižšia prahová teplota \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Obrázok 2.** Meranie citlivosti zadnej labky po chronickej ligácii sedacieho nervu (a) pri 46°C, (b) pri 4°C, po podávaní fyziologického roztoku (kontrola), Ang II a Ang II + Los. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Obrázok 3.** Percentuálne zastúpenie (a) veľkých a (b) malých ATF3-IR neurónov po podávaní fyziologického roztoku (kontrola), Ang II a Ang II + Los. \* $p < 0,05$ .



**Obrázok 4.** Percentuálne zastúpenie veľkých aferentných neurónov obklopených aktivovanými SGCs po podávaní fyziologického roztoku (kontrola), Ang II a Ang II + Los. \* $p < 0,05$ .

*Výskumná práca bola podporená VEGA grantom č. 2/0203/10 a 2/0191/13.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. 1988; 33:87-107.
- Pavel J, Tang H, Brimijoin S, Moughamian A, Nishioku T, Benicky J, Saavedra JM. Expression and transport of Angiotensin II AT1 receptors in spinal cord, dorsal root ganglia and sciatic nerve of the rat. *Brain Res*. 2008; 1246:111-122.

# **METABOLIZMUS ORGANICKÝCH KYSELÍN V BACHORE OVIEC *IN VITRO* PRI VYSOKO-KONCENTRÁTOVEJ DIÉTĚ S PRÍDAVKOM FUMARÁTU STANOVENÝ METÓDOU LC-MS**

Pisarčíková J.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## **ABSTRAKT**

Cieľom *in vitro* pokusu bolo štúdium vplyvu prídavku exogénneho fumarátu na metabolizmus organických kyselín a bachorové fermentačné parametre pri dvoch vysoko-koncentrátových diétach. Metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou (LC-MS) boli v bachorovej tekutine stanovené koncentrácie fumarátu, sukcinátu, malátu a laktátu po 4, 12 a 24 hod fermentácie. Exogénny fumarát pozitívne ovplyvnil metabolizmus organických kyselín v diétach zvýšením produkcie propionátu ( $P < 0,01$  a  $P < 0,001$ ) a znížením pomeru acetátu : propionátu.

## **ÚVOD**

Negatívny vplyv skrmovania vysoko-koncentrátových krmných dávok prežúvavcami často vedie k negatívnym javom ako je nízke pH, zníženie stráviteľnosti vlákniny, akumulácia kyseliny mliečnej atď. a preto sú pridávané do krmiva rôzne antimikrobiálne aditíva. Organická kyselina fumarát predstavuje jednu z alternatív k antibiotikám a rastovým promotórom (Carro a Ranilla, 2003) a jeho prídavok do krmiva prežúvavcov redukuje metanogenézu a zvyšuje produkciu propionátu v bachore (Asanuma a kol., 1999). Preto cieľom našej práce bolo zistiť vplyv exogénneho prídavku fumarátu na metabolizmus organických kyselín a bachorové fermentačné parametre pri vysoko-koncentrátovej diéte v *in vitro* podmienkach.

## **MATERIÁL A METODIKA**

*In vitro* pokus vo fermentačných nádobách s bachorovou tekutinou, diétou a prídavkom fumarátu (10 a 30 mmol/l, FUM10, FUM30) bol zostavený podľa Váradyovej a kol. (2000). Testované boli dve diéty: MH+BG (lúčne seno+jačmeň, 400:600, w/w) a MH+BG+MP (10% MH nahradené zmesou medicínálnych rastlín, MP). Organické kyseliny v bachorovej tekutine boli stanovené metódou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie spojenej s hmotnostnou spektrometriou LC/ESI-MS-MS po 4, 12 a 24 hod inkubácie. Separácia kyselín bola uskutočnená pomocou kvapalinového chromatografu použitím kolóny C18 250 mm × 4,6 mm (5 μm) vyhrievanej na 30°C a 0,1% kyseliny mravčej ako eluentu pri prietoku 0,6 ml/min. Ako detektor bol použitý hmotnostný spektrometer s trojitým kvadrupólom. Pre ionizáciu kyselín bol k dispozícii pneumatically podporovaný elektrosprej pracujúci pri atmosférickom tlaku (API-ESI) za vzniku deprotonovanej molekuly  $[M-H]^-$ . Kvantifikácia organických kyselín bola uskutočnená v MRM akvizícnom móde, kde boli sledované fragmentačné prechody  $m/z$  s najvyššou intenzitou pre malát 133→115, pre laktát 89→43, pre sukcinát 117→73 a fumarát 115→71 v retenčných časoch 6,5 min, 7,8 min, 12,7 min a 13,2 min v rovnakom poradí. Pre jednotlivé kyseliny bola vykonaná optimalizácia zdrojových parametrov a parametrov zlúčenín. Tok sušiacieho plynu ( $N_2$ ) 6 l/min, teplota splynenia 450°C, tlak rozprašovania 207 kPa, napätie v kapiláre -4000 V a zdržanie 150 ms. Pre každú kyselinu boli nájdené kolízne energie od -8 do -20 V. Pokus bol štatisticky vyhodnotený analýzou variancie (Graphpad Instat, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## **VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Koncentrácia laktátu vo fermentáciách bez aj s prídavkom fumarátu bola približne rovnaká počas celých 24 hod (Obr. 1-2 a,b,c). Sukcinát dosahoval najvyššie hodnoty vo fermentáciách



a metabolizoval sa po 12 hod (FUM10) resp. až po 24 hod (FUM30). Koncentrácia malátu bola výraznejšia len pri FUM30. Organické kyseliny sa v bachorovej tekutine rýchlo metabolizujú (do 12 hod) predovšetkým na propionát a menej na acetát a butyrát (Russell a Van Soest, 1984). Exogénny prídavok fumarátu do fermentácií ovplyvnil stráviteľnosť *in vitro* ako aj produkciu celkových a individuálnych krátkoreťazcových mastných kyselín ( $P < 0,001$ ; Tabuľka č.1). So zvyšujúcou sa dávkou fumarátu sa lineárne zvyšovala produkcia propionátu a znižoval sa pomer acetátu : propionátu pri oboch diétach. Vplyv fumarátu sa prejavil len numerickým (nie signifikantným) znížením metánu (o 13-15%) oproti kontrole pravdepodobne pre slabší účinok fumarátu na metánovú produkciu vo vysoko-koncentrátových diétach (Carro a Ranilla, 2003; Asanuma a kol., 1999). Záverom môžeme povedať, že koncentrácie organických kyselín boli prvý krát stanovené metódou LC-MS v bachorovej tekutine a prídavok exogénneho fumarátu pozitívne ovplyvnil metabolizmus organických kyselín v prospech vyššej produkcie propionátu v bachore prežúvavcov *in vitro* pri vysoko-koncentrátovej diéte.

### Tabuľka č.1

Vplyv fumarátu (10 a 30 mmol/l) na fermentačné parametre po 24 hod inkubácie *in vitro*

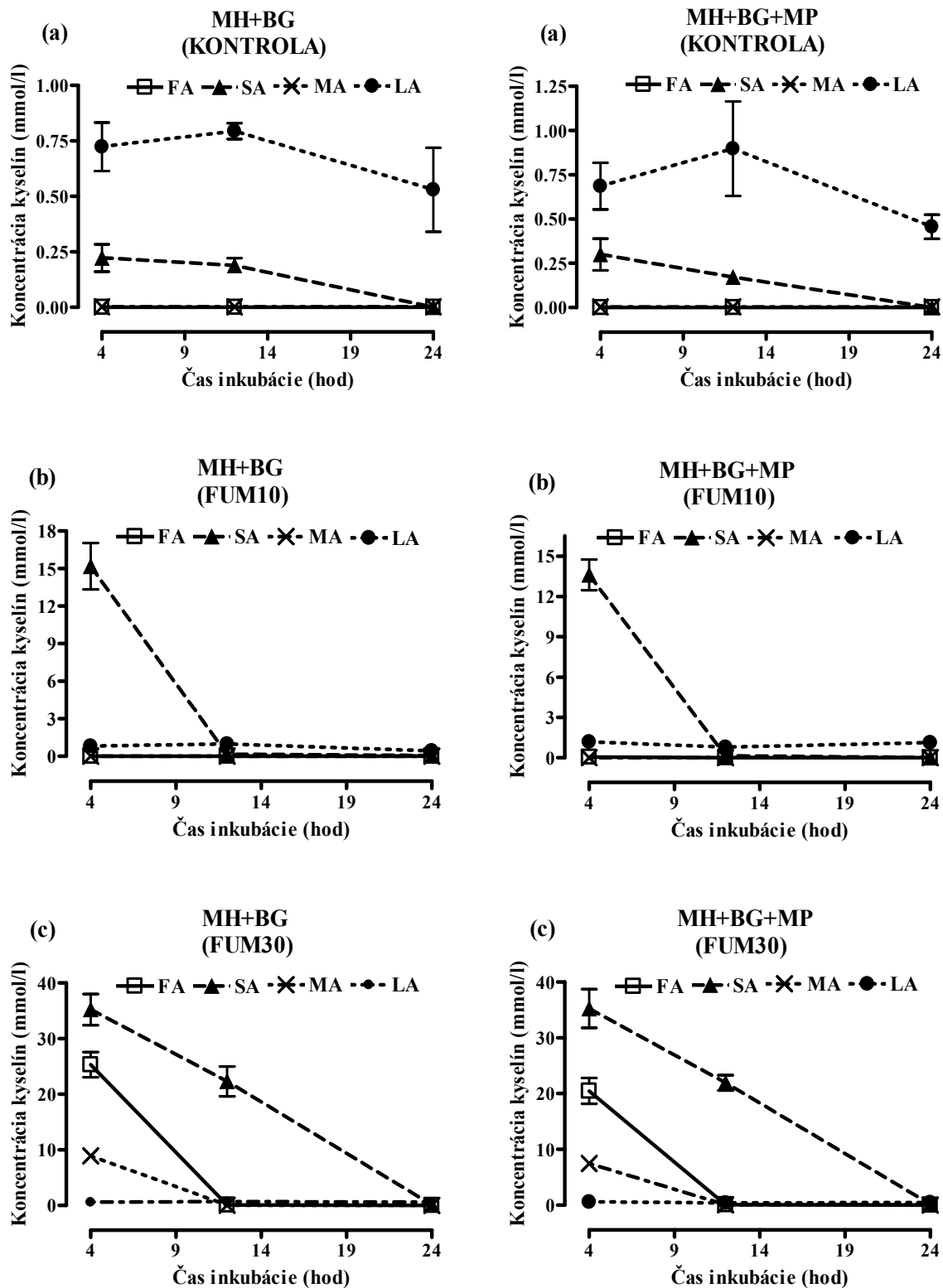
Diéta	Fumarát (FUM)	IVDMD (g/kg DM)	Metán (%)	SCFA (mmol/l)	Acetát (mol%)	Propionát (mol%)	Butyrát (mol%)
MH+BG	Kontrola	560	10,5	48,2	59,9	18,1	13,2
	FUM10	686	10,5	51,5	58,7	21,6	11,5
	FUM30	385 <sup>a</sup>	9,15	60,9 <sup>c</sup>	55,4 <sup>b</sup>	29,1 <sup>c</sup>	8,98 <sup>c</sup>
MH+BG+MP	Kontrola	617	10,0	44,6	60,0	16,2	15,1
	FUM10	656	8,91	52,4 <sup>a</sup>	58,7 <sup>a</sup>	21,4 <sup>b</sup>	11,9 <sup>b</sup>
	FUM30	455 <sup>a</sup>	9,05	63,0 <sup>c</sup>	55,4 <sup>c</sup>	29,3 <sup>c</sup>	9,12 <sup>c</sup>
SEM		25,4	0,481	1,61	0,57	0,75	0,578
	FUM	***	Ns	***	***	***	***
	Diéta	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns
	FUM × Diéta	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns	Ns

MH+BG, lúčne seno+jačmeň (400:600, w/w); MH+BG+MP, MH+BG+10% MH nahradené zmesou medicínálnych rastlín; IVDMD, *in vitro* stráviteľnosť; SCFA, celkové krátkoreťazcové mastné kyseliny; Ns: nie je signifikantné; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ . <sup>a</sup> $P < 0,05$ ; <sup>b</sup> $P < 0,01$ ; <sup>c</sup> $P < 0,001$  rozdiely od kontroly v rámci diéty

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠ a SAV (VEGA 2/0009/14).

### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asanuma N, Iwamoto M, Hino T. J. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms *in vitro*. Dairy Sci. 1999; 82: 780-787.
- Carro MD, Ranilla MJ. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms *in vitro*. Br. J. Nutr. 2003; 90: 617-623.
- Russell JB, Van Soest PJ. *In vitro* ruminal fermentation of organic acids common in forage. Appl. Environ. Microbiol. 1984; 47: 155-159.
- Váradyová Z, Zelenák I, Siroka P. *In vitro* study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 2000; 83: 127-138.



Obr. 1-2 (a,b,c) Vplyv prídavku fumarátu (0,10 a 30 mmol/l; kontrola, FUM10, FUM30) na metabolizmus organických kyselín v MH+BG, resp. MH+BG+MP diéte po 4, 12 a 24 hod fermentácie v bachorovej tekutine oviec *in vitro* (FA, fumarát; SA, sukcinát; MA, malát; LA, laktát).

## DEKONTAMINÁCIA LABORATÓRNYCH SPF MYŠÍ A ICH VYUŽITIE V GNOTOBIOTICKÝCH ŠTÚDIÁCH

Popper, M., Gancarčíková, S.

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, [miro.popper@gmail.com](mailto:miro.popper@gmail.com)

### ABSTRAKT

Experimentálna práca bola zameraná na získanie germ-free myši dekontamináciou SPF myši. Takto zmenené zvieratá by boli použiteľné pre špecificky zamerané fyziologické štúdie. Možnosť využitia takýchto laboratórnych zvierat pre imunologické štúdie je značne obmedzená, keďže už prišli do kontaktu s bežnou mikroflórou tráviaceho traktu. Do štúdie bolo zaradených 5ks SPF laboratórnych myši línie BALB/c (Velaz,s.r.o.). Zvieratá boli v transportnej nádobe umiestnené do sterilného gnotobiotického odchovňového izolátora. V prvom kroku boli na základe farmakologických vlastností vyselektované vhodné antibiotiká. Terapeutická dávka bola zvolená ako počiatočná experimentálna dávka. Samotná štúdia bola rozdelená do 7 etáp, ktoré sa od seba navzájom líšili na začiatku druhom antibiotiká, neskôr účinnou dávkou a dĺžkou aplikácie. Najnižšie počty KTJ ( $6,933 \times 10^3$  aerobná kultivácia a  $5 \times 10^3$  anaerobná kultivácia) za celú dobu štúdie boli dosiahnuté pri simultánnej aplikácii dvoch antibiotík, a to roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulanovou pri koncentrácii 387,11 mg/kg aplikovaného p.o., a roztoku Ciprofloxacínu s koncentraciou účinnej látky 11,76 mg/kg aplikovaného s.c. Ani takto vysoká koncentrácia účinných látok nespôsobila úplnú dekontamináciu mikroflóry u zvierat, ale potlačila jej druhovú rôznorodosť.

### ÚVOD

Gnotobiotické zvieratá sú vhodnými modelmi pre štúdium interakcií presne definovaných mikroorganizmov. Na našom pracovisku zavádzame technológiu získavania a odchovu gnotobiotických laboratórnych myši. Ide o zvlášť náročnú metodiku, ktorá si vyžaduje okrem samotných zvierat aj metódu akou sa budú získavať, prístrojové, materiálne vybavenie a personálne zabezpečenie plynulej prevádzky počas priebehu štúdií na týchto zvieratách. Odchovom gnotobiotických zvierat sa zaoberajú celé inštitúcie zamerané na tento účel s nepretržitou prevádzkou a silným personálnym zabezpečením a samozrejme dobrou finančnou podporou, keďže ide o náročnú technológiu. Na našom pracovisku disponujeme len jedným vedeckým pracovníkom zaoberajúcim sa danou problematikou a pomocnými silami v maximálnom počte 5 ľudí, preto hľadáme iné spôsoby ako získať gnotobiotické myši do nášho pokusného zariadenia.

### MATERIÁL A METODIKA

Laboratórne myši boli získané z chovu Velaz s.r.o., Praha a letecky prepravené v špeciálnych transportných nádobách (kartónové krabice s mikrobiologickými filtrami prepúšťajúcim vzduch) do pokusného zariadenia Laboratória gnotobiológie, Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie, UVLF Košice v počte 5 kusov línie BALB/c, kategórie SPF (Specific Pathogen Free), vo veku 4 týždňov a vážiace 15 – 19g. Po sterilizácii povrchu transportnej nádoby a vnútra spojovacieho tunela bola transportná nádoba premiestnená do vnútra gnotobiotického odchovňového izolátora. Laboratórne zvieratá boli kŕmené *ad libitum* kompletnou kŕmnom zmesou pre myši ST-1, ktorá bola predkladaná v suchom stave a granulovanej forme dva krát denne a mali nepretržitý prístup k autoklávovanej vode v sklenených fľašiach. Priestory chovných nádob a obohatenie prostredia (domčeky, podstielka, koleso na behanie) v nich, umožňovali zvieratám normálne prejavy správania a primerane znižovali súperenie medzi jedincami rovnakého druhu. Zdravotnícky materiál bol radiačne sterilizovaný (Bioster, Veverská Bitýška, ČR). Sklenený a kovový materiál bol

sterilizovaný autoklávom. Filtrácia vzduchu v izolátoroch bola zabezpečená filtračnou patronou HEPA v puzdre z PP, prevedenie ako jednocestný filter, H13 podľa EN 1822. Po presune myšiek do odchovňového izolátora sa pravidelne vykonávala mikrobiologická kontrola, pri ktorej sa odoberali stery z povrchu myšiek, rekta a stien izolátorov detoxikačnými tampónmi (Imuna, Šarišské Michaľany) do pripraveného PYG bujónu a fyziologického roztoku. V ďalšom kroku bol 0,1g trusu nariadený a zhomogenizovaný (Seward STOMACHER® 80 LAB SYSTEM) a 0,1ml roztoku vzorky bolo inokulovaných na pripravené platne – krvný agar v počte zodpovedajúcom počtu riedení. Výber vhodných antibiotík na účel dekontaminácie SPF BALB/c myší bol realizovaný formou porovnávania priemeru inhibičných zón jednotlivých antibiotík a chemoterapeutík reprezentovaných vo forme antibiotických diskov (Lachema, Lach-Ner, HiMedia, Oxoid). Disky boli umiestnené na inokulované platne s médiom krvný agar. Na aerobnú kultiváciu boli platne uložené do termostatu s teplotou prostredia 37,5 °C a na anaerobnú kultiváciu aj do anaerostatu s GasPakom (BD GasPak™). V prípade aerobnej kultivácie boli inhibičné zóny odčítané po dobe inkubácie 24 hodín, anaerobná kultivácia prebiehala v anaerostate 48 hodín.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvej fáze dekontaminácie sme sa rozhodli pre aplikáciu účinnej látky Ciprofloxacín vo forme liekového prípravku CIPHIN PRO INFUSIONE 200 mg/100 ml sol inf 100 ml/200 mg (fl.skl.inf.) 1x100 m od firmy ZENTIVA, a.s., Hlohovec, Slovenská republika, určeného na vnútrožilové infúzne podávanie, ale taktiež vhodného na perorálne podávanie.

Každý myši zvlášť sme aplikovali 0,1 ml zriedeného roztoku Ciprofloxacínu (dávka 2,94 mg/kg) perorálne pomocou inzulínovej striekačky s ihlou na konci obalenou gumenou hadičkou s cca. 1 mm lúmenom. Túto procedúru sme opakovali každých 12 hodín. Pri prvej dekontaminácii sme aplikovali 0,1 ml roztoku Ciprofloxacínu v trvaní 48 h. Výmenu podstielky a čistenie odchovňových nádob sme opakovali každý deň. Deň po aplikácii sme zaznamenali pozitívny výsledok z kontroly kontaminácie podstielky a povrchu pokusných zvierat, preto sme urobili ďalší antibiotikogram na potvrdenie účinnosti zvolených antibiotík a chemoterapeutík. Ten preukázal dobrú účinnosť antimikrobiálnych látok za aerobných podmienok. V druhej etape hľadania vhodného spôsobu dekontaminácie SPF BALB/c myší sme predĺžili dobu podávania roztoku Ciprofloxacínu na 5 dní. Po ukončení 5 dňovej aplikácie roztoku Ciprofloxacínu, sme sa rozhodli použiť nové antimikrobiálne látky, z dôvodu vyššej účinnosti, vyššej hodnoty LD50 a nižšieho zaťaženia vnútorných orgánov (obličiek, pečene). Najväčšiu zónu inhibície sme namerali na antibiotickom disku obsahujúcom Amoxicilín a kyselinu klavulánovú. Preto sme zvolili liečivo Amoksiklav 2 x 457 mg/5 ml pul. na p.o. užívanie (fl.skl.inf.) od firmy Sandoz Pharmaceuticals d.d., Verovškova 57, 1000 Lubľana, Slovinsko s obsahom týchto antimikrobiálnych látok. Pri výpočte dávky antibiotika sme vychádzali z priemernej hmotnosti myší, čiže 17 g a z terapeutickú dávku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou, ktorá je 10 mg/kg/deň (Knotková a Knotek, 2001). Podávali sme 0,1 ml roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou s koncentráciou účinnej látky 5,38 mg/kg na každú myš, aplikácia *per os* každých 12 hodín. Pri jednotlivých kontrolách počtov KTJ (kolónií tvoriacich jednotky) vykonaných v 1., 3. a 6. deň aplikácie Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou sme zaznamenali pri anaeróbnej kultivácii na krvnom agare zníženie počtov KTJ o zhruba 2-3 desiatinné miesta. V niektorých štúdiách bolo na dekontamináciu použitých viacero kombinácií antibiotík, pre príklad neomycínu, cefaloridínu, polymyxínu B alebo E a nystatínu alebo amfotericínu, alebo kombinácia gentamicínu, vankomycínu a nystatínu s úspešným výsledkom (E.O.R.T.C. Gnotobiotic Project Group, 1982). V iných štúdiách použili dokonca streptomycín a bacitracín vo vysokých dávkach, ktoré zabezpečili úspešnú dekontamináciu (Berg, 1980), pričom streptomycín je pre hlodavce vysoko toxický

(Tynes, 1998). V našej štúdií zvýšenie dávky Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou (0,2 ml) p.o. a súbežné podávanie roztoku Ciprofloxacínu s.c. viedlo k ďalšiemu zníženiu počtov KTJ ako pri aeróbnej, tak aj pri anaeróbnej kultivácii, čo najlepšie prezentuje výsledok kultivácie z 10. dňa kde sa počty KTJ znížili na úroveň troch rádov. Pri ďalších kontrolách sme zaznamenali zvýšenie počtov KTJ, a to hlavne pri anaeróbnej kultivácii, čo pravdepodobne súvisí s tým, že sme neskladovali nariadený antibiotický liek pri chladničkovej teplote a nespotrebovali sme ho do siedmich dní, ako je uvedené na obale lieku. Nebolo to možné, nakoľko sme nariadený liek uchovávali vo vnútri gnotobiotického izolátora, aby bola zaručená sterilita prostredia a samotného lieku pri teplote 17-20 °C. Pri tvorbe ďalšej schémy dekontaminácie sme sa vydali cestou zvyšovania dávky účinných antimikrobiálnych látok. Jedna dávka pozostávala z 0,2 ml roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou s koncentráciou účinnej látky 43,01 mg/kg na každú myš a 0,2 ml roztoku Ciprofloxacínu s koncentráciou účinnej látky 5,88 mg/kg každej myši s.c. použitím inzulínovej striekačky do kožnej riasy v oblasti zátylku každých 12 hodín. Týmto spôsobom sme postupovali šesť dní a zaznamenali sme opätovné zníženie počtov KTJ cca. o dve desatinné miesta, ale nie viac ako pri predošlej schéme. Opäť sme zvýšili množstvá účinných látok, v jednej dávke sme tak podávali 0,2 ml roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou s koncentráciou účinnej látky 129,04 mg/kg na každú myš a 0,2 ml roztoku Ciprofloxacínu s koncentráciou účinnej látky 23,53 mg/kg každej myši s.c. Počas tejto doby ostali množstvá KTJ zhruba rovnaké, zaznamenali sme len trojnásobné zníženie pri anaeróbnej kultivácii. Posledná, v poradí siedma modifikácia postupu dekontaminácie pri tomto pokuse nám poskytla cenné informácie do budúcnosti. Použili sme nové balenie lieku, ktorý sme nariadili a takto sme podávali čerstvú perorálnu suspenziu. Znova sme zvýšili podiel účinnej látky a dávka bola 0,2 ml roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou s koncentráciou účinnej látky 387,11 mg/kg na každú myš a 0,1 ml roztoku Ciprofloxacínu s koncentráciou účinnej látky 11,76 mg/kg každej myši s.c. Použitím čerstvej perorálnej suspenzie a vysokej dávky účinnej látky, ktorá preyšuje terapeutickú dennú dávku viac ako 77 násobne sme dosiahli pri kontrole počtu KTJ po 24 h. najnižšie počty KTJ ako pri aeróbnej, tak aj pri anaeróbnej kultivácii za celú dobu štúdie. Navzdory tomuto výsledku pri dodržaní dávok v neskoršej dobe počty KTJ stúpali. Je preto veľmi dôležité, aby bol liek obsahujúci antimikrobiálnu látku účinný, čiže použitý v prijateľnej dobe po rozriedení a skladovaný v adekvátnych podmienkach. Napriek tomu, že liek bol čerstvo nariadený a podali sme vysokú koncentráciu účinných látok, nezabezpečil úplnú dekontamináciu črevnej mikroflóry u pokusných myší. Podobný fenomén pozorovali vo svojej štúdií Khanykov a kol. (1980), keď po 7 dňoch aplikácie vysokých dávok gentamicínu (2,4 mg), restomycínu (3 mg) a nystatínu (110 000 IU) síce nezaznamenali žiadne mikroorganizmy, ale po prerušení aplikácie antibiotík sa počty vrátili do pôvodného stavu. V našom prípade ide o pilotnú štúdiu uskutočnenú na malom počte zvierat, ktorej cieľom bolo vyprofilovanie účinných antibiotík a ich dávok na účel úplnej alebo čiastočnej selektívnej dekontaminácie, so širokým terapeutickým rozpätím (LD50) a čo najnižším negatívnym zdravotným dopadom na stav a funkciu vnútorných orgánov (nephrotoxicita, hepatotoxicita). V budúcnosti štúdiu zopakujeme s vyselektovanými antimikrobiálnymi látkami a otestovanými dávkami na vyššom počte zvierat.

Podarilo sa nám vybrať a otestovať optimálne antibiotiká a ich dávkovanie na účel dekontaminácie, ide o kombináciu roztoku Amoxicilínu potencovaného kyselinou klavulánovou pri koncentrácii 387,11 mg/kg aplikovaného p.o., a roztoku Ciprofloxacínu s koncentráciou účinnej látky 11,76 mg/kg aplikovaného s.c.

*Uvedená práca bola vytvorená realizáciou projektu VEGA 1/0435/11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Knotková Z. , Knotek, Z. Drobní savci. Fyziologické hodnoty, léky a jejich dávkování. Noviko a. s., Brno. 2000, 69 s. ISBN -80-902676-3-7
- E.O.R.T.C. Gnotobiotic Project Group: a prospective cooperative study of antimicrobial decontamination in granulocytopenic patients. Comparison of two different methods. *Infection*. 1982; 10(3), 131-138.
- Berg, R. D. Inhibition of *Escherichia coli* translocation from the gastrointestinal tract by normal cecal flora in gnotobiotic or antibiotic-decontaminated mice. *Infection and immunity*. (1980); 29(3), 1073-1081.
- Tynes, V. V. Drug Therapy in Pet Rodents. *Vet Med*. 1998; 93[11]:988-991. ISSN 8750-7943
- Khanykov, A. V., Nasonova, T. A., Strel'nikov, V. A., Nevinnaiia, A. P., & Ivanov, A. A. Phenomenon of intestinal microfloral increase after stopping the use of poorly adsorbed antibiotics. [Fenomen vozrastaniia mikroflory kischechnika posle otmeny maloabsorbiruemykh antibiotikov.]. *Antibiotiki*. 1980; 25(11), 847-850.

# VYUŽITIE METODIKY FLUORESCENČNEJ *IN SITU* HYBRIDIZÁCIE NA HISTOLOGICKÝCH REZOCH (HISTO-FISH), URČENEJ PRE ŠTÚDIUM TVORBY BIOFILMOV V GASTROINTESTINÁLNOU TRAKTE U GNOTOBIOTICKÝCH ZVIERAT

Slížová M., Maďar M., Gancarčíková S., Popper M., Csank T., Pistl J., Hadryová J., Nemcová R.<sup>1</sup>

Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181, [magdalenaslizova@gmail.com](mailto:magdalenaslizova@gmail.com)

## ABSTRAKT

Proces tvorby biofilmu v *in vivo* podmienkach nie je dodnes úplne objasnený. Využívanie *in vitro* testov ako alternatívy k štúdiu tvorby biofilmov vedie niekedy k nepresným výsledkom, nakoľko nezahŕňa komplexnosť GIT v *in vivo* podmienkach. V rámci štúdia prítomnosti zástupcov probiotických baktérií v biofilme GIT sme použili metódu HISTO-FISH, ktorou sme sledovali proces tvorby biofilmu v *in vivo* podmienkach s využitím Germ-free myší. Myši boli kŕmené špeciálnou sterilnou diétou pričom im bol per orálne aplikovaný kmeň *Lactobacillus reuteri* (L26) v koncentrácii  $1 \times 10^8$  KTJ/ml v objeme 0.1ml/deň/zviera a aplikácia trvala 21 dní. Použitý izolát bol vyselektovaný na základe schopnosti tvorby biofilmu v *in vitro* podmienkach. Ako vzorky pre štúdium biofilmu boli použité fixované histologické rezy zo žalúdkov Germ free myší. Použitá bola rôznymi fluorochromami značená próba: Lab158 5'[6FAM] GGTATTAGCAYCTGTTTCCA 3' a Txrd Lab 158, syntetizovaná (Sigma Aldrich). Pre lepšiu vizualizáciu biofilmu na povrchu slizníc GIT a tkanív v histologických rezoch bolo použité farbivo DAPI. Výsledkom bola detekcia prítomnosti a presná lokalizácia zástupcov *Lactobacillus* v trávenine a na povrchu sliznice žalúdka v histologických rezoch pomocou epifluorescenčnej mikroskopie. Preukázali sme, že izolát *Lactobacillus reuteri* (L26) je schopný tvorby biofilmu aj bez prítomnosti zástupcov iných bakteriálnych populácií, hoci tvorba biofilmu nebola zaznamenaná v takej miere ako v prípade *in vitro* testov. Pre štúdium tvorby biofilmu sa ako lepší variant osvedčila próba Lab158 značená fluorochromom Txrd. Pre štúdium tvorby bakteriálnych biofilmov a pri osídľovaní jednotlivých častí GIT u Germ-free ako aj konvenčných myší budú v budúcnosti za presne špecifikovaných podmienok využití aj iné zástupcovia rodu *Lactobacillus*.

## ÚVOD

Je známe, že biofilmy sa v prírode nachádzajú na povrchoch, ktoré sú permanentne v priamom kontakte s vodou. V medicíne majú biofilmy dvojakú funkciu z hľadiska patogenézy, negatívnou vlastnosťou je tvorba biofilmov na povrchoch zubov, kde môžu perzistovať baktérie spôsobujúce zubný kaz, alebo spôsobuje upchávanie katétrov prípadne sa vytvára a udržuje na povrchoch umelých náhrad ako napríklad srdcové chlopne alebo kĺbové protézy. Pozitívnou vlastnosťou biofilmu v GIT je schopnosť chrániť sliznicu GIT pred potenciálnymi patogénmi [1]. Proces tvorby biofilmu v *in vivo* podmienkach nie je dodnes úplne objasnený. Využívanie *in vitro* testov ako alternatívy k štúdiu tvorby biofilmov vedie niekedy k nepresným výsledkom, nakoľko nezahŕňa komplexnosť GIT v *in vivo* podmienkach [2]. V rámci štúdia prítomnosti zástupcov probiotických baktérií v biofilme GIT sme použili nami štandardizovanú metódu HISTO-FISH, ktorou sme sledovali proces tvorby biofilmu v *in vivo* podmienkach s využitím Germ-free myší.

## MATERIÁL A METODIKA

Ako predloha protokolu HISTO-FISH slúžila jediná štúdia tohto druhu [3]. Vzorky žalúdkov boli získané od Germ free myší kŕmených špeciálnou sterilnou diétou a ktorým bol per orálne

aplikovaný kmeň *Lactobacillus reuteri* (L26) v koncentrácii  $1 \times 10^8$  KTJ/ml v objeme 0.1ml/deň/zviera, pričom aplikácia trvala 21dní. Žalúdky boli sterilne odobrané a s obsahom fixované v ependorfke v čerstvom Karnoyovom roztoku po dobu 4h pri teplote  $4^{\circ}\text{C}$ , vzorky boli spracované klasickým histologickým procesom v skrátenej forme. Vzorky sme po fixácii preniesli do histologických kaziet a inkubovali pri izbovej teplote v 100% alkohole po dobu 1hod. Následne sme pokračovali v 30min inkubáciách pri izbovej teplote v 96% alkohole, acetóne, aceton-xyléne (1:1), xyléne a pri teplote  $52^{\circ}\text{C}$  v xylén-parafíne (1:1), následne sme nechali vzorky inkubovať cez noc v parafíne 1 pri teplote  $52^{\circ}\text{C}$ . Na druhý deň sme pokračovali v 30min inkubáciách pri teplote  $52^{\circ}\text{C}$  v parafíne 2 a parafíne 3. Potom sme tkanivá vybrali a zalievali do parafínových bločkov. Parafínové bločky sme rezali na sánkovom mikrotóme na rezy o hrúbke  $7\mu\text{m}$ . Rezy sme fixovali na sklíčkach SuperFrost Plus, pomocou tepla  $60^{\circ}\text{C}$  po dobu 6min. Následne sme preparáty preniesli do radu kyviet, kde sme ako prvé vzorky deparafinizovali pomocou xylénu po dobu  $2 \times 7$ min. V ďalších kyvetách sme vzorky postupne rehydratovali v 96% ETOH na 5min, 80% ETOH na 5min a 60% ETOH na 5min a PBS na 5min. Po rehydratácii sme vzorky postfixovali v čerstvom 4% paraformaldehyde po dobu 20min. zvyšok paraformaldehydu sa vymyl pomocou PBS po dobu 5min pri izbovej teplote. Potom sme na povrch preparátu aplikovali  $500\mu\text{l}$  enzymatického roztoku ( $10\text{g}$  lyzozýmu na  $1^{-1}$  TRISHCL pH6,5) po dobu 10min pri teplote  $37^{\circ}\text{C}$ . Zvyšky roztoku sme vymyli pomocou PBS po dobu 30sec. Následne sme vzorky hybridizovali s  $10\text{-}20\mu\text{l}$  hybridizačného pufru (HP) podľa [3], do ktorého sme pridali próbu Lab158  $5'$ [6FAM] GGTATTAGCAYCTGTTTCCA  $3'$  alebo Txrd Lab158, syntetizovanú (Sigma Aldrich) v koncentrácii  $30\text{mg l}^{-1}$  v pomere 1:10 próba k HP. Vzorky sme hybridizovali cez noc vo vlhkej komôrke v termostate pri teplote  $52^{\circ}\text{C}$ . Po hybridizácii sme každé sklíčko opláchli  $50\text{ml}$  wash pufrom podľa [3] a ofarbili pomocou DAPI o koncentrácii  $2\mu\text{g l}^{-1}$  po dobu  $10\text{-}15$ min pri teplote  $50^{\circ}\text{C}$ , potom sme zvyšné farbivo vymyli destilovanou vodou a preparát vysušili v sušičke. Na suché preparáty sme pridali kvapku imerzneho olej a s pomocou prehľadného laku po okrajoch zapečatili krycie sklíčko. Preparát sme pozorovali pri rôznych zväčšeniach na epifluorescenčnom mikroskope Carl Zeiss Axio Observer Z1 pričom pre detekciu prítomnosti *Lactobacillus reuteri* (L26) sme použili 1000 násobné zväčšenie pri okuláry 10 a objektíve 100 s použitím imerzného oleja. Sledovali sme prítomnosť baktérií v biofilme ich tvar, veľkosť a usporiadanie biofilmu na povrchu sliznice žalúdka s pomocou filtra využívajúcom vlnovú dĺžku pre farbivo DAPI a následne po zaostrení sme sledovali pri iných filtroch zodpovedajúcich použitým fluorochromom pre dané próby. Clonu sme dali na minimum aby nám nevznikala nešpecifická fluorescencia. Snímky sme zaznamenávali pomocou digitálnej kamery a s pomocou softvéru Axiovision. Ako negatívna kontrola slúžili žalúdky od Germ free myší, ktorým bola podávaná iba sterilná potrava.

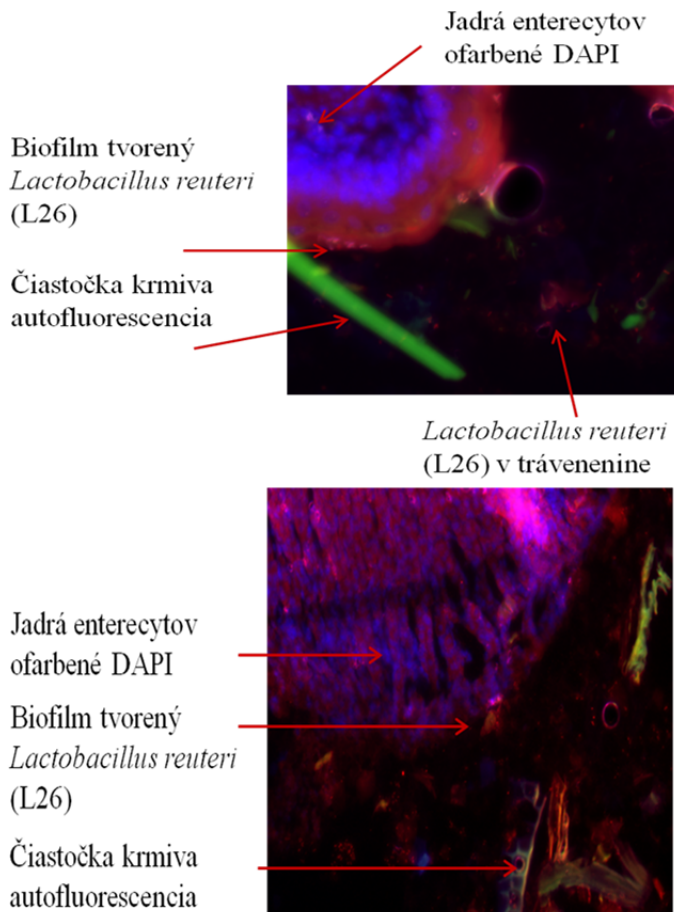
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledkom bola detekcia prítomnosti a presná lokalizácia zástupcov *Lactobacillus reuteri* (L26) v trávenine a na povrchu sliznice žalúdka v histologických rezoch pomocou metódy HISTO FISH za využitia epifluorescenčnej mikroskopie. Preukázali sme, že izolát *Lactobacillus reuteri* (L26) je schopný tvorby biofilmu aj bez prítomnosti zástupcov iných bakteriálnych populácií (Obr.1., 2.), hoci tvorba biofilmu nebola zaznamenaná v takej miere ako v prípade *in vitro* testov. Pri negatívnych kontrolách nebola zaznamenaná prítomnosť žiadnych baktérií v trávenine ani na povrchu sliznice žalúdka. Pre štúdium tvorby biofilmu sa ako lepší variant osvedčila próba lab158 zančená flouorchromom Txrd. Zistili sme, že niektoré štruktúry pri použití fluorochromu FAM 6 na próbe Lab158 majú rovnakú vlnovú dĺžku, čo spôsobuje autoflorescenciu napr.: mucín, cievy a erytrocyty alebo, čiastočky krmiva s tým istým problémom sa stretla vo svojej práci aj Lebeerová [3]. Pri použití próby značenej Txrd bol tento efekt využití na odlišenie nešpecifickej autoflorescencie, ktorá nám



dopomohla odlíšiť vyššie spomínané súčasti vzorky. Pre štúdium tvorby bakteriálnych biofilmov a pri osídľovaní jednotlivých častí GIT u Germ-free ako aj konvenčných myší budú v budúcnosti využité za presne špecifikovaných podmienok aj iný zástupcovia rodu *Lactobacillus*, prípadne iné probiotické baktérie.

**Obrázok č. 1., 2.:** Tvorba biofilmu prostredníctvom *Lactobacillus reuteri* (L26) u Germ free myší zaznamenaná epifluorescenčnou mikroskopou a vizualizovaná s pomocou metódy HISTO-FISH.



*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0199-11, projektom VEGA 1/0435/11 a projektom Medipark*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hall-Stoodley, L., J.W. Costerton, a P. Stoodley, *Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases*. Nat Rev Microbiol, 2004. 2(2): 95-108.
2. Pedersen, K. and G.W. Tannock, *Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli*. Appl Environ Microbiol, 1989. 55(2): 279-83.
3. Lebeer, S., et al., *FISH analysis of Lactobacillus biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts*. Lett Appl Microbiol.

# INHIBÍCIA TVORBY BIOFILMU KMEŇOV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EXTRACELULÁRNymi METABOLITMI *LACTOBACILLUS MUCOSAE*

Straková E., Bujňáková D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo sledovať schopnosť extracelulárnych metabolitov z ovčích izolátov *Lactobacillus mucosae* (*L. mucosae*) inhibovať tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus*, ktorý je najčastejšie zodpovedný za chronické a rekurentné mastitídy v mliečnych stádach. Kvantitatívna analýza inhibície bola prevedená pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) a FISH kombinovanej s Flow Cytometriou (FISH-FCM), ako aj spektrofotometricky s využitím kryštálovej viate ako zmena absorbancie meranej pri vlnovej dĺžke 570 nm. Zo sledovaných kmeňov, izolát *L. mucosae* 14k vykazoval najvyššiu inhibičnú aktivitu, pričom táto schopnosť bola kmeňovo závislá.

## ÚVOD

*Staphylococcus aureus* je jedným z hlavných patogénov zodpovedných za mastitídy v stádach určených na mliečnu produkciu. Rezistencia na antibiotiká a tvorba biofilmu, považované za virulentné faktory, môžu čiastočne vysvetľovať prečo mastitídy perzistujú v stádach ako chronické a rekurentné ochorenia. Tieto faktory sú častým výsledkom zlyhania terapie antibiotikami a ekonomických strát chovateľov. V tomto smere vývoj nových prístupov je žiaduci, pričom jednou z alternatívnych metód liečby a prevencie mastitíd je použitie baktérií mliečneho kvasenia, alebo ich extracelulárnych produktov ako mamárnych probiotík. Karwacki et al.(2013) popisuje vo svojej štúdiu inhibičný účinok extraktu získaného z kultúry *Actinobacillus pleuropneumonie* sérotyp 5 na tvorbu biofilmu *S. aureus*, *S. epidermis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Maldonado et al. (2007) analyzoval inhibičný účinok rôznych frakcií kultúry laktobacilov na tvorbu biofilmu a rast *Klebsiella pneumoniae*.

Cieľom práce bolo hodnotenie inhibičného efektu supernatantov (CFCS- Cell Free Culture Supernatant) získaných z ovčích izolátov *Lactobacillus mucosae* na tvorbu biofilmu *S. aureus* s využitím FISH a FISH- FCM ako aj spektrofotometrie.

## MATERIÁL A METODIKA

V štúdiu sme hodnotili schopnosť CFCS z dvoch ovčích kmeňov *Lactobacillus mucosae* inhibovať tvorbu biofilmu *Staphylococcus aureus*. Kmene *Lactobacillus mucosae* boli izolované z tráviaceho traktu oviec a kultivované v MRS bujóne (Oxoid, Veľká Británia) za anaeróbných podmienok pri 37°C 48 hodín. *S. aureus* bol kultivovaný v Manitol bujóne (Oxoid, Veľká Británia).

Po extrakcii proteínov pomocou kyseliny mravčej a acetonitrilu boli namerané proteínové spektrá pomocou MALDI- TOF (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) hmotnostnej spektrofotometrie (Bessede et al., 2011). Proteínové spektrá boli následne importované do softvéru BioTyper verzia 3.0, porovnané s referenčnými spektrami v databáze a na základe toho identifikované.

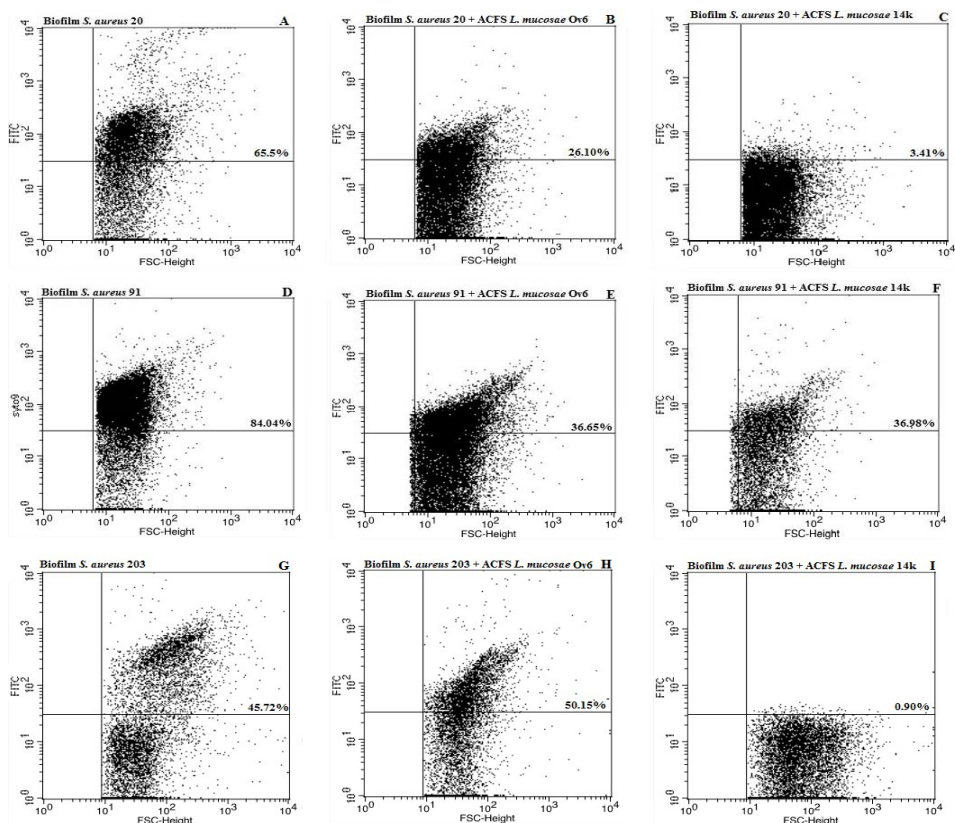
Na získanie supernatantu 1 ml suspenzie *L. mucosae* Ov6 a 14k (McFarland 1) bol inokulovaný do 9 ml MRS bujónu, po 24 hodinách kultivácie bola kultúra centrifugovaná (4000 ot./10min) a získaný supernatant filtrom sterilizovaný s použitím 0,22 mm membránového filtra (Millipore, Írsko). Pre kontrolu boli supernatanty naočkované na MRS agar a kultivované za anaeróbných podmienok 24 hodín pri 37°C, aby sme sa uistili, že supernatanty neobsahujú baktérie.

Schopnosť tvoriť biofilm na abiotických povrchoch (Nunc, Dánsko) bola analyzovaná spektrofotometricky (Bujnakova et al., 2012) ako zmena absorbančie meranej pri vlnovej dĺžke 570 nm na prístroji Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, USA). Výsledky sú udávané ako priemerná hodnota merania ôsmich replikátov  $\pm$  štandardná odchýlka (SD). Hodnoty  $< 0,1$  sú považované za slabú tvorbu biofilmu, od 0,1- 0,2 ako stredná a pri hodnotách  $> 0,2$  je tvorba biofilmu považovaná za silnú. Na analýzu inhibície tvorby biofilmu *S. aureus*, boli kmene prenesené do mikroplošiek (Nunc, Dánsko) v koncentrácii  $1,5-3 \cdot 10^8$  cfu/ml a do každej jamky bol pridaný supernatant o koncentrácii 10%, aby výsledný objem bol 200  $\mu$ l. Mikrotitračné platničky boli inkubované 24 hodín pri 37 °C. Ako kontrola slúžili neošetrené vzorky. Takto pripravené vzorky boli analyzované spektrofotometricky ako bolo vyššie popísané. Schopnosť tvorby ako aj inhibície biofilmu sme analyzovali tiež pomocou FISH a FISH-FCM. Pred kvantifikáciou boli naviazané baktérie odlepené pridaním 100  $\mu$ l 0,5% Tritonu X-100, fixované v 4% paraformaldehyde (Fluka, Švajčiarsko) cez noc pri 4 °C a uskladnené v rovnakom objeme PBS a 96% etanolu pri -20 °C. Baktérie boli značené univerzálnou sondou *Bact338* značenou fluoresceínom podľa Sghir et al. (2000). Hybridizované vzorky boli vákuovo filtrované na 0,2  $\mu$ m polykarbonátový membránový filter a analyzované pomocou fluorescenčného mikroskopu (BX 51; Olympus, Japonsko) vybavenom príslušným filtrom. Kvantifikácia pomocou FISH-FCM bola prevedená s využitím prístroja FACSCALIBUR™ (BD, Biosciences) a analyzovaná BD CELLQUEST™ PRO softvérom (BD, BIOSCIENCES). Bakteriálne populácie boli identifikované v korešpondujúcich dot plotoch (FSC/SSC, FSC/FL1 alebo SSC/FL1). Pre absolútnu kvantifikáciu boli využité 6  $\mu$ m mikrosféry v koncentrácii  $1,0 \times 10^8$  /ml deionizovanej vody s 2mM azidom sódnym (Molecular Probes). Absolútne počty boli takto určené ako pomer počtu baktérií a počtu mikrosfér a ich dilačného faktora podľa vzorca:

$$\frac{[(\# \text{ počet baktérií}) \times (\text{dilučný faktor})]}{[(\# \text{ počet mikrosfér}) \times 10^{-6}]} = \text{počet baktérií ml}^{-1}$$

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najsilnejšiu schopnosť tvoriť biofilm mal *S. aureus* 91 (85 %) v porovnaní s ostatnými dvoma izolátmi. Schopnosť CFCS získaných z *L. mucosae* 14k a Ov6 inhibovať tvorbu biofilmu *S. aureus* bola kmeňovo závislá. Najvýraznejší efekt bol zaznamenaný u CFCS pochádzajúceho z *L. mucosae* 14k na *S. aureus* 20 z pôvodných 69 % (Obr. 1A) adherovaných na 3.85% (17 násobný pokles) (Obr. 1C). CFCS *L. mucosae* Ov6 spôsobil pokles z pôvodných 69 % na 23 (3 násobný pokles) (Obr. 1B). Podobný alebo nižší efekt mali použité CFCS na ostatné dva izoláty *S. aureus* 91 a 203 (1.3-2.6 násobný pokles) (Obr. 1D-I). Porovnateľné výsledky sme získali aj pomocou FISH a spektrofotometrie.



Obrázok 1 : FISH-FCM analýza inhibície tvorby biofilmu *S. aureus*

Z našich výsledkov vyplýva, že použitie *L. mucosae* 14k resp. jeho metabolitov môže byť alternatívou prípadne suplementom k antibiotickej terapii infekcií spôsobených *S. aureus*, keďže jeho metabolity dokázali efektívne potlačiť formovanie biofilmu.

Táto práca za podpory grantu VEGA 2/0014/13.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bessede 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, *Clinical Microbiology and Infection* 2011, 17: 533-538.
- Bujnakova D., Kmet V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia microbiologica* 2012, 57: 263-267.
- Karwacki M. T., Kadouri D. E., Bendaoud M., Izano E. A., Sampathkumar V., Inzana T. J., Kaplan J. B. Antibiofilm Activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 Capsular Polysaccharide *Plos One* 2013, 5: 1-8.
- Maldonado N. C., Silva de Ruiz, Cecilia M., Nader-Marcias M.E. A simple technique to detect *Klebsiella* biofilm-forming- strains. Inhibitory potential of *Lactobacillus fermentum* CRL 1058 whole cells and products. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 2007, 52-59.
- Sghir A., Gramet G., Sau A., Rochet V., Pochart P., Dore J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization, *Applied Environmental Microbiology* 2000, 66: 2263-2266.

## BAKTERIÁLNE SPOLOČENSTVO HNEDEHO KALU SKLÁDKY V ŽIARI NAD HRONOM - IDENTIFIKÁCIA A MOŽNÉ VYUŽITIE PRI BIOREMEDIÁCII

Stramová, Z.<sup>1,2</sup>, Kosorínová P.<sup>3</sup>, Júdová, J.<sup>4</sup>, Remenár, M.<sup>4</sup>, Pristaš P.<sup>1,4</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, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice,

<sup>4</sup> Katedra biológie a ekológie, Univerzita Mateja Bela, Banská Bystrica

### ABSTRAKT

Skládka odpadového kalu v Žiari nad Hronom predstavuje jednu z najväčších ekologických záťaží na Slovensku. Na tejto skládke sa nachádza viac ako 106 ton vysoko alkalického odpadového kalu (pH = 13) z výroby hliníka s vysokým obsahom ťažkých kovov (najmä chrómu – 50 mg/L). Napriek extrémnym podmienkam pre život v tomto prostredí prežíva početná populácia baktérií. Kultivačnými metódami sme získali viaceré izoláty (3500 KTJ/mg), ktoré sme identifikovali pomocou MALDI – TOF proteínových profilov a 16S rRNA sekvencií. Všetky izoláty sme testovali na rezistenciu voči ťažkým kovom (Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) a na prítomnosť biotechnologicky významných enzýmov.

### ÚVOD

Výroba oxidu hlinitého na Slovensku (Žiar nad Hronom) siaha do roku 1957. V Žiari nad Hronom sa Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vyrábala spekačnou metódou, pri ktorej vznikala tzv. hnedý kal, ktorý sa ukladal na kalové pole. Postupne tak vznikalo rozsiahle odkalisko, na ktorom sa nachádza až 10<sup>6</sup> ton tohto hnedého kalu a drenážnej vody. Táto odpadová skládka predstavuje jedno z najnehostinnejších prostredí pre život a veľkú ekologickú záťaž pre životné prostredie vzhľadom na vysoké pH (až 13) a vysoký obsah ťažkých kovov (najmä chrómu – 50 mg/L) (Schwartz a kol., 2011). Aj napriek týmto extrémnym podmienkam sa v hedom odpadovom kale nachádza početná bakteriálna populácia. Ide predovšetkým o alkalotolerantné mikroorganizmy, medzi ktoré patria alkalofily a haloalkalofily. Alkalofily vyžadujú pH 9 alebo aj viac pre svoj rast a ich pH optimum je 10, zatiaľ čo haloalkalofily vyžadujú pre svoj rast hodnoty pH vyššie ako 9 a vysokú salinitu (nad 33% NaCl) (Zavarzina a kol., 2006). Cieľom tejto práce bolo štúdium bakteriálnej populácie odpadového kalu skládky v Žiari nad Hronom a možné využitie v procese bioremediácie.

### MATERIÁL A METODIKA

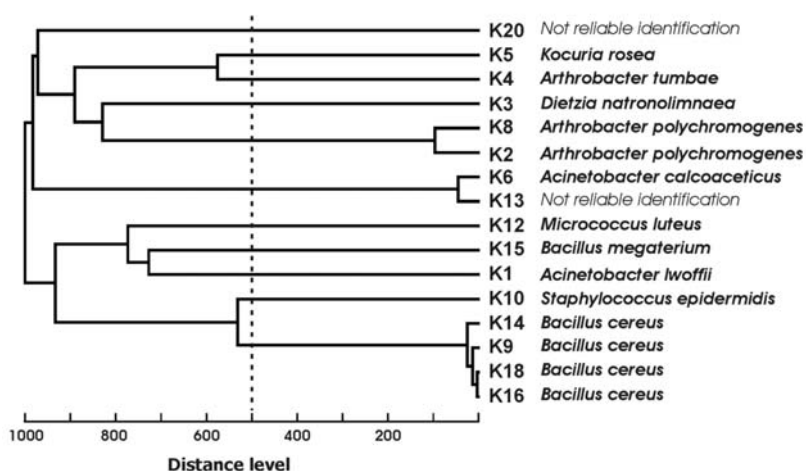
*Pôvod a spracovanie vzoriek:* Odber vzoriek hnedého kalu zo skládky kalu sa uskutočnil v septembri 2010 v Žiari nad Hronom. 1g hnedého kalu sme rozriedili v PBS roztoku v pomere 1:4 a vysievali na Živný agar č. 2 s rôznymi hodnotami pH (7, 9.7 až 10) po 100 µl a kultivovali sme 24 hod. pri laboratórnej teplote a teplote 37°C.

*Charakterizácia izolátov:* Jednotlivé izoláty sme charakterizovali pomocou analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) a taxonomicky klasifikovali pomocou blastn analýzy 16S rRNA sekvencií voči databáze sekvencií typových kmeňov baktérií a archea. Vlastnosti vybraných izolátov, ako prítomnosť biotechnologicky využiteľných enzýmov (lipáza, amyláza, celuláza, proteáza) a rezistenciu voči ťažkým kovom (Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>) sme stanovili klasickými biochemickými a mikrobiálnymi postupmi.

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Napriek extrémnym podmienkam, ako je vysoké pH (až 13), obsah toxických kovov a množstvo rozpustených látok, sme vo vzorkách hnedého kalu detegovali početnú (3500 KTJ/mg) populáciu mikroorganizmov. Kolónie všetkých izolovaných kmeňov rástli na TSA

médiu s pH 9.7 až 10 teda majú alkalotolerantný charakter. Pomocou údajov z MALDI-TOF analýzy sme jednotlivé izoláty rozdelili do jedenástich skupín (Obr. 1).



Obr. 1: Dendrogram príbuznosti izolátov z hnedého kalu zo skládky v Žiari nad Hronom vytvorený porovnaním MALDI-TOF proteínových profilov

Najpočetnejšími boli izoláty zaradené do XI skupiny (K9, K14, K16, K18), ktoré sme pomocou MALDI-TOF analýzy identifikovali ako baktérie rodu *Bacillus cereus*. Ide o grampozitívne bacily tvoriace kolónie krémovej farby. Ďalšie najčastejšie sa vyskytujúce izoláty boli zaradené do V skupiny (izoláty K2, K8). Tieto izoláty sme identifikovali ako baktérie rodu *Arthrobacter polychromogenes*. Táto skupina je tvorená grampozitívnymi kokmi až diplokokmi vytvárajúcimi krémovo biele kolónie. Dvoma izolátmi bola tvorená aj skupina VI (izoláty K6, K13), pričom pomocou MALDI-TOF sa nám podarilo identifikovať iba izolát K6 ako *Acinetobacter calcoaceticus*. Ostatné skupiny (I, II, III, IV, VII, VIII, IX, X) boli tvorené iba jedným izolátom (Obr. 1). Vzhľadom na vysoký výskyt ťažkých kovov v odpadovom hnedom kale sme jednotlivé izoláty podrobili testom rezistencie na 6 ťažkých kovov. Analyzovaná bola minimálna inhibičná koncentrácia jednotlivých ťažkých kovov. Izoláty (K2, K9, K13, K16, K20) vykazovali zvýšenú toleranciu na nikel, zinok, keď s minimálnou inhibičnou koncentráciou až 500 µg/ml. Izoláty K1, K3, K4, K5, K8 vykazovali citlivosť už pri koncentrácii 100 µg/ml pre kobalt a chróm. Minimálna inhibičná koncentrácia mangánu bola stanovená až na 1500 µg/ml, čo súvisí s nízkou toxicitou mangánu. Prekvapujúcim zistením bolo, že izoláty nevykazovali zvýšenú toleranciu voči chrómu, aj napriek tomu, že boli izolované z prostredia s vysokým obsahom tohto kovu. Izoláty, ktoré sa nám nepodarilo identifikovať pomocou MALDI-TOF sme podrobili analýze 16S rRNA. Zástupcovia alkalofilných mikroorganizmov majú potenciálne využitie v rôznych oblastiach biotechnológií, pretože produkujú biotechnologicky využiteľné enzýmy (Horikoshi, 1999). U viacerých izolátov sme pozorovali produkciu amyláz, celuláz, proteáz a lipáz. Identifikácia izolátov z hnedého kalu a prítomnosť vybraných enzýmových aktivít je uvedená v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Identifikácia izolátov hnedého kalu zo skládky v Žiari nad Hronom a prítomnosť vybraných enzýmových aktivít. <sup>a</sup> NRI - not reliable identification. <sup>b</sup> + označuje produkciu daného enzýmu.

Maldi skupina/počet izolátov	Maldi identifikácia druh/skóre <sup>a</sup>	16S rRNA identifikácia blastn best hit/similarity (%)	Enzymová aktivita <sup>b</sup>			
			amyláza	celulóza	proteáza	lipáza
I / 1	NRI	<i>Isoptericola halotolerans</i> /99.7	-	+	-	-
II / 1	<i>Kocuria rosea</i> / 2,529	-----	-	+	-	-
III / 1	<i>Arthrobacter tumbae</i> / 1,887	-----	-	+	-	+
IV / 1	<i>Dietzia natronolimnaea</i> / 1,882	-----	-	+	-	-
V / 2	<i>Arthrobacter polychromogenes</i> / 2, 375	-----	-	+	-	+
VI / 2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> / 1,98	-----	-	+	-	-
VII / 1	<i>Micrococcus luteus</i> / 2,276	-----	-	+	-	-
VIII / 1	<i>Bacillus megaterium</i> / 2,122	-----	-	+	-	-
IX / 1	<i>Acinetobacter lwoffii</i> / 1,961	-----	-	+	-	+
X / 1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> / 2.094	-----	-	+	-	-
XI / 4	<i>Bacillus cereus</i> / 2,069	-----	-	+	-	-

Predpokladáme, že po overení ďalších vlastností by boli tieto mikroorganizmy prípadne nimi produkované enzýmy využiteľné v biotechnologických procesoch a aplikáciách. Skládky nebezpečného priemyselného odpadu môžu tak byť zdrojom unikátnych mikroorganizmov či nimi produkovaných enzýmov.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- HORIKOSHI, K. 1999: Alkaliphiles: Some application of their products for biotechnology, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 735-750.
- SCHWARTZ M., LALÍK V. & VANEK M. 2011: Možnosti využitia odpadového kalu z výroby oxidu hlinitého — *Chem. Listy* 105: 114 – 121.
- ZAVARZINA, D.G., KOLGANOVA, T.V. & BULYGINA, E.S. 2006: *Geoalkalibacter ferrihydriticus* gen. nov., sp. nov., the first alkaliphilic representative of the family Geobacteraceae, isolated from a soda lake. — *Mikrobiologičeskii žurnal* 75 (6): 775–85

## CIRKULÁCIA GIARDIÓZY VO VYBRANÝCH SKUPINÁCH DETÍ A PSOV Z OKOLIA KOŠÍC

Štrkolcová G.<sup>1</sup>, Goldová M.<sup>1</sup>, Halánová M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ústav parazitológie, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Ústav verejného zdravotníctva, UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

V rokoch 2013-14 sme sledovali výskyt giardiózy v rôznych skupinách detí a psov v okolí Košíc. Prvú skupinu - minoritnú tvorili deti z rómskej osady a deti z detského domova v Medzeve. Majoritná skupina detí bola rozdelená podľa veku na 4 podskupiny: 1-5 ročné, 6-9 ročné, 10-14 ročné a staršie ako 14 ročné. Druhú skupinu - majoritnú tvorili deti bežnej populácie, ktoré podstúpili preventívnu prehliadku u svojho pediatra v Medzeve. Treťou sledovanou skupinou boli psy rozdelené na dve skupiny: psy z rómskej osady v Medzeve a psy z útulku Únie vzájomnej pomoci ľudí a zvierat v Haniske pri Košiciach. Vzorky feces boli vyšetrené flotačno-koncentračnou metódou podľa Fausta. V prvej skupine u minoritnej skupiny detí bola prevalencia giardiózy 15,07% (33/219). U detí z detského domova bola prevalencia 40,91% (9/22). V druhej - majoritnej skupine detí sme giardiózu nedetegovali. U psov z osady sme giardiózu našli v jednom prípade (1/24) a v útulku Únie vzájomnej pomoci ľudí a zvierat sme vyšetrili 45 vzoriek trusu psov, z nich 33,3% (15/45) bolo pozitívnych na *Giardia intestinalis*. Predpokladáme, že v týchto skupinách cirkulujú kmene so zoonóznym potenciálom.

### ÚVOD

*Giardia intestinalis* je bičíkatý extracelulárny protozoárny patogén lokalizujúci sa v distálnej časti duodena, proximálnej a strednej časti jejuna. Giardióza je endemická črevná protozoóza širokej škály cicavcov, vrátane psov a ľudí. Je dobre známa ako pôvodca jednej z najrozšírejších črevných infekcií a to ako v miernom pásme, tak aj v tropických oblastiach. Šíri sa fekálno-orálnou cestou a klinicky sa manifestuje od asymptomatického štádia až po akútnu hnačku s ťažkým malabsorbčným syndrómom. Vyvoláva tzv. waterborne a foodborne disease, t.j. infekcia prenášaná vodou a potravou. Zaraďuje sa medzi oportúnne nákazy uplatňujúce sa hlavne u mladých jedincov s ešte neúplne vyvinutou imunitou, pri imunosupresívnych stavoch, alebo sa uplatní ako sekundárna infekcia. *Giardia intestinalis* izolovaná z fekálií ľudí a zvierat je morfológicky identická. Na základe molekulárnych metód bola potvrdená existencia siedmich hlavných genotypov A až G, z ktorých A a B sú zoonotické a sú zodpovedné za 99,2% humánnych prípadov giardiózy (Ballweber a kol., 2010; Sprong a kol., 2012). Genotypy C a D sú genotypy popisované u psov. Genotyp E bol potvrdený u teliat a raticovej zveri, F u mačiek a genotyp G u hlodavcov (Ballweber a kol., 2010). Priebeh nákazy u imunokompetentných jedincov môže byť asymptomatický alebo subklinický, zatiaľ čo u mláďat a jedincov imunosuprimovaných sa vyskytujú klinicky zjavné formy spojené najmä s vodnatými bledými páchnúcimi hnačkami, subfebríliami, bolesťami brucha, nauzeou, anorexiou, flatulenciou, abdominálnou distenziou a stratou hmotnosti. Stolica pri giardióze obsahuje zvýšené množstvo hlienu a tuku. Tieto infekcie mávajú u mláďat vážnejší priebeh, než opakované infekcie v neskoršom veku (Mircean a kol., 2011). Cysty sú odolné vo vonkajšom prostredí a môžu prežiť niekoľko mesiacov v pôde a povrchových vodách v miernych podmienkach (Plutzer et al., 2010). Potenciálne mechanizmy prenosu zahŕňajú prenos z osoby na osobu, zo zvierat'a na zviera, ale aj zoonóznym prenos (zo zvierat'a na človeka, alebo z človeka na zviera), zvyčajne nepriamym spôsobom prostredníctvom kontaminácie životného prostredia.



## MATERIÁL A METODIKA

**Flotačná metóda vyšetrenia stolice:** K 3-5 g stolice sme pridali 10-15 ml vody a dôkladne roztrelí v tretej 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 Faustov 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, prikryli krycím sklíčkom a vyšetřovali pod mikroskopom (Faust a kol, 1938).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**V prvej skupine** sme vyšetřili 219 detí z minoritnej skupiny obyvateľstva, ktorú tvorili deti z oblasti s nízkym hygienickým štandardom – rómske deti. Cysty giardií sme zistili u 15,07% (33/219) detí. U detí z detského domova bola prevalencia giardiózy 40,91% (9/22). Deti z osady boli rozdelené podľa veku na 4 podskupiny: 1-5 ročné, 6-9 ročné, 10-14 ročné a viac ako 14 ročné. Pozitívne prípady boli nájdené vo vekovej kategórii 1-5 ročných (7/89), 6-9 ročných (18/76) a 10-14 ročných (8/43). Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bol v skupine 6-9 ročných (54,54%), čiže detí na prvom stupni školskej dochádzky.

Na základe porovnania relatívneho rizika výskytu giardiózy medzi chlapcami a dievčatami v jednotlivých vekových kategóriách bolo zistené, že riziko infekcie je 1,53x vyššie v skupine chlapcov ako v skupine dievčat ( $P=0,2$ ). Relatívne riziko bolo 1,79x vyššie u chlapcov medzi vekom 6-9 ( $P=0,22$ ), 1,78x vyššie medzi vekom 1-5 ( $P=0,47$ ) a 0,95x nižšie medzi vekom 10-14 ( $P=0,94$ ) oproti dievčatám.

**Druhú skupinu** tvorilo 75 zdravých detí z majoritnej skupiny obyvateľstva, ktoré podstúpili preventívnu prehliadku u svojho pediatra. V tejto skupine sme giardiózu nedetegovali. Relatívne riziko výskytu giardiózy v minoritnej skupine obyvateľstva v porovnaní s kontrolnou majoritnou skupinou detí bolo 23,14, čo znamená, že riziko v skupine rómskych detí bolo 23,14x vyššie v porovnaní s majoritnou skupinou zdravých detí ( $p=0,03$ ).

Všetky pozitívne deti boli preliečené metronidazolom (Entizol), v dávke 5 mg/kg 3-krát denne počas 5 až 10 dní.

**V tretej skupine** boli vyšetřené psy z osady v Medzeve, kde sme našli *Giardia intestinalis* v jednom prípade (1/24). V útulku Únie vzájomnej pomoci ľudí a zvierat v Haniske pri Košiciach sme vyšetřili 45 vzoriek trusu psov, z nich 33,3% (15/45) bolo pozitívnych na *Giardia intestinalis*. Psy sme rozdelili na 2 vekové kategórie mladšie ako 7 mesiacov (23) a staršie ako 7 mesiacov (22). Pri rozdelení podľa veku bolo na *Giardia intestinalis* pozitívnych 30,43 % (7/23) šteniat mladších ako 7 mesiacov a 36,36 % (8/22) psov starších ako 7 mesiacov.

Za rezervoáre infekcie pre človeka sa v súčasnosti považujú psy, mačky a domáce prežúvavce, u ktorých infekcia často nebýva rozpoznaná. Keďže vylučovanie cýst je nepravidelné, ich záchytnosť pri parazitologickom vyšetření závisí od možnosti vyšetřenia vzoriek aspoň z troch za sebou nasledujúcich dní. Výskyt giardiózy hlavne u psov v osade je pravdepodobne vyššia, ale odber trusu od toho istého psa z troch za sebou idúcich dní v osade, kde psy voľne pobežujú je takmer nemožné.

Predpokladáme, že v týchto skupinách detí a psov cirkulujú kmene so zoonóznym potenciálom. Na potvrdenie tejto hypotézy plánujeme prítomnosť týchto zoonózných genotypov *Giardia intestinalis* dokázať využitím molekulárno-biologických metód.

Tab.1. *Giardia intestinalis* u detí – porovnanie pozitívnych prípadov giardiózy vo vzťahu k pohlaviu a veku.

Vek	Chlapci		Dievčatá		Σ		Relatívne riziko	P-hodnota
	N	P (%)	N	P (%)	N	P (%)		
1-5	52	5 (9,62%)	37	2 (5,40%)	89	7 (7,87%)	1,78	P=0,47
6-9	45	13 (28,28%)	31	5 (16,12%)	76	18 (23,68%)	1,79	P=0,22
10-14	22	4 (18,18%)	21	4 (19,05%)	43	8 (18,60%)	0,95	P=0,94
> 14	5	0	6	0	11	0	-	-
<b>Σ</b>	<b>124</b>	<b>22 (17,74%)</b>	<b>95</b>	<b>11 (11,58%)</b>	<b>219</b>	<b>33 (15,07%)</b>	<b>1,53</b>	<b>P=0,2</b>

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G., Cama, V.A. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology*. 2010; 26:180-189.
- Bowman D. D. 2009: *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9.vydanie, St. Louis: Saunders Elsevier, 451 s. ISBN: 978-1-4160-4412-3.
- Faust E.C., D'Antonio J.S., Odom V., Miller M.J., Peres C., Sawitz W., Thomen L.F., Tobie J., Walker J.H. A critical study of clinical laboratory techniques for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1938; 18: 169–183.
- Mircean, V., Györke, A., Cozma, V., 2011: Prevalence and risk factors of *Giardia duodenalis* in dogs from Romania. In *Veterinary Parasitology*. ISSN 0304-4017, vol. 184, no. 2-4, p. 325-329.
- Plutzer, J., Ongerth, J., Karanis, P. *Giardia* taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *International Journal of hygiene and Environmental Health*. 2010; 3213:321-333.
- Weese, J. S., Fulford, M.B. *Companion Animals Zoonoses*. 2011. Blackwell Publishing Ltd. ISBN 978-0-8138-1964-8.
- Feng, Y., Xiao, L. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2011; 24(1):110-111.

## VZŤAH POLYPLOIDIE A PARAZITÁRNEJ INFEKČIE U RÝB

Šmiga Ľ.<sup>1</sup>, Košuthová L.<sup>1</sup>, Košuth P.<sup>1</sup>, Koščo J.<sup>2</sup>, Halačka K.<sup>3</sup>, Manko P.<sup>2</sup>, Ševc J.<sup>2</sup>, Oberhauserová K.<sup>1</sup>, Fedorčák J.<sup>2</sup>, Falatová L.<sup>2</sup>, Oros M.<sup>4</sup>, Barčák D.<sup>4</sup>, Lazar P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice, <sup>2</sup>Fakulta prírodných a humanitných vied, Prešovská univerzita v Prešove, Prešov, <sup>3</sup>Ústav biologie obratlovců, Akademie věd ČR, Brno, <sup>4</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice

### ABSTRAKT

Ploidia zohrávala dôležitú úlohu pri fylogénze a zachovaní rastlinných a živočíšnych druhov, je charakteristická pre nižšie stavovce, akými sú aj kostnaté ryby. O dôležitosti ploidie v prírodných ekosytémoch svedčí výskyt rôzne ploidných jedincov v populáciách rýb. Vzťah medzi parazitizmom a rôznou ploidiou nie je detailne preskúmaný a tejto problematike sa venuje veľmi malá pozornosť. V našej štúdií sme zistili rozdiel v prevalencii parazitov medzi polyploidmi a diploidmi len v jednej lokalite. Na rieke Ondava tohto roku bola zistená viac než dvojnásobná prevalencia *A. transversale* u polyploidov, ako u diploidov. Na tejto lokalite bol pomer počtu diploidných a polyploidných jedincov rovnaký. Ostatné údaje z jednotlivých sezón a na lokalitách neboli štatisticky významné. Rozdiely v prevalencii v jednotlivých veľkostných kategóriách a počas jednotlivých sezón neboli zistené. Neznámy vývinový cyklus *Allocreadium transversale* nám nedovoľuje lepšie pochopiť vzťah polyploidie a parazitizmu.

### ÚVOD

Napriek podrobne zdokumentovanej historickej dôležitosti polyploidie, je mechanizmus vzniku nových polyploidných línií naďalej nejasný. S polyploidnými jedincami sa stretávame najmä u nižších stavovcov, najmä u rýb (Leggatt, Iwama, 2003). „Red Queen“ hypotéza hovorí o neustálej potrebe prispôsobovania sa druhu neustále sa meniacim podmienkam prostredia, teda aj potrebe výskytu jedincov s rôznou ploidiou v populácii (Fritz et al. 1999). Jednou z možností, ktorá nebola doteraz teoreticky zhodnotená je, že polyploidné línie sú primárne rezistentnejšie voči patogénom ako ich diploidní predkovia (Oswald a Nuismer 2007), naopak niektoré práce toto tvrdenie vyvracajú (Guégan, Morand, 1996). 86 rozličných štúdií mapovalo rastlinné a živočíšne hybridné populácie pre objasnenie zásad infekcie. Vzťah medzi parazitizmom a rôznou ploidiou nie je detailne preskúmaný a tejto problematike sa venuje veľmi malá pozornosť. Vedecké výskumy v tomto smere prebiehajú najmä u hospodársky významných druhov rýb. Fritz et al. (1999) predkladá až štyri rozličné statické scenáre pre distribúciu parazitov u hybridných versus rodičovských taxónoch. Nejasný vzťah medzi intenzitou infekcie a úrovňou ploidie druhu cobitidov zaznamenal vo svojej práci Popiolek and Kotusz (2003). Populácie plžov sú vďaka výskytu jedincov s rôznou ploidiou na rovnakých lokalitách ideálnymi modelovými druhmi pre skúmanie tohto vzťahu.

### MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrili sme 503 jedincov druhu *Cobitis elongatoides* (Cypriniformes, Cobitidae) z modelových riek Okna, Ondava a Roňava, počas sezónnych odberov v období rokov 2011 – 2014. Odlov rýb bol vykonaný pomocou elektrického agregátu. Získané dáta biotických a abiotických parametrov prostredia modifikovanou metódou boli zaznamenané v terénnych protokoloch. Helmintologickou pitvou zameranou na endoparazity, sme získali informácie o druhovej diverzite parazitofauny plžov. Následne sme stanovili základné epizootologické indexy, ako prevalenciu (P) a intenzitu infekcií (I.i) (Bush et al. 1997) vo vzťahu k dĺžke tela, sezóne a ploidií hostiteľa. Parazity boli fixované horúcim 4 % formalínom alebo 70 % etylalkoholom. Determinácia parazitov bola vykonávaná na základe mikrometrie a mikrofotografie pomocou skenovacieho mikroskopu a svetelného mikroskopu Olympus BX

41 TF a kamerového systému AXIO CAM ERc 5s s príslušným softvérom a determinačných kľúčov (Ergens a Lom 1970; Moravec 1994). Určenie ploidie bolo vykonávané na Ústave biologie obratlovců Akademie věd v Brne.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parazitofauna vyšetrených rýb: *Allocreadium transversale* ad. (Digenea, Allocreadidae) – dominantný druh, adulty v čreve, intenzita infekcie (I.i.) 1 – 12; *Clinostomum* sp. larv. (Digenea, Clinostomidae) – satelitný druh, metacerkárie lokalizované v podkoží, I.i = 1 - 4. Nematoda – sporadický nález larválnych štádií v čreve, v dvoch prípadoch, I.i. = 1 a Acantocephala v štyroch prípadoch, I.i. = 1 - 2.

Tab. 1: Prevalencie a intenzity *Allocreadium transversale* u diploidných a polyploidných populáciách z troch lokalít počas rôznych odberových sezón.

Lokalita a dátum	Celkový počet vzoriek	Diploidná populácia				Polyploidná populácia			
		Prevalencia (P)	P (%)	I.i.	I.i. Ø	Prevalencia (P)	P (%)	I.i.	I.i. Ø
<b>Okna</b> (07.2011)	52	4/47	8,5	1-4	2	1/4	20	1	1
<b>Ondava</b> (09.2012)	94	<b>3/51</b>	<u>5,8</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<b>3/43</b>	<u>6,9</u>	<u>1-2</u>	<u>1</u>
<b>Roňava</b> (07.2013)	49	18/42	42,8	1-5	2	6/7	85,7	1-4	2
<b>Okna</b> (05.2013)	47	17/38	44,7	1-3	1	2/9	22,2	1-2	1
<b>Ondava</b> (07.2013)	53	<b>6/29</b>	<u>20,6</u>	<u>1-2</u>	<u>1</u>	<b>6/24</b>	<u>25</u>	<u>1-2</u>	<u>1</u>
<b>Ondava</b> (09.2013)	60	4/28	14,2	1-3	1	6/32	18,75	1-6	2
<b>Ondava</b> (14.3.2014)	77	<b>5/41</b>	12,1	1 - 4	2	<b>13/36</b>	36,11	1 - 5	2
<b>Okna</b> (25.6.2014)	71	<b>29/49</b>	59	1 - 12	3	<b>12/22</b>	55	1 - 6	3

Tab. 2: Prevalencia *Allocreadium transversale* ad. u jednotlivých veľkostných kategórii/ Tab. 3: Prevalencia *Allocreadium transversale* ad. pri rôznych teplotách.

Dĺžka vyš. rýb (SL mm)	Celkový počet vzoriek	Prevalencia (%)
< 59	70	18,60%
60-89	326	32%
90 <	104	18,30%

Teplota	Prevalencia	Prevalencia (%)
9 °C	18/77	23,4
18 – 20 °C	93/334	27,8

*Allocreadium transversale* je dominantným druhom rýb rodu *Cobitis* (Popiolek, Okulewicz, Kotusz, 2003; Popiolek a Kotusz, 2003), bol nájdený u oboch ploidných skupín. Nízku intenzitu infekcie tohto parazita a vysokú prevalenciu na niektorých lokalitách predpokladáme vysokým počtom infikovaných medzihostiteľov a nižším počtom larválnych štádií. Polyploidy majú predpoklady byť lepším hostiteľom pre parazity, pretože dosahujú väčšie rozmery, krmia sa väčším množstvom potravy (Benfey, 2001) a majú menej vyvinutý imunitný systém (Guégan a Morand, 1996). Polyploidné jedince neinvestujú do rozmnožovania, tak veľa energie ako diploidné (Guégan a Morand, 1996). V našej štúdii tento rok bola na rieke

Ondava zistená viac než dvojnásobne vyššia prevalencia *A. transversale* u polyploidov, ako u diploidov. Na tejto lokalite bol pomer počtu diploidných a polyploidných jedincov rovnaký. Ostatné údaje z jednotlivých sezón a lokalít neboli štatisticky významné. Na rieke Okna prevládali diploidné jedince a to v pomere 4 : 1. Odlov na rieke Roňava bol realizovaný len počas jednej sezóny, preto sme túto lokalitu v tomto smere nevyhodnocovali. Rozdiely v prevalenciách sme nezaznamenali u jednotlivých veľkostných kategórií, z čoho usudzujeme, že medzihostiteľ *A. transversale* (napr. *Ephemera danica* a *E. vulgata*) je požíraný všetkými jedincami v populácii. Rast metacerkárii v medzihostiteľovi je najrýchlejší pri nižších teplotách na jeseň, preto je prevalencia v definitívnom hostiteľovi práve počas tohto obdobia najvyššia (Meyer a Radulescu, 1979), my sme tento trend nezaznamenali. Neznámy vývinový cyklus *Allocreadium transversale* nám nedovoľuje lepšie pochopiť vzťah polyploidie a parazitizmu.

*Táto práca vznikla za podpory projektov VEGA projects No. 1/0916/14 and 1/0847/13.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Lamošová D, Zeman M. Effect of leptin and insulin on chick embryonic muscle cells and hepatocytes. *Physiol Res.* 2001; 50:183-9.
- Benfey T J. Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture. *J. Mar. Sci.* 2001; 58:525 – 9.
- Bush A O. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *The Journal of Parasitology.* 1997; 83:575-83.
- Ergens R, Lom J. Původci parazitárních nemocí ryb. Praha:Academia, 1970. 384 s.
- Fritz S, Moulia C, Newcombe G. Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens and parasites. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 1999; 30:565-91.
- Guégan J F, Morand S. Polyploid hosts: strange attractors for parasites? 1996; 77:366-9.
- Leggatt A R, Iwama K G. Occurrence of polyploidy in the fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 2003;13:237-46.
- Meyer E A, Radulescu S. *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology.* 1979; 17: 1-47.
- Moravec F. Checklist of the Metazoan parasites of fishes of the Czech republic and the Slovak republik (1873–2000). Praha:Academia, 2001. 168 p. ISBN 80-200-0907-8.
- Popiolek M, Kotusz J. Endoparasitic Helminths of Fishes of the Genus *Cobitis* from Poland. *Folia biologica (Krakow).* 2003; 51:173-8.
- Popiolek M, Okulewicz J, Kotusz J. The first record of *Allocreadium transversale* (Rudolphi, 1802) (Digenea, Allocreadiidae) from cobitid fishes of poland. *Helminthologia.* 2003; 40:245-6.
- Marcogliese D J. Parasites: small players with crucial roles in the ecological theatre. *EcoHealth.* 2004; 1:151-64.

## ŠTÚDIUM KARCINÓMU PRSNEJ ŽĽAZY POMOCOU FLUORESCENČNÝCH TECHNÍK

Špaková I.<sup>1</sup>, Tomečková V.<sup>1</sup>, Bilecová-Rabajdová M.<sup>1</sup>, Urban P.<sup>1</sup>, Fialkovičová V.<sup>2</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav lekárskej a klinickej biochémie a Labmed a.s., Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, 040 11 Košice

<sup>2</sup> Gynekologicko-pôrodnická klinika UPJŠ LF a UN LP, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, 040 11 Košice

### ABSTRAKT

Pri nádorových ochoreniach dochádza k patologickým kvantitatívnym aj kvalitatívnym zmenám endogénnych fluorofórov. Sledovanie endogénnej fluorescence redukovaného nikotínamidadenínindukleotidu (NADH+H<sup>+</sup>), ktorého koncentrácia narastá v dôsledku zvýšenej anaeróbnej glykolýzy v rýchlo sa deliacich bunkách, fluorescenčnými technikami by mohlo byť využité na diagnostické účely.

### ÚVOD

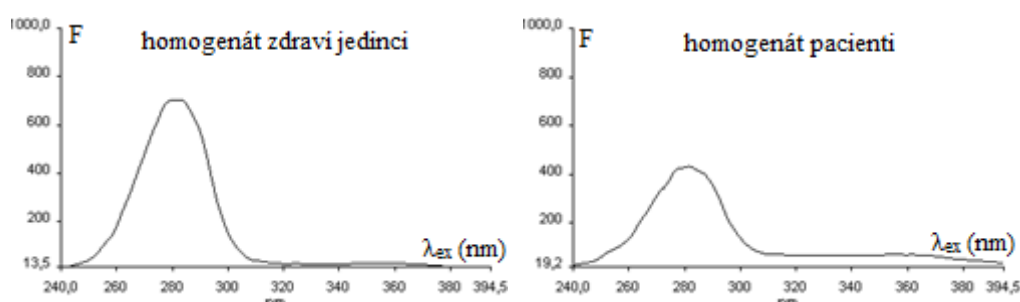
Rakovina je invazívne ochorenie, ktoré sa dá identifikovať pomocou rôznych markerov. Je známe, že na vznik rakovinových buniek majú vplyv vonkajšie ale aj vnútorné podnety. Gény každého jedinca obsahujú vo svojej výbave určité množstvo rizikových génov tzv. onkogénov napríklad rakoviny prsníka (BRCA1, BRCA2, CHEK2, PTEN, M6-b, Dr6, ATM a TP53 a ďalších). V zdravom organizme sú onkogény pod kontrolou, ale po poškodení napríklad mutáciou dochádza k chybnému prepisu genetickej informácie a následne môže dôjsť k vzniku rakoviny. Jedným z možných markerov vývoja rakoviny prsníka je sledovanie koncentrácie NADH+H<sup>+</sup>. Množstvo tohto kofaktoru sa zvyšuje v dôsledku zvýšenej glykolýzy v rýchlo sa deliacich bunkách, ktoré potrebujú okamžitý zdroj energie (ATP). Pre štúdium endogénneho fluorofóru NADH+H<sup>+</sup> [1], ktorý má charakteristickú excitačnú endogénnu fluorescenciu v oblasti  $\lambda = 340$  nm a emisnú fluorescenciu v oblasti  $\lambda = 450$  nm po excitácii  $\lambda = 360$  nm, bola použitá metóda synchronného fluorescenčného fingerprintu (SFF). Touto technikou je možné sledovať nielen zmeny v koncentrácií NADH+H<sup>+</sup>, ale aj proteínov tak vo vzorkách tkaniva, ako aj krvi zdravých jedincov i pacientov. Cieľom tejto štúdie bolo pozorovať zmeny nastávajúce v tkanive a krvnej plazme v dôsledku ochorenia a štatisticky porovnať ich významnosť v porovnaní so zdravými jedincami.

### MATERIÁL A METODIKA

Vzorky krvnej plazmy (0,5  $\mu$ l) a homogenátu prsnej žľazy (0,5  $\mu$ l) pacientov a zdravých jedincov boli riedené fosfátovým tlmivým roztokom (0,2 mol.l<sup>-1</sup>, pH = 7,4). Následne boli uskutočnené merania daných vzoriek pomocou SFF pri teplote 25 °C v rozsahu vlnových dĺžok 240 – 400 nm. Z horizontálnych rezov ( $\Delta\lambda = 50$ ) synchronných fluorescenčných fingerprintov krvnej plazmy a tkanivového homogenátu prsnej žľazy bolo namerané autofluorescenčné maximum v oblasti  $\lambda_{ex} = 280$  nm, ktoré predstavuje zmes proteínov a aromatických aminokyselín. Ďalšie autofluorescenčné maximum NADH+H<sup>+</sup> bolo určené v oblasti  $\lambda_{ex} = 340-360$  nm. Emisné fluorescenčné merania (t = 25 °C) krvnej plazmy a homogenátu prsnej žľazy (2  $\mu$ l) boli uskutočnené pomocou fluorescenčného nanodropu s excitačnou vlnovou dĺžkou  $\lambda_{ex} = 360 \pm 10$  nm. Štatisticky boli výsledky vyhodnotené testom Tukey-Kramer Multiple Comparisons, Kolmogorovou - Smirnovou metódou. Získané dáta boli spracované a kvantitatívne vyhodnotené pomocou One-way ANOVA testu. Pre minimalizáciu variability výsledkov autofluorescencie biologického materiálu boli vzorky merané v sériových opakovaníach.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

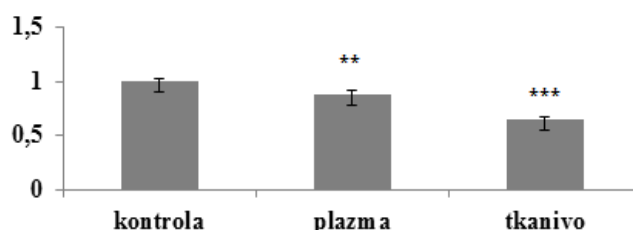
Vo fluorescenčných spektrách pacientov s karcinómom prsníka a zdravých jedincov boli pozorované maximá fluorescencie zmesi rôznych endogénnych fluorofórov hlavne porfyrínov, kolagénov, NADH+H<sup>+</sup> a flavínov. Maximálna intenzita excitačnej autofluorescenčného centra krvnej plazmy zdravých jedincov SFF bola  $F = 700 \pm 70$ , umiestneného pri  $\lambda_{\max} = 280 \pm 5$  nm a  $\Delta\lambda = 70$  nm. U pacientov s histologicky potvrdenou diagnózou duktálneho invazívneho karcinómu prsnej žľazy bolo pozorované na SFF jediné maximum intenzity autofluorescencie krvnej plazmy  $F = 650 \pm 50$ , ktoré sa nachádzalo pri  $\lambda_{\max} = 280 \pm 5$  nm /  $\Delta\lambda = 70$  nm. Z horizontálnych rezov ( $\Delta\lambda = 50$ ) synchronných fluorescenčných fingerprintov tkanivového homogenátu prsnej žľazy zdravých jedincov bolo namerané autofluorescenčné maximum  $F = 700 \pm 50$  umiestnenej pri  $\lambda_{\max} = 280 \pm 5$  nm (Obr. 1-homogenát zdraví jedinci), kým autofluorescencia homogenátov prsnej žľazy u pacientov s karcinómom prsníka bola znížená  $F = 450 \pm 50$ ,  $\lambda_{\max} = 280 \pm 5$  nm (Obr. 1-homogenát pacienti).



Obr. 1 – Horizontálny rez SFF  $\Delta\lambda = 50$  tkanivového homogenátu prsnej žľazy.

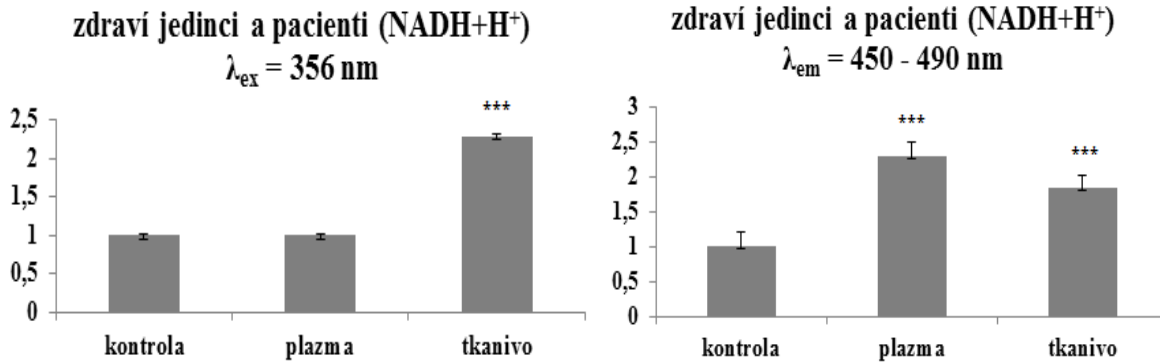
Intenzita emisnej fluorescencie NADH+H<sup>+</sup> krvnej plazmy a tkanivového homogenátu prsnej žľazy pacientov s karcinómom bola signifikantne zvýšená oproti zdravým jedincom, ktorá bola meraná pri konštantnej  $\lambda_{\text{ex}} = 360 \pm 10$  nm v oblasti  $\lambda_{\text{em}} = 450 - 490$  nm. Zvýšenie intenzity fluorescencie NADH+H<sup>+</sup> je markerom nedostatku kyslíka, tak ako to pozorovali aj Zhang a kol. a Pu a kol. [2, 3]. Autofluorescencia vzoriek krvnej plazmy a tkaniva prsnej žľazy pacientov s karcinómom prsníka sa signifikantne významne znížila v oblasti s maximom intenzity pri  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm (Obr. 2).

### zdraví jedinci a pacienti (proteíny) $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm



Obr. 2 – Signifikatné zmeny intenzity autofluorescencie proteínov  $\lambda_{\max} = 280$  nm v horizontálnych rezoch SFF pri  $\Delta\lambda = 50$  nm SFF (plazma:  $p < 0,01$ ; tkanivo:  $p < 0,001$ ).

Naopak, intenzita autofluorescencie a emisnej fluorescencie NADH+H<sup>+</sup> krvnej plazmy a tkaniva prsnej žľazy pacientov s karcinómom prsníka (Obr. 3) bola zvýšená oproti kontrole, tak ako to pozoroval Mayevsky [4].



Obr. 3 – Signifikantné zmeny intenzity autofluorescencie NADH+H<sup>+</sup>  $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$  v horizontálnych rezoch pri  $\Delta\lambda = 50 \text{ nm}$  SFF (plazma:  $p > 0,05$ ; tkanivo:  $p < 0,001$ ) a emisnej fluorescence NADH+H<sup>+</sup>  $\lambda_{\text{max}} = 450 - 490 \text{ nm}$  (plazma:  $p < 0,001$ ; tkanivo:  $p < 0,001$ ).

Ak je v bunke dostatok kyslíka, poklesne koncentrácia redukovaného NADH+H<sup>+</sup>, čo sa prejaví zníženou fluorescenciou. Nedostatok kyslíka v mitochondriách zvýši tvorbu NADH+H<sup>+</sup>, čo sa prejaví nárastom intenzity fluorescence. Naopak, pre proteíny v tumorových bunkách platí, že k zníženiu intenzity autofluorescencie dochádza v dôsledku rozbalenia a degradácie plazmatických bielkovín [5].

*Práca vznikla pri riešení projektu VEGA-1/0115/14.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Mokry M. a kol. 2005. Úprava optosondy luminiscenčného spektrometra Perkin-Elmer LS 55 na meranie fluorescenčných spektier kožných povrchov. Chemické listy 99, str. 653-656.
2. Zhang Q., Muller J. a kol. 2000. Turbidity – free Fluorescence Spectroscopy of Biological Tissue. Opt. Lett. 25, str. 1451-1453.
3. Pu Y., Wang W. a kol. 2013. Native Fluorescence Spectra of Human Cancerous and Normal Breast Tissues Analyzed with non-Negative Constraint Methods. Applied Optics 52 (6), str. 1293-1301.
4. Mayevsky, Rogatsky. 2007. Mitochondrial Function in vivo evaluated by NADH Fluorescence: from Animal Models. American Journal of Cell Physiology. Volume 61, Issue 2, p. p. 615-640.
5. Mattley Y. 2013. Modular Spectroscopy Tools for Measuring Intrinsic Protein Fluorescence.



## **IN VITRO KULTIVÁCIA POTKANÍCH SCHWANNOVÝCH BUNIEK U DOSPELÉHO TKANIVA**

Tomko P., Vanický I.

*Neurobiologický ústav Slovenskej akadémie vied, Košice*

### **ABSTRAKT**

Cieľom práce je vypestovanie dostatočne veľkej populácie Schwannových buniek (SC) a ich následné využitie pri autológnych transplantáciách. Použili sme metodiku z Komiyawa et al., 2003. Na rozdiel od tejto práce sme použili stredný nerv, keďže jeho odstránenie má menej negatívny dopad na laboratórne zviera. Nerv bol podviazaný, prerušený a rana sa opätovne uzavrela. Zviera sme nechali týždeň prežívať, čím sa docielila predegenerácia nervu v procese Wallerovej degenerácie. Nerv sme odobrali (približne 1cm), nasekali na milimetrové kúsky a vložili do kultivačných misiek s DMEM s 10% FBS. Po troch dňoch sme vymenili médium za médium bez FBS a po ďalších troch dňoch sme podali DMEM s 2,5% FBS. Týmto médium sme krmili kultúru až do posledného, 21. dňa. V tomto protokole neboli použité žiadne mitogény. Po 21. Dňoch však SC nevytvorili súvislú vrstvu a kultúra je prerastená fibroblastami. SC tvorili v najlepšom prípade 42% kultúry. V porovnaní s protokolom je tento počet veľmi nízky. Pre využitie v mikrotransplantačných štúdiách je tento počet nedostatočný a preto je potrebné použiť iný protokol, najskôr obsahujúci mitogény.

### **ÚVOD**

V súčasnej dobe sa testuje mnoho spôsobov ako regenerovať poškodené nervové vlákna. Ako jedná z možností sa ukazujú „scaffolds“ naplnené SC. Jedná sa o transplantát z biodegradovateľných materiálov, ktoré sa postupom času rozložia. Ďalšou z výhod je, že vďaka autológnej transplantácii sa neobjavuje imunitná odpoveď. Avšak vypestovanie dostatočne veľkej kultúry SC za čo najkratší čas je mnohokrát komplikované (Verdu et al., 2000). Hlavným problémom je prerastenie kultúry odolnejšími bunkami, hlavne fibroblastami (La Fleur et al. 1996), ktoré sa však v istom množstve ukazujú ako podpora pre rast kultúry. V tomto príspevku sa budem zaoberať metódou, ktorá by mala viesť k vypestovaniu čistej kultúry SC počas 21 dní, pričom počas prvých dní sa v kultúre nachádzajú aj fibroblasty, podporujúce rast, ale následne sú vhodne volenou metódou odstránené. Pri regenerácii sa SC používajú ako podpora pre rastúce axóny a taktiež vedú ich rast správnym smerom. V bunkovej kultúre majú SC bi- alebo tripolárny predĺžený tvar s malým jadrom (Kaewkhaw et al., 2012).

### **MATERIÁL A METODIKA**

Pri práci bol použitý protokol Komiyawa et al., 2003. V experimentoch sme použili laboratórne potkany kmeňa Zvieratá boli uspané isofluránom a oholené na bruchu a vnútornej strane predných končatín. Nastrihnutím kože na vnútornej strane hrudníkových končatín sme odhalili stredný nerv (nervus medianus). Nervus medianus bol podviazaný v proximálnej časti a následne bol prerušený. Rana bola chirurgicky uzavretá a zviera bolo ponechané na týždňové prežívanie. Tým sme dovolili aby nastal proces nazývaný Wallerova degenerácia. Po týždni sme zviera znova uspali, otvorili ranu, odhalili predegenerovaný nerv a odobrali sme asi 10mm. Nerv sme opláchli v médiu s pridanými 1% antibiotikami (ATB). Odobratý nerv sme očistili od epineuria a nakrájali na kúsky dlhé približne 1mm. Tie sme následne tri hodiny trávili v 0,05% roztoku kolagenázy. Následne sme ich desať minút centrifugovali. Natrávené kúsky sme umiestnili do kultivačných misiek pokrytých roztokom laminínu. Následne sme pridali DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) s 1% ATB a 10% FBS (fetal bovine serum). Po troch dňoch sme odobrali médium a pridali DMEM s 1% ATB bez FBS. Po ďalších troch dňoch sme kúsky nervu preniesli do ďalšej misy a vymenili médium

za DMEM s 1% ATB a 2,5% FBS. Toto médium sme podávali bunkám každé tri dni po dobu 21 dní. Následne bola kultúra zafixovaná paraformaldehydom a zafarbená dvojitým imunofarbením s použitím protilátky S-100 (pre SC) a DAPI (pre bunkové jadrá). Bunky boli pozorované pomocou fluorescenčného mikroskopu, nafotené a vyhodnotené.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultúra bola pripravená zo siedmich rôznych zvierat (rôzne vekové zloženie). V kultúre sa nachádzali tri pozorovateľné zložky – SC, fibroblasty a zvyšky natrávených nervov. Spracovanie výsledkov bolo urobené pomocou dvojitého farbenia, S-100 (pre SC) a DAPI (pre bunkové jadrá). Po porovnaní množstva SC ku celkovému počtu buniek sme prišli k záveru, že SC majú 0 až 42% zastúpenie v kultúre. Fibroblasty vo všetkých prípadoch tvorili väčšinu buniek v kultúre. Ani v jednom prípade sa nepodarilo pripraviť kultúru, ktorá by vytvorila na povrchu súvislú vrstvu.

Naším cieľom je vypestovanie čo najčistejšej kultúry SC (>90%) v čo najkratšom čase a najlepšie bez prídavku mitogénov. Zmeny v koncentrácii FBS by mali vplývať na proliferáciu jednotlivých typov buniek. Pri vyššej koncentrácii FBS proliferujú ako fibroblasty tak SC, odstránenie FBS z média zastavuje proliferáciu buniek, následné zvýšenie koncentrácie na nižšiu koncentráciu spôsobí proliferáciu SC (Komiya, 2003). V nami vytvorených kultúrach však k vyselektovaniu čistých SC nedošlo. Všetky kultúry boli prerastené fibroblastami aj napriek zmenám v koncentráciách séra. Komiya udáva, že viac ako 90% buniek bolo SC. Nám sa nepodarilo prekročiť ani hranicu 50%. Taktiež nedošlo k vytvoreniu súvislej vrstvy buniek, hoci v protokole sa popisuje porastenie celej plochy povrchu. Tento výsledok by sa dal odstrániť nanosením iných povrchov, na ktorých by sme pestovali bunky. V niektorých prípadoch bola kultúra úplne vymretá. To mohlo byť spôsobené buď infikovaním, zlou manipuláciou alebo neúplným spracovaním nervového tkaniva. Pre vytvorenie kultúry SC by bolo vhodné použiť mitogény, čo by nebolo vhodné pre aplikáciu v medicíne, zamerať sa na rozdiely v metabolizme SC a fibroblastov (Keawkhaw, 2013) alebo na ich rozdielne správanie sa, pri zmenách vonkajších faktorov (Jirsová et al., 1997).

*Projekt VEGA č.2/0183/13 Transplantácia tkanivových konštruktov pre regeneráciu poškodených nervových vlákien*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Jirsová K., Sodaar P., Mandys V. & Bär P.R. 1997. Cold jet: a method to obtain pure Schwann cell culture without the need for cytotoxic, apoptosis-inducing drug treatment. *Journal of Neuroscience Methods* 78(1997) 133-137.
- Keawkhaw R., Scutt A. M. & Haycock J. W. 2012. Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue. *Nature Protocols* vol.7 no.11. 2012.
- Komiya T., Nakao Y., Toyama Y., Asou H., Vacanti C. A. & Vacanti M. P. 2003. Novel technique to isolate adult Schwann cells for an artificial nerve conduit. *Journal of Neuroscience Methods* 122(2003) 195-200.
- La Fleur M., Underwood J. L., Rappolee D. A. & Werb Z. 1996. Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J Exp Med* 196;184(6):2311 – 26.
- Verdu E., Rodriguez F. J., Gudino-Cabrera G., Nieto-Sampedro M. & Navarro X. 2000. Expansion of adult Schwann cells from mouse predegenerated peripheral nerves. *Journal of Neuroscience Methods* 99(2000) 111-117.

# GENOTYPIZÁCIA PÔVODCU MORU VČELIEHO PLODU, *PAENIBACILLUS LARVAE*

Vaníková S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, <sup>2</sup> Katedra genetiky, UPJŠ, Košice

## ABSTRAKT

*Paenibacillus larvae* je Gram pozitívna baktéria, ktorá vyvoláva ochorenie mor včelieho plodu. Infekčné spóry sa do tela larvy dostávajú alimentárnou cestou, následne v tráviacom trakte klíčia a larva hynie na celkovú sepsu. Cieľom práce bola základná genotypizácia získaných kmeňov *P. larvae* s využitím metód založených na PCR. Využitie rep-PCR fingerprintingu s pomocou primérov BOX A1R a MBO REP1 umožnilo rýchlu identifikáciu genotypov siedmich kmeňov *P. larvae*. Na základe prítomnosti/absencie jednotlivých fragmentov získaných pomocou rep-PCR analýzy možno rozlíšiť 3 rôzne genotypy, pričom 2 genotypy už boli popísané, AB a aB. Tretí genotyp zaznamenaný u kmeňa CCM 38, ktorý doposiaľ nebol popísaný, sa výrazne líšil neprítomnosťou ďalších fragmentov. Dendrogram skonštruovaný na základe podobnosti proteínových profilov získaných pomocou MALDI-TOF analýzy znázorňuje grupovanie izolátov, ktoré čiastočne potvrdzuje ich rozdelenie do troch skupín podľa rep-PCR analýzy. Použitím RFLP analýzy nebola odhalená žiadna variabilita 16S rRNA.

## ÚVOD

*Paenibacillus larvae* je Gram pozitívna baktéria, ktorá postihuje larvy včiel. Vyvoláva závažné ochorenie mor včelieho plodu, ktoré je vysoko nákazlivé. Spóry, ktoré sú pre larvu infekčné sa do tela dostávajú alimentárnou cestou. V tráviacom trakte lariev klíčia a vegetatívne štádia baktérií napádajú telo larvy. Larva následne hynie na celkovú sepsu.

V súčasnosti sa pozornosť o *P. larvae* upriamuje na genetický aspekt problému. Na základe PCR metód zameraných na repetitívne sekvencie bolo popísaných niekoľko rôznych genotypov *P. larvae*. Existujú tri hlavné súbory repetitívnych elementov: repetitívne extragénové palidromické (REP) elementy, enterobakteriálne repetitívne intragénové sekvencie (ERIC) a BOX elementy (Versalovic a kol., 1994). Na základe kombinácie fragmentov získaných s priméromi BOX A1R a MBO REP1 možno získať teoreticky až 9 rôznych genotypov *P. larvae*: AB, Ab, Aβ, aB, ab, aβ, αB, αb, αβ. V Európskych krajinách (Nemecko, Rakúsko, Bulharsko) bolo zaznamenaných 6 rôznych genotypov: AB, Ab, ab, aB, αB, αb (Genersch a Otten, 2003; Neuendorf a kol., 2004; Lončarić a kol., 2009; Rusenova a kol., 2013), z ktorých najčastejšie sa vyskytujúci bol genotyp ab. Na Slovensku zatiaľ podobná štúdia nebola urobená.

Cieľom práce bola základná genotypizácia získaných kmeňov *P. larvae* s využitím PCR metód.

## MATERIÁLY A METÓDY

Celkovo bolo testovaných 8 kmeňov *P. larvae*, z čoho 3 kmene boli divoké, izolované z úl'ov, a 4 kmene pochádzajú z českej zbierky mikroorganizmov z Brna. Divoké kmene boli izolované z infikovaných uhynutých lariev, označené 5S, 10S, D3 a D4. Všetky kmene *P. larvae* boli kultivované na MYPGP agare (Dingman a Stahly, 1983) a identifikované pomocou prístroja MALDI-TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany). Na základe analýzy proteínových profilov prístrojom MALDI-TOF Biotyper bol skonštruovaný strom podobnosti jednotlivých izolátov.

Na genotypizáciu boli použité priméry (Versalovic a kol. 1994): BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), MBO REP1 (5'-CCGCCGTTGCCGCCGTTGCCGCCG-3'). Na PCR analýzu bol použitý Taq Core Kit (Jena Bioscience, Germany).

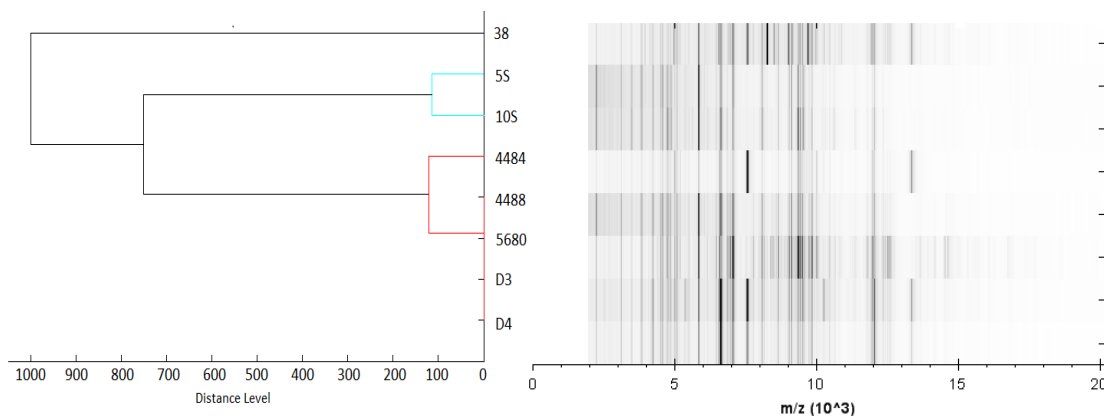
Podmienky pre PCR reakciu boli nasledovné: po počiatkovej denaturácii 95°C, 15 min. nasledovalo 37 cyklov: denaturácia 94°C, 1 min.; hybridizácia pri 53°C, 1 min., elongácia pri 72°C, 2,5 min. a konečná elongácia pri 72°C, 10 min.

Gén 16S rRNA bol amplifikovaný s použitím univerzálnych primérov fD1 a rP2 (Weisburg et al. 1991). Na PCR analýzu bol použitý Taq Core Kit. Podmienky pre PCR reakciu boli nasledovné: po počiatkovej denaturácii pri 94°C, 5 min nasledovalo 30 cyklov: denaturácia pri 94°C, 1 min, hybridizácia pri 54°C, 1 min, elongácia 72°C, 1,5 min, a finálna extenzia pri 72°C, 10 min. Získané amplikóny o veľkosti 1500 bp boli štiepené restriktčnými endonukleázami MboI, TaqI a TasI, podľa príslušného protokolu (Fermentas, Germany).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe podobnosti proteínových profilov získaných pomocou MALDI-TOF analýzy bol skonštruovaný dendrogram znázorňujúci podobnosť jednotlivých kmeňov (Obr. 1). Na dendrograme je možné vidieť grupovanie samostatných izolátov. Kmeň 38 sa výrazne odčleňuje od ostatných kmeňov. Divoké kmene 5S a 10S tvoria ďalšiu samostatnú vetvu. Tretia vetva dendrogramu predstavuje najväčšie zoskupenie izolátov, ktorá znázorňuje, že kmene 4488, 5680, D3 a D4 sú identické. Avšak vizualizácia porovnania príslušných proteínových profilov poukazuje na vyšší stupeň variability.

Všetky kmene boli podrobené RFLP analýze génu 16S rRNA. Použitím tejto analýzy však neboli zaznamenané rozdiely vo veľkosti štiepených fragmentov (Obr. 2).

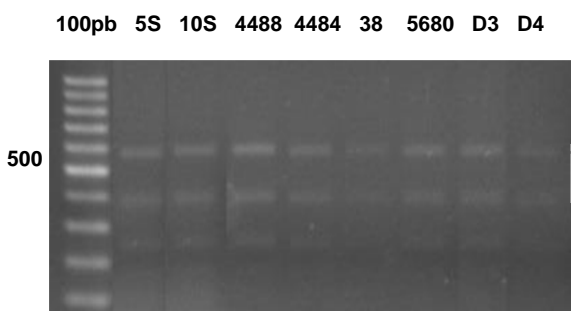


Obr. 1 Dendrogram znázorňujúci podobnosť izolátov *P. larvae* skonštruovaný MALDI TOF analýzou na základe porovnania proteínových profilov

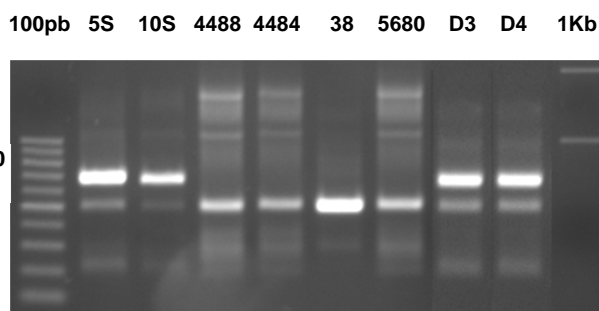
Využitie rep-PCR fingerprintingu s využitím primérov BOX A1R a MBO REP1 umožnilo rýchlu identifikáciu genotypov ôsmich kmeňov *P. larvae*. Študované kmene produkovali fragmenty v rozsahu od 150 do 2000 bázových párov. Veľkosť fragmentov získaných pomocou BOX A1R priméru bola v rozmedzí 200 až 2000 bp. Celkovo bolo viditeľných 5 rozpoznateľných fragmentov (Obr. 3). Na základe prítomnosti/absencie jednotlivých fragmentov možno rozlíšiť 3 rôzne genotypy. Kmeň CCM 38 sa rovnako ako na dendrograme výrazne odlišuje. Všetky divoké kmene (5S, 10S, D3, D4) vykazujú rovnaký genotyp. Ostatné kmene (CCM 4488, CCM 4484, CCM 5680) prislúchajú tretiemu genotypu. V konfrontácii s týmito výsledkami je dendrogram, ktorý poukazuje na podobnosť 2 divokých kmeňov (D3, D4) s tromi zbierkovými kmeňmi (CCM 4488, CCM 4484, CCM 5680). S využitím priméru MBO REP1 boli u všetkých kmeňov rozoznateľné 4 fragmenty v rozsahu 700 až 2000 bp. Podobnej genotypizácii sa vo svojich prácach venovalo viacero autorov (Genersch a Otten, 2003; Neuendorf a kol., 2004). Na základe kombinácie fragmentov získaných s priméromi BOX A1R a MBO REP1 možno získať teoreticky až 9 rôznych genotypov *P. larvae*: AB, Ab, Aβ, aB, ab, aβ, αB, αb, αβ. Pre primér BOX A1R je charakteristická prítomnosť/

neprítomnosť jedného až dvoch fragmentov o veľkosti 700bp, na základe čoho sa rozoznávajú subtypy A, a,  $\alpha$ . Subtypy B, b, a  $\beta$  sa vyhodnocujú na základe fragmentov o veľkosti 1000bp. Pomocou primérov BOX A1R a MBO REP1 možno rozdeliť naše izoláty do troch genotypov, pričom 2 genotypy už boli popísané, AB (5S, 10S, D3, D4) a aB (CCM 4488, CCM 4484, CCM 5680) (Genersch a Otten, 2003; Lončarić a kol., 2009). Tretí genotyp (CCM 38) sa výrazne líši neprítomnosťou ďalších fragmentov a doposiaľ nebol zaznamenaný.

S využitím rôznych metód bola odhalená určitá variabilita medzi získanými kmeňmi *P. larvae*. Rep-PCR analýza odhalila variabilitu na úrovni genómu, ktorá sa však nepotvrdila pri RFLP analýze. Rovnako aj MALDI-TOF analýza čiastočne potvrdila túto diferenciáciu. Avšak MALDI TOF analýza poukazuje na vyšší stupeň variability. Význam genotypizácie kmeňov *P. larvae* spočíva v možnosti určiť ich infekčnosť. Za najinfekčnejší sa považuje genotyp AB, ktorý bol zaznamenaný aj v tejto práci (Genersch a kol., 2005).



Obr. 2 RFLP analýza 16S rRNA izolátov *P. larvae* s TasI restriktázou



Obr. 3 rep-PCR fingerprinting izolátov *P. larvae* s použitím BOX A1R priméru

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dingman DW, Stahly DP. Medium Promoting Sporulation of *Bacillus larvae* and Metabolism of Medium Components. *Appl Environ Microbiol.* 1983; 46 (4):860–869.
- Genersch E, Otten C. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie.* 2003; 34:195–206.
- Genersch E. et al. Strain- and Genotype-Specific Differences in Virulence of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a Bacterial Pathogen Causing American Foulbrood Disease in Honeybees. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71 (11): 7551-7555.
- Lončarić I et al. Genetic diversity among isolates of *Paenibacillus larvae* from Austria. *J Invertebr Pathol.* 2009; 100 (1): 44–46.
- Neuendorf S et al. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. *Microbiology.* 2004; 150: 2381–2390.
- Rusenova N et al. Molecular Typing of *Paenibacillus larvae* Strains Isolated from Bulgarian Apiaries Based on Repetitive Element Polymerase Chain Reaction (PCR). *Curr. Microbiol.* 2013; 66: 573-577.
- Versalovic JM et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR. *Methods Mol Cell Biol.* 1994; 5: 25–40.
- Weisburg, WG et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991; 173 (2): 697–703.

# **IN VITRO A IN VIVO ŠTÚDIA VPLYVU ZMESI MEDICINÁLNYCH RASTLÍN A SLNEČNICOVÉHO OLEJA NA BACHOROVÝ METABOLIZMUS OVIEC**

Wencelová M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice*

## **ABSTRAKT**

Cieľom štúdie bolo zistiť vplyv zmesi medicínálnych rastlín (MR) a slnečnicového oleja (SO) na bachorové fermentačné parametre a lipidový metabolizmus oviec pri vysoko-koncentrátovej diéte. V in vivo pokuse boli použité štyri ovce kŕmené základnou diétou pozostávajúcou z lúčneho sena a jačmeňa (kontrola) s prídavkami k diéte vo forme MR, SO, a obidvoch súčasne (MRSO) pri použití metódy Latinského štvorca (4×4). Vplyv MR, SO a MRSO na bachorovú fermentáciu bol najprv testovaný po 24 hod inkubácie *in vitro* pri použití rovnakej diéty. Prídavkami diéty boli ovplyvnené takmer všetky základné fermentačné parametre *in vitro* a vyššia koncentrácia polynenasýtených mastných kyselín (PUFA,  $P < 0,001$ ) bola pri MRSO v porovnaní s kontrolou. Naopak pokusné diéty neovplyvnili fermentačné parametre oviec a v porovnaní s kontrolnou a MR skupinou bol zaznamenaný výrazný pokles PUFA ( $P < 0,001$ ) pri ovciach s MRSO a SO diétou. Pozitívny vplyv MR a SO na lipidový metabolizmus bachora, ktorý sme zistili v *in vitro* sa nepotvrdil v pokuse na ovciach.

## **ÚVOD**

Medicínálne rastliny získali v posledných rokoch pozornosť v oblasti výživy prežúvavcov a to hlavne ako náhrada antibiotík a iných chemických látok, ktorých používanie ako stimulátorov rastu v živočíšnej výrobe bolo Európskou úniou zakázané. Mnohé sekundárne metabolity obsiahnuté v medicínálnych rastlinách predstavujú potenciálne modulátory bachorového metabolizmu. Bol zaznamenaný vplyv sekundárnych rastlinných metabolitov ako tanínov a saponínov na lipidový metabolizmus a bachorovú biohydrogenáciu pri použití vhodného zdroja lipidov (Jayanegara a kol., 2012). Sekundárne metabolity pôsobia pravdepodobne inhibične na bachorovú mikrobiálnu populáciu a tým inhibujú proces biohydrogenácie a nepriamo zvyšujú koncentráciu polynenasýtených mastných kyselín. Bol zaznamenaný aj antimikrobiálny vplyv medicínálnych rastlín (Bodas a kol., 2012). Avšak väčšinou boli testované koncentrované rastlinné extrakty, ktoré môžu pôsobiť toxicky a ich používanie je finančne náročné pre chovateľa. Diéta obohatená o zmes sušených medicínálnych rastlín môže do určitej miery napodobniť prirodzené podmienky zvierat'a na pastve a zároveň zlepšiť jeho zdravotný stav. Preto cieľom tohto experimentu bolo zistiť vplyv zmesi vybraných medicínálnych rastlín a slnečnicového oleja ako zdroja lipidov na fermentačné parametre a lipidový metabolizmus v bachore oviec.

## **MATERIÁL A METODIKA**

V pokuse boli použité štyri barany (Zošľachtená valaška; vek 1,5 roka; hmotnosť 45,4±0,5 kg) s permanentne zavedenou bachorovou fistulou, v 4×4 Latinskom štvorci v období 8 týždňov. Zvieratá prijímali vysoko-koncentrátovú diétu ktorá pozostávala zo 720 g sušiny lúčneho sena/deň a 540 g sušiny jačmeňa/deň rozdelenú do dvoch denných dávok. Chemické zloženie lúčneho sena bolo (priemerné hodnoty, g/kg sušiny): sušina: 916, N: 18, CP: 112, ADF: 365, NDF: 498 a jačmeňa: sušina: 869, N: 10, CP: 61, ADF: 84, NDF: 331. Diéta bola doplnená buď zmesou medicínálnych rastlín (MR, 67 g sušiny/deň), slnečnicovým olejom (SO, 36 g/deň) alebo obidvoma súčasne (MRSO). Pokusu predchádzala 4 týždňová adaptačná fáza v ktorej zvieratá dostávali polovičnú dávku MR a SO. Zmes MR bola podávaná ako 10% náhrada objemového krmiva a pozostávala z vňatí ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum*), rebríčka obyčajného (*Achillea millefolium*), žihľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), čakanky obyčajnej (*Cichorium intybus*), kvetu nechtíka lekárskeho (*Calendula officinalis*),

koreňov púpavy lekárskej (*Taraxacum officinale*) a puškvorca obyčajného (*Acorus calamus*). Chemické zloženie zmesi MR bolo (priemerné hodnoty, g/kg sušiny): sušina: 896, N: 11, CP: 67, ADF: 376, NDF: 409. Odbery bachorovej tekutiny prebiehali vždy dva dni za sebou v dvojtýždňových intervaloch. *In vitro* pokus bol zostavený podľa Váradyovej a kol. (2000). Koncentrácie krátkoreťazcových mastných kyselín (Cottyn a Boucque, 1968) a vyšších mastných kyselín (Váradyová a kol., 2008) boli stanovené na plynovom chromatografe Perkin-Elmer Clarus 500 (Perkin - Elmer, Inc. Shelton, Connecticut, USA). Výsledky *in vivo* pokusu boli štatisticky vyhodnotené ako opakované merania v 4×4 Latinskom štvorci pomocou analýzy variancie (Graphpad Instat, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). *In vitro* pokus bol vyhodnotený analýzou variancie a Tukey-post testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V *in vitro* pokuse bola stráviteľnosť sušiny najvyššia pri MR pravdepodobne z dôvodu prítomnosti ľahko stráviteľných polysacharidov v koreňoch rastlín (Tabuľka č.1). Pri jednotlivých diétach boli štatisticky významne ovplyvnené aj hodnoty acetátu, propionátu a *n*-butyrátu. Najnižšie koncentrácie nasýtených mastných kyselín (SFA) a najvyššie koncentrácie kyseliny linolovej,  $\alpha$ -linolénovej a PUFA *in vitro* boli zaznamenané pri MRSO (Tabuľka č.2).

### Tabuľka č.1

Vplyv diét na fermentačné parametre v bachorovej tekutine po 24 hod inkubácie *in vitro*

	Kontrola	MR	MRSO	SO	SEM	P-value
IVDMD (g/kg DM)	579 <sup>b</sup>	655 <sup>c</sup>	584 <sup>b</sup>	465 <sup>a</sup>	5,4	0,001
Celk. SCFA (mmol/l)	48,7	36,2	42,2	44,3	2,36	0,149
Acetát (mol%)	67,1 <sup>a</sup>	68,3 <sup>ab</sup>	69,2 <sup>b</sup>	66,9 <sup>a</sup>	0,45	0,015
Propionát (mol%)	16,6 <sup>c</sup>	15,6 <sup>b</sup>	14,2 <sup>a</sup>	16,6 <sup>c</sup>	0,14	0,001
<i>n</i> -Butyrát (mol%)	10,7 <sup>a</sup>	11,6 <sup>ab</sup>	12,2 <sup>b</sup>	11,1 <sup>ab</sup>	0,24	0,012

IVDMD, *in vitro* stráviteľnosť sušiny; SCFA, krátkoreťazcové mastné kyseliny; MR, medicínálne rastliny; SO, sľečnicový olej. Indexy (a,b,c) vyjadrujú rozdiely v rámci riadku.

### Tabuľka č.2

Vplyv diét na bachorovú koncentráciu vyšších mastných kyselín po 24 hod inkubácie *in vitro*

MK (g/kg MK)	Kontrola	MR	MRSO	SO	SEM	P-value
Myristová	17,2 <sup>c</sup>	23,8 <sup>b</sup>	7,60 <sup>a</sup>	8,20 <sup>a</sup>	0,432	0,001
Palmitová	273 <sup>c</sup>	312 <sup>d</sup>	147 <sup>a</sup>	152 <sup>b</sup>	5,3	0,001
Stearová	450 <sup>c</sup>	431 <sup>c</sup>	325 <sup>a</sup>	372 <sup>b</sup>	5,1	0,001
Linolová	37,9 <sup>a</sup>	32,3 <sup>a</sup>	161 <sup>c</sup>	87,9 <sup>b</sup>	1,63	0,001
$\alpha$ -Linolénová	18,8 <sup>a</sup>	14,6 <sup>a</sup>	29,7 <sup>c</sup>	24,6 <sup>b</sup>	1,03	0,001
$\gamma$ -Linolénová	0,06 <sup>b</sup>	0,07 <sup>c</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,001	0,001
PUFA	79 <sup>b</sup>	64 <sup>a</sup>	200 <sup>d</sup>	138 <sup>c</sup>	2,3	0,001
SFA	826 <sup>c</sup>	845 <sup>c</sup>	521 <sup>a</sup>	580 <sup>b</sup>	5,8	0,001

MK, mastné kyseliny; PUFA, polynenasýtené MK; SFA, nasýtené MK; MR, medicínálne rastliny; SO, sľečnicový olej. Indexy (a,b,c,d) vyjadrujú rozdiely v rámci riadku.

Pri pokuse na ovciach neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely v bachorových fermentačných parametroch. Koncentrácie PUFA v kontrole a MR boli signifikantne vyššie a koncentrácie SFA boli nižšie v porovnaní s MRSO a SO (Tabuľka č.3). Koncentrácie mastných kyselín v kontrolách a MR boli podobné. Nedávne štúdie naznačujú, že polyfenoly

(skupina sekundárnych rastlinných metabolitov), najmä taníny sú schopné redukovať biohydrogenáciu PUFA bachore na rôznych úrovniach (Khiaosa-ard a kol., 2009; Vasta a kol., 2009; Cabiddu a kol., 2010). Pokus na ovciach nepotvrdil pozitívny vplyv zmesi MR a SO na produkciu PUFA zaznamenaný v *in vitro* fermentáciách, pravdepodobne vplyvom vysoko-koncentrátovej diéty, ktorá s prídavkom SO ovplyvnila mikrobiálnu populáciu bachora oviec a následne bachorovú koncentráciu mastných kyselín (Váradyová a kol., 2008).

### Tabuľka č. 3

Vplyv diét na koncentráciu vyšších mastných kyselín v bachore oviec

MK (g/kg MK)	Kontrola	MR	MRSO	SO	SEM	P-value
Myristová	10,8	11,7	10,3	11,1	1,86	0,926
Palmitová	314 <sup>b</sup>	290 <sup>ab</sup>	228 <sup>a</sup>	239 <sup>a</sup>	13,7	0,021
Stearová	415 <sup>a</sup>	436 <sup>a</sup>	570 <sup>b</sup>	534 <sup>b</sup>	19,4	0,085
Linolová	66,4 <sup>b</sup>	65,6 <sup>b</sup>	38,1 <sup>a</sup>	39,7 <sup>a</sup>	3,06	0,001
α-Linolénová	26,2 <sup>b</sup>	29,5 <sup>b</sup>	13,8 <sup>a</sup>	19,5 <sup>a</sup>	2,22	0,001
γ-Linolénová	2,06 <sup>b</sup>	2,02 <sup>b</sup>	1,32 <sup>a</sup>	1,41 <sup>a</sup>	0,124	0,005
PUFA	97 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	56 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>	5,0	0,001
SFA	810 <sup>a</sup>	808 <sup>a</sup>	863 <sup>b</sup>	848 <sup>b</sup>	9,1	0,012

MK, mastné kyseliny; PUFA, polynenasýtené MK; SFA, nasýtené MK; MR, medicínálne rastliny; SO, slnečnicový olej. Indexy (a,b) vyjadrujú rozdiely v rámci riadku.

*Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠ a SAV (VEGA 2/0009/14).*

### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bodas R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012; 176: 78-93.
- Cabiddu A, Salis L, Tweed JKS, Molle G, Decandia M, Lee MRF. The influence of plant polyphenols on lipolysis and biohydrogenation in dried forages at different phenological stages: *in vitro* study. *J. Sci. Food Agric.* 2010; 90: 829-835.
- Cottyn BG, Boucque CV. Rapid method for the gas chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *J. Agric. Food Chem.* 1968; 16: 105-107.
- Jayanegara A, Kreuzer M, Leiber F. Ruminal disappearance of polyunsaturated fatty acids and appearance of biohydrogenation products when incubating linseed oil with alpine forage plant species *in vitro*. *Livestock Sci.* 2012; 147: 104-112.
- Khiaosa-ard R, Bryner SF, Scheeder MRL, Wettstein HR, Leiber F, Kreuzer M, Soliva CR. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal α-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.* 2009; 92: 177-188.
- Vasta V, Makkar HPS, Mele M, Priolo A. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. *Brit. J. Nutr.* 2009; 102:82-92.
- Váradyová Z, Zeleňák I, Siroka P. *In vitro* study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2000; 83: 127-138.
- Váradyová Z, Kišidayová S, Siroka P, Jalč D. Comparison of fatty acid composition of bacterial and protozoal fractions in rumen fluid of sheep fed diet supplemented with sunflower, rapeseed and linseed oils. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008; 144: 44-54.



# POROVNANIE ÚČINNOSTI DIÉTY S PRÍDAVKOM HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÉ PARAMETRE V PLAZME, PEČENI, SRDCI A OBLIČKÁCH

Žatko D., Džurinová R.

Univerzita P. J. Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF a LABMED a.s, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv prídavku humínových kyselín (HK) do diéty kurčiat na aktivitu enzýmov priamo zapojených do eliminácie oxidačného stresu organizmu, v plazme a v mitochondriách významných syntetických a metabolických orgánov – v pečeni, obličkách a v srdci. Kurčatá boli vystavené stresovým podmienkam, ktoré predstavoval transport z chovnej farmy na bitúnok, čím bol u zvierat indukovaný oxidačný stres.

## ÚVOD

Cesta kuracieho mäsa na tanier spotrebiteľa často začína transportom živých kurčiat z chovnej farmy na bitúnok v lokalite predaja, čo nezriedka predstavuje aj niekoľko stoviek kilometrov. Takýto transport jednoznačne predstavuje pre zvieratá množstvo stresových faktorov. Stresové podmienky vyvolávajú okrem iného aj zvýšenú produkciu katecholamínov, ktorých metabolizmus prostredníctvom monoaminoxidáz (MAO), ako aj ich autooxidácia, významne prispieva k zvýšenej tvorbe reaktívnych kyslíkových častíc (ROS), čo vyúsťuje do zvýšeného oxidačného stresu zvierat a v konečnom dôsledku ovplyvní aj kvalitu ich mäsa (5, 7). Mitochondrie, ktoré sú významnými producentami ROS v organizme, disponujú však aj účinným mechanizmom, ktorý má za úlohu eliminovať zvýšené hladiny ROS a brániť tak oxidačnému poškodeniu bunkových komponentov. Tento mechanizmus zahŕňa okrem iného tripeptid glutatión (GSH), ktorý pôsobí ako redukčné činidlo voči ROS, a enzýmy superoxidodismutázu (SOD), metaloenzým, ktorý katalyzuje dismutáciu superoxidu na peroxid vodíka a kyslík, glutatiónperoxidázu (GPx), selenoenzým katalyzujúci rozpad peroxidov za prítomnosti GSH, a glutatiónreduktázu (GR), ktorá spätne redukuje oxidovaný glutatión (GSSG) na redukovanú formu (GSH) za prítomnosti kofaktora NADPH (14). Humínové kyseliny (HK) sú organické zlúčeniny s podobnou štruktúrou nachádzajúce sa najmä v humusovej vrstve pôdy resp. v hnedom uhlí. Ich štruktúra je v podstate heteropolymér tvorený rôznymi cukornými kyselinami, polyfenolickými aromatickými resp. heterocyklickými stavebnými jednotkami. Sú rozpustné v alkalickom prostredí a nerozpustné v kyslom a neutrálnom prostredí, vyznačujú sa vysokou chelatačnou schopnosťou voči iónom kovov a antioxidačnými vlastnosťami. Preto majú HK prospešné vlastnosti pre zdravie rastlín, zvierat či ľudí (13).

## MATERIÁL A METÓDY

V experimente sme použili 36000 brojlerových kurčiat COBB 500 z hydinej farmy Vinica (okr. V. Krtíš), ktoré boli rozdelené do dvoch skupín. Kontrolnej skupine (15700 ks) bolo po dobu 42 dní podávané štandardné krmivo. Pokusnej skupine (20000 ks) bolo podávané štandardné krmivo s prípravkom 0,6% humínových kyselín (Humac Natur, Humac s.r.o., Košice) od prvého dňa výkrmu po dobu 42 dní. Kurčatá mali prístup k vode a krmivu *ad libitum*. Po 42 dňoch boli zvieratá transportované 220 km na hydínový bitúnok v Košiciach, kde prebehla porážka, počas ktorej sme vykonali odber orgánov a plazmy z 10 ks zvierat z oboch skupín. Z odobratých vzoriek sme izolovali mitochondrie pečene, obličiek a srdca (6) a stanovili v nich koncentráciu celkových bielkovín kyselinou bicinchoninovou. Následne sme stanovili aktivitu glutatiónperoxidázy (GPx, E.C. 1.19.1.9) podľa Flohé a Gunzlera (8), glutatiónreduktázy (GR, E.C. 1.8.1.7) podľa Carlberga a Mannervika (2) a hladinu

redukovaného glutatiónu (GSH) (Floreani a kol. 1997). Aktivitu superoxiddizmutázy (SOD, E.C. 1.15.1.1) sme zmerali pomocou SOD-Assay Kit-WST (Fluka). Aktivity enzýmov sme prepočítali na mg proteínov v ml mitochondriálneho homogenátu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané hodnoty sú vyjadrené v Tabuľke č. 1. Dôsledkom zvýšenej aktivity SOD a zároveň zníženej aktivity GPx v mitochondriách pečene pri podávaní HK je, že dochádza k výraznejšej eliminácii  $O_2^-$  a zvýšení hladiny  $H_2O_2$ . Vysvetlením môže byť to, že v mnohobunkových organizmoch zvýšenie expresie antioxidantných enzýmov nie je univerzálnou odpoveďou na  $H_2O_2$  (3). Ale aj to, že v podmienkach, kde je zvýšená tvorba  $O_2^-$  sa nedá jednoznačne určiť, či zmena v aktivitách antioxidantných enzýmov je spôsobená zmenou v hladinách  $H_2O_2$  alebo aj NO (12). Je to kvôli tomu, že  $H_2O_2$  je špecifickým substrátom pre katalázu, a katalytická činnosť katalázy pre NO prítomnosť  $H_2O_2$  vyžaduje. Zvýšená produkcia  $H_2O_2$  je potom prevenciou tvorby peroxynitritových aniónov (11) a teda, v prípade podávania HK je inhibícia tvorby peroxynitritov v pečeni pravdepodobne podporovaným dejom. Obličky sú jediný orgán v tele, ktorý produkuje a vylučuje do krvného obehu renalázu, metabolizujúcu catecholamíny oxidačným mechanizmom, využívajúcim  $O_2^-$ , na aminochrómy (4), a preto by zvýšená aktivita SOD pravdepodobne znemožnila oxidáciu adrenalínu renalázou. Znížená aktivita GR (ako kofaktor vyžaduje NADPH), a následné

**Tabuľka č. 1: Aktivita SOD, GPx a GR a hladina GSH v plazme a v mitochondriách pečene, obličiek a srdca kurčiat (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ )**

orgán		SOD [ $\mu$ kat/mg prot.]	GPx [ $\mu$ kat/mg prot.]	GR [nkat/g prot.]	GSH [nmol/mg prot.]
pečeň	Kontrola	2,59 $\pm$ 0,44	5,735 $\pm$ 0,629	8,64 $\pm$ 1,78	14,55 $\pm$ 8,62
	pokus HK	4,98 $\pm$ 0,48**	3,227 $\pm$ 1,062*	20,25 $\pm$ 4,45**	15,11 $\pm$ 5,24
obličky	Kontrola	3,01 $\pm$ 0,44	3,401 $\pm$ 1,248	17,18 $\pm$ 5,91	14,74 $\pm$ 7,37
	pokus HK	3,11 $\pm$ 0,58	2,963 $\pm$ 0,648	18,57 $\pm$ 6,59	23,53 $\pm$ 7,3
srdce	Kontrola	9,3 $\pm$ 1,52	7,490 $\pm$ 2,35	18,85 $\pm$ 2,84	2,98 $\pm$ 1,44
	pokus HK	5,1 $\pm$ 0,64*	1,559 $\pm$ 0,12*	10,46 $\pm$ 1,58*	8,87 $\pm$ 2,22*
plazma	Kontrola	0,9 $\pm$ 0,32	1,758 $\pm$ 0,22	7,75 $\pm$ 0,40	64,86 $\pm$ 17,54
	pokus HK	1,24 $\pm$ 0,43	1,139 $\pm$ 0,48	4,01 $\pm$ 1,12*	11,4 $\pm$ 6,38*

zníženie hladiny GSH v plazme môže byť spôsobené práve zníženou hladinou NADPH v krvi pri stresových podmienkach, nakoľko zvýšená hladina adrenalínu okrem iného pôsobí inhibične na glukóza-6-fosfát-dehydrogenázu, čoho dôsledkom je znížená tvorba NADPH (16). Aktivity SOD, GPx aj GR v mitochondriách srdca boli v pokusnej skupine s prídavkom HK znížené, no hladina GSH bola, naopak, signifikantne zvýšená. V dôsledku vysokých hladín catecholamínov pri pôsobení stresora nastáva v mitochondriách kardiomyocytov nárast spotreby kyslíka a zároveň odpojenie oxidatívnej fosforylácie (uncoupling), ktorý slúži na minimalizovanie emisie ROS v elektrónovom transportnom reťazci (1), no zároveň je v akútnych stresových podmienkach kontrolovaný aj kovalentnou modifikáciou glutatiónom (10). Preto vyššie hladiny GSH v mitochondriách srdca v skupine, kde boli podávané humínové kyseliny, môžeme považovať za indikátor lepšieho zvládania oxidačného stresu. V praxi by to potvrdzovalo zistené aktivity HK v regulácii redoxnej rovnováhy in vitro (15).

Prídavok humínových kyselín do diéty kurčiat ovplyvnil aktivity antioxidantných enzýmov v sledovaných orgánoch špecificky. V pečeni sa ako prioritný efekt javí podpora prevencie tvorby peroxynitritových aniónov, kým v obličkách je to zabezpečenie aktivity renalázy, podieľajúcej sa na metabolizme katecholamínov. V mitochondriách srdca nárast hladiny glutatiónu zvýšil pripravenosť antioxidantného mechanizmu. Celkovo možno konštatovať, že podávanie humínových kyselín má pozitívny vplyv na antioxidantný status mitochondrií v orgánoch kurčiat a teda pomáha lepšie zvládnuť stresové podmienky zvierat, napr. v dôsledku transportu.

*Práca bola podporená grantami VEGA 1/1236/12 a VEGA 1/0648/11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adameova A et al. Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 87:493-514.
2. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione Reductase. *Methods. Enzymol.* 1985, 113:484-490.
3. Desaint S et al. Mammalian Antioxidant Defenses Are Not Inducible by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* 2004, 279: 31157-31163.
4. Desir GV et al. Human Renalase: A Review of Its Biology, Function, and Implications for Hypertension. *J. Am. Soc. Hypertension.* 2012; 6:417-426.
5. Fazio E, Ferlazzo A. Evaluation of stress during transport. *Vet. Res. Commun.* 2003; 27:519-524.
6. Fernández-Vizarra E et al. Isolation of Mitochondria for Biogenetical Studies: An Update. *Mitochondrion.* 2010; 10:253-262.
7. Fink G. Stress science: Neuroendocrinology. 2010; 5.
8. Flohé L, Gunzler WA. Assays of Glutathione Peroxidase. *Methods Enzymol.* 1984; 105:114-121.
9. Floreani M et al. Comparison between Different Methods for the Determination of Reduced and Oxidized Glutathione in Mammalian Tissues. *Free Radic. Res.* 1997, 26: 449-455.
10. Mailoux RJ, Harper ME. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 51:1106-1115.
11. McBride AG et al. Superoxide Dismutase and Hydrogen Peroxide Cause Rapid Nitric Oxide Breakdown, Peroxynitrite Production and Subsequent Cell Death. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1454:275-288.
12. Stone JR, Yang S. Hydrogen Peroxide: A Signaling Messenger. *Antioxid. Redox. Signal.* 2006; 3&4:243-270.
13. Vaško L, Vašková J. Humínové kyseliny ako intenzifikátory produkcie krmív a potravín. In: *Ekológia a veterinárna medicína VIII : zborník referátov z medzinárodnej vedeckej konferencie konanej pri príležitosti nedežitého 90. výročia narodenia prof. MVDr. Jána Rosochu, CSc. UVL, 2011. - ISBN 9788080772499.*
14. Vašková J et al. Oxidative Processes and Antioxidative Metaloenzymes. In: *Antioxidant enzyme, Rijeka, InTech 2012; 19-58.*
15. Vašková J, Vaško L.: Humic acid in redox regulation. *Folia Veterinaria*, 2011, 55, 56-58.
16. Young JB; Lansberg L. In: Wilson J D, et al. (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology, (9th Edition) 1998; 665-728.*

Názov: **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2014**  
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu  
IX. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.

Rok vydania: 2014  
Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

Počet strán: 126

**ISBN 978-80-971428-1-0**