



# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2015**

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

**X. ročník**

**Košice, 8. a 9. september 2015**



**Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Bod'ú  
8. a 9. septembra 2015  
v Košiciach**

**Usporiadali:**

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

**Zostavil:**

MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

**Recenzovali:**

MVDr. Beáta Koréneková, PhD.

Doc. MVDr. Katarína Beňová, PhD.

**Organizačný a programový výbor:**

MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD.

*Neprešlo jazykovou úpravou*

**ISBN 978-80-971428-2-7**



## OBSAH

1. VÝSKYT ANTIHELMINTICKEJ REZISTENCIE V CHOVOCH KÔZ NA SLOVENSKU Babják M., Königová A., Dolinská S., Várady M. _____	7
2. VPLYV PROBIOTICKÉHO KMEŇA <i>E. FAECIUM</i> AL41 NA PRODUKCIU IGA V JEJUNE, ILEU A CÉKU V ČREVE KURČIAT INFIKOVANÝCH <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> Bobíková K., Husáková E., Stašová D. _____	10
3. ANTIPARAZITÁRNY ÚČINOK PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA INFEKCIU <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i> U MYŠÍ Bucková B., Dvorožňáková E., Hurníková Z., Lauková A. _____	13
4. IZOLÁCIA A DIAGNOSTIKA <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> U PSOV Böhmová E. _____	16
5. VÝSKYT AUTOCHTÓNNEJ ANGIOSTRONGYLÓZY U PSOV NA ÚZEMÍ SLOVENSKA Čabanová V., Miterpáková M., Hurníková Z., Pipíková J. _____	19
6. ÚLOHA NUKLEÁRNYCH ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV V PROCESE REEPITELIZÁCIE KOŽNÝCH RÁN Čriepoková Z., Gál P., Peržel'ová V., Lenhardt L. _____	22
7. DETEKCIA ZMIEN DNA V LYMFÓME U PSOV Drážovská M., Šivíková K., Dianovský J. _____	25
8. ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ POTENCIÁLNE VYUŽITEĽNÝCH V AKVAKULTÚRE Fečkaninová A., Popelka P., Koščová J., Mudroňová D. _____	28
9. VARIABILITA ENTEROKOKOV Z OKRUHU <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i> Hrehová L., Pristaš, P. _____	31
10. VZŤAH ERYTROPOETÍNOVÉHO RECEPTORA K CITLIVOSTI BUNIEK ADENOKARCINÓMU MLIEČNEJ ŽLÁZY NA TAMOXIFEN Hurtuková L., Szentpeteriová E., Fecková B., Solár P. _____	34
11. VPLYV MATERSKÉHO STRESU NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN – MODULÁCIA METABOLICKÝM STAVOM MATERSKÉHO ORGANIZMU Janštová Ž. _____	37
12. VPLYV LEPTÍNU NA VÝVIN PREIMPLANTAČNÉHO EMBRYA MYŠI <i>IN VITRO</i> V ZÁVISLOSTI OD KONDIČNÉHO STAVU MATKY Kačmarová M. _____	41
13. ÚLOHA AURORA A KINÁZY V PRIEBEHU ZAHÁJENIA PRVEJ MITÓZY PO OPLODNENÍ Kovaříková V., Burkuš J., Reháč P., Brzáková A., Šolc P., Baran V. _____	45
14. <i>IN VITRO</i> ŠTÚDIUM IMUNOMODULAČNEJ AKTIVITY EXOPOLYSACHARIDOV PRODUKOVANÝCH <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i> Kšonžeková P., Mudroňová D., Link R., Tkáčiková L. _____	49
15. VÝSKYT GÉNOV PRE PRODUKCIU ENTEROCÍNOV U KMEŇOV ENTEROKOKOV ZO PSOV Kubašová I. _____	52
16. PROTINÁDOROVÝ ÚČINOK PRÍRODNÉHO ANTIBIOTIKA MANUMYCÍNU A NA BUNKOVÚ LÍNIU KOLOREKTÁLNEHO ADENOKARCINÓMU HT-29-OxR REZISTENTNÚ VOČI OXALIPLATINE Macejová M., Sačková V., Jendželovský R., Fedoročko P. _____	55

17. HODNOTENIE MIERY NAVIAZANOSTI PSA NA MAJITEĽA PROSTREDNÍCTVOM DOTAZNÍKA C-BARQ A NA ZÁKLADE FYZIOLOGICKÝCH PARAMETROV POČAS TESTU NEZNÁMYCH SITUÁCIÍ	
Miňo I., Kottferová J.	58
18. IDENTIFYING AND QUANTIFYING THYMOL IN BROILER PLASMA AND TISSUES BY SOLID – PHASE MICROEXTRACTION – GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY	
Oceľová V., Chizzola R.	61
19. POROVNANIE METÓD IZOLÁCIE DICHELOBACTER NODOSUS A FUSOBACTERIUM NECROPHORUM Z KONČATÍN DOJNÍC	
Osová A., Segurado Benito Pilipčincová I., Király J., Mudroň P.	64
20. ŽIVOTNÉ PROSTREDIE V OBLÚBENÝCH REKREAČNÝCH LOKALITÁCH Z HLADISKA PARAZITÁRNEJ KONTAMINÁCIE	
Pipiková J., Papajová I.	67
21. DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS) STUDIES ON DILUTE SOLUTIONS OF BOVINE SKIN GELATIN	
Pisarčíková J., Farrugia C., Sinagra, E.	70
22. POROVNANIE DETEKČNEJ SCHOPNOSTI MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV S MAXIMÁLNYMI LIMITMI REZÍDUÍ VYBRANÝCH ANTIBIOTÍK POUŽÍVANÝCH VO VETERINÁRNEJ PRAXI U POTRAVINOVÝCH ZVIERAT	
Poláková Z., Kožárová I.	73
23. EXPRESIA PROZÁPALOVÝCH CYTOKÍNOV V IZOLOVANÝCH KURACÍCH PMBCS PO ICH STIMULÁCII PROBIOTICKÝMI BAKTÉRIAMI A INFEKCIÍ <i>C. JEJUNI</i> V <i>IN VITRO</i>	
Stašová D., Bobíková K., Husáková E., Karaffová V., Lauková A., Levkutová M., Levkut M.	76
24. MORFOLOGICKÉ A PROLIFERAČNÉ VLASTNOSTI MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK DERIVOVANÝCH Z TUKU	
Székiová E. Slovinská L., Blaško J., Plšíková J. Harvanová D, Čížková D.	79
25. SENZITIVITA A ŠPECIFICITA SÉROLOGICKÝCH ELISA TESTOV NA DETEKCIU ŠPECIFICKÝCH PROTILÁTKOVI PROTI <i>ECHINOCOCCUS SPP.</i>	
Škutová M., Antolová D., Reiterová K.	81
26. VÝSKYT <i>STRONGYLOIDES STERCORALIS</i> U DETÍ A PSOVI V RÓMSKEJ OSADE NA VÝCHODNOM SLOVENSKU	
Štrkolcová G., Goldová M., Halánová M.	84
27. TUBULIZAČNÉ TECHNIKY PRE OPRAVU POŠKODENÝCH PERIFÉRNÝCH NERVOV	
Tomko P., Vanický I.	87
28. VÝZNAM NOMOGRAMOV V SÚDNOM VETERINÁRSKOM LEKÁRSTVE	
Vargová G., Takáčová D.	90
29. STANOVENIE FYZIOLOGICKÝCH HODNÔT OČNÝCH IMPEDANČNÝCH INDEXOV U PSOVI MALÝCH PLEMIEN	
Vrbovská T., Trbolová A.	93
30. MODULÁCIA LIPIDOVÉHO METABOLIZMU V BACHORE OVIEC ZMESOU MEDICINÁLNYCH RASTLÍN A ZDROJMI RASTLINNÝCH TUKOV	
Wencelová M.	96

## VÝSKYT ANTIHELMINTICKEJ REZISTENCIE V CHOVOCH KÔZ NA SLOVENSKU

Babják M., Königová A., Dolinská S., Várady M.

Parazitologický ústav SAV, Košice

### ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo detegovať výskyt antihelmintickej rezistencie na benzimidazolové liečivá na farmách kôz v Slovenskej republike. V prvej fáze prieskumu bolo vyšetrených 11 väčších chovov na západnom a strednom Slovensku použitím *in vivo* a *in vitro* testov. Od testovaných zvierat bol na farmách odobratý biologický materiál. Z *in vivo* testov bol použitý test redukcie počtu vajíčok v truse (FECR) a z *in vitro* testov test liahnutia vajíčok (EHT) a test larválneho vývinu (LDT). Z celkového počtu 11 fariem bolo do testovania zaradených len 9 fariem pretože zvyšné dve nespĺňali kritériá počtu strongyloidných vajíčok na gram vyšetrovaného trusu. Nematódy rezistentné na benzimidazolové liečivá boli detegované na všetkých skúmaných farmách. Na piatich farmách bolo zistené nízke zastúpenie rezistentných parazitov (pod 20%). Na ďalších štyroch farmách bolo zastúpenie rezistentných nematódov vyššie (nad 20%).

### ÚVOD

Rezistencia na antihelmintiká predstavuje jeden z najzávažnejších problémov v chovoch malých prežúvavcov na celom svete. Vážnym problémom sa stala najmä u malých prežúvavcov infikovaných nematódmi z čeľade *Trichostrongylidae*. Termín 'rezistencia' popisuje jav, kedy populácia nematódov pôvodne na antihelmintikum citlivá, dedí po opakovanom pôsobení liečiva schopnosť odolávať pôsobeniu terapie. Osobitným problémom je skrížená rezistencia alebo polyrezistencia, ktorá znamená rezistenciu na dva alebo viac antihelmintík z rôznych chemických skupín a s rozdielnym mechanizmom účinku. Prvým parazitom, u ktorého sa zistil výskyt rezistencie bol *Haemonchus contortus*, z čeľade *Trichostrongylidae*, ktorý parazituje v sleze malých prežúvavcov (Drudge a kol., 1957). Prvý prieskum mapujúci výskyt benzimidazolej rezistencie na Slovensku bol vykonaný v rokoch 1991-1993 (Praslička a kol., 1994). Tento prieskum zahŕňal 77 fariem ovčích fariem, z ktorých bol na šiestich farmách potvrdený výskyt rezistentných nematódov, čo predstavuje 7,8% z všetkých vyšetrovaných fariem. Prvý prípad polyrezistencie bol zaznamenaný na Slovensku v roku 1993 (Várady a kol., 1993), kedy bolo z Nového Zélandu na Slovensko importovaných 622 kašmírskych a 28 angorských kôz. Benzimidazolové preparáty sú na Slovensku stále používané vo veľkom množstve, hlavne z dôvodu ekonomickej výhodnosti oproti iným skupinám liečiv, čo má za následok vyšší výskyt antihelmintickej rezistencie v chovoch malých prežúvavcov.

### MATERIÁL A METODIKA

Navštívené farmy boli situované na západnom (Devínska Nová Ves, Stupava, Záhorská Bystrica, Gbelce a Branovo) a strednom Slovensku (Veľký Blh, Klokoč, Jánova Lehota a Kopernica). Výskyt antihelmintickej rezistencie v chovoch sme detegovali prostredníctvom *in vivo* a *in vitro* testov. Pri *in vivo* test redukcie počtu vajíčok v truse sme porovnávali počet vajíčok helmintov v truse pred liečbou a po liečbe. Zvieratá boli na každej farme rozdelené na liečenú a kontrolnú skupinu. V každej skupine sa nachádzalo minimálne 12 zvierat. Zvieratá boli liečené albendazolom v dávke 5 mg /kg živej hmotnosti. Vzorky trusu boli odoberané v deň liečby a v intervale 10-14 dní po aplikácii antihelmintika. V laboratóriu sme následne určili hodnotu EPG (počet vajíčok na 1 g trusu) modifikovanou McMasterovou metódou. Zo zistených hodnôt EPG pred a po odčervení sme vypočítali percento redukcie počtu vajíčok v truse. Ak je pri tejto metóde hodnota percenta redukcie počtu vajíčok nematódov v truse nižšia ako 95 %, v stáde sú prítomné parazity rezistentné na testované liečivo. *In vitro* test

liahnutia vajčiek (egg hatch test-EHT) v truse je založený na ovocídnej vlastnosti benzimidazolov a porovnaní schopnosti vajčiek embryonovať a vyvíjať sa v rôznych koncentráciách benzimidazolového antihelmintika. V teste sme použili nasledovné koncentrácie tiabendazolu: 0,05 , 0,1, 0,3 , 0,5 a 1  $\mu\text{g/ml}$ . Test sme uskutočnili v 24 jamkových platničkách s objemom jamôk 3 ml. V jednotlivých koncentráciách a kontrole sme po 48 hodinovej inkubácii pri teplote 27 °C spočítali počet nevyliahnutých vajčiek a lariev prvého štádia. Pomocou logaritmicko-koncentračného logitsového modelu sme následne vypočítali hodnotu ED<sub>50</sub> (koncentrácia tiabendazolu, ktorá zabráni liahnutiu 50% prítomných vajčiek). Ak je zistená hodnota ED<sub>50</sub> vyššia ako 0,1  $\mu\text{g/ml}$  a ED<sub>99</sub> je vyššia ako 0,3  $\mu\text{g/ml}$  testovanú populáciu považujeme za rezistentnú (Coles a kol. 1992). Test vývinu lariev (larval development test - LDT) je založený na schopnosti lariev prežívať a vyvíjať sa v prostredí s rôznou koncentráciou antihelmintika. V jamkách mikrotitračnej platničky sme si pripravili výsledné koncentrácie tiabendazolu v rozmedzí od 0,0006  $\mu\text{g/ml}$  po 1,28  $\mu\text{g/ml}$ . Platničky sme inkubovali 7 dní pri teplote 27 °C. Po inkubácii sme určili počet vajčiek, lariev prvého (L<sub>1</sub>), druhého (L<sub>2</sub>) a tretieho (L<sub>3</sub>) štádia v jamkách pri jednotlivých koncentráciách anthelmintika, ako aj v kontrolných jamkách. Pomocou logaritmicko-koncentračného logitsového modelu sme vypočítali hodnotu LD<sub>50</sub> (koncentrácia antihelmintika, ktorá zabráni vývinu 50% prítomných vajčiek na larvy tretieho štádia) a LD<sub>99</sub> (koncentrácia antihelmintika, pri ktorej sa nevyvíja 99% strongylidných vajčiek na larvy L<sub>3</sub>).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Farmy kôz navštívené počas prieskumu sú uvedené v Tabuľke č. 1 . V Tabuľke č. 2 uvádzame výsledky in vivo testu redukcie vajčiek v truse a in vitro testov liahnutia vajčiek a larválneho vývinu.

Prieskum výskytu rezistencie na antihelmintiká zo skupiny benzimidazolov na farmách kôz na Slovensku doposiaľ nebol uskutočnený s výnimkou práce Várady a kol., (1994), ktorí sa zamerali len na importované stáda kôz z Nového Zélandu. Vzhľadom k chýbajúcim poznatkom v tejto oblasti počas posledných dvoch dekád sme mali za cieľ preskúmať stav rozšírenia rezistentných nematódov na farmách na celom území Slovenska.

Z našich výsledkov vyplýva, že na všetkých navštívených farmách sme detegovali nematódy rezistentné na benzimidazolovú skupinu antihelmintík. Rozdiel medzi jednotlivými farmami bol len v tom v akom zastúpení sa na nich nachádzala rezistentná časť populácie. Na farmách č. 1, 4, 5 a 9 toto zastúpenie bolo viac ako 20 % a na farmách č. 2, 3, 6, 7 a 8 pod 20 %.

Vo všeobecnosti in vivo test FECRT je časovo náročnejší, cenovo drahší a získané výsledky nemusia byť presné, čo môže byť zapríčinené rozdielmi vo farmakodynamike liečiv u zvierat. In vitro EHT a LDT sú cenovo omnoho lacnejšie, výsledky sú získané za kratší čas a testy pri použití diskriminačnej dávky (ED<sub>99</sub>, LD<sub>99</sub>, C 0,3) dokážu identifikovať aj veľmi nízke zastúpenie benzimidazol rezistentných parazitov v skúmanej vzorke, čo je veľmi dôležité z hľadiska skorej detekcie rezistencie v terénnych podmienkach. Tieto výhody poukazujú na skutočnosť, že použitie in vitro testov v monitoringu terénnej rezistencie gastrointestinálnych parazitov malých prežúvavcov je výhodnejšia voľba v porovnaní s použitím in vivo metód. Vykonaný prieskum však dokazuje, že rezistencia na túto skupinu antihelmintík je v chovoch kôz na Slovensku už prítomná. Chovatelia preto musia dodržiavať opatrenia pomocou ktorých možno zabrániť rýchlejšiemu nástupu rezistencie, inak hrozí, že výskyt rezistentných parazitov a s ním spojená neefektívna liečba môže v blízkej budúcnosti negatívne ovplyvniť ekonomiku našich chovov.



### Tabuľka č. 1

Farmy kôz navštívené počas prieskumu

Farma	# farmy
Devínska Nová ves	1
Záhorská Bystrica	2
Stupava	3
Veľký Blh	4
Klokoč	5
Kopernica	6
Janova Lehota	7
Branovo	8
Gbelce	9

### Tabuľka č.2

Výsledky in vivo testu redukcie vajíčok v truse a in vitro testov liahnutia vajíčok a larválneho vývinu na farmách kôz

Farma #	1	2	3	4	5	6	7	8	9
EHT									
LD <sub>50</sub>	0,64	0,04	0,07	0,6	0,69	0,03	0,04	0,11	0,70
LD <sub>99</sub>	3,06	0,19	0,29	2,65	2,30	0,63	0,16	1,10	7,24
C 0,3	86,5	4,5	12	75,5	80,5	5,5	2,5	17,5	73
LDT									
LD <sub>50</sub>	0,44	0,007	0,013	0,186	0,422	0,030	0,01	0,0103	0,54
LD <sub>99</sub>	5,38	0,277	0,033	1,03	22,14	0,154	0,041	0,0683	8,24
FECR	62,3	88,8	n.	70,9	73,9	93,1	91,5	95,2	53,5

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0151/13

### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World association for the advancement of veterinary parasitology (W.A.A.V.P.) *Methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. *Vet. Parasitol.* 44, 35-44.
- Drudge, J.H., Leland, E., Wiant, Z.N.: Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. In *American Journal of Veterinary Research*, Vol. 18 (1957), 317-325
- Praslička, J., Várady, M., Čorba, J., Veselý L.: The first survey of anthelmintic resistance in Slovakia. In *Veterinary Parasitology*. Vol. 52 (1994), p. 169-171
- Várady, M., Praslička, J., Čorba, J., Veselý, L.: Multiple anthelmintic resistance of nematodes in imported goats. In *Veterinary Record*. Vol. 132 (1993), p. 387 – 388
- Várady, M., Praslička, J., Čorba, J., Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia spp.* in cashmere and angora goats. In *International Journal for Parasitology*. Vol. 24 (1994), p. 335 – 340

# VPLYV PROBIOTICKÉHO KMEŇA *E. FAECIUM* AL41 NA PRODUKCIU IGA V JEJUNE, ILEU A CÉKU V ČREVE KURČIAT INFIKOVANÝCH *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

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 jejune, ileu a céku u kurčiat po infikovaní *Campylobacter jejuni*. Porovnali sme 4 skupiny kurčiat: kontrolná skupina (C), skupina obsahujúca probiotický kmeň *E. faecium* AL41 (EFAL41), skupina infikovaná s *Campylobacter jejuni* (CJ), skupina obsahujúca *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaná *Campylobacter jejuni* (EFAL41+CJ).

V skorej fáze *Campylobacter jejuni* infekcie (4 p.i.) viedlo pôsobenie *E. faecium* AL41 k zvýšeniu sIgA v črevnom obsahu ilea (EFAL41). Najvyššiu hodnotu sekrečného IgA (sIgA) v črevnom obsahu jejuna a céka sme zaznamenali u kurčiat ovplyvnených s *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaných s *Campylobacter jejuni* (EFAL41+CJ). V neskorej fáze infekcie (7 p.i.) sa pozitívny efekt *E. faecium* AL41 prejavil najviac v črevnom obsahu jejuna v kombinovanej skupine kurčiat (EFAL41+CJ). Najvyššie hodnoty sIgA v ileu sme zaznamenali v skupine kurčiat ovplyvnených *E. faecium* AL41 (EFAL41) a v skupine kurčiat infikovaných s *Campylobacter jejuni* (CJ). V céku boli hodnoty koncentrácie sIgA zvýšené vo všetkých testovaných skupinách (EFAL41; EFAL41+CJ; CJ). Výsledky preukázali pozitívny efekt *E. faecium* AL41 na produkciu sekrečného IgA v jejune, ileu a céku u kurčiat infikovaných *Campylobacter jejuni*.

## ÚVOD

*Campylobacter jejuni* predstavuje hlavnú príčinu celosvetovo rozšírenej infekcie gastrointestinálneho traktu, predovšetkým v dôsledku jeho schopnosti asymptomaticky kolonizovať tráviaci trakt hospodárskych zvierat, vrátane kurčiat (Johnson a kol., 2014). Použitie probiotík, ktoré môžu prispieť k zlepšeniu prirodzenej obrany zvierat proti patogénnym baktériám, je alternatívny a efektívny spôsob pre zníženie bakteriálnej kontaminácie hydiny. Ochranný efekt niektorých probiotických kmeňov súvisí so stimuláciou lokálnej produkcie sekrečného IgA (sIgA), ako aj so zvýšením aktivity imunitných buniek asociovaných s črevom. Levkut a kol., 2014 uvádza, že probiotiká môžu zvýšiť hladinu IgA produkujúcich buniek v sliznici (Levkut a kol., 2014). 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). Husáková a kol. 2014, zaznamenala priaznivý vplyv *E. faecium* AL41 na produkciu sekrečného sIgA v čreve kurčiat infikovaných *S. Enteritidis* PT4. *E. faecium* AL41 pôsobí taktiež na expresiu TGF-β4 a IL-17, ktoré vplývajú na sekréciu IgA v čreve (Karaffová, 2015). Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na produkciu sIgA v črevnom obsahu jejuna, ilea a céka u kurčiat po infikovaní *Campylobacter jejuni*.

## MATERIÁL A METODIKA

**Zvieratá.** 40 kurčiat plemena Cobb 500 bolo rozdelených do 4 skupín (n=10): C, EFAL41, CJ a EFAL41+CJ. Probiotický kmeň *Enterococcus faecium* AL41 (poskytnuté: Andrea Lauková, IAP SAS, Košice, Slovakia) bol individuálne *per os* aplikovaný skupinám EFAL41 a EFAL41+CJ 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 CJ a EFAL41+CJ skupinách individuálnym *per os* podaním *Campylobacter jejuni* (poskytnuté: Andrea Lauková, IAP SAS, Košice, Slovakia) v dávke  $1 \times 10^8$  CFU/0.2 ml PBS. Vzorky z jejuna, ilea a céka pre hodnotenie IgA boli odoberané na 4 a 7 deň po s infekciou *C. jejuni*.

*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 odobraté úseky z jejuna, ilea a céka. Na preplach jednotlivých vzoriek sa použilo 5 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.

*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

Štúdie preukázali, že *Campylobacter* je schopný napadnúť črevnú sliznicu kurčiat (Van Deun a kol., 2008) a spôsobiť systémovú infekciu (Awad a kol., 2015). Získaná imunitná odpoveď je v tejto oblasti zabezpečovaná aktiváciou lymfocytov a lokálnou sekréciou sIgA (Muir a kol., 2000). V súlade s našimi výsledkami aj Cao a kol. 2013, uvádza, že *E. faecium* má vplyv na zvýšenie koncentrácie sekrečného IgA v sliznici jejuna. Taktiež Qiu a kol. 2012, zaznamenali najvyššiu hladinu sIgA v jejune u 1-dňových kurčiat po aplikovaní krmiva obsahujúceho *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* a *Enterococcus faecium* v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naš experiment preukázal zvýšenie koncentrácie sIgA v črevnom obsahu jejuna u kurčiat, ktorým bol aplikovaný probiotický kmeň EFAL41 (EFAL41; EFAL41+CJ) v skorej fáze infekcie *Campylobacter jejuni*. V ileu a céku bola zaznamenaná najvyššia koncentrácia sIgA u kurčiat ovplyvnených s *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaných s *Campylobacter jejuni*, čo môže byť výsledkom pôsobenia oboch baktérií.

V neskorej fáze infekcie pretrvávala v črevnom obsahu jejuna zvýšená koncentrácia sIgA u kurčiat ovplyvnených s *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaných s *Campylobacter jejuni*. V ileu bol zaznamenaný nárast sIgA v skupine kurčiat ovplyvnených *E. faecium* AL4, čo poukazuje na pozitívny vplyv probiotického kmeňa. Zvýšená koncentrácia sIgA bola nameraná v ileu aj v skupine kurčiat infikovaných s *Campylobacter jejuni*, čo môže súvisieť so schopnosťou *C. jejuni* kolonizovať okrem céka aj ileum (Chaloner a kol. 2014). V céku boli hodnoty koncentrácie sIgA zvýšené vo všetkých testovaných skupinách (EFAL41; EFAL41+CJ; CJ). V závere môžeme dodať, že naše výsledky preukázali pozitívny vplyv *E. faecium* AL41 na produkciu celkového sIgA v jejune, ileu a céku u kurčiat infikovaných *C. jejuni*.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Awad, W.A., Molnár, A., Aschenbach, J.R., Ghareeb, K., Khayal, B., Hess, C., Liebhart, D., Dublec, K., Hess, M. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immunity*. 2015; 21: 151-60.
- Cao, G.T., Zeng, X.F., Chen, A.G., Zhou, L., Zhang, L., Yiao, Y.P., Yang, C.M. Effects of probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*. 2013; 92: 2949-55.
- Husáková, E., Bobíková, K., Stašová, D. Total IgA in spleen, bursa of Fabricii and intestine in chickens pretreated with *E. faecium* AL41 and challenged with *Salmonella* Enteritidis PT4. 2014. DOI: 10.1080/09540105.2014.918587.

- Chaloner, G., Wigley, P., Humphrey, S., Kemmett, K., Lacharme-Lora, L., Humphrey, T., Williams, N. Dynamics of dual infection with *Campylobacter jejuni* strains in chickens reveals distinct strain-to-strain variation in infection ecology. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 6366-72.
- Johnson, J.G., Livny, J., DiRita, V. J. High-throughput sequencing of *Campylobacter jejuni* insertion mutant libraries reveals mapA as a fitness factor for chicken colonization. *J Bacteriol.* 2014; 196: 1958-67.
- Karaffová, V., Bobiková, K., Husáková, E., Levkut, M. jr., Herich, R., Revajová, V., Levkutová, M., Levkut, M. Interaction of TGF- $\beta$ 4 and IL-17 with IgA secretion in the intestine of chickens fed with *E. faecium* AL41 and challenged with *S. Enteritidis*. *Res Vet Sci.* 2015. DOI: 10.1016/j.rvsc.2015.04.005.
- 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.
- Muir, W.I., Bryden, W.L., Husband, A.J. Immunity, vaccination and the avian intestinal tract. *Dev Comp Immunol.* 2000; 24: 325-42.
- Qiu, R., Croom, J., Ali, R.A., Ballou, A.L., Smith, C., Ashwell, C.M., Hassan, H.M., Chiang, C.C., Koci, M.D. Direct fed microbial supplementation repartitions host energy to the immune system. *J Anim Sci.* 2012; 90: 2639-2651.
- 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, 155-8, ISBN 978-90-8686-222-1.
- Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van Den Broeck, W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology.* 2008; 130: 285-97.

## ANTIPARAZITÁRNY ÚČINOK PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA INFEKCIU *TRICHINELLA SPIRALIS* U MYŠÍ

Bucková B.<sup>1</sup>, Dvorožňáková E.<sup>1</sup>, Hurníková Z.<sup>1</sup>, Lauková A.<sup>2</sup>

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

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

### ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo sledovať vplyv probiotických a bakteriocín-produkujúcich bakteriálnych kmeňov na intenzitu infekcie počas črevnej a svalovej fázy trichinelózy, ako aj na fertilitu samičiek *Trichinella spiralis* u experimentálnych myší. Parazitárnu záťaž (intenzitu infekcie) sme vyhodnotili cez počet adultov parazita, ktorý sa zistí výplachom tenkého čreva a počet lariev parazita vo svaloch získaný tráviacou metódou. Infekčnosť parazita sme stanovili indexom reprodukčnej kapacity (RCI) a fertilitu samičiek *in vitro* testom plodnosti. Bakteriocín-produkujúce kmene *Enterococcus faecium* AL41 a *E. faecium* 2019 = CCM7421 signifikantne znížili počet adultov v čreve myší. Aplikácia probiotických kmeňov *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7420, *L. plantarum* 17L/1 a bakteriocín-produkujúcich kmeňov *E. faecium* AL41 a *E. durans* ED26/7 viedla k výraznému poklesu počtu svalových lariev. Reprodukčný potenciál trichinel v hostiteľovi (RCI) bol redukovaný u myší s aplikáciou *E. faecium* AL41, *E. durans* ED26/7, *L. fermentum* AD1 = CCM7420 a *L. plantarum* 17L/1. Redukčný vplyv kmeňov na fertilitu samičiek trichinel bol signifikantný len pri *E. faecium* AL41, po aplikácii ostatných kmeňov bol pozorovaný mierny redukčný účinok na počet novonarodených lariev. Na redukcii parazitárnej záťaže vo svaloch hostiteľa sa preto pravdepodobne podieľali imunitné mechanizmy stimulované bakteriálnymi kmeňmi.

### ÚVOD

Črevo hostiteľa predstavuje komplexný ekosystém, v ktorom prebiehajú interakcie medzi črevnými mikroorganizmami, imunitným systémom a patogénmi. Všetky tieto zložky sa podieľajú na udržiavaní homeostázy dôležitej pre zachovanie zdravia hostiteľa. Črevné parazity tiež ovplyvňujú mikrobiótu čreva a modifikujú túto rovnováhu. Na druhej strane, črevné mikroorganizmy výrazne ovplyvňujú patofyziológiu parazitárnej infekcie, ale aj prežívanie parazita a rozvoj parazitárnej infekcie. Preto probiotické baktérie môžu hrať významnú úlohu v redukcii patogenity mnohých parazitov. Na základe týchto skutočností sa zvyšuje záujem vedcov vysvetliť interakcie medzi mikroorganizmami, imunitnou odpoveďou, zápalovými procesmi a črevnými parazitmi (Berrilli a kol., 2012). Zdraviu prospešné probiotické kmene v čreve hostiteľa sú schopné inhibovať a vytesňovať patogénnu mikrobiótu, zvyšovať aktivitu slizničnej bariéry, avšak, tieto ich vlastnosti sú kmeňovo-špecifické (Gupta a Garg, 2009). Počas poslednej dekády bol zaznamenaný benefičný účinok probiotických baktérií aj pri kontrole parazitárnych infekcií, predovšetkým črevných ochorení, ale aj pri niektorých mimočrevných infekciách závažných v humánnej a veterinárnej medicíne. Tieto štúdie dokazujú, že probiotické baktérie môžu poskytovať kmeňovo-špecifickú ochranu proti parazitom, pravdepodobne prostredníctvom viacerých mechanizmov, ale je potrebných viacero vysvetľujúcich štúdií na obhajobu terapeutického využitia probiotík (Travers a kol., 2011).

Naším cieľom je otestovať antiparazitárny účinok bakteriocín-produkujúcich a probiotických bakteriálnych kmeňov u myší infikovaných *Trichinella spiralis*. Keďže trichinelóza je závažná zoonóza rozšírená po celom svete, je potrebné rozvíjať stále nové liečebné postupy a využitie probiotických kmeňov s antiparazitárnym účinkom môže byť sľubné.

### MATERIÁL A METODIKA,

V experimente bolo použitých 126 myší BALB/c. Samce s hmotnosťou 18-20 g boli

rozdelené do siedmich skupín: Kontrola (n = 18) – infekcia *T. spiralis* bez podávania bakteriálnych kmeňov. 1. skupina (n = 18) – *Enterococcus faecium* EF55 a infekcia *T. spiralis*. 2. skupina (n = 18) – *E. faecium* 2019 = CCM7421a infekcia *T. spiralis*. 3. skupina (n = 18) – *E. faecium* AL41 a infekcia *T. spiralis*. 4. skupina (n = 18) – *E. durans* ED26/7 a infekcia *T. spiralis*. 5. skupina (n = 18) – *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7420 a infekcia *T. spiralis*. 6. skupina (n = 18) – *L. plantarum* 17L/1 a infekcia *T. spiralis*.

Bakteriálne kmene boli podávané *per os* denne v dávke 100 µl (10<sup>9</sup> KTJ/ml v Ringerovom roztoku). Bakteriocín-produkujúce kmene s probiotickým účinkom *Enterococcus faecium* EF55, izolát z kurčat'a, produkujúci antimikrobiálnu substanciu bielkovinového charakteru – enterocín (*Ent*) 55, environmentálny izolát *E. faecium* AL41, produkujúci *Ent* M, *E. faecium* 2019 = CCM7421, izolát z trusu králikov produkujúci *Ent* 2019 a probiotický kmeň *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7420, izolát z trusu psa; boli pripravené na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice. Probiotický kmeň *L. plantarum* 17L/1, izolát z ovčieho sudovaného syra, pochádzal z Výskumného ústavu mliekarenskeho, Žilina.

Myši boli infikované *per os* dávkou 400 lariev *T. spiralis*/myš na 7. deň aplikácie bakteriálnych kmeňov.

Izolácia parazita: Adulty *T. spiralis* boli získané z tenkého čreva (Campbell, 1983). Svalové larvy *T. spiralis* boli získané tráviacou metódou – umelá tráviaca šťava (1 % pepsín, 1% HCl na 4 h pri 37°C) (Kapel a Gamble, 2000). Test plodnosti samičiek trichinel bol vykonaný podľa protokolu Cabaj (1990). Výsledky boli spracované one-way ANOVA a post hoc Tukey testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parazit *T. spiralis* vyvoláva tkanivové ochorenie trichinelózu, charakterizované enteritídou (vyvolanou pohlavne zrelými trichinelami) a zápalom s degeneratívnymi zmenami v priečne pruhovanom svalstve (vyvolané larvami) (Jurášek a Dubinský, 1993). Patológia trichinelózy je v podstate reakciou na iniciálnu zápalovú odpoveď počas črevnej fázy a na následné alergické a zápalové odpovede počas migrácie lariev a svalovej invázie hostiteľa. Patogénnosť *T. spiralis* je vyššia ako u iných druhov črevných parazitov pre vysokú produkciu novonarodených lariev (Pozio a kol., 1992) a silnú imunitnú reakciu hostiteľa (Pozio a kol., 1993; Brushi, 1999; Morales a kol., 2002). Závažnosť trichinelovej infekcie je v konečnom dôsledku ovplyvnená počtom migrujúcich novonarodených lariev. Účinná imunita je preto charakterizovaná reakciami, ktoré obmedzujú plodnosť samičiek parazita, poškodzujú alebo zničia novonarodené larvy a sprostredkujú elimináciu dospelých parazitov z čreva.

V našom experimente boli dospelé červy parazita izolované z tenkého čreva na 5., 11. a ojedinele aj na 18. deň po infekcii (p.i.). K redukcii črevných parazitov došlo na 11. deň p.i. u myší, ktorým boli podávané bakteriocín-produkujúce kmene *Enterococcus faecium*, pričom signifikantný pokles (P<0,05) bol zaznamenaný v skupinách myší s *E. faecium* AL41 a *E. faecium* 2019 = CCM7421.

Pri vyhodnotení svalovej fázy infekcie v našom experimente bol zistený výrazný pokles (P<0,01; P<0,05) počtu lariev na 25. aj 32. deň p.i. v skupinách myší, ktorým boli podávané probiotické kmene *Lactobacillus fermentum* AD1= CCM7420, *L. plantarum* 17L/1 a bakteriocín-produkujúce kmene *E. faecium* AL41 a *E. durans* ED26/7. Zredukovaný počet adultov u myší s aplikáciou *E. faecium* AL41 mal znížený aj reprodukčný potenciál. Produkcia lariev bola vyhodnotená indexom reprodukčnej kapacity (RCI), ktorý je biologickým ukazovateľom infekčnosti trichinel. Je to pomer počtu lariev získaných z jedinca k počtu lariev, ktorými bol nainfikovaný. Infekčnosť parazita je výsledkom vzájomného spolupôsobenia štyroch komponentov – počtu samíc, ktoré sa vyvinú do dospelosti, ich plodnosti, dĺžky ich prežívania v čreve a doby, počas ktorej zostávajú životaschopné svalové larvy trichinel (Dvorožňáková a kol., 2011). Index reprodukčnej kapacity bol znížený

v skupinách s aplikáciou kmeňov *E. faecium* AL41, *E. durans* ED26/7, *L. fermentum* AD1-CCM7420 a *L. plantarum* 17L/1, v porovnaní s len infikovanou skupinou bez aplikácie kmeňov

To, či tieto bakteriálne kmene priamo ovplyvnili plodnosť samičiek alebo zabránili prieniku novonarodených lariev do krvného a lymfatického obehu, príp. sa na redukcii svalových lariev podieľala stimulovaná imunita hostiteľa, vysvetľujú výsledky *ex vivo* testu fertility samičiek izolovaných z čreva infikovaných myši s aplikáciou bakteriálnych kmeňov. Počet novonarodených lariev na samičku bol použitý ako miera plodnosti. Fertilita samičiek v našom experimente bola výrazne inhibovaná ( $P < 0,05$ ) u myši s aplikáciou *E. faecium* AL41, na základe čoho možno predpokladať priamy vplyv tohto bakteriálneho kmeňa na plodnosť samičiek. V prípade ostatných testovaných bakteriálnych kmeňov, u ktorých bola fertilita trichinel len mierne znížená, sa na redukcii počtu novonarodených lariev podieľali pravdepodobne imunitné mechanizmy. Sú zaznamenané tri hlavné výhody probiotických organizmov: 1) vedia modulovať svoje fyzikálno-chemické prostredie; 2) produkujú biologicky aktívne molekuly ako bakteriocíny, látky s antimikrobiálnym účinkom; 3) modulujú imunitu hostiteľa (Travers a kol., 2011).

Navrhnuť probiotické kmene ako alternatívu klasickej terapie antihelmintikami nie je pravdepodobné, ale ako doplnkový terapeutický prístup k zníženiu rizika infekcie alebo k zníženiu terapeutickú dávku antihelmintík (s mnohými nepriaznivými vedľajšími účinkami) sa zdá byť reálnejšie. Štúdie antiparazitárnych účinkov probiotických baktérií sú ešte v začiatkoch a je potrebný ďalší výskum.

*Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA 2/0081/15.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Berrilli F., Di Cave D., Cavallero S., D'Amelio S. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2 (141): 1-6.
- Bruschi F. How can *Trichinella* escape the host immune response. *Helminthologia.* 1999; 36: 139-145.
- Cabaj W. The effect of cyclosporin A on the course of infection by *Trichinella pseudospiralis* or *Nematospiroides dubius* on C3H strain mice. *Acta Parasitol Pol.* 1990; 35: 241-253.
- Campbell W.C. *Trichinella* and Trichinosis. 1st ed., 1983; 582.
- Dvorožňáková E., Hurníková Z., Kolodziej-Sobocińska M. Development of cellular immune response of mice to infection with low doses of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis* larvae. *Parasitol Res.* 2011; 108: 169-176.
- Gupta V., Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009; 27: 202-209.
- Jurášek V., Dubinský P. *Veterinárna parazitológia.* 1. vyd., 1993; 382.
- Kapel C. M. O., Gamble H. R. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol.* 2000; 30: 215-221.
- Morales M. A., Mele R., Sanches M., Sacchini D., De Giacomo M., Pozio E. Increased CD8 (+) T-cell expression and a type 2 cytokine pattern during the muscular phase of *Trichinella* infection in humans. *Infect Immun.* 2002; 70: 233-239.
- Pozio E., La Rosa G, Rossi P., Murrell K. D. Biological characterizations of *Trichinella* isolates from various hosts species and geographic regions. *J Parasitol.* 1992; 78: 647-653.
- Pozio E., Varese P., Gomez-Morales M. A., Croppo G. P., Pelliccia D., Bruschi F. Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 568-575.
- Travers M.-A., Florent I., Kohl L., Grellier P. Probiotics for the control of parasites: an overview. *J Parasitol Res.* 2011; 2011 (610769): 1-11.

## IZOLÁCIA A DIAGNOSTIKA MALASSEZIA PACHYDERMATIS U PSOV

Böhmová E.

Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Kvasinky rodu *Malassezia* tvoria prirodzenú mikroflóru kože človeka a zvierat. Ako oportúnne patogény môžu pôsobením vhodných predispozičných faktorov spôsobiť kožné ochorenia, systémové choroby a dermatitídy.

Prezentovaná práca je zameraná na fenotypovú identifikáciu a frekvenciu výskytu druhu *Malassezia pachydermatis* izolovaného od psov.

Vzorky boli získané od 137 psov a odbery boli vykonané z predilekčných miest výskytu malassezií ako sú uši, interdigitálny priestor a perianálna oblasť.

Na kultiváciu boli použité špecifické selektívne médiá (MLNA – modifikovaný Leeming-Notman agar, HIT – modifikovaný Candida-Chrom agar, SCH – Sabouraud dextrózový agar, SAOT – modifikovaný Sabouraud dextrózový agar). Inokulované platne boli inkubované pri teplote 32 °C po dobu sedem dní.

Čisté kultúry boli získané pasážovaním. Fenotypová identifikácia zahŕňala mikroskopickú diagnostiku, katalázový test, utilizáciu Tweenu, ricínového oleja a rozklad eskulínu.

Prítomnosť malassezií bola zaznamenaná vo vzorkách získaných od 64 psov a všetky pozitívne izoláty boli diagnostikované ako druh *M. pachydermatis*.

### ÚVOD

Kvasinky rodu *Malassezia* sú lipofilné mikroorganizmy, ktoré patria medzi normálnu komenzálnu kožnú mikroflóru teplokrvných stavovcov. Pri pôsobení vhodných predispozičných faktorov sa môžu prejaviť ako oportúnne patogény (Batra a kol., 2005).

Okrem jediného non-lipid-dependentného druhu *Malassezia pachydermatis*, izolovaného najčastejšie z vonkajšieho zvukovodu psov a mačiek, medzi typické zoofilné malassezie zaradujeme lipid-dependentné druhy *M. caprae*, *M. equina*, *M. nana* a *M. cuniculi* (Guillot a Bond, 1999).

Identifikácia jednotlivých druhov kvasiniek rodu *Malassezia* sa vykonáva na základe rozlíšenia rozdielnych fenotypových vlastností. Najčastejšie sa sleduje rast na Sabouradouvom agare, ktorý sa porovnáva so selektívnymi živnými médiami (Leeming-Notman agar, Dixonov agar, ChromMalassezia agar). Ďalšími navrhnutými metódami pre identifikáciu sú katalázový test, schopnosť využívať rôzne koncentrácie Tweenu, sledovanie rastu na CEL (pôde obohatenej ricínovým olejom) a na TE agare (Tween-esculínový agar), pomocou ktorej sa zisťuje schopnosť hydrolyzovať eskulín (Kaneko a kol., 2007).

### MATERIÁL A METODIKA

Výskyt malassezií bol hodnotený na základe vyšetrenia vzoriek pochádzajúcich od 137 psov. Výtery boli odobraté z predilekčných oblastí výskytu malassezií, a to vonkajší zvukovod oboch uší, trup, interdigitálny priestor a perineum.

Po odbere bola každá vzorka naočkovaná na špecifické selektívne médiá: SCH (Sabouraudov dextrózový agar s chloramfenikolom), SAOT (modifikovaný Sabouraudov dextrózový agar), MLNA (modifikovaný Leeming-Notman agar) a HIT (modifikovaný Candida-Chrom agar). Inokulované platne boli inkubované pri teplote 32 °C počas 7 dní. Po siedmich dňoch boli platne posudzované makroskopicky, tj. tvar kolónií, textúra a farba.

Kolónie, pri ktorých bolo podozrenie, že by mohlo ísť o malassezie boli posúdené aj mikroskopicky. Hodnotená bola morfológia buniek (tvar stopy, hruškovitý, okrúhly až ovoidný). Čisté kultúry izolátov malassezií, ktoré boli podrobené podrobnejšej fenotypovej identifikácii sa získali pasážovaním na špecifickom selektívnom médiu.



Fenotypová identifikácia čistých kultúr zahŕňala okrem mikroskopickej diagnostiky aj katalázový test, utilizáciu Tweenu, asimiláciu ricínového oleja a rozklad eskulínu.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na štyroch testovaných špecifických selektívnych médiách (SCH, SAOT, MLNA a HIT) používaných na kultiváciu malassezií bol rast kvasiniek pozorovaný už po štyroch dňoch (Obr. 1.).

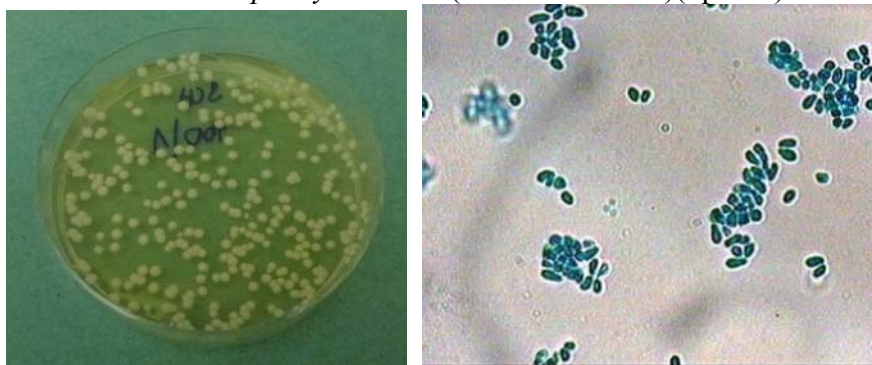
Mikroskopicky boli pozorované zvyčajne ovoidné, fľaškovité, resp. bunky tvaru stopy (Obr. 2.).

Pre ďalšiu identifikáciu bol použitý katalázový test s 3 % peroxidom vodíka, ktorý bol pri všetkých izolátoch pozitívny. Na CEL agare a na TE agare vykazovali taktiež všetky izoláty pozitívnu reakciu.

Na základe týchto fenotypových charakteristík vo všetkých vzorkách od psov bol identifikovaný druh *M. pachydermatis*.

Správnosť diagnostiky izolátov bola overená použitím referenčných kmeňov malassezií CBS (Utrecht, Holandsko).

Obr. 1.; 2.: Rast *Malassezia pachydermatis* na SCH (vľavo); mikroskopické zobrazenie buniek *Malassezia pachydermatis* (zväčšenie 400 x)(vpravo).



Zdroj: doc. MVDr. Eva Čonková PhD., MVDr. Ema Böhmová

V predloženej práci sme sa zaoberali výskytom a zastúpením kvasiniek rodu *Malassezia* u psov.

Pre určenie jednotlivých druhov malassezií sa používajú tradičné, fenotypové metódy založené na rozdielnosti morfológických a/alebo biochemických charakteristík (katalázová reakcia, schopnosť asimilovať Tween, rast na pôde s ricínovým olejom (CEL), schopnosť hydrolyzovať eskulín a vytvárať čierny pigment - TE) (Cafarchia a kol., 2011).

Všetky izoláty pochádzajúce od psov vykazovali pozitívne reakcie pri uvedených testoch.

Pre kultiváciu našich vzoriek boli použité pôdy SCH, MLNA, SAOT a HIT. Všetky tieto pôdy boli vhodné pre určenie izolátov zo vzoriek odobratých od psov, ktoré boli identifikované ako *Malassezia pachydermatis*.

V predloženej práci sme zisťovali aj vzájomnú súvislosť medzi výskytom malassezií a fyziologickými faktormi zvierat ako sú plemeno, vek, pohlavie a vyhodnocovali sme miesta najčastejšieho osídlenia malassezií.

Zo vzoriek získaných od 137 psov bola *Malassezia pachydermatis* zistená u 64 jedincov. Jej incidencia u zdravých psov dosahovala 41,1 % a u chorých 60,5 %. Naše výsledky sú podobné ako vo svojej práci uvádzajú Cafarchia a kol. (2005), ktorí referujú o incidencii malassezií u 51,7 % psov, pričom vyššia prevalencia bola zaznamenaná u psov s kožnými léziami (61,1 %) ako u zdravých psov (36,4 %).

Viacero štúdií je zameraných na plemennú predispozíciu vo vzťahu k výskytu malassezií. Výsledky v našej práci korešpondujú so zisteniami autorov, ktorí vo svojich prácach udávajú, že *M. pachydermatis* je najčastejšie izolovaná u plemien ako sú Pudel, Kokeršpaniel, Nemecký ovčiak a Yorkshirský teriér (Crespo et al., 2002; Kumar et al., 2002).

Čo sa týka vekovej predispozície, názory autorov sa líšia. V tejto práci najviac vyšetrených psov bolo vo veku od 1-10 rokov. V tejto skupine zvierat sme zaznamenali vyššiu incidenciu *M. pachydermatis* pri chorých (58,8 %) ako pri zdravých zvieratách (42,8 %).

Pohlavie viacerí autori (Crespo et al., 2002; Kumar et al., 2002) nepovažujú za predispozičný faktor. Nardoni a kol. (2004) nezistili žiadne významné rozdiely vo výskyte kvasiniek u rôznych pohlaví. Pri vyhodnocovaní tohto faktora sme nezaznamenali výrazné rozdiely incidencie kvasinky u zdravých zvierat (44,6 % psy a 37,2 % suky).

Z hľadiska predilekčných miest výskytu malassezií sme zaznamenali najvyššie percento pri výteroch z ucha tak u zdravých (27,3 %) ako aj u zvierat s otitídou (44,7 %). Tieto údaje korešpondujú s prácou Čonkovej a kol. (2011), v ktorej je taktiež uvedená najčastejšia izolácia z ušných výterov (44,8 %).

V práci sme sa zaoberali izoláciou a diagnostikou druhu *M. pachydermatis*, ktorý sme získali odberom vzoriek od 137 psov.

Na základe kultivačných metód a fenotypových charakteristík sme prítomnosť malassezií zaznamenali u 64 psov. Vo všetkých pozitívnych izolátoch pochádzajúcich od psov bol zistený druh *M. pachydermatis*.

Zamerali sme sa tiež na vyhodnotenie miest najčastejšieho osídlenia kvasiniek a zisťovali sme vzájomnú súvislosť medzi výskytom kvasinky a fyziologickými faktormi psov ako sú plemeno, vek a pohlavie.

Znalosť predispozičných faktorov výskytu malassezií u zvierat môže pomôcť pri diagnostike týchto infekcií.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Batra R, Boekhout T, Guého E, Cabanes FJ, Dawson TL, Gupta AK. Malassezia Baillon, emerging clinical yeasts. FEMS Yeast Res. 2005; 5, 12: 1101-1113.
- Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Chermette R, Guillot J, Otranto D. Frequency, body distribution, and population size of Malassezia species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. Journal Veterinary Diagnostic Investigation. 2005; 17: 316-322.
- Cafarchia C, Gasser RB, Figueredo LA, Latrofa MS, Otranto D. Advances in the identification of Malassezia. Mol Cell Probes. 2011; 25, 1: 1-7.
- Guillot J, Bond R. Malassezia pachydermatis: a review. Med Mycol. 1999; 37: 295-306.
- Kaneko T, Makimura K, Abe M, Shiota R, Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Sugita T, Shibuya S, Watanabe S, Yamaguchi H, Abe S, Okamura N. Revised culture-based system for identification of Malassezia species. J Clin Microbiol. 2007; 45, 11: 3737-3742.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of Malassezia spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. Med Mycol. 2002; 40, 2: 115-121.
- Kumar A, Singh K, Sharma A. Prevalence of Malassezia pachydermatis and other organisms in healthy and infected dog's ears. Israel Journal of Veterinary Medicine. 2002; 57: 145-148.
- Nardoni S, Mancianti F, Corazza M, Rum A. Occurrence of Malassezia species in healthy and dermatologically diseased dogs. Mycopathologia. 2004; 157: 383-388.
- Čonková E, Sesztáková E, Páleník L, Smrčo P, Bílek J. Prevalence of Malassezia pachydermatis in dogs with suspected Malassezia dermatitis or otitis in Slovakia. Acta Vet Brno. 2011; 80: 249-254.

## VÝSKYT AUTOCHTÓNNEJ ANGIOSTRONGYLÓZY U PSOV NA ÚZEMÍ SLOVENSKA

Čabanová V., Miterpáková M., Hurníková Z., Pipíková J.

*Parazitologický ústav, SAV, Košice*

### ABSTRAKT

Angiostrongylóza je na našom území novo sa vyskytujúce parazitárne ochorenie ohrozujúce zdravie a život psov. Prvé dva prípady ochorenia na Slovensku boli zaznamenané v roku 2012 a 2013 u psov žijúcich v meste Košice. V tejto práci prinášame predbežné výsledky prvého epizootologického výskumu angiostrongylózy u psov na Slovensku, ktoré potvrdzujú jej autochtónny výskyt na našom území s prevalenciou 5,26% .

### ÚVOD

Vplyvom klimatických a ekologických zmien ako aj migráciou zvierat prenikajú na naše územie nové parazitárne ochorenia. Jedným z takýchto ochorení je aj angiostrongylóza, ktorej pôvodcom je parazitický červ *Angiostrongylus vasorum*, známy aj pod menom francúzsky srdcový červ. Práve vo Francúzsku bol tento parazit po prvý krát opísaný v roku 1853 (Serres, 1854).

Vektorom tohto parazita sú zástupcovia z triedy Gastropoda, prevažne bezulitnaté slimáky. Definitívny hostiteľ sa nakazí požitím infikovaného slimáka alebo olizovaním jeho výlučkov na tráve alebo iných predmetov, čím sa dostávajú infekčné larvy (L3) do tráviaceho traktu zvierat'a. Larvy aktívne penetrujú črevo a prenikajú do pľúc, kde kladú vajíčka, z ktorých sa liahne prvé larválne štádium (L1). Larvy L1 dráždia dýchacie ústroje a sú vykašliavané do ústnej dutiny, odkiaľ po prehltnutí znovu putujú do tráviaceho traktu jedinca a trusom sa dostávajú do okolitého prostredia. Toto ochorenie sa prejavuje prevažne závažnými respiračnými problémami, následkom ktorých môže byť aj náhly úhyn jedinca. Na Slovensku bolo po prvýkrát toto parazitické ochorenie zaznamenané v roku 2012 u maltézskeho psíka na území mesta Košice (Hurníková *et al.* 2013).

Epizootologický výskum angiostrongylózy predstavuje pre vedcov veľkú výzvu. Dôvodom je výskyt tohto ochorenia v prevažne malých ohraničených ohniskách, čo komplikuje výskum cirkulácie pôvodcu. Taktiež diagnostika tohto ochorenia je mimoriadne diskutovaná, keďže doteraz nebola ustálená preferencia jednej diagnostickej metódy (Elsheikha *et al.* 2014).

Z týchto príčin boli v úvodných etapách nášho výskumu modifikované rôzne diagnostické metódy a vytvorené nové, ktoré v porovnaní s metódami ako SAF a Bearmannova metóda vykazujú vyššiu citlivosť a sú flexibilne použiteľné na čerstvé aj zmrazené vzorky trusu.

V tomto príspevku sú publikované predbežné výsledky prvého epizootologického výskumu angiostrongylózy u psov na území Slovenska.

### MATERIÁL A METODIKA

Za účelom diagnostiky angiostrongylózy bolo doteraz zozbieraných a vyšetrených 114 čerstvých a zmrazených vzoriek trusu psov pochádzajúcich tak od súkromných majiteľov, ako aj od psov umiestnených v psích útulkoch z rôznych častí Slovenska. Vzorky boli vyšetrené modifikovanou flotačnou metódou podľa nasledujúceho postupu: Tri gramy čerstvého alebo rozmrazeného trusu (pri izbovej teplote) boli zhomogenizované spolu s 10 ml vody. Homogénna zmes bol prefiltrovaná a centrifugovaná po dobu 2 minút pri 2 500 rpm. Supernatant bol zliaty a k sedimentu boli pridané 2 ml roztoku síranu zinočnatého so špecifickou hmotnosťou 1,18. Táto zmes bola znovu centrifugovaná pri rovnakých podmienkach. Po centrifugácii bol opätovne pridaný roztok síranu zinočnatého tak, aby sa vytvorila konvexná hladina na povrchu skúmavky, na ktorú bolo priložené krycie sklo. Po 10 minútach bolo krycie sklo s vyflotovaným obsahom odobraté, položené na podložné sklo a pozorované pod svetelným mikroskopom pri 150 násobnom zväčšení. V prípade

pozitívneho nálezu boli zachytené larvy určované morfológicky podľa typického zakončenia kaudálneho konca parazita. Za účelom jednoznačnej druhovej diferenciácie bola izolovaných lariiev extrahovaná DNA s použitím komerčne vyrábaného setu DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN Group, Germany). Následne bola amplifikovaná ITS2 sekvencia rDNA pomocou špecifických AV5 a AV4 priemerov navrhnutých Al Sabim a kol. (2010). Amplifikácia prebiehala za ďalej uvedených podmienok: počiatočná denaturácia 94 °C/ 2 min; 38 cyklov (denaturácia 94 °C/30 s, „aniling“ 57 °C/30 s, extenzia 72 °C/ 30 s), konečná extenzia 72 °C/ 7 min.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V nami vyšetrených vzorkách trusu boli zachytené larvy *A. vasorum* v 6 prípadoch, čo predstavuje priemernú prevalenciu 5,26 %. Všetky prípady je možné považovať za autochtónne. Rozmiestnenie pozitívnych prípadov na území Slovenska znázorňuje mapa (Obr. 1).

Morfológia kaudálneho zakončenia lariiev L1 vykazovala typické znaky pre druh *A. vasorum* (Obr. 2), čo bolo jednoznačne potvrdené aj analýzou DNA pomocou PCR (Obr. 3).

Použitá modifikovaná flotačná metóda s roztokom síranu zinočnatého sa ukázala ako dostatočne citlivá a flexibilná pre diagnostiku čerstvých aj zmrazených vzoriek trusu.

Počiatočné výsledky nášho výskumu potvrdili autochtónny výskyt angiostrongylózy na území Slovenska. Vzhľadom na to, že parazit vykazuje tendenciu cirkulácie v rámci malých ohraničených ohnisk, je nutné predpokladať, že skutočná prevalencia tohto ochorenia bude výrazne vyššia, čo jednoznačne podporuje potrebu ďalších výskumov v tejto oblasti.

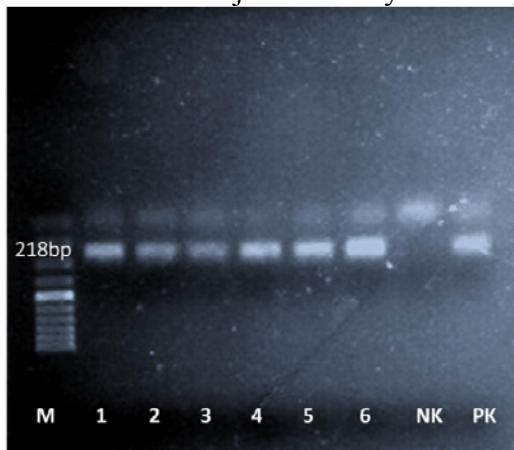
Obr.1: Lokality výskytu autochtónnych prípadov angiostrongylózy.



Obr. 2: Larva *A. vasorum* s typickým zakončením kaudálnej časti.



Obr. 3: Výsledky DNA analýzy PCR metódou (M – marker; 1 až 6 – analyzované vzorky DNA extrahovanej z izolovaných lariev; NK – negatívna kontrola, PK – pozitívna kontrola).



*Tento príspevok bol finančne podporený prostriedkami projektu VEGA č.2/0011/12.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Al-Sabi, M.N., Deplazes, P., Webster, P., Willesen, J.L., Davidson, R.K., Kapel, C.M.O. PCR detection of *Angiostrongylus vasorum* in faecal samples of dogs and foxes. *Parasitology Research*. 2010;107:135–140.
- Elsheikha H. M, Holmes A.A., Wright I., Morgan E. R., Lacher D. W. Recent advances in the epidemiology, clinical and diagnostic features , and control of canine cario-pulmonary angiostrongylosis. *Veterinary Research*. 2014; 45: 1-12.
- Hurníková Z., Miterpáková M., Mandelík R. First autochthonous case of canine *Angiostrongylus vasorum* in Slovakia. *Parasitology Research*.2013; 112: 3505-3508.
- Serres , E. Entozoaires trouvés dans l'oreille droite, le ventricule correspondant et l'artère pulmonaire d'un chien. *Journal des Vétérinaires du Midi*. 1854; 7: 70.

## ÚLOHA NUKLEÁRNYCH ESTROGÉNOVÝCH RECEPTOROV V PROCESÉ REEPITELIZÁCIE KOŽNÝCH RÁN

Čriepoková Z.<sup>1</sup>, Gál P.<sup>2,3</sup>, Peržel'ová V.<sup>1,2</sup>, Lenhardt L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra patologickej anatómie a fyziológie, UVLF, Košice

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

<sup>3</sup>Ústav biomedicínskeho výskumu, VÚSCH, Košice

### ABSTRAKT

Deprivácia estrogénu je u žien po menopauze zodpovedná okrem iného za narušené hojenie kožných rán. Reepitelizácia je neodeliteľnou fázou hojenia a keďže keratinocyty exprimujú estrogénové receptory- ER- $\alpha$  a ER- $\beta$ , je pravdepodobné, že regenerácia epidermis je ovplyvnená estrogénom a modulovaná práve cez tieto receptory. Pre objasnenie úloh týchto dvoch receptorov sme v *in vivo* pokuse skúmali pôsobenie selektívnych ER agonistov na reepitelizáciu v modeli hojenia otvorených rán u ovariektomizovaných samíc potkanov v porovnaní s kontrolami (ovariektomizovanými a slepo operovanými potkanmi). Vzorky tkaniva rán boli rutinne spracované pre svetelnú mikroskopiu a na monitorovanie reepitelizácie epidermis bola použitá semi- kvantitatívna metóda. Rany potkanov po podávaní ER- $\alpha$  agonistu vykazovali oneskorený proces regenerácie chlpových folikulov a oneskorené hrubnutie epidermis, čo bolo porovnateľné s výsledkami u ovariektomizovaných potkanov. Naproti tomu, aplikácia ER- $\beta$  agonistu viedla k normalizácii procesu regenerácie epidermis porovnateľne so slepo operovanými zvieratami. Týmto bola v našej štúdii preukázaná receptorová- špecificita pôsobenia estrogénu na reepitelizáciu a významná úloha ER- $\beta$  v akcelerácii regenerácie epidermis.

### ÚVOD

Je dobre známe, že efektívnosť reparácie rán je u starších jedincov redukovaná, koža je krehkejšia a náchylnejšia k traumám (Kurt a kol., 2012). Práve deprivácia estrogénu sa u žien v postmenopauznom období považuje za hlavnú príčinu mnohých vekovo súvisiacich procesov vrátane nedokonalého hojenia rán (Archer, 2012). Reepitelizácia, ako neoddeliteľná súčasť hojenia rán, vytvára prostredníctvom proliferácie a migrácie keratinocytov cez ranu bariéru medzi vonkajším a vnútorným prostredím (Torma a kol., 2008). Keďže keratinocyty exprimujú estrogénové receptory (Emmerson a kol., 2012), predpokladá sa, že regenerácia epidermis je modulovaná cez tieto receptory. V štúdii využívajúcej ER- $\beta$  knock-out myši, sa zaznamenalo, že za sprostredkovanie priaznivých účinkov estrogénovej substitučnej terapie sú zodpovedné epidermálne ER- $\beta$  (Krahn-Bertil a kol., 2010). Tento výsledok naznačuje, že estrogénová substitučná terapia môže byť receptorovo- špecifická. Pre objasnenie a potvrdenie úlohy jednotlivých podtypov nukleárných estrogénových receptorov ER- $\alpha$  a ER- $\beta$  v procese epidermálnej regenerácie sme v *in vivo* pokuse skúmali za použitia selektívnych ER agonistov mieru regenerácie epitelu v modeli hojenia otvorených rán u ovariektomizovaných samíc potkanov.

### MATERIÁL A METODIKA

Experimentálne podmienky boli v súlade s Európskymi pravidlami ošetrovania zvierat a welfaru. Naš experiment bol schválený etickou komisiou Fakulty medicíny Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky.

V experimente bolo použitých 20 samíc potkana plemena Sprague-Dawley vo veku 4 mesiacov. Náhodne boli rozdelené do štyroch skupín pričom v každej skupine bolo päť zvierat: (i) kontrola- falošne operované, liečené nosičom (NOV-C); (ii) ovariektomizované, liečené nosičom aplikáciou (OVX-C); (iii) ovariektomizované, liečené so selektívnym ER- $\alpha$

agonistom PPT (OVX-PPT); (iv) ovariektomizované, liečené selektívnym ER- $\beta$  agonistom DPN (OVX-DPN).

Propyl (1H) pyrazol-1,3,5-triyl-trisfenol (PPT), selektívny ER- $\alpha$  agonista, a 2,3-bis (4 hydroxyfenyl)-propionitril (DPN), selektívny ER- $\beta$  agonista (Tocris Bioscience, Bristol, UK) boli rozpustené v dimetyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Všetky chirurgické intervencie boli vykonané pod celkovou anestéziou indukovanou administráciou 33 mg/kg ketamínu (Narkamon a.u.v.; Spofa, Praha, Česká republika), 11 mg/kg xylazínu (Rometa a.u.v.; Spofa) a 5 mg/kg tramadolu (Tramadol-K; Krka, Novo Mesto, Slovenia). Dvanásť týždňov pred začatím samotného experimentu hojenia rán (Gál a kol., 2008a), podstúpili potkany zo všetkých OVX skupín ovariektómii, zatiaľ čo potkany zo skupiny NOV-C boli falošne operované. Na sledovanie hojenia kožných rán bola za aseptických podmienok vytvorená jedna kruhová kožná rana prechádzajúca cez celú hrúbku kože s priemerom 1 cm na chrbte každého potkana. Po vytvorení rany bol potkanom zo skupín OVX-PPT a OVX-DPN denne aplikovaný príslušný modulátor ER v dávke 1 mg/kg subkutánne (počas prvých siedmych dní po zákroku), zatiaľ čo ostatným potkanom bol aplikovaný nosič (1 % DMSO) (Wegorzewska a kol., 2008 a Gál a kol., 2010). Na 21. deň po vytvorení rany boli zvieratá utratené inhaláciou éteru a tkanivo rany bolo odobraté pre ďalšie spracovanie. Vzorky tkaniva boli rutinne spracované pre svetelnú mikroskopiu (fixácia v 4% pufrovanom formaldehide, dehydratácia, zaliatie do parafínu, narezanie a ofarbenie vzoriek hematoxylin- eozínom (HE)). Zafarbené rezy boli hodnotené za použitia mikroskopu Olympus BX51 vybaveného kamerou DP50 CCD (Olympus, Tokyo, Japan). Na monitorovanie reepitelizácie epidermis, ako aj na zaznamenanie prítomnosti zápalových buniek (PMNL- polymorfonukleárne leukocyty), fibroblastov, ciev a nového kolagénu bola použitá semi- kvantitatívna metóda (Gál a kol., 2008b). Rezy boli hodnotené podľa stupnice 0, 1, 2, 3, 4.

*Štatistická analýza:* Údaje zo semikvantitatívnej analýzy boli prezentované ako priemerné a boli porovnané s neparametrickým Kruskal-Wallis testom. Stupeň signifikancie bol  $p < 0.05$

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas post- operačnej periódy boli všetky zvieratá zdravé a nevykazovali klinické symptómy infekcie. Inflamačná fáza bola ukončená u všetkých skupín bez prítomnosti PMNL a iba s veľmi nepatrným výskytom tkanivových makrofágov v mieste rany. 21. deň po vytvorení rany bola prítomná tenká keratínová vrstva u všetkých rán, demonštrujúc normálny priebeh diferenciacie keratinocytov. Odlišnosti boli zaznamenané v procese regenerácie epidermis. Rany potkanov zo skupín OVX-C a OVX-PPT vykazovali oneskorený proces regenerácie chlpových folikulov a oneskorené hrubnutie epidermis. Aplikácia ER- $\beta$  agonistu viedla k normalizácii procesu regenerácie epidermis porovnateľne so slepo operovanými zvieratami. S ohľadom na obe kontrolné skupiny (OVX-C a NOV-C), počet luminizovaných ciev nepatrne vzrástol na základe estrogénovej aplikácie (OVX-PPT a OVX-DPN). V granulačnom tkanive všetkých rán bol zaznamenaný mierny počet fibroblastov, reflektujúc progresiu vo fibróze tkaniva. Pokiaľ ide o prítomnosť luminizovaných ciev alebo fibroblastov neboli pozorované žiadne signifikantné rozdiely medzi skupinami.

Aj keď sa estrogén považuje za kľúčový regulátor hojenia rán, nekompletné objasnenie molekulárnych ciest účinku estrogénov, rovnako ako aj dobre dokumentované nežiaduce účinky estrogénov podávaných po menopauze v klinickej sfére, vopred vylučujú bežné klinické používanie ERT v hojení rán. Pre lepšie porozumenie účinku estrogénov na hojenie rán, sa štúdie zameriavajú na estrogénové receptory, prostredníctvom ktorých estrogény pôsobia. Naznačuje sa, že úloha týchto dvoch estrogénových receptorov je odlišná, keďže *in vivo* experimenty preukázali, že zacielenie na ER- $\beta$ , ale nie na ER- $\alpha$  akceleruje reepitelizáciu u myší (Campbell a kol., 2010) a u potkanov (Novotný a kol., 2011). Okrem toho, ER- $\alpha$  je

zodpovedný za spomalenie reepitelizácie rán u samcov myší (Gilliver a kol., 2010). V našej štúdií bola takisto potvrdená normalizácia procesu reepitelizácie po agonizovaní ER- $\beta$  a nie po agonizovaní ER- $\alpha$ .

*Práca bola podporená grantmi VEGA 1/0299/13, VEGA 1/0404/15, VEGA 1/0048/15, APVV-0408-12, APVV-14-0731, UNCE 204013, PRVOUK 27, CZ.1.05/1.1.00/02.0109 GlycoHIT (contract no. 260600), GLYCOPHARM (contract no. 317297).*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Archer DF. Postmenopausal skin and estrogen. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28: 2-6.
- Campbell L, Emmerson E, Davies F, Gilliver SC, Krust A, Chambon P, Ashcroft GS and Hardman MJ. Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor  $\beta$  independent of its antiinflammatory activities. *J Exp Med* 2010; 207: 1825-1833.
- Emmerson E and Hardman MJ. The role of estrogen deficiency in skin ageing and wound healing. *Biogerontology* 2012; 13: 3-20.
- Gál P, Kilik R, Mokry M, Vidinsky B, Vasilenko T, Možeš S, Bobrov N, Tomori Z, Bober J and Lenhardt L. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med* 2008a; 53: 652-659.
- Gál P, Novotný M, Vasilenko T, Depta F, Šulla I and Tomori Z. Decrease in wound tensile strength following post-surgical estrogen replacement therapy in ovariectomized rats during the early phase of healing is mediated via ER- $\alpha$  rather than ER- $\beta$ : a preliminary report. *J Surg Res* 2010; 159: 25-28.
- Gál P, Toporcer T, Vidinsky B, Mokry M, Grendel T, Novotny M, Sokolsky J, Bobrov N, Toporcerova S, Sabo J, et al. Postsurgical administration of estradiol benzoate decreases tensile strength of healing skin wounds in ovariectomized rats. *J Surg Res* 2008b; 147: 117.
- Gilliver SC, Emmerson E, Campbell L, Chambon P, Hardman MJ and Ashcroft GS. 17 $\beta$ - estradiol inhibits wound healing in male mice via estrogen receptor- $\alpha$ . *Am J Pathol* 2010; 176: 2707-2021.
- Krahn-Bertil E, Dos Santos M, Damour O, Andre V and Bolzinger MA. Expression of estrogen-related receptor b (ERR $\beta$ ) in human skin. *Eur J Dermatol* 2010; 20: 719-723.
- Kurt O, Yilmaz-Aydogan H, Uyar M, Isbir T, Seyhan MF and Can A. Evaluation of ER $\alpha$  and VDR gene polymorphisms in relation to bone mineral density in Turkish postmenopausal women. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 6723-6730.
- Novotný M, Vasilenko T, Varinska L, Smetana K Jr, Szabo P, Šarišsky M, Dvořankova B, Mojžiš J, Bobrov N, Toporcerova S, et al. ER- $\alpha$  agonist induces conversion of fibroblasts into myofibroblasts, while ER- $\beta$  agonist increases ECM production and wound tensile strength of healing skin wounds in ovariectomised rats. *Exp Dermatol* 2011; 20: 703-708.
- Torma H, Lindberg M and Berne B. Skin barrier disruption by sodium lauryl sulfate-exposure alters the expressions of involucrin, transglutaminase 1, profilaggrin, and kallikreins during the repair phase in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1212-1219.
- Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ and Wu TJ. Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199: 67.



## DETEKCIA ZMIEN DNA V LYMFÓME U PSOV

Drážovská M., Šiviková K., Dianovský J.

Ústav genetiky, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

V našej práci sme sledovali chromozómovú nestabilitu a zmeny v nádorovom supresorovom géne *TP53* v lymfómoch sučky bernského salašnického psa a sučky kríženca metódou komparatívnej genómovej hybridizácie (CGH). Detegovali sme početné prestavby, ktoré naznačili heterogenitu nádorov. V lymfóme kríženca sme našli deléciu na chromozóme 9 a duplikácie na chromozómoch 5, 8 a 17. U bernského salašnického psa sme identifikovali stratu genetického materiálu na chromozómoch 1,5, 8, 12, 18, 22, 27, 29 a získali genetického materiálu na chromozómoch 1, 2, 9, 11, 15, 16, 18, 20, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 34, 36, 37 a 38. Po sekvenácii *TP53* génu sme detegovali tranzíciu A/G na pozícii 138 v 5. exóne, avšak bez zmeny aminokyseliny.

### ÚVOD

Lymfómy patria medzi často sa vyskytujúce nádory u cicavcov. Je známe, že sú výsledkom malígnej transformácie vyvíjajúcich sa lymfocytov. Početné chromozómové aberácie boli zaznamenané v humánných lymfómoch. Autori D'Haese a kol. (2005) dokumentovali chromozómovú nestabilitu metódou CGH a translokáciu t(14;18) sekvenáciou *BCL2* génu u pacientov s non-Hodgkinovým lymfómom. Mutácie v lymfoidnom tkanive pozorovali aj Ohi a kol. (2007) u myší. Autori sledovali zmeny v DNA v 5 génoch (*Bcl11b*, *Ikaros*, *Myc*, *Pten* a *Notch1*). Okrem týchto génov boli často popisované aj mutácie v géne *TP53* v rôznych typoch humánných nádorov, hemangiosarkómoch u myší, v nádoroch mliečnej žľazy u psov alebo v osteosarkómoch u psov. Psí *TP53* gén obsahuje 11 exónov, pričom exóny 4-8 sú u cicavcov vysoko konzervované a zároveň sú v nich najčastejšie identifikované mutácie. Podobne psí p53 proteín obsahujúci 381 aminokyselín je identický na 81% s humánnym, obsahujúcim 393 aminokyselín (Chu a kol., 1998). Napriek častému výskytu lymfómov u ľudí a psov a podobným symptómom ochorenia je o DNA zmenách v lymfómoch psov len veľmi málo informácií.

Cieľom našej práce bolo detegovať zmeny DNA (straty/zisky genetického materiálu) v psích lymfómoch CGH metódou a potenciálnych mutácií v *TP53* géne pomocou PCR.

### MATERIÁL A METODIKA

#### Izolácia testovanej a referenčnej DNA

Testovanú genómovú DNA sme izolovali z nádorového tkaniva (lymfómy) od sučiek (kríženc so solídnym nádorom v uzlinách - donor 1 a bernský salašnický pes s početnými metastázami - donor 2) vo veku 10 a 12 rokov. Referenčnú DNA sme izolovali z krvi zdravého psa (Jack Russell Terrier, 7 ročný) pomocou DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (Qiagen).

#### Komparatívna genómová hybridizácia

Testovanú DNA sme označili pomocou BioPrime Array CGH Genomic Labeling System (Invitrogen) s fluorescenčným farbivom Cyanine 3-dUTP (Enzo Life Science, červená farba) a referenčnú s Green 500-dUTP (Enzo Life Science, zelená farba). Následne sme ich zmiešali s kompetitívnou DNA; vyzrážali ich vo vákuovom koncentrátore a nakoniec resuspendovali v hybridizačnom pufrí. Sonden sme denaturovali pri 73°C 10 min a nechali sme ich stáť pri 37°C 45 min. Preparáty boli následne denaturované v 70% formamide 2 min pri 73°C a dehydratované v ľadovej alkoholovej rade. Na takto pripravené sklíčka sme aplikovali sondy, prikryli krycím sklíčkom, utesnili lepidlom Fixogum a hybridizovali sme ich vo vlhkej

komôrke pri 37°C 2 dni. Na záver sme preparáty ofarbili s DAPI. Metafázy boli hodnotené fluorescenčným mikroskopom Olympus BX 60 a analyzované pomocou CGH-ISIS softvéru. Karyotypovali sme 9 metafáz z každej vzorky a použili ich na výpočet priemerného pomeru červenej a zelenej farby. Pomer väčší ako 1,25:1 indikoval zisk genetického materiálu, pomer menší než 0,75:1 zase jeho stratu.

#### Návrh primerov a PCR reakcia

Špecifické primery sme navrhli pre *p53* exóny 5-6 (187bp, ENSCAFE00000181392 a 113bp, ENSCAFE00000181396) a exóny 7-8 (110bp, ENSCAFE00000181397 a 137bp, ENSCAFE00000181399) pomocou Primer3 Plus softvér

#### DNA sekvenácia

PCR amplikóny *TP53* génu, exóny 5-6, a exóny 7-8 boli sekvenované pomocou ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVLF Košice). Výsledky sekvenácie boli porovnávané s referenčnou sekvenciou dostupnou v GenBank pod číslom NM\_001003210 a hodnotené DNASTAR programom.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hlavnou výhodou CGH techniky je možnosť pozorovať celý genóm v jednej hybridizačnej reakcii, a preto je vhodná pre identifikáciu chromozómových ziskov a strát v genómovej DNA z nádorového tkaniva (Venkatraj a kol., 1998).

V našej práci sme analyzovali a našli viaceré chromozómové prestavby vo vzorkách nádorového tkaniva psov: deléciu na chromozóme 9q26.2, a duplikácie na chromozómoch 5q35-36; 8q33.3 a 17q23-24 u donora 1. U donora 2 sme detegovali straty genetického materiálu na chromozómoch 1q14; 5q33-34; 8q13-31; 12q14-23; 18q22.1; 22q12.3-23; 27q12-14; 29q13-15 a naopak jeho zisky na chromozómoch 1q34-38; 2q11,32-35; 9q11-12,25; 11q23; 15q11,26; 16q25.2; 18q25.3; 20q16-17; 23q24; 24q25; 25q24; 28q11; 29q23.1-23.2; 30q15.1-15.2; 34q17; 36q15; 37q17, 38q11. Podobne zisky a straty na viacerých chromozómoch dokumentovali vo vzorkách lymfómov šiestich krížencov a ďalších 19 psov rôznych plemien Thomas a kol. (2003). Zmeny na viacerých chromozómoch boli zhodné s našimi výsledkami, no vyskytli sa aj rozdiely. Zdá sa, že odlišnosti v genómových zmenách môžu byť spôsobené etiologickou povahou endogénnych aj exogénnych faktorov zahrnutých v karcinogéneze. Podobne početné chromozómové prestavby vo vzorkách od pacientov s metastázami zaznamenali aj autori Lin a kol. (2005).

V súvislosti s nádorovými ochoreniami sú často popisované aj mutácie nádorového supresorového génu *TP53*, ktorý sa podieľa na kontrole proliferácie. V našich vzorkách sme našli iba tranzíciu A/G na pozícii 138 v exóne 5 u donora 2. Jednonukleotidové mutácie meniace zmysel *TP53* boli často identifikované u ľudí (Hainaut a Hollstein, 2000). Delécie a inzercie v tomto géne, vedúce ku zmene aminokyseliny popísal v 15 rôznych nádoroch psov Setoguchi a kol. (2001). Niekoľko mutácií v exónoch 5,7 a 8 pozorovali v lymfóme myši aj Brathwaite a kol. (1992). Naopak, Hollstein a kol. (1997) a York a kol. (2011) nenašli žiadnu bodovú mutáciu v exónoch 5-8 *TP53* génu v humánných nádoroch pečene, respektíve v nádoroch mozgu u psov.

Psy sú vhodným modelom pre štúdium nádorových ochorení, pretože sa u nich vyskytujú nádory rovnakej povahy s veľmi podobnou odpoveďou na terapiu. Naše výsledky odhalili genómovú instabilitu nádorového tkaniva a tiež heterogenitu v nádorovej progresii. Keďže sme v *TP53* géne identifikovali len jednu tichú mutáciu, pravdepodobne mutácie v *TP53* géne nezohrávajú kľúčovú rolu vo formácii a progresii psích lymfómov.

*Táto práca bola podporená Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky prostredníctvom grantu VEGA č. 1/0117/13 a VEGA č. 1/0043/15.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brathwaite O, Bayona W, Newcomb EW. p53 Mutations in C57BL/6J Murine Thymic Lymphomas Induced by  $\gamma$ -Irradiation and N-Methylnitrosourea. *Cancer Res.* 1992; 52: 3791-5.
- Chu LL, Rutteman GR, Kong JM, Ghahremani M, Schmeing M, Misdorp W, van Garderen E, Pelletier J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 50: 11–25.
- D'Haese JG, Tsukasaki K, Cremer FW, Fischer C, Bartram CR, Jauch A. Chromosomal aberrations in follicular non-Hodgkin lymphomas of Japanese patients, detected with comparative genomic hybridization and polymerase chain reaction analysis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 162: 107–14.
- Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000; 77: 81–137.
- Hollstein M, Bartsch H, Wesch H, Kure EH, Mustonen R, Mühlbauer KR, Spiethoff A, Wegener K, Wiethage T, Müller KM. p53 gene mutation analysis in tumors of patients exposed to alpha-particles. *Carcinogenesis.* 1997; 18: 511–16.
- Lin Y-S, Eng H-L, Jan Y-J, Lee H-S, Ho WL, Liou C-P, Lee W-Y, Tzeng C-C. Molecular cytogenetics of ovarian granulosa cell tumors by comparative genomic hybridization. *Gynecol Oncol.* 2005; 97: 68–73.
- Ohi H, Mishima Y, Kamimura K, Maruyama M, Sasai K, Kominami R. Multi-step lymphomagenesis deduced from DNA changes in thymic lymphomas and atrophic thymuses at various times after  $\gamma$ -irradiation. *Oncogene.* 2007; 26: 5280–89.
- Setoguchi A, Sakai T, Okuda M, Minehata K, Yazawa M, Ishizaka T, Watari T, Nishimura R, Sasaki N, Hasegawa A, Tsujimoto H. Aberrations of the p53 tumor suppressor gene in various tumors in dogs. *Am J Vet Res.* 2001; 62: 433–9.
- Thomas R, Smith KC, Ostrander EA, Galibert F, Breen M. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *Br J Cancer.* 2003; 89: 1530–7.
- Venkatraj VS, Begemann M, Sobrino A, Bruce JN, Weinstein IB, Warburton D. Genomic changes in glioblastoma cell lines detected by comparative genomic hybridization. *J Neurooncol.* 1998; 36: 141–8.
- York D, Higgins RJ, LeCouteur RA, Wolfe AN, Grahn R, Olby N, Cambell M, Dickinson PJ. TP53 Mutations in Canine Brain Tumors. *Vet Pathol.* Online 2011, doi: 10.1177/0300985811424734.

## ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ POTENCIÁLNE VYUŽITELNÝCH V AKVAKULTÚRE

Fečkaninová A.<sup>1</sup>, Popelka P.<sup>1</sup>, Koščová J.<sup>2</sup>, Mudroňová D.<sup>2</sup>

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

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

### ABSTRAKT

Rezistencia na rozličné druhy antibiotík je významnou vlastnosťou kyslomliečnych baktérií a je považovaná za jedno z kritérií pre hodnotenie bezpečnosti kmeňov potenciálne využiteľných v akvakultúre. Cieľom tejto práce bolo stanoviť citlivosť šiestich laktobacilov (*L. paraplantarum*, n=1; *L. plantarum*, n=3; *L. fermentum*, n=1; *L. brevis*, n=1) izolovaných z črevného obsahu pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792) voči deviatim antimikrobiálnym látkam, ktoré doporučuje EFSA (ampicilín, erytromycín, gentamicín, chloramfenikol, kanamycín, klindamycín, streptomycín, tetracyklín a vankomycín). Profil antibiotickej rezistencie laktobacilov sme získali použitím kvantitatívnej metódy citlivosti (E-test). Testované kmene preukázali citlivosť na všetky antibiotiká, okrem vankomycínu.

### ÚVOD

Laktobacily patria medzi najčastejšie používané produkčné mikroorganizmy pre prípravu probiotík. Kritériom bezpečnosti pre využívanie probiotík v praxi má byť skutočnosť, že probiotické mikroorganizmy by nemali zvyšovať už existujúce riziká antibiotickej rezistencie spojenej s normálnou mikroflórou v čreve alebo v potravinách. Gény rezistencie sú rozširované horizontálne medzi baktériami zo suchozemských zvierat, rýb, ľudí a okrem toho sú prítomné vo vonkajšom prostredí.

### MATERIÁL A METODIKA

V pokuse bolo použitých šesťdesiat kusov pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) vylovených zo sádky rybochovného zariadenia v Diviakoch firmy Rybárstvo Požehy s.r.o. Celkovo v tejto práci bolo použitých šesť baktérií mliečneho kvasenia izolovaných z črevného obsahu rýb, ktoré patrili do rodu *Lactobacillus* a zahŕňali druhy: *L. plantarum* (n = 3), *L. paraplantarum* p (n = 1), *L. fermentum* (n = 1), *L. brevis* (n = 1). Na identifikáciu izolovaných kyslomliečnych baktérií sme použili hmotnostnú spektrometriu s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom (MALDI-TOF MS) (Ultraflex III, Bruker Daltonics).

Na stanovenie antibiotickej citlivosti sme použili E-test (Liofilchem®, Italy). E-test je kvantitatívnou modifikáciou diskovo-difúznej metódy. K testovaniu sme použili nočnú kultúru baktérií, z ktorej sme pripravili suspenzie s turbiditou rovnou 1. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice ( $\approx 5 \times 10^5$  KTJ/ml). Na povrch agaru zloženého z ISO agaru (90 %) + MRS agaru (10 %) sme aplikovali rozterom suspenziu príslušného kmeňa (0,1 ml). Prúžky E-testu sme umiestnili na vysušené platne. K testovaniu sme použili antibiotiká, ktoré doporučuje EFSA (2012) o koncentrácii 0,016-256  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  s výnimkou streptomycínu o koncentrácii 0,064-1024  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Platne boli inkubované anaeróbne pri 37 °C po dobu 48 hodín. Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) boli odčítané priamo z testovacieho prúžku podľa pokynov výrobcu. MIC jednotlivých bakteriálnych kmeňov boli vyhodnotené za rezistentné (R) alebo citlivé (C) na základe mikrobiologických hraničných hodnôt, ktoré definovala FEEDAP (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) (EFSA, 2012). Pokus sme opakovali trikrát. V tabuľke sú zaznamenané priemerné hodnoty MIC jednotlivých antibiotík u testovaných laktobacilov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka: Stanovenie antibiotickej citlivosti laktobacilov E-testom.

	AMPICILÍN			VANKOMYCÍN		
	MIC (mg/L)	MHH (mg/L)	SC	MIC mg/L	MHH (mg/L)	SC
<i>L. paraplantarum</i>	0,094±0,054	4	C	-	NH	R
<i>L. plantarum</i>	0,099±0,045	2	C	-	NH	R
<i>L. fermentum</i>	0,048±0,016	2	C	-	NH	R
<i>L. plantarum</i>	0,058±0,009	2	C	-	NH	R
<i>L. plantarum</i>	0,042±0,009	2	C	-	NH	R
<i>L. brevis</i>	0,094±0,000	2	C	-	NH	R
	GENTAMICÍN			KANAMYCÍN		
	MIC (mg/L)	MHH (mg/L)	SC	MIC mg/L	MHH (mg/L)	SC
<i>L. paraplantarum</i>	1,000±0,000	16	C	40,000±21,166	64	C
<i>L. plantarum</i>	2,333±0,577	16	C	48,000±16,000	64	C
<i>L. fermentum</i>	1,167±0,289	16	C	13,333±4,619	32	C
<i>L. plantarum</i>	1,667±0,764	16	C	24,000±8,000	64	C
<i>L. plantarum</i>	1,667±0,289	16	C	30,667±18,037	64	C
<i>L. brevis</i>	0,627±0,214	16	C	29,333±4,619	32	C
	STREPTOMYCÍN			ERYTROMYCÍN		
	MIC (mg/L)	MHH (mg/L)	SC	MIC mg/L	MHH (mg/L)	SC
<i>L. paraplantarum</i>	21,333±4,619	64	C	0,357±0,156	1	C
<i>L. plantarum</i>	24,000±8,000	NH	-	0,241±0,143	1	C
<i>L. fermentum</i>	10,667±2,309	64	C	0,285±0,165	1	C
<i>L. plantarum</i>	16,000±8,000	NH	-	0,292±0,191	1	C
<i>L. plantarum</i>	53,333±18,475	NH	-	0,531±0,379	1	C
<i>L. brevis</i>	6,000±0,000	64	C	0,299±0,252	1	C
	KLINDAMYCÍN			TETRACYKLÍN		
	MIC (mg/L)	MHH (mg/L)	SC	MIC mg/L	MHH (mg/L)	SC
<i>L. paraplantarum</i>	0,016±0,000	1	C	8,000±0,000	8	C
<i>L. plantarum</i>	0,016±0,000	2	C	10,667±2,309	32	C
<i>L. fermentum</i>	0,032±0,016	1	C	4,667±2,309	8	C
<i>L. plantarum</i>	0,037±0,018	2	C	2,667±1,155	32	C
<i>L. plantarum</i>	0,032±0,000	2	C	1,583±0,722	32	C
<i>L. brevis</i>	0,032±0,000	1	C	1,500±0,000	8	C
CHLORAMFENIKOL						
	MIC (mg/L)	MHH (mg/L)	SC			
<i>L. paraplantarum</i>	2,667±0,577	4	C			
<i>L. plantarum</i>	3,667±0,577	8	C			
<i>L. fermentum</i>	3,333±0,577	4	C			
<i>L. plantarum</i>	2,500±0,866	4	C			
<i>L. plantarum</i>	3,000±0,000	4	C			
<i>L. brevis</i>	1,000±0,433	8	C			

MIC-minimálna inhibičná koncentrácia, MHH-mikrobiologická hraničná hodnota, NH-nevyžadovaná hodnota, SC-stanovenie citlivosti, C-citlivý, R-rezistentný

Výsledky hodnôt MIC citlivosti šiestich kyslomliečnych baktérií voči deviatim antibiotikám sú uvedené v tabuľke. Všetky kmene preukázali nižšie hodnoty MIC, voči testovaným antibiotikám, ako sú mikrobiologické hraničné hodnoty uvedené v usmernení EFSA (2012). Keďže ani jeden kmeň nebol rezistentný voči jednotlivým antibiotikám, podľa EFSA (2012)

nie sú potrebné žiadne ďalšie testy. Avšak všetky kmene boli rezistentné voči vankomycínu, ide o prirodzenú rezistenciu, kvôli čomu EFSA nestanovila MHH pre toto antibiotikum. Aj keď striktne homofermentatívne laktobacily sú citlivé na vankomycín, mnoho kmeňov ako napr. *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. confusus* a *L. leichmannii* sú prirodzene rezistentné voči tomuto antibiotiku vzhľadom na prítomnosť enzýmu D-alanín ligáza (Elisha a Courvalin, 1995). Probiotické kmene rezistentné voči antibiotikám môžu mať aj prínos počas podávania antibiotík v chove rýb a to tým, že sa neporuší prospešná mikroflóra rýb (Kim a Austin, 2008). Avšak je potrebné zabezpečiť, aby sa táto rezistencia neprenášala prostredníctvom mobilných génov rezistencie (Pérez-Sánchez a kol., 2011). Testované izolované kmene preukázali citlivosť na antimikrobiálne látky, ktoré doporučuje EFSA (2012). Z pohľadu bezpečnosti sú vhodnými kandidátmi probiotík pre využitie v akvakultúre. V Európskej únii podliehajú všetky mikroorganizmy pred použitím ako aditívum stanoveniu citlivosti voči antimikrobiálnym látkam (Bories a kol., 2008).

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bories G, Brantom P, Brufau de Barbera J, Chesson A, Cocconcelli PS, Debski B, Dierick N, Franklin A, Gropp J, Halle I, Hogstrand C, De Knecht J, Leng L, Lundebye Haldorsen A-K, Mantovani A, Mezes M, Nebbia C, Rambeck W, Rychen G, Atte von W, Wester P. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. 2008; EFSA Journal. 732:1–15.
- Elisha BG, Courvalin P. Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. 1995; Gene.152 (1): 79–83.
- European food safety authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012; EFSA Journal. 10 (6): 10.
- Kim DH, Austin B. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. 2008; Letters in Applied Microbiology. 47: 141-147.
- Pérez-Sánchez T. et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. 2011, Journal of Fish Diseases. 34: 499–507.

## VARIABILITA ENTEROKOKOV Z OKRUHU *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Hrehová L.<sup>1,2</sup>, Pristaš, P.<sup>1,2</sup>

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

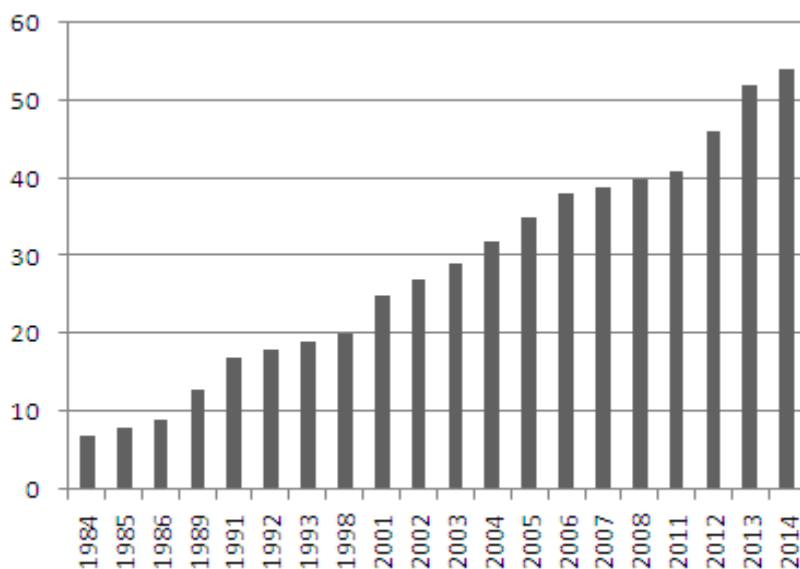
<sup>2</sup> Ústav biologických a ekologických vied, UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

Enterokoky patriace do okruhu *E. faecalis* sú jednými z najčastejšie sa vyskytujúcich enterokokov v tráviacom trakte teplokrvných živočíchov. V minulosti patrili medzi streptokoky, od roku 1984 boli zaradené do rodu *Enterococcus*, ktorý je postupne rozširovaný o nové druhy. Pri analýze enterokokov izolovaných z faeces voľne žijúcich vtákov sa nám podarilo získať viaceré izoláty patriace do tohto okruhu. Izolát LA7, ktorý je na úrovni 16S rRNA sekvencie podobný druhu *E. rotai*, vykazuje však viaceré odlišnosti v biochemickom profile a odlišný od doteraz identifikovaných druhov. Na základe doterajších výsledkov sa môžeme domnievať, že sa jedná o nový druh rodu *Enterococcus*, ktorý si vyžaduje ďalší výskum.

### ÚVOD

Do rodu *Enterococcus* sú zaradené baktérie, ktoré boli v minulosti klasifikované ako črevné streptokoky. Ide o grampozitívne, fakultatívne anaeróbne, guľovité baktérie, usporiadané jednotlivo alebo v kratších reťazkách. Ukázalo sa, že sa od streptokokov líšia mnohými fenotypickými (kultivačné podmienky, pH, koncentrácia solí, teplota a iné) i genetickými vlastnosťami (Štefanovič a Hanzen, 2013). V súčasnosti zahŕňa 54 druhov (<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>) a jeho zastúpenie sa každoročne rozrastá o stále nové druhy (Obr. 1). V rámci rodu *Enterococcus* rozpoznávame viacero skupín (Byappanahalli a kol., 2012). Do skupiny *E. faecalis* sa radí 8 ďalších druhov (*E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. termitis*, *E. caccae*, *E. rotai*, *E. silesiacus*, *E. plantarum*, *E. ureilyticus*, Obr. 2).



Obr.1 Počet platne popísaných druhov enterokokov v jednotlivých rokoch.

### MATERIÁL A METODIKA

Pôvod a spracovanie vzoriek: Faeces z lastovičky domovej (*Hirundo rustica*) sme homogenizovali vo fyziologickom roztoku, alikvótné množstvá vysiali na selektívny agar pre enterokoky (Bile Aesculin Azid Agar) a platne kultivovali 48 hodín pri teplote 37° C. Izoláty sme identifikovali pomocou MALDI- TOF analýzy.

Pre presnejšiu identifikáciu sme použili metódu PCR s detekciou génu 16 S rRNA za použitia primérov fd1 a rP2 (Weisburg a kol., 1991). Ako templát sme použili DNA izolovanú podľa Pospiecha a Neumana (1995). Získaný amplikón sme po prečistení klonovali a odoslali na sekvenčnú analýzu. Na fylogenetické analýzy sekvencií sme použili software MEGA6 (Tamura a kol., 2013).

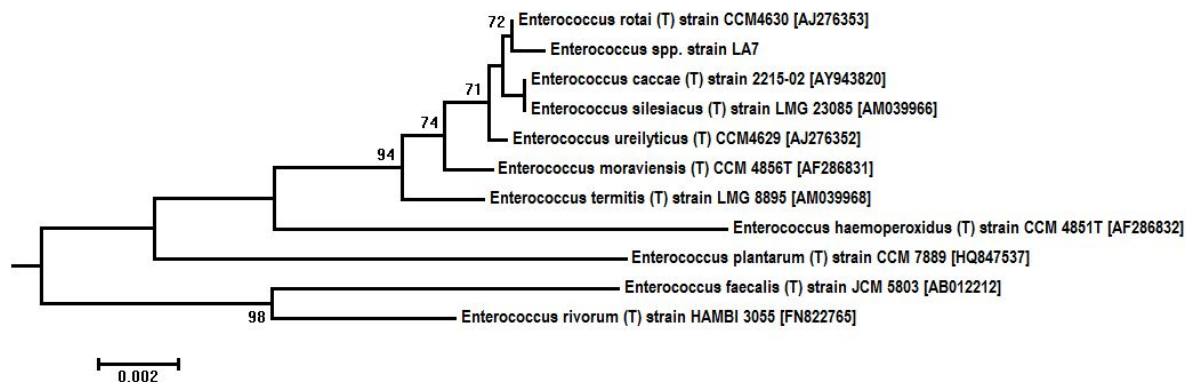
Biochemické vlastnosti izolátu sme testovali pomocou Biolog testu (BIOLOG GEN III MICROPLATE).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z trusu lastovičky domovej sme kultiváciou na BAA agare získali izoláty enterokokov s početnosťou približne  $4,35 \times 10^5$  KTJ na g trusu. Prostredníctvom MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie sme izolát s pracovným názvom LA7 identifikovali ako *E. caccae*. Vzhľadom na nízke skóre (1,917), a teda neistú identifikáciu druhu sme pri ďalšej identifikácii izolátu použili metódu sekvenovania génu pre 16S rRNA. Porovnania sekvencií ukázali, že 16S rRNA sekvencia izolátu LA7 vykazuje významnú podobnosť so 16S rRNA sekvenciami viacerých druhov enterokokov z okruhu *E. faecalis* (99,9% z *E. caccae*, *E. rotai* a *E. silesiacus*, 99,7% z *E. ureilyticus* a 99,1% z *E. moraviensis*).

Sekvenčná analýza pre 16S rRNA však nedokáže dostatočne odlišiť jednotlivé druhy enterokokov, čo potvrdzuje aj Shewmaker a kol. (2011), keď v ich štúdiu *E. silesiacus* a *E. caccae* majú identické 16S rRNA sekvencie. Pre odlišenie ich druhovej príslušnosti bolo nevyhnutné použitie ďalších metód (DNA- DNA hybridizácia, *rpoB* génová sekvencia).

Mnohonásobné porovnanie sekvencií izolátu LA7 so sekvenciami ostatných druhov enterokokov dostupnými v databáze GenBank programom MEGA6 preukázalo, že LA7 izolát je príbuzný s druhom *E. rotai*, izolovaného nedávno z pitnej vody, avšak od typového kmeňa *E. rotai* sa čiastočne líši a tvorí separátnu vetvu vo fylogenetickom strome (Obr. 2).



Obr. 2 Fylogenetický strom zobrazujúci podobnosť 16S rRNA sekvencie LA7 a vybraných druhov rodu *Enterococcus*.

Pozorované rozdiely na úrovni sekvencií pre 16S rRNA naznačujú, že izolát LA7 by mohol byť predstaviteľom nového druhu rodu *Enterococcus*. Túto hypotézu potvrdzuje aj porovnanie vlastností izolátu LA7 s vlastnosťami druhu *E. rotai* (Sedláček a kol., 2013). Pri raste na TSA agare izolát LA7 tvoril biele okrúhle kolónie, pričom neprodukoval žiadny pigment. *E. rotai* vytvára žlté pigmentované kolónie (Sedláček a kol., 2013). Pozorovali sme taktiež rozdiely v utilizácii niektorých cukrov (Tab. 1). Na rozdiel od *E. rotai* izolát LA7 utilizoval D- mannitol, ale nie D- turanózu a D- laktózu. Podobne, na rozdiel od *E. rotai* izolát LA7 utilizoval aminokyseliny L- alanín a L- serín.



Tab. 1 Porovnanie vybraných biochemických ukazovateľov druhu *E. rotai* a izolátu LA7.

	<i>E. rotai</i>	LA7
N- acetyl- $\beta$ - mannosamine	+	-
D- fructose- 6- PO <sub>4</sub>	-	+
L- alanine	-	+
L- serine	-	+
$\alpha$ - keto- glutaric acid	-	+
Tween 40	-	+
Propionic acid	-	+
D- galacturonic acid	-	+
D- mannitol	-	+
$\alpha$ - D- lactose	+	-
D- turanose	+	-
L- glutamic acid	-	+

Všetky doterajšie výsledky nasvedčujú, že izolát LA7 by mohol predstavovať nový druh enterokokov patriacich do okruhu *E. faecalis*. Na rozdiel od ostatných enterokokov, bola väčšina druhov patriacich do tohto okruhu (okrem druhov *E. faecalis* a *E. caccae*) izolovaná z prostredia iných než faeces. Naše výsledky naznačujú, že variabilita enterokokov a počet známych druhov je väčší, než sa predpokladalo. Potvrdenie hypotézy, že izolát LA7 je predstaviteľom nového druhu enterokokov si však vyžaduje ďalší výskum.

*Práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0087/14.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Byappanahalli, M. N. a kol. 2012. Enterococci in environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012; 76: 685- 706.
- List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Enterococcus*. [online]. [17.6.2015] Dostupné na internete: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>
- Pospiech A, Neumann B. Aversatile quick- prep of genomic DNA from Gram- positive bacteria. *Trends Genet.* 1995; 11: 217- 218.
- Sedláček, I. a kol. *Enterococcus ureilyticus* sp. nov. and *Enterococcus rotai* sp. nov., two urease-producing enterococci from the environment. *Int. J. Evol. Microbiol.* 2013; 63: 502- 510.
- Shewmaker, P. L. 2011. Reevaluation of the Taxonomic Status of Recently Described Species of *Enterococcus*: Evidence that *Enterococcus thailandicus* is a Senior Subjective Synonym of “*Enterococcus sanguinicola*”, and Confirmation of *Enterococcus caccae* as a Species Distinct from *Enterococcus silesiacus*. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49: 2676- 2679.
- Štefanovič, J., Hanzen, J. 2013. Lexikón lekárskej bakteriologie. Bratislava: HPL SERVIS, 2013, 259 s., ISBN 978- 80- 971151- 1- 1.
- Tamura a kol., MEGA 6: : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30: 2725- 2729.
- Weisburg W. G. a kol. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 1991; 173: 687- 703.

## **VZŤAH ERYTROPOETÍNOVÉHO RECEPTORA K CITLIVOSTI BUNIEK ADENOKARCINÓMU MLIČNEJ ŽLAZY NA TAMOXIFEN**

Hurtuková L., Szentpeteriová E., Fecková B., Solár P.

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

### **ABSTRAKT**

Hlavnou úlohou erythropoetínu (EPO) a jeho receptora (EPOR) je stimulácia erytropoézy v hematopoetickom tkanive. Expresia EPOR však bola potvrdená aj v niektorých typoch normálnych buniek, ako aj v bunkách rôznych typov nádorov, čo naznačuje, že EPO/EPOR signalizácia sa podieľa na regulácii aj iných procesov v bunke, ako je erytropoéza. Prítomnosť EPOR bola pozorovaná aj v bunkových líniiach ľudského mamárneho adenokarcinómu, taktiež aj u pacientov s rakovinou prsníka, pričom hladina expresie EPOR korelovala s odpoveďou na liečbu tamoxifenom (TAM). V tejto práci sme sa zamerali na testovanie úlohy EPOR v odpovedi na terapiu TAM vo vybraných bunkových líniiach ľudského mamárneho adenokarcinómu (T47D-WT a klon T47D buniek E13 s overexprimovaným EPOR) v prítomnosti alebo neprítomnosti rekombinantného ľudského EPO (rHuEPO). Pomocou MTT testu sme sledovali vplyv TAM na metabolickú aktivitu buniek s rôznou expresiou EPOR. Schopnosť buniek proliferovať po ovplyvnení TAM sme stanovili použitím testu klonogenicity. Úlohu EPO/EPOR v odpovedi buniek na pôsobenie TAM sme sledovali aj analýzou signálnej transdukcie v bunkách. Výsledky poukázali na nižšiu metabolickú aktivitu a nižšiu schopnosť proliferácie u buniek E13 po ovplyvnení TAM v porovnaní s WT líniou buniek. Po ovplyvnení TAM bola u E13 buniek pozorovaná zvýšená fosforylácia ERK1/2 v prítomnosti 100 IU rHuEPO, čo možno považovať za dôkaz funkčnosti EPOR signalizácie.

### **ÚVOD**

Rakovina prsníka je celosvetovo druhý najčastejšie diagnostikovaný typ rakoviny s asi 1 miliónom nových prípadov ročne, u žien tvorí takmer tretinu rakovinových ochorení. V terapii nádorov prsníka sa využíva viacero prístupov, vrátane chirurgickej liečby, chemoterapie, rádioterapie, hormonálnej terapie a kombinácií týchto metód v závislosti od celkového charakteru ochorenia (Knowles a Selby, 2005). Štandardná terapia mamárnych adenokarcinómov pozitívnych na prítomnosť estrogénového receptora (ER+) je založená na podávaní modulátorov aktivity ER alebo inhibítorov biosyntézy estrogénu. Prvou látkou, ktorá sa začala využívať pri liečbe ER+ mamárnych adenokarcinómov, bol tamoxifen (Jensen a Jordan, 2003). TAM pôsobí ako antagonist ER v bunkách rakoviny prsníka, a tak znižuje proliferáciu buniek a rast nádoru. Larsson a kol. (2009) pozorovali, že odpoveď pacientov na TAM koreluje s hladinou expresie EPOR v bunkách ER+ nádorov prsníka. Súvislosť medzi odpoveďou organizmu na liečbu tamoxifenom a expresiou EPOR naznačuje možné prepojenie medzi EPO/EPOR a ER signalizáciou. V tejto práci sme sa preto zamerali na testovanie úlohy EPOR v odpovedi na terapiu tamoxifenom vo vybraných bunkových líniiach ľudského mamárneho adenokarcinómu.

### **MATERIÁL A METODIKA**

*Bunkové línie.* Bunkové línie ľudského mamárneho adenokarcinómu T47D-WT a klon T47D buniek E13 s overexprimovaným EPOR (poskytla Doc. Dr. Nataša Debeljak, Ústav biochémie, Lekárska fakulta Univerzity v Ľubľane, Slovinská republika) boli kultivované v kompletnom médiu RPMI 1640 s prídavkom 10 % FBS v inkubátore v štandardných podmienkach (5% CO<sub>2</sub>, vlhkosť 95 %, 37°C). Pre jednotlivé analýzy boli použité viaceré koncentrácie TAM v prítomnosti rHuEPO (10 IU/ml alebo 100 IU/ml) alebo bez prítomnosti rHuEPO.

*Analýza metabolickej aktivity buniek (MTT test).* Bunky boli po dobu 72 hod inkubované za štandardných podmienok s viacerými koncentráciami TAM, následne k nim bol pridaný MTT a ďalší postup prebiehal podľa všeobecne zaužívaného protokolu. Absorbancia ( $\lambda=585$  nm) rozpusteného formazánu bola meraná pomocou spektrofluoroluminometra FluorStar Optima. Do výslednej analýzy boli vybrané koncentrácie 25 a 50  $\mu$ M TAM.

*Analýza klonogénnej schopnosti (test klonogenicity).* Bunky boli po dobu 72 hod inkubované v prítomnosti TAM (17,5  $\mu$ M) a potom boli v počte 1000 buniek/jamku nasadené na 14 dní do 6-jamkových platní. Po inkubácii boli kolónie buniek ofarbené (metylénová modrá), premyté PBS a po osušení platne naskenované. Počet kolónií bol stanovený voľne dostupným programom Clono-Counter (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770926/>). Výsledky MTT testu a testu klonogenicity boli analyzované pomocou programu GraphPad Prism version 5.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) použitím testu One-way analysis of variance (One-way ANOVA).

*Analýza signálnej transdukcie.* Z buniek kultivovaných 24 hod za štandardných podmienok boli pripravené lyzáty a pomocou Western blot metódy boli za použitia špecifických protilátok sledované hladiny fosforylovaných a nefosforylovaných foriem signálnych proteínov AKT, ERK1/2 a STAT-5 v podmienkach samotného TAM, EPO, aj ich kombinácie. Pre účely kontroly nanášania rovnakého množstva celkových proteínov boli stanovené aj hladiny proteínu  $\beta$ -aktín. Hladiny proteínov boli kvantifikované pomocou voľne dostupného softvéru ImageJ verzie 1.48v (National Institutes of Health, USA).

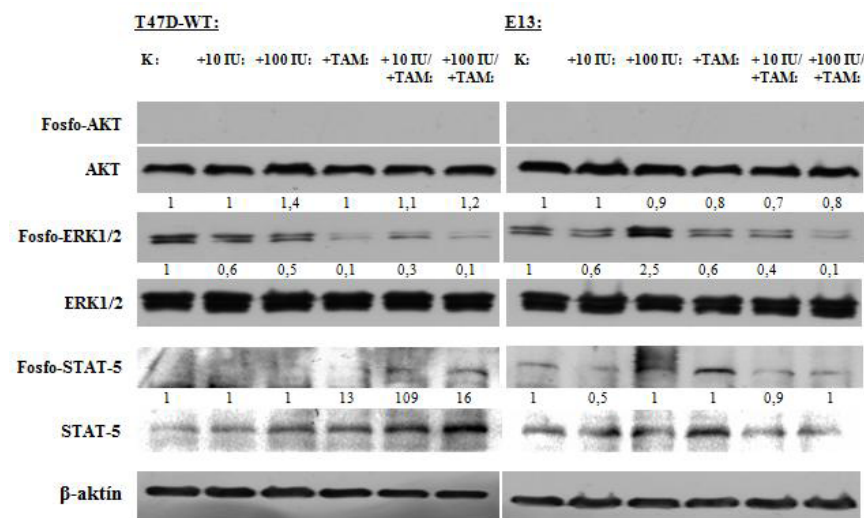
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto štúdie bolo preto sledovanie vzťahu EPOR k citlivosti buniek na terapiu tamoxifénom vo vybraných bunkových líniiach ľudského mamárneho adenokarcinómu. Vychádzajúc zo štúdie Larsson a kol. (2009) sme predpokladali, že vzhľadom na overexpresiu EPOR bude rezistencia klonu E13 v porovnaní s T47D-WT bunkami vyššia. MTT test ani test klonogenicity nepotvrdili vyššiu rezistenciu na TAM v prípade E13 buniek oproti T47D-WT, naopak E13 bunky boli na 50  $\mu$ M TAM citlivejšie ako T47D-WT bunky ( $p<0,01$ ). V prípade oboch bunkových línii sme v prostredí 10 IU rHuEPO pozorovali pokles metabolickej aktivity oproti kontrole bez pridaného rHuEPO, a to ako pri 25  $\mu$ M koncentrácii TAM (WT  $p<0,01$ ; E13  $p>0,05$ ), tak aj 50  $\mu$ M koncentrácii TAM (WT  $p<0,001$ ; E13  $p>0,05$ ). Naopak, v prostredí so 100 IU rHuEPO sa ako T47D-WT, tak aj E13 bunky správali rezistentnejšie (vyššia metabolická aktivita) na TAM ako kontroly bez pridaného rHuEPO (T47D-WT 25  $\mu$ M TAM  $p>0,05$ , 50  $\mu$ M TAM  $p<0,001$ ; E13 25 aj 50  $\mu$ M TAM  $p>0,05$ ).

Prostredníctvom testu klonogenicity sme zisťovali rozdiel v schopnosti buniek proliferovať a vytvárať klony buniek po ovplyvnení TAM na základe ich rôznej expresie EPOR. Pokles počtu klonov po podaní TAM oproti kontrole bol výraznejší v prípade E13 buniek ( $p<0,01$ ) než u WT línie ( $p<0,05$ ). Pridanie rHuEPO spôsobilo výraznejšie zníženie denzity kolónií u oboch bunkových línii, ako účinkom samotného TAM. Test klonogenicity potvrdil zmeny citlivosti E13 a T47D-WT buniek na TAM v prostredí s rHuEPO pozorované testom metabolickej aktivity len v prípade 10 IU rHuEPO, nie však v prípade 100 IU rHuEPO. Rozdielny účinok 100 IU rHuEPO na citlivosť T47D-WT buniek aj E13 klonu na TAM analyzovaný MTT testom a testom klonogenicity môže byť spôsobený rôznosťou týchto metódik, ale bolo by ho potrebné overiť ďalšími analýzami.

Za hlavné signálne dráhy spúšťané cez EPOR sú považované STAT-5, MAPK/ERK a PI3K/AKT signálna dráha, preto sme skúmali aktiváciu týchto dráh po ovplyvnení TAM. Signalizácia prostredníctvom PI3K dráhy, v ktorej je zapojený AKT proteín, nebola formou fosfo-AKT signálnej molekuly za nami testovaných podmienok detekovaná. Dôkazom funkčnosti signalizácie EPOR bola zvýšená fosforylácia ERK1/2 proteínu po podaní 100 IU rHuEPO v EPOR overexprimovaných E13 bunkách, ktorá klesla, ak bol k bunkám pridaný

TAM. V bunkách T47D-WT nebola síce po podaní rHuEPO zvýšená fosforylácia ERK1/2 proteínu pozorovaná, no v čase 24 hod, kedy sme signál analyzovali, mohol už fosforylovaný signál ERK1/2 odznieť, čoho dôkazom je mierny pokles fosforylácie ERK1/2 proteínu. K podobným záverom, čo sa týka dynamiky fosforylácie ERK1/2 proteínu vo vzťahu k EPOR signalizácii, dospeli Solár a kol. (2012) v prípade ovariálnych adenokarcinómových buniek A2780. Nevysvetleným pre nás však zostáva výsledok zvýšenej fosforylácie STAT-5 proteínu po TAM terapii T47D-WT buniek, ešte zosilnený pridaním rHuEPO. Pre objasnenie tohto javu by možno bolo vhodné doplniť v ďalších experimentoch aj detekciu iných signálnych dráh asociovaných s EPOR, ako je napr. JAK-2 proteín a jeho fosforylovaná forma. Pochopenie korelácie medzi EPOR a pôsobením TAM by tak mohlo napomôcť zvýšeniu účinnosti terapie TAM prsných adenokarcinómov.



**Obzr.:** Western blot analýza fosfo-AKT, AKT, fosfo-ERK1/2, ERK1/2, fosfo-STAT-5 a STAT-5 proteínov v lyzátoch buniek T47D-WT a E13 po 24 hod inkubácii s 17,5  $\mu$ M TAM a/alebo 10 (+10 IU) resp. 100 IU EPO (+100 IU). Hladiny proteínov boli kvantifikované pomocou voľne dostupného softvéru ImageJ verzie 1.48v a vyjadrené ako pomer denzity testovaných proteínov voči  $\beta$ -aktínu. Fosforylované formy proteínov boli vyjadrené ako pomer denzity proteínových pásov voči ich nefosforylovaným formám, pričom sami boli vyjadrené voči  $\beta$ -aktínu.

*Táto práca bola podporená Vedeckou Grantovou Agentúrou Ministerstva Školstva SR prostredníctvom grantu č. VEGA1/0394/15, Vnútorým vedeckým grantovým systémom PF UPJŠ č. VVGS-PF-2014-190 a Vnútorým vedeckým grantovým systémom UPJŠ č. VVGS-2014-449.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Elliott S, Sinclair AM. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. 2012; *Biologics: Targets & Therapy*. 6, 163.
- Jensen EV, Jordan VC. The estrogen receptor a model for molecular medicine. *Clinical Cancer Research*. 2009; 9(6), 1980-1989.
- Knowles MA, Selby PJ. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. Fourth edition. New York: Oxford University Press. 2005; 533 s. ISBN 0-19-856853-3.
- Larsson A M, Jirstrom K, Fredlund E, Nilsson S, Rydén L, Landberg G. Erythropoietin receptor expression and correlation to tamoxifen response and prognosis in breast cancer. 2009; *Clin. Cancer Res*. 15(17), 5552-5559.
- Solár P, Hřčková G, Varinská L, Solárová Z, Kriška J, Uhrínová I, Kello M, Mojžiš J, Fedoročko P, Sytkowski AJ. Location and the functionality of erythropoietin receptor(s) in A2780 cells. 2012; *Oncol. Rep*. 28(1), 141-146.

## VPLYV MATERSKÉHO STRESU NA PREIMPLANTAČNÝ VÝVIN – MODULÁCIA METABOLICKÝM STAVOM MATERSKÉHO ORGANIZMU

Janštová Ž.

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

### ABSTRAKT

Materský stres a materská obezita sú negatívne faktory, ktoré môžu významne ovplyvniť celý reprodukčný cyklus, vrátane preimplantačného vývinu. U obéznych ľudí dochádza k nárastu tukového tkaniva a tým pádom sa zvyšuje aj sekrécia hormónov tohto tkaniva. Hormóny tukového tkaniva inhibujú ovariálnu aktivitu a spôsobujú rôzne poruchy neplodnosti. Súčasťou stresovej odpovede organizmu je nárast koncentrácie glukokortikoidov a katecholamínov, ktoré tiež môžu negatívne ovplyvňovať reprodukčné funkcie organizmu. V našej práci sme skúmali možné interakcie medzi zmenami vyvolanými pôsobením stresu a zmenami vyvolanými množstvom telesného tuku matky, pričom sme sa zamerali na sledovanie kvality preimplantačných embryí. Naše výsledky ukázali rozdielne hladiny relevantných hormónov u matiek v rôznej telesnej kondícii, pričom sme zistili, že vplyv stresu na preimplantačné embryá významne závisí od fyziologického stavu materského organizmu na ktorý stres pôsobí.

### ÚVOD

Mechanizmy ktorými môže stres poškodzovať reprodukčný systém a vývin embrya, nie sú celkom známe. Poruchy fertility sú vo vyspelých krajinách čoraz viac rozšírené, a to nie iba u ľudí ale aj medzi hospodárskymi zvieratami. Stres, ako negatívny faktor môže narúšať hormonálny systém v hypotalame, hypofýze a vo vaječníkoch, čoho dôsledkom je nižšia reprodukčná schopnosť (Lazinski a kol., 2008, von Borell a kol., 2007). Hlavným stresovým glukokortikoidovým hormónom u ľudí je kortizol (kortikosterón u myši a potkanov) (Javorka a kol., 2009). Je produkovaný kôrou nadobličiek a v stresovej situácii účinkuje na jednej strane ako mediátor a na druhej strane ako inhibítor, čím blokuje nadmernú aktiváciu stresovej reakcie (Orth a Kovacs, 1998). U myši bolo pozorované, že počet buniek v blastocystách je výrazne nižší u samičiek, ktorým bol podaný kortizol počas maturácie oocytov (Zhang a kol. 2011). Receptory kortizolu sa hojne vyskytujú v endometriu, myometriu a vo vaječníkoch, čo poukazuje na mechanizmus ako môže stres narúšať reprodukčný cyklus a ovplyvniť vývin potomstva už v preimplantačnom štádiu (Chrousos, 1998). Ďalšími významnými mediátormi uplatňujúcimi sa v stresovej odpovedi sú katecholamíny, najmä adrenalín, pričom adrenergné receptory boli detegované už u preimplantačných embryí (Čikoš a kol., 2005, 2007, 2010).

Principiálnou funkciou tukového tkaniva je uskladňovanie nadbytku energie, ale okrem toho je aj endokrinný orgán, ktorý je zdrojom mnohých bioaktívnych látok – adipokínov. V súčasnosti je známych vyše 50 adipokínov (Maeda a kol., 1997), ktoré ovplyvňujú široké spektrum fyziologických funkcií ako napr. energetickú bilanciu, metabolizmus lipidov, krvný tlak, angiogénu, hemostázu, reprodukciu, zápalové procesy a inzulínovú senzitivitu (Schäffler a kol., 2006; 2007; Svačina a kol., 2010; Mitchell a kol., 2005). Najznámejšie adipokíny sú leptín a adiponektín.

### MATERIÁL A METÓDY

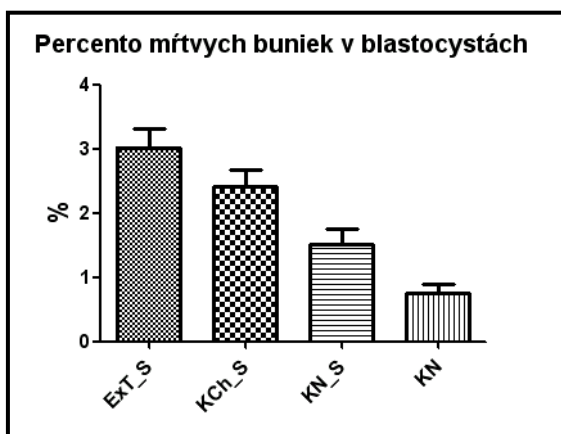
Dospelé samice myši kmeňa ICR (Velaz, Praha, Česká republika) vo veku 30-35 dní, odchované pri štandardných podmienkach (teplota 22±2 °C, vlhkosť 65±5 %, 12-hodinový svetelný cyklus, svetelná fáza 5:00 – 17:00, voľný prístup k potrave a vode) sme hormonálne stimulovali sérovým gonadotropínom (eCG 5 IU ip., Folligon, Intervet International, Boxmeer, Holandsko). O 47 hodín neskôr sme im podali hormón ľudského choriového

gonadotropínu (hCG 4 IU ip., Pregnyl, Organon, Oss, Holandsko) a následne ich pripustili k samcom rovnakého kmeňa. Oplodnené samice sme rozdelili do dvoch skupín – kontrola a experiment. Počas gravidity (21 dní) a laktácie (21 dní) kontrolnej skupine sme podávali štandardnú laboratórnu diétu (M1, Ricmanice, Česká republika; 3,2 kcal/g; 26,3% proteínov, 9,5% tuky, 64,2% karbohydrátov, 3,8% celulóza, hemicelulóza). Experimentálnej skupine sme podávali štandardnú laboratórnu diétu M1 a pridávali vysoko - energetický výživný doplnok Ensure Plus (tekutý nápoj, 1,5 kcal/g; 15% proteínov, 28% tuky, 57% karbohydrátov). Experimentálne (n=49) aj kontrolné (n=46) 35 dňové samice F1 generácie sme individuálne odvážili a zmerali im telesný tuk pomocou EchoMRI (Whole Body Composition Analyser, Echo Medical System, Houston, Texas). Podľa percenta telesného tuku, samice sme rozdelili do štyroch skupín: KN - s fyziologickým množstvom telesného tuku (7-8%), ExN – mierne zvýšeným množstvom telesného tuku (8-11%), ExT -s vysokým obsahom telesného tuku (> 11%) a KCh - s výrazne zníženým množstvom telesného tuku (< 7%). Myši sme ďalej rozdelili na stresované skupiny (ExT\_S, ExN\_S, KN\_S, KCh\_S) a na jednu nestresovanú kontrolnú skupinu (KN). Imobilizačný stres sme aplikovali trikrát denne (8:00, 12:00, 16:00) po 30 minút počas svetlej fázy dňa. Stres sme aplikovali po dobu štyroch dní od D1-D4 gravidity (preimplantačné obdobie). Embryá sme izolovali z vajíčkovodov a materníc stresovaných aj nestresovaných matiek na D4 (96h po hCG). Izoláty podľa morfológie sme rozdelili do troch skupín: 1. Degeneráty, oocyty a embryá s nízkym počtom buniek (2-16), 2. moruly (17-34), 3. blastocysty (35 a viac). Blastocysty sme fluorescenčne farbili (Hoechst 33342, TUNEL assay) a zistili počet buniek, prítomnosť bunkovej smrti a mieru apoptózy. Štatistický rozdiel medzi jednotlivými skupinami sme hodnotili pomocou ANOVA a Tukey post-hoc testu. Počas usmrtenia sme odoberali krv zvieratá, z ktorého boli stanovené hladiny kortikosterónu a iných látok významných počas obezity. Hladiny vybraných hormónov v krvnom sére sme stanovili pomocou komerčne dostupných ELISA kitov podľa pokynov výrobcu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Matkám kŕmeným diétou s prídavkom vysoko-energetického prípravku Ensure Plus sa výrazne zvýšila telesná hmotnosť a percento telesného tuku na rozdiel od kontrolnej skupiny, v ktorej boli gravidné samice kŕmené iba štandardnou laboratórnou diétou. Výsledkom tejto diéty je produkcia potomstva s vysokou predispozíciou pre vývin obezity v čase pohlavnej dospelosti.

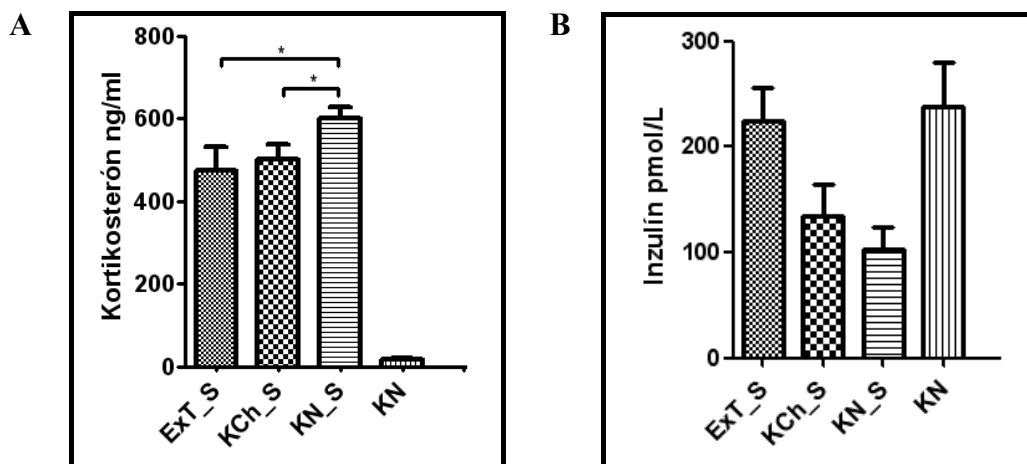
Väčšina preimplantačných embryí bolo izolovaných z maternice, menej ako 7% sa nachádzalo vo vajcovode. V počte izolovaných embryí na matku medzi stresovanou a nestresovanou skupinou myši sme nenašli žiadny signifikantný rozdiel. Z izolovaných embryí viac ako 60% dosiahlo štádium blastocysty. V stresovaných skupinách s vyšším a nižším podielom telesného tuku (ExT\_S, ExN\_S a KCh\_S) sa mierne zvýšil počet degenerátov a embryí s nižším počtom buniek. Po fluorescenčnom farbení sme nezistili žiadny signifikantný rozdiel v počte buniek v blastocystách medzi stresovanou a nestresovanou skupinou. Zaznamenali sme štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými skupinami v podiele blastocýst obsahujúce mŕtve bunky. U myši s normálnym fyziologickým množstvom telesného tuku (KN) 36% blastocýst neobsahovalo ani jednu mŕtvu bunku. Tento podiel u stresovaných myši s normálnym fyziologickým množstvom telesného tuku (KN\_S) je mierne zvýšený (46%). Z tohto vyplýva, že materský stres nemá významný vplyv na podiel mŕtvych buniek v blastocystách u matiek s normálnym množstvom telesného tuku (KN, KN\_S). Avšak u matiek s vyšším alebo nižším podielom telesného tuku (ExT\_S, KCh\_S;  $P < 0,001$ ) stres výrazne vyvolal nárast mŕtvych buniek v blastocystách. Porovnanie podielu mŕtvych a apoptotických buniek v blastocystách ukázalo takmer identické hodnoty, čo poukazuje na fakt, že bunky hynuli takmer výlučne mechanizmom apoptózy.



**Obr. 1** Percento mŕtvych buniek v blastocystách izolovaných zo stresovaných matiek s rôznym množstvom telesného tuku

Pre určenie metabolického a nutričného stavu matiek sme okrem stanovenia telesného tuku merali aj koncentráciu vybraných hormónov a glukózy v krvi. Hladina kortikosterónu bola signifikantne vyššia u všetkých stresovaných skupín myši. Avšak u stresovaných myši s vyšším alebo nižším podielom telesného tuku (ExT\_S, KCh\_S) hladina kortikosterónu je signifikantne nižšia ako u myši s normálnym množstvom telesného tuku (KN\_S). U stresovaných matiek je koncentrácia inzulínu nižšia ako u kontrolnej skupiny myši. U stresovaných matiek s vysokým obsahom telesného tuku (ExT\_S) je koncentrácia inzulínu a glukózy výrazne vyššia ako u ostatných stresovaných skupín, čo poukazuje na zvýšené riziko vzniku inzulínovej rezistencie pôsobením stresu (Li a kol., 2013). Naše výsledky ukázali, že vplyv stresu na preimplantačné embryá závisí aj od fyziologického stavu materského organizmu na ktorý stres pôsobí.

**Obr. 2** Koncentrácia vybraných hormónov u myši s rôznym metabolickým statusom



A: Koncentrácia kortikosterónu u stresovaných a nestresovaných myši s rôznym metabolickým stavom. B: Koncentrácia inzulínu u stresovaných a nestresovaných myši s rôznym metabolickým stavom.

Práca bola podporená grantami APVV-0815-11 a VEGA 2/0039/15.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Čikoš Š, Veselá J, Il'ková G a kol. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71: 145-153.
- Čikoš Š, Reháč P, Czikková, S a kol. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction.* 2007; 133: 1139-1147.
- Čikoš Š, Burkuš J, Bukovská A. a kol. Expression of adiponectin receptors and effect of adiponectin isoforms in mouse preimplantation embryo. *Human Reproduction.* 2010; 25: 2247-2255.
- Chrousos G. P. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. In: Csermely P. editor. *Stress of life: from molecules to man.* Ann NY Acad Sci. New York: NYAS. 1998; 851: 311 – 35.

- Javorka K. a kol. *Lekárska fyziológia*. Martin: Osveta, 2009. 408 s. ISBN 80-8063-023-2.
- Lazinski M. J, Shea A. K, Steiner M. Effects of maternal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health*. 2008; 11: 363-375.
- Li L. a kol. Acute Psychological Stress Results in the Rapid Development of Insulin Resistance. *J Endocrinol*. 2013; 217: 175–184.
- Maeda K. a kol. Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*. 1997; 190: 227-235.
- Orth D. N, Kovacs W. J. The adrenal cortex. In: Wilson J. D, Foster D. W, Kronenberg H. M. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 1998; 517-664.
- Schaffler A. a kol. Role of adipose tissue as an inflammatory organ in human diseases. *Endocrinology Review*. 2006; 27: 449-467.
- Schaffler A. a kol. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, V1q/TNFs and CTRPs. *Immunology*. 2007; 28: 393-399.
- Von Borell E, Dobson H, Prunier A. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Hormones and Behavior*. 2007; 52: 130-138.
- Zhang, S. Y. a kol. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. *Biol Reprod*. 2011; 84: 672-681.



## VPLYV LEPTÍNU NA VÝVIN PREIMPLANTAČNÉHO EMBRYA MYŠI *IN VITRO* V ZÁVISLOSTI OD KONDIČNÉHO STAVU MATKY

Kačmarová M.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Leptín je pleiotropný polypeptid regulujúci energetický metabolizmus a rozličné fyziologické procesy. Má priamy vplyv na reprodukčný stav ženy a prostredníctvom receptorov vplýva aj na intrauterinný vývin jedinca. Dvojgeneračný zvierací model, ktorý bol v minulosti štandardizovaný na našom pracovisku, predstavuje vhodný prostriedok pre experimentálnu simuláciu obezity a štúdium jej priameho vplyvu na vývinové schopnosti a kvalitu preimplantačných embryí. V aktuálnych experimentoch sme sledovali vývinové schopnosti a kvalitu embryí kultivovaných *in vitro* od 2-bunkového štádia do štádia blastocysty, ktoré pochádzali z matiek s rozličným kondičným stavom: CN – normálne kontrolné samice s fyziologickým množstvom telesného tuku (7-8%) a EXF – obézne experimentálne samice s vysokým obsahom telesného tuku (>11%). Zároveň sme v oboch skupinách zisťovali vplyv prídavku leptínu (0 ng/ml, 10 ng/ml) na sledované parametre. Zistil sme, že pôvod embryí nemal vplyv na kvalitu získaných blastocýst. Po pridaní leptínu k embryám z CN matiek sme zaznamenali zhoršenie ich vývinových schopností, naopak v skupine embryí z EXF matiek mal leptín pozitívny vplyv na ich vývin. Nezaznamenali sme vplyv leptínu na priemerný počet buniek na blastocystu ani na priemerný počet mŕtvych buniek na blastocystu v skupine embryí pochádzajúcich z CN samíc. V skupine embryí pochádzajúcich z EXF matiek mal prídavok leptínu do kultivačného média tendenciu znižovať množstvo mŕtvych buniek na blastocystu. Naše výsledky potvrdili, že vplyv leptínu na preimplantačné embryá závisí od množstva telesného tuku a metabolického stavu matiek, z ktorých pochádzali.

### ÚVOD

Objav leptínu predstavoval dôležitý krok k pochopeniu príčin vzniku a liečby obezity, ktorá má v súčasnosti stúpajúci trend. Zmeny metabolizmu v tukovom tkanive pri obezite sú často sprevádzané s rozvojom ďalších ochorení ako sú *diabetes mellitus* II. typu, hypertenzia a hyperlipidémia (Zhang a kol., 1994; Purcell a Moley, 2011). Ženy v reprodukčnom veku, ktorých BMI (body mass index) je  $\geq 30$  trpia infertilitou, poruchami menštruačného cyklu, syndrómom polycystických ovárií, zvýšeným rizikom spontánnych potratov, preeklampsie, vzniku cukrovky počas tehotenstva a zníženou schopnosťou vynosiť plod v dôsledku vzniku vrodených vád (Swain a kol., 2004; Purcell a Moley, 2011). Tento 16-kDa polypeptidový hormón je produktom *obese (ob)* génu a jeho produkcia adipocytmi ho predurčuje k regulácii sýtosti a energetickej homeostázy. Okrem toho sa vyskytuje aj v rozličných periférnych tkanivách, kde sa zúčastňuje na zápalových procesoch, imunoreakciách, hematopoéze, angiogenéze a termogenéze (Efstratiadis a kol., 2007). Henson a kol. (2006) uviedli, že koncentrácia leptínu sa cirkadiálne mení a vyššie hodnoty nachádzame u žien, plodov ženského pohlavia a u žien pred menopauzou. Zvýšené koncentrácie súvisia s nástupom puberty a na začiatku luetálnej fázy menštruačného cyklu sú naopak najnižšie, korelujúce s hladinami progesterónu (Barb a Kraeling, 2004). Leptínový receptor je produkt *diabetes (db)* génu, patrí do rodiny cytokínových receptrov a vyskytuje sa v 6 izoformách (Barb a Kraeling, 2004). U myši a potkanov sa nachádza špecifická izoforma cirkulujúceho Ob-Re, ktorý je vo veľkých množstvách exprimovaný v placente, indukuje leptínovú rezistenciu matky počas gravidity a je schopný transplacentárneho prestupu, čím reguluje vývin plodu (Henson a kol., 2006).

Preimplantačný a intrauterinný vývin embrya predstavuje kritické obdobie, počas ktorého zdravotný stav matky a výživa môže mať dlhodobý vplyv na nasledujúce potomstvo (Purcell

a Moley, 2011). Cieľom našej štúdie bolo otestovať vplyv leptínu na vývin preimplantačného embrya myši *in vitro* v závislosti od kondičného stavu matky, pričom sme využili štandardizovaný dvojgeneračný model odchovu zvierat s nadváhou a zvýšeným objemom telesného tuku (Kubandová a kol., 2014; Fabian a kol., 2015).

## MATERIÁL A METÓDY

Samice kmeňa ICR (CD-1<sup>®</sup> IGS, Velaz, Praha, ČR) vo veku 4-6 týždňov sme hormonálne synchronizovali eCG (equine chorionic gonadotropin) a hCG (human chorionic gonadotropin) a pripustili k samcom rovnakého kmeňa cez noc. Nasledujúce ráno o 8:00 sme skontrolovali vaginálne zátky (plug+). Plug+ samice sme náhodne rozdelili do 2 skupín – kontrolnej a experimentálnej (P generácia). Matky z oboch skupín boli umiestnené v klimatizovanej miestnosti a boli kŕmene štandardnou peletovou diétou M1 (Řicmanice, Česká republika) *ad libitum*. Samiciam v experimentálnej skupine bol navyše podávaný vysokoenergetický prípravok Ensure Plus po dobu 42 dní – 21 dní gravidity + 21 dní od začiatku laktácie po odstav. Po odstave mláďat v oboch skupinách (F1 generácia) na 21. deň sme ich naďalej kŕmili štandardnou peletovou diétou. Na 34. deň sme samiciam F1 generácie zmerali telesnú hmotnosť a tuk rozdelili ich do 4 skupín: (CN) normálne kontrolné myši s fyziologickou váhou a fyziologickým obsahom telesného tuku (7-8%), (CL) chudé kontrolné myši so zníženou váhou a zníženým obsahom tuku (<7%), (EXN) normálne experimentálne myši s fyziologickou váhou a so zvýšeným obsahom telesného tuku (8-11%) a (EXF) obézne experimentálne samice s nadváhou a vysokým obsahom telesného tuku (>11%). V reprodukčnom experimente sme použili spontánne ovulujúce CN a EXF samice, ktoré sme na 35. deň od ich narodenia pripustili k samcom. Plug+ samíc bola vyšetovaná počas nasledujúcich 5 dní. Na druhý deň po identifikácii vaginálnej zátky (D2 gravidity CN a EXF samíc F1 generácie), sme zvieratá usmrtili cervikálnou dislokáciou a vyizolovali z nich embryá v 2-bunkovom štádiu vývinu.

Embryá sme izolovali prepláchnutím vajíčkovodu pomocou FHM (flushing and holding medium) obsahujúcim 1% BSA (bovine serum albumin) (Lawits a Biggers, 1993). Následne sme ich 3-krát prepláchli v médiu obsahujúcom 1% BSA, v ktorom mali byť kultivované, t.z. KSOMaa Evolve<sup>®</sup> (Zenith Biotech, Kanada) alebo v KSOMaa s leptínom (10ng/ml). Kultivovali sme ich *in vitro* v štandardných podmienkach (5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 20-25 embryí/ 30μl kultivačného média). Na 5. deň kultivácie sme pomocou stereomikroskopického vyšetrenia (Nikon SMZ 745T; Nikon, Tokyo, Japan) určili jednotlivé vývinové štádiá – degeneráty, 2-bunkové embryá, 4-16-bunkové embryá, moruly a blastocysty – ktoré embryá dosiahli. Blastocysty sme fixovali v 4% paraformaldehyde. Na určenie množstva mŕtvych buniek v blastocystách sme použili fluorescenčné farbenie TUNEL assay doplnené kontrastným farbením Hoechst 33342, umožňujúcim detekovať počet a morfológiu jadier v blastocystách (Burkuš a kol., 2013). Zafarbené embryá sme pozorovali pomocou fluorescenčného mikroskopu (BX50 Olympus, Japan) pri 400-násobnom zväčšení.

Na štatistické vyhodnotenie výsledkov sme zvolili GraphPad Prism software. Na zistenie rozdielov vývinových schopností medzi EXF a CN skupinou, kultivovaných v médiu s a bez prídavku leptínu sme použili štandardný  $\chi^2$  test. Analýzu ANOVA nasledovanú Tukey testom sme použili na porovnanie priemerného počtu buniek blastocýst v jednotlivých skupinách. Na analýzu rozdielov v množstve mŕtvych buniek v blastocystách medzi jednotlivými skupinami sme zvolili Kruskal-Wallisov test nasledovaný Dunnovým testom. Rozdiel P<0,05 sme považovali za štatisticky významný.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stereomikroskopickým hodnotením embryí kultivovaných v médiu v s prídavkom leptínu sme na D5 zaznamenali nasledujúce rozdiely v distribúcií jednotlivých vývinových štádií embryí:

v skupine embryí pochádzajúcich z kontrolných matiek s normálnym fyziologickým obsahom telesného tuku (CN) sme zaznamenali znížený podiel embryí v štádiu moruly a blastocysty a zvýšený podiel degenerátov v skupine kultivovanej v médiu obsahujúcom leptín – okolo 67% v porovnaní so skupinou kultivovanou v médiu, ktoré leptín neobsahovalo – okolo 91% ( $P < 0,001$ ). K odlišnému výsledku sme prišli v skupine kultivovaných embryí pochádzajúcich z experimentálnych matiek s vysokým obsahom telesného tuku (EXF). Zatiaľ čo v prípade kultivačného média, ktoré neobsahovalo prídavok leptínu dosahovala úspešnosť embryí vyvinúť sa z 2-bunkového štádia do štádia moruly alebo blastocysty okolo 93%, v prípade embryí kultivovaných v médiu s leptínom sme štádium moruly a blastocysty zaznamenali v približne 82% prípadoch ( $P < 0,05$ ).

Pomocou fluorescenčnej mikroskopie sme sledovali rozdiely v priemernom počte buniek na blastocystu v jednotlivých skupinách embryí. Nezaznamenali sme významné rozdiely medzi experimentálnou skupinou a kontrolnou skupinou, ani medzi skupinami kultivovanými za alebo bez prídavku leptínu. Taktiež sme nezaznamenali vplyv leptínu v kultivačnom médiu na počet mŕtvych buniek na blastocystu v skupine embryí pochádzajúcich z CN samíc. V skupine embryí pochádzajúcich z EXF matiek mal prídavok leptínu do kultivačného média tendenciu znižovať množstvo mŕtvych buniek na blastocystu ( $P < 0,05$  pri porovnaní s CN skupinou kultivovanou bez prídavku leptínu).

Schopnosť leptínu ovplyvňovať preimplantačné embryá dokumentovali aj Herrid a kol. (2006), ktorí sledovali vplyv rozličných koncentrácií leptínu na distribúciu vývinových štádií embryí myši kultivovaných z 2-bunkových embryí. Nízka koncentrácia leptínu v kultivačnom médiu (10 ng/ml) významne zvýšila percentuálne zastúpenie v prospech blastocýst a hatchovaných blastocýst v porovnaní s vysokou koncentráciou (100 ng/ml) a s kontrolnou skupinou (0 ng/ml). Protichodné výsledky priniesli Fedorcsák a Storengová (2003), podľa ktorých leptín s koncentráciou v rozmedzí fyziologických hodnôt u myši (1,6 – 160 ng/ml) inhibuje embryonálny vývin. Swain a kol. (2004) dokonca nezaznamenali žiadny vplyv leptínu v rozličných koncentráciách (0, 12,5, 25, 50, 100 ng/ml) na vývinovú schopnosť embryí myši. Herrid a kol. (2006) ďalej zaznamenali, že prídavok leptínu (10 ng/ml) zvýšil množstvo buniek v blastocystách. Fedorcsák a Storengová (2003) zasa zaznamenali zvýšenie množstva apoptických buniek v skupinách kultivovaných s prídavkom leptínu v porovnaní s kultiváciou bez leptínu. Rozporuplné výsledky uvedených štúdií sú pravdepodobne dôsledkom toho, že v jednotlivých štúdiách boli použité rozdielne kmene zvierat, rozličné podmienky kultivácie (kultivačné média bez/s aminokyselinami), rozličné vývinové štádiá embryí, na ktoré leptín pôsobil, ako aj druhy exogénneho leptínu, ktorý bol použitý.

Predchádzajúce štúdie dokázali, že vplyv leptínu závisí od zvolenej koncentrácie a od vývinového štádia embryí, na ktoré má pôsobiť. Naše výsledky potvrdili, že vplyv leptínu na vývin embryí závisí tiež od množstva telesného tuku a metabolického profilu matiek, z ktorých pochádzali. V prípade embryí z CN matiek sme zaznamenali zhoršenie vývinových schopností, naopak v skupine embryí z EXF matiek mal leptín pozitívny vplyv na ich vývin a kvalitu.

*Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0001/14 a APVV-0815-11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barb C.R., Kreaming R.R. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82-83:155-67.
- Burkuš J., Cikoš S., Fabian D., Kubandová J., Czikková S., Koppel J. Maternal restraint stress negatively influences growth capacity of preimplantation mouse embryos. *Gen Physiol Biophys.* 2013; 1: 129-137.
- Efstratiadis G, Nikolaidou C, Vergoulas. Leptin as a cardiovascular risk factor. *Hippokratia.* 2007; 11(4): 163–170.

- Fabian D., Kubandová J., Čikoš Š., Burkuš J., Fabianová K., Račková E., Czikková S., Koppel J. The effect of maternal body condition on in vivo production of zygotes and behavior of delivered offspring in mice. *Theriogenology*. 2015; 83: 577-589
- Fedorcsák P, Storeng R. Effects of leptin and leukemia inhibitory factor on preimplantation development and STAT3 signaling of mouse embryos *in vitro*. *Biol Reprod*. 2003; 69:1531–1538.
- Henson M.C., Castracane V.D. Leptin in pregnancy: An update. *Biol Reprod*. 2006; 74: 218-229
- Herrid M, Nguyen V.L, Hinch G, McFarlane J. R. Leptin has concentration and stage dependent effects on embryonic development *in vitro*. *Reproduction*. 2006; 132: 247–256
- Kubandová J, Fabian D, Burkuš J, Čikoš Š, Czikková S, Možeš Š. Two-Generation Diet-Induced Obesity Model Producing Mice With Increased Amount of Body Fat in Early Adulthood. *Physiol. Res*. 2014; 63: 103-113
- Lawitts J.A, Biggers J.D, Culture of preimplantation embryos. Guide to Techniques in Mouse Development. *Methods Enzymol*. 1993; 225: 153-164
- Pan W, Kastin A. J. Leptin: A biomarker for sleep disorders? *Sleep Med Rev*. 2014; 18: 283-289
- Peréz-Peréz A., Sánchez-Jiménez F., Maymó J., Dueñas J.L., Varone C., Schnez-Margalet V. Role of leptin in female reproduction. *Clin Chem Lab Med*. 2013; 53:15-28
- Purcell S. H., Moley. The impact of obesity on egg quality. *J Assist Reprod Genet*. 2011; 28: 517–524
- Swain J.E., Dunn R.L., McConnell D., Gonzalez-Martinez J, Smith G. D. Direct Effects of Leptin on Mouse Reproductive Function: Regulation of Follicular, Oocyte, and Embryo Development. *Biology of reproduction*. 2004; 71: 1446-1452
- Zhang Y., Proenca R., Maffel M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372: 425–432.

## ÚLOHA AURORA A KINÁZY V PRIEBEHU ZAHÁJENIA PRVEJ MITÓZY PO OPLODNENÍ

Kovaříková V.<sup>1</sup>, Burkuš J.<sup>1</sup>, Reháč P.<sup>1</sup>, Brzákova A.<sup>2</sup>, Šolc P.<sup>2</sup>, Baran V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice, <sup>2</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov

### ABSTRAKT

Aurora-A kináza (AURKA) - člen rodiny serín/treonín kináz je zapojená vo viacerých fázach mitózy. Reguluje maturáciu centrozómov, tvorbu deliaceho vretienka a cytokinézu. V in vitro experimentoch na ranných embryách kde bola AURKA exogénne inaktivovaná inhibítorom MLN8237 sa dokumentovalo postupné zastavenie proliferlačnej aktivity blastomér. V AURKA inhibovaných jednobunkových embryách bola tvorba vretienka a začiatok anafázy oneskorená a segregácia chromozómov defektná. Inhibícia AURKA indukovala apoptózu. AURKA sa takto ukazuje ako nevyhnutná pre korektnú segregáciu chromozómov v prvej mitóze a jej aktivita je dôležitá aj pre neskorší vývin preimplantačného embrya.

### ÚVOD

Rodina Aurora kináz je vysoko konzervovaná skupina onkogénnych serín/treonínových proteínkináz, ktoré majú dôležité regulačné úlohy v priebehu mitózy. V somatických bunkách je AURKA kľúčovou proteínkinázou, ktorej aktivita je spojená s maturáciou centrozómov (De Luca a kol., 2006), tvorbou bipolárneho vretienka (Kufer a kol., 2002) a cytokinézu (Marumoto a kol., 2003). V G2 fáze bunkového cyklu je AURKA akumulovaná na centrozóme pričom tento proces je podporovaný Polo-like kinázou (Plk1). AURKA je primárne samoaktivovaná a takto v komplexe s kofaktorom Bora je zodpovedná za aktiváciu Plk1 pred vstupom bunky do mitózy (Macurek a kol. 2008). Podobne sa podieľa na akumulácii gama-Tubulínu (Hannak a kol., 20011) a aktivácii CDK1-Cyklín B komplexu (Hirota a kol., 2003) v oblasti centrozómálnych subštruktúr.

### MATERIÁL A METÓDY

*Izolácia ranných embryí a ich kultivácia:* 6-8 týždňové samice boli superovulované i.p. aplikáciou gonadotropínov (5 IU PMSG a 5 IU hCG). Takto stimulované samice boli fertilizované in vivo. V časovom intervale 17 hod po aplikácii hCG boli jednobunkové embryá izolované v M2 médiu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a následne kultivované in vitro v médiu KSOM (Milipore Co., Billerica, MA). Po dvojhodinovej kultivácii (19 h post hCG) boli mikroinjekčne aplikované 4 pl (z roztoku 125ng/μl) mRNA pre MAP4-EGFP a súčasne 7 pl (z roztoku 75 ng/μl) mRNA pre H2B-mCHERRY. V intervale 20 hodín post hCG boli izolované embryá rozdelené do 2 skupín: (i) kontrolná skupina a (ii) AURKA-inhibované embryá. Kontrolné embryá boli kultivované v médiu KSOM a AURKA-inhibované embryá v médiu KSOM s obsahom 500 nM MLN8237 (SelleckAxon Medchem, Groningen, Germany). Proliferačná aktivita ranných embryí bola hodnotená pod invertným mikroskopom (Nikon-Eclipse-90i) v intervaloch 43, 67 a 91 hodín post hCG korešpondujúcich s cytokinézu neošetrených embryí.

*Life-cell imaging:* Pre pozorovanie dynamiky chromozómov počas bunkového cyklu v reálnom čase, bol použitý CAG::H2B-GFP transgénny kmeň myší (Hadjantonakis a Papaioannou, 2004). Pre pozorovanie tvorby vretienka počas prvej mitózy boli použité mikroinjekované jednobunkové embryá zmesou mRNA pre MAP4-EGFP a H2B-mCHERRY. Sekvenčné snímanie v časových intervaloch 5 min bolo zaznamenané konfokálnym laserovým mikroskopom Leica TCS SP5.

*Imunocytochémia:* In vitro kultivované embryá boli zozbierané 31 alebo 43 hodín post hCG. Po krátkom oplachu v PBS, boli embryá fixované v 3,7% paraformaldehide po dobu 50 minút. Po premytí v PBS, boli embryá permeabilizované 0,5% Triton X-100 po dobu 45 minút a inkubované inaktívnym 2% kozím sérom (Sigma) po dobu 2 hodín. Pre nepriamu imunoflorescenciu boli embryá inkubované cez noc pri 4°C s primárnymi protilátkami. Acetylovaný alfa-Tubulín bol detekovaný myšou monoklonálnou protilátkou (Sigma, T7451) pri riedení 1:1000 a gama-Tubulín králičou polyklonálnou protilátkou (Biolegend, 620901) pri riedení 1:200. Po premytí boli reakcie primárnych protilátok vizualizované aplikáciou afinitne purifikovaných sekundárnych protilátok s naviazaným fluorescenčným farbivom (FITC, Texas Red) po dobu 1 hodiny. Po konečnom premytí v PBS/BSA boli embryá montované do Mowiol-u (Merck) tak aby s zachovala 3D topológia subštruktúr bunky.

*Testy apoptózy:* In vitro kultivované embryá boli zozbierané v intervaloch 91-115 hodín post hCG a fixované v 3,7% paraformaldehide. Po permeabilizácii boli embryá inkubované v reagensiach pre TUNEL assay (TUNEL, In Situ Cell Death Detection Kit, Roche, Penzberg, Germany) po dobu 1 hodiny pri 37 °C. Nešpecifické imunoreakcie boli blokové s 10% normálnym kozím sérom (NGS) po dobu 2 hodín pri izbovej teplote. Pre imunodetekciu kaspázy-3 bola použitá špecifická primárna protilátka polyclonal rabbit cleaved caspase-3 – Asp175 antibody (Cell Signaling) v riedení 1:100 v 10% NGS pri 4°C. Po premytí boli embryá farbené so sekundárnymi protilátkami s naviazaným fluorescenčným farbivom (Texas Red) po dobu 1 hodiny pri izbovej teplote. Po dvojnásobnom premytí v PBS/BSA a jadrá boli embryá dofarbené s Hoechst 33342 (20mg/ml, Sigma-Aldrich, Germany) a montované do Vectashield (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA). Preparáty boli hodnotené použitím epifluorescenčného mikroskopu (BX 51 Olympus, Japan). Časť kontrolných 4-bunkových embryí kultivovaných v KSOM médiu bola ošetrovaná Actinomycínom D v koncentrácii 0,05mg/ml v 100% etanole (Sigma-Aldrich).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V štúdií sme ukázali, že aktivita AURKA kinázy nie je nevyhnutná pre tvorbu bipolárneho acentrozomálneho vretienka jednobunkového myšacieho embrya. Na druhej strane inhibícia AURKA aktivity spôsobuje zlyhanie embryogenézy počas prvých dvoch bunkových delení. V in vitro fertilizovaných myších oocytoch kultivovaných v médiu s prídavkom AURKA inhibítora MLN8237 dochádza k zastaveniu delenia ešte pred 8-bunkovým štádiom embrya a vyššej incidencii apoptózy a nekrózy. Incidencia apoptózy bola vyššia aj v prípade použitia apoptotického induktora Aktinomycínu D avšak nižšia v porovnaní s inhibítorm MLN 8237. To poukazuje na to, že zastavenie proliferácie embryí kultivovaných s prídavkom inhibítora MLN8237 bolo spôsobené nielen inhibíciou bunkového cyklu, ale tiež zvýšenou apoptotickou indukciou. V tomto kontexte Cowley a kol. (2009) pozorovali, že deplécia AURKA v období strednej fázy gestácie spôsobí zvýšenie mitotického indexu a zvýšenie incidenciu apoptózy. Niektoré štúdie na nádorových bunkách ukázali, že pôsobenie inhibítorov Aurora kináz je aspoň z časti sprostredkovaná inhibíciou bunkového cyklu a indukciou apoptózy a to ako následok inhibície AURKA kinázy (Michaelis a kol., 2014). V tejto štúdií sme ukázali, že AURKA nie je absolútne nevyhnutná pre tvorbu bipolárneho vretienka, ale podporuje korektné vytvorenie jeho štruktúr. Pozorovanie, že embryá ošetrované MLN8237 vykazujú problémy s chromozómovou segregáciou môže znamenať, že AURKA je zainteresovaná v procese zachytenia mikrotubulov v kinetochórovej oblasti chromozómu v priebehu anafázy pričom je pravdepodobné, že toto zachytenie mikrotubulov môže byť primárne defektné už vo fáze metafázy. Ako sa ukázalo, inhibícia AURKA môže totiž oslabiť SAC (spindle assembly checkpoint) aktivitu. Sledovaním priebehu prvej mitózy v reálnom čase pomocou technológie „time-lapse recording“ sme boli schopní presne stanoviť časovanie

jednotlivých fáz prvej mitózy (NEBD, metafáza, cytokinéza). Preto bolo možné odhaliť predĺženú periódu NEBD-anafáza v AURKA inhibovaných embryách počas prvej mitózy. G2 fáza myších 1-bunkových embryí je relatívne dlhá a je nasledovaná vstupom do mitózy pričom jadrá podliehajú NEBD s nasledným vytvorením vretienka. Sikora a kol. (2006) tejto súvislosti ukázali, že prvá mitóza je predĺžená v dôsledku metafázického bloku. Autori tiež uvádzajú, že mitotický blok je nezávislý na aktivite SAC. Molekulárny mechanizmus tohto dočasného pozastavenia nebol však doposiaľ upokojivo objasnený. Napriek predĺženej perióde NEBD-anafáza v našej štúdii, SAC neblokoval vstup do anafázy, pretože AURKA-inhibované embryá boli schopné dokončiť prvú mitózu, čo sa potvrdilo rozdelením embrya do 2-bunkového štádia. V našej predošlej štúdii sme dokumentovali, že aj po inhibícii aktivity Plk1 kinázy jednobunkové embryo je schopné vytvoriť bipolárne deliaceho vretienka a to aj bez akumulácie gama-tubulínu v centrozomálnych subštruktúrach. Hoci Plk1 nie je nevyhnutná pre tvorbu vretienka a jeho bipolaritu, jej kinázová aktivita je nevyhnutná pre vstup do anafázy a to nezávisle od aktivity SAC (Baran a kol., 2013). V tejto štúdii sme ukázali, že po inhibícii aktivity AURKA sa bipolárne vretienko vytvorilo a gama-Tubulín bol akumulovaný v centrozomálnych oblastiach. Na druhej strane mikrotubuly nevytvárajú bipolárne vretienko v prípade, keď je súčasne inhibovaná aktivita Plk1 a AURKA. V prípade inhibície Plk1 je blok mitotického cyklu trvalý (Baran a kol.,2013) ale v prípade inhibície AURKA bol tento blok dočasný a jedno-bunkové embryá dokončili svoje prvé delenie. Zdá sa, že aktivita AURKA a Plk1 môžu koregulovať niektoré procesy počas prvej mitózy, hoci tieto kinázy sú považované za vzájomných antagonistov. Ukázalo sa, že inhibícia Plk1 aktivity v zygote vedie ku SAC nezávislému metafázickému bloku v dôsledku blokovania degradácie sekurínu pred vstupom do anafázy, zatiaľ čo AURKA inhibované embryá dokončujú druhú mitózu a vykazujú aberantnú mitózu spúšťajúcu procesy bunkovej smrti - apoptózy. Záverom môžeme konštatovať, že aktivita AURKA nie je nevyhnutná pre vytvorenie acentrozomálneho bipolárneho vretienka u myšieho jedno-bunkového embrya, ale je nevyhnutná pre transformáciu mikrotubuly organizujúcich centier (MTOC) v rámci prechodu na plnohodnotné centrozómy a korektnú segregáciu chromozómov v priebehu prvej mitózy, čo je nevyhnutnou podmienkou pre následný normálny vývoj preimplantačného embrya.

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

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baran V, Solc P, Kovarikova V, Rehak P, Sutovsky P. Polo-like kinase 1 is essential for the first mitotic division in mouse embryo. *Mol Reprod Dev.* 2013; 80:522-534.
- Cowley DO, Rivera-Perez JA, Schliekelman M, He YJ, Oliver TG, Lu L, O'Quinn R, Salmon ED, Manguson T, vanDyke T. Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. *Mol Cell Biol.* 2009; 4:1059-1071.
- De Luca M, Lavia P, Guarguaglini G. A functional interplay between Aurora-A, PLK1 and TPX2 at spindle poles: PLK1 control centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell Cycle.* 2006; 5:296-303.
- Hadjantonakis AK, Papaioannou V. Dynamic in vivo imaging and cell tracking using a histone fluorescent protein fusion in mice. *BMC Biotechnol.* BMC 2004; 4-33
- Hannak E, Kirkham M, Hymann AA, Oegema K. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol.* 2011; 155:1109-1116.
- Hirota T, Kunitoku N, Sasayama T, Marumoto T, Zhang D, Nitta M, Hatakeyama K, Saya H. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 2003; 114:585-598.
- Kufer TA, Silje HH, Korner R, Gruss OJ, Meraldi P, Nigg EA. Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol.* 2002; 158:617-623

- Macurek L, Linnquist A, Lim D, Lampson MA, Klompaker R, Freire R, Clouin C, Taylor SS, Yaffe MB, Medena RH. Polo-like kinase-1 is activated by Aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 2008; 455:119-123.
- Marumoto T, Honda S, Hara T, Nitta M, Hirota T, Kohmura E, Saya H. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2003; 278:51786-51795.
- Michaelis M, Selt F, Rothweiler F, Loschmann N, Nusse B, Dirks WG, Zehner R, Cinatl J Jr. Aurora kinases as targets in drug-resistant neuroblastoma cells. *PLoS One*. 2014; 9:e108758
- Sikora-Polaczek M, Hupalowka A, Polanski Z, Kubiak JZ, Ciemerych MA. The first mitosis of the mouse embryo is prolonged by transitional metaphase arrest. *Biol Reprod*. 2006; 74:734-743



## **IN VITRO ŠTÚDIUM IMUNOMODULAČNEJ AKTIVITY EXOPOLYSACHARIDOV PRODUKOVANÝCH *LACTOBACILLUS REUTERI***

Kšonžeková P.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>, Link R.<sup>2</sup>, Tkáčiková L.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Klinika oštipaných, UVLF, Košice, Slovensko

### **ABSTRAKT**

Cieľom našej práce bolo otestovať imunomodulačnú aktivitu exopolysacharidov (EPS) produkovaných kmeňom *L. reuteri* DSM 17938, pričom ako experimentálny model sme použili prasacie dendritové bunky diferencované v *in vitro* podmienkach z periférnych monocytov (moDC). EPS neovplyvnili génovú expresiu kostimulačných molekúl, avšak vo vyššej testovanej koncentrácii indukovali expresiu génov kódujúcich významné T<sub>H</sub>17 polarizačné cytokíny IL-1 $\beta$  a TGF- $\beta$  ( $P < 0,01$ ), ale naopak expresia IL-12 a TNF- $\alpha$  génov bola znížená, a to v oboch testovaných koncentráciách. Získané výsledky dokazujú imunomodulačné vlastnosti EPS produkovaných kmeňom *L. reuteri* DSM 17938.

### **ÚVOD**

Bakteriálne EPS, polysacharidy slabo viazané na bunkový povrch alebo uvoľňované do okolitého prostredia, sú v súčasnosti objektom mnohých štúdií, a to okrem iného aj pre ich imunomodulačný potenciál. Nedávne štúdie dokazujú ich stimulačný účinok na proliferáciu imunitných buniek, fagocytózu (Liu a kol., 2011), ako aj produkciu prozápalových (Liu a kol., 2011) a protizápalových cytokínov (Bleau a kol., 2010). Cieľom našej práce bolo otestovať vplyv EPS produkovaných kmeňom *L. reuteri* DSM 17938 na expresiu významných polarizačných cytokínov, pričom ako experimentálny model sme použili prasacie dendritové bunky diferencované z periférnych monocytov (moDC) v *in vitro* podmienkach.

### **MATERIÁL A METÓDY**

**Kultivácia baktérií:** *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (BioGaia AB) bol kultivovaný podľa Sims a kol. (2011) v modifikovanom De Man-Rogosa-Sharpe médiu (Himedia) obohatenom o 10 % sacharózu (Mikrochem), avšak bez glukózy a kvasničného extraktu. Pre izoláciu EPS boli laktobacily kultivované po dobu 48 h pri 37°C, pričom ako inokulum bola použitá čerstvá 16 h kultúra laktobacilov (10%).

**Príprava EPS:** Pred samotnou izoláciou EPS, bola kultúra laktobacilov inkubovaná pri teplote 100°C po dobu 15 min s cieľom denaturovať EPS-degradujúce enzýmy (Bergmaier a kol., 2001) a následne po ochladení boli bunky odstránené centrifugáciou (9000  $\times$  g, 20 min, 4°C) a supernatant bol použitý na izoláciu a purifikáciu EPS podľa Sims et al. (2011).

**Izolácia monocytov a diferenciácia moDC:** Prasacia venózna krv bola sterilne odobraná do skúmavky s 1,5% kyselinou etyléndiaminotetraoctovou. Po izolácii mononukleárných leukocytov pomocou separačnej tekutiny boli monocyty následne izolované pomocou magnetických častíc (BioLabs) označených anti-CD14 protilátkou (klon MIL-2). Monocyty boli kultivované v RPMI médiu obohatenom o tepelne inaktivované FBS (10%), penicilín/streptomycín (1%) a prasacie cytokíny (20  $\mu$ g  $\cdot$  l<sup>-1</sup> rpGM-CSF; 50  $\mu$ g  $\cdot$  l<sup>-1</sup> rpIL-4; R&D Systems) pri 37 °C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> po dobu 6 dní. V priebehu diferenciácie moDC bola analyzovaná expresia MHC molekúl II. triedy (protilátka proti prasacím MHC molekulám II. triedy DQ (K274.3G8); Exbio) a CD80/CD86 molekúl (huCD152(CTLA-4) muIg fúzovaný proteín viažuci CD80/CD86; Ancell) na prietokovom cytometri BD FACS Canto™ pomocou BD FACS Diva softvéru (BD Biosciences).

**Testovanie imunomodulačnej aktivity EPS:** Nezrelé resp., neaktivované moDC (2  $\times$  10<sup>5</sup>) boli ošetrené EPS (0,1 a 1 g  $\cdot$  l<sup>-1</sup>) alebo prozápalovým cytokínom TNF- $\alpha$  (5  $\mu$ g  $\cdot$  l<sup>-1</sup>; R&D Systems) a inkubované pri 37 °C v atmosfére 5% CO<sub>2</sub> po dobu 24 h.

**Analýza géovej expresie:** Celková RNA bola izolovaná použitím Purezol™ reagentu (BioRad) a následne ošetrená pomocou DNA Rapid Removal kitu (Thermo Scientific). Koncentrácia a čistota vzorky RNA bola meraná pri 260/280 nm použitím Nanodropu 8000 (Thermo Scientific). Na prepis RNA do cDNA bola použitá RevertAid Premium reverzná transkriptáza (Thermo Scientific). Primery pre  $\beta$ -aktín, CD80, CD86, IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$ , IL-12 a TNF- $\alpha$  sú charakterizované v tabuľke (Tab. 1). qPCR reakčná zmes obsahovala 1 x iQ™ SYBR Green Supermix (BioRad), 0.5  $\mu$ mol . l<sup>-1</sup> každého z dvojice primerov a 17,5 ng cDNA. qPCR protokol pozostával z nasledovných krokov: denaturácia pri 95 °C po dobu 5 min, amplifikácia v 40 cykloch tvorených 4 krokmi, a to denaturáciou pri 94 °C po dobu 30 s, hybridizáciou pri 60 °C resp. 62 °C po dobu 30 s, extenziou pri 72 °C po dobu 30 s a meraním fluorescencie. Po finálnej extenzii pri 72 °C po dobu 15 min bola urobená analýza krivky topenia. Na qPCR analýzu bol použitý iCycler CFX96 (BioRad). Relatívna normalizovaná expresia bola vyhodnotená použitím 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> metódy pomocou CFX96 Manager softvéru (BioRad), pričom  $\beta$ -aktín bol použitý ako housekeeping gén.

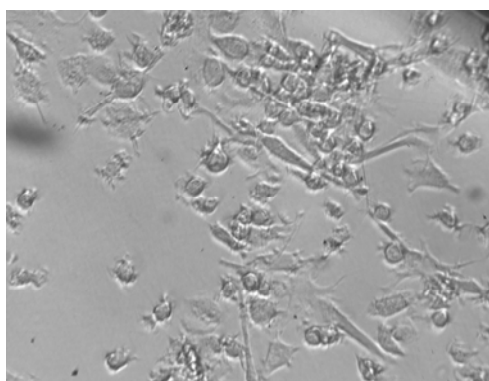
**Tab. 1.** Primery použité pri qRT-PCR analýze.

Gény	Forward primer	Reverse primer
$\beta$ -actin	CAT CAC CAT CGG CAA CGA	GCG TAG AGG TCC TTC CTG ATG T
CD80	CCC CCA GGG GCA GTT GGT GT	CAC TGA GGG TGG GGC CAG A
CD86	GCA ACC CCC TGT CCC AGA CCA	AGG GGC AGG CTG CTT CTT CT
IL-1 $\beta$	GCC CTG TAC CCC AAC TGG TA	CCA GGA AGA CGG GCT TTT G
IL-6	TGG ATA AGC TGC AGT CAC AG	ATT ATC CGA ATG GCC CTC AG
TGF- $\beta$	CAC GTG GAG CTA TACCAG AA	TCC GGT GAC ATC AAA GGA CA
IL-12	AGT TCC AGG CCA TGA ATG CA	TGG CAC AGT CTC ACT GTT GA
TNF- $\alpha$	CGA CTC AGT GCC GAG ATC AA	CCT GCC CAG ATT CAG CAA AG

**Štatistická analýza:** Výsledky boli spracované v programe GraphPad Prism verzia 3.00 použitím jednocestnej ANOVA a Dunnetovho testu.

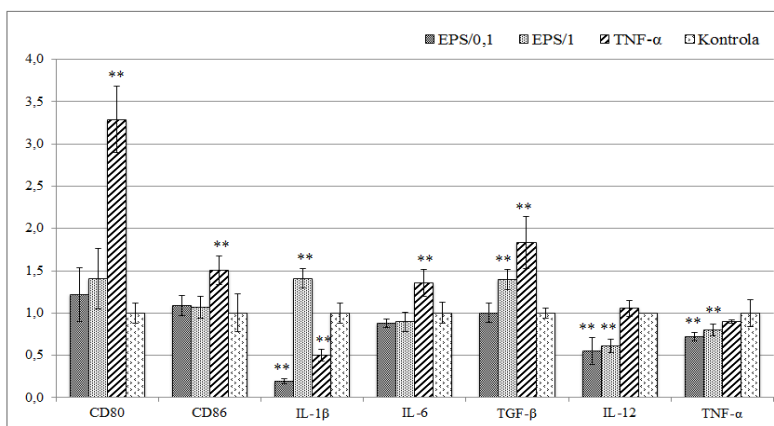
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prasacie moDC boli v *in vitro* podmienkach diferencované z periférnych monocytov, a to ich kultiváciou v médiu obohatenom o cytokíny GM-CSF a IL-4. V priebehu diferenciácie došlo k nárastu expresie MHC molekúl II. triedy, ako aj kostimulačných molekúl CD80/CD86. Po 6 dňovej stimulácii buniek uvedenými cytokínmi došlo k vzniku heterogénnej populácie moDC, ktorá bola tvorená minoritnou adherentnou a majoritnou neadherentnou subpopuláciou (Obr. 1).



**Obr. 1.** Prasacie moDC diferencované z periférnych monocytov v *in vitro* podmienkach (zväčšenie 10 x 20).

V bunkách stimulovaných cytokínom TNF- $\alpha$  došlo k signifikantnému nárastu expresie génov kódujúcich kostimulačné molekuly antigén prezentujúcich buniek ( $P < 0,01$ ), kým takýto efekt nebol pozorovaný po ošetrení moDC nami izolovanými EPS (Obr. 2). Avšak EPS vo vyššej testovanej koncentrácii indukovali expresiu génov kódujúcich významné  $T_h17$  polarizačné cytokíny IL-1 $\beta$  a TGF- $\beta$  ( $P < 0,01$ ), ale naopak expresia IL-12 ( $T_h1$ ) a TNF- $\alpha$  ( $T_h22$ ) génov bola znížená, a to v oboch testovaných koncentráciách. U prasiat bola okrem  $T_h1$  a  $T_h2$  lymfocytov, ako aj regulačných T buniek (Gerner a kol., 2009) identifikovaná taktiež subpopulácia  $T_h17$  lymfocytov (Kiros a kol., 2011).  $T_h17$  bunky sú významnou subpopuláciou lymfocytov v slizničných priestoroch, kde sa podieľajú na indukcii prozápalových procesov prostredníctvom tvorby IL-17A a IL-17F cytokínov, ako aj posilnení epitelovej bariéry slizníc produkciou IL-22 (Buc, 2012). Na záver môžeme konštatovať, že bol dokázaný imunomodulačný účinok EPS produkovaných *L.reuteri*, avšak v súvislosti s ich potenciálom indukovať moDC sprostredkovanú polarizáciu  $T_h$  lymfocytov je nevyhnutné vyzdvihnúť potrebu ďalších kokultivačných štúdií.



**Obr. 2.** Relatívna génová expresia vyjadrená ako priemer  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Signifikancia v porovnaní s kontrolou (\*\* $P < 0,01$ ).

Práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0834/12 a Probiotech č. 26220220152.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bergmaier D., Lacroix C., Guadalupe M.M., Champagne C.P. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001; 57(3): 401–406.
- Bleau C., Monges A., Rashidan K., Laverdure J.P., Lacroix M., Van Clasteren M.R., Millette M., Savard R., Lamontagne L. Intermediate chains of exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M increase IL-10 production by macrophages. *Journal of Applied Microbiology*. 2010; 108(2): 666-675.
- Buc M. Základná a klinická imunológia. Bratislava: VEDA. 2012; s. 345-351. ISBN 978-80-224-1235-3
- Kiros T.G., Van Kessel J., Babiuk L.A., Gerds V. Induction, regulation and physiological role of IL-17 secreting helper T-cells isolated from PBMC, thymus and lung lymphocytes of young pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2011; 144: 448-454
- Liu C.F., Tseng K.C., Chaing S.S., Lee B.H., Hsu W.H., Pan T.M. Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2011; 91(12): 2284-2291.
- Moue M., Tohno M., Shimazu T., Kido T., Aso H., Saito T., Kitazawa, H. Toll like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1780(2): 134–144.
- Sims I.M., Frese S.A., Walter J., Loach D., Wilson M., Appleyard K., Eason J., Livingston M., Baird M., Cook G., Tannock G. W. Structure and functions of exopolysaccharide produced by gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23. *ISME Journal*. 2011; 5(7): 1115-1124.
- Gerner W., Käser T., Saalmuller A. Porcine T lymphocytes and NK cells – An update. *Developmental and Comparative Immunology*. 2009; 33: 310-320.

## VÝSKYT GÉNOV PRE PRODUKCIU ENTEROCÍNŮV U KMEŇOV ENTEROKOKOV ZO PSOV

Kubašová, I.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Enterokoky patria do skupiny baktérií mliečného kvasenia a sú bežnou súčasťou komenzálnej mikroflóry čreva ľudí a zvierat. Využitie niektorých kmeňov z rodu *Enterococcus* vo fermentačných procesoch potravín alebo ako probiotík zvyšuje potrebu štúdia ich vlastností. Jednou z významných charakteristík probiotických baktérií je produkcia látok s antimikrobiálnym účinkom. Ako je známe, enterokoky môžu byť producentmi bakteriocínov – enterocínov, substancí bielkovinovej povahy s antimikrobiálnym účinkom. V prezentovanej práci je popísaný výskyt génov pre produkciu enterocínov u kmeňov enterokokov zo psov. Z počtu 90 psov sme izolovali baktérie rodu *Enterococcus*, ktoré sme identifikovali prostredníctvom MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie. Následne sme u nich detegovali prítomnosť génov pre produkciu enterocínov (A, P, B, L50A, L50B, AS-48, 31) metódou PCR. Najvyšší výskyt génov pre enterocíny bol zaznamenaný u druhu *E. faecium*, u ktorého sa vyskytovali gény pre enterocín A, P, B, L50A, L50B a Ent31. Enterocín 31 sa v našej štúdii vyskytol u 1 kmeňa *E. faecium* a 1 kmeňa *E. faecalis*. U 2 kmeňov *E. hirae* bol potvrdený výskyt génu pre enterocín B. U žiadneho z kmeňov *E. casseliflavus* a *E. mundtii* nebol potvrdený výskyt sledovaných génov pre produkciu enterocínov.

### ÚVOD

Baktérie rodu *Enterococcus* sú Gram-pozitívne, sférické alebo ovoidné bunky usporiadané v pároch alebo retiazkach. Sú nesporeujúce, fakultatívne anaeróbne, obvykle homofermentatívne baktérie, produkujúce kyselinu mliečnu ako konečný produkt fermentácie glukózy bez produkcie plynu (Gilmore a kol., 2014). Enterokoky môžu produkovať látky bielkovinovej povahy (bakteriocíny). Bakteriocíny produkované enterokokmi patria zväčša medzi enterocíny. Bakteriocíny sú ribozomálne syntetizované, extracelulárne produkované látky bielkovinovej povahy s antibakteriálnou aktivitou proti viac alebo menej príbuzným bakteriálnym rodom (Nes a kol. 2000). Nes a kol. (2014) klasifikujú bakteriocíny nasledovne: I, II (IIa, IIb a iné) a III. Do triedy I. lantibiotiká patria hemolytický enterocín cytolyzín a Ent W, ktoré sú aktívne proti G+ baktériám. Trieda II. zahŕňa rôznorodú skupinu bakteriocínov: podtrieda IIa („pediocin-like“ bakteriocíny so silnou aktivitou proti baktériám rodu *Listeria*; Ent A, Ent P, Ent 31) a podtrieda IIb („two-peptide“ bakteriocíny; Ent C, Ent X, Ent 1071). Trieda II zahŕňa taktiež cirkulárne bakteriocíny (Ent AS-48), „leaderless“ bakteriocíny (Ent L50A/B, Ent Q) a iné termostabilné bakteriocíny (Ent B, Ent 96). Medzi bakteriolyzíny (v minulosti pomenované ako trieda III.) patria enterolyzín A a bakteriocín 41. Väčšina doposiaľ charakterizovaných enterocínov bola potvrdená u druhov *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hirae* a *E. durans*. V predkladanej práci je popísaný výskyt génov pre enterocíny A, P, B, L50A, L50B, 31 a AS-48 u kmeňov enterokokov izolovaných z trusu psov.

### MATERIÁL A METODIKA

Pre izoláciu boli použité vzorky trusu z 90 psov, 30 rôznych plemien a krížence, vo vekovom rozmedzí 4 mesiace – 10 rokov, ktoré boli kŕmené rôznymi diétami. Trus od psov bol riedený štandardnou mikrobiologickou metódou a následne inokulovaný na selektívne médium pre enterokoky M-*Enterococcus* agar (Becton a Dickinson, Cockeysville, USA). Platne boli inkubované 48 hodín pri teplote 37°C a izolovaných bolo 133 kmeňov. Izoláty boli identifikované použitím proteínových "fingerprintov" prostredníctvom MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie (Brucker Daltonics MALDI Biotyper, USA) (Bessède a kol.,

2011). Alkalickou lýzou bola izolovaná DNA z identifikovaných kmeňov (Baele a kol., 2001) a následne boli detegované enterocíny metódou PCR za použitia C1000<sup>TM</sup> termocyklera (Bio-Rad Laboratories, USA). Sekvencie použitých primerov pre jednotlivé enterocíny sú uvedené v Tab. 1. Reakčný cyklus pre enterocíny A a 31 bol nasledovný: denaturácia pri 95°C 5 minút nasledovaná 30 cyklami 95°C 30 sekúnd, 58°C 30 sekúnd, 72°C 30 sekúnd; na koniec 72°C 5 minút a schladenie na 4°C. Cyklus pre enterocíny P, B, L50A, L50B, AS48 sa odlišoval teplotou počas hybridizácie, 56°C namiesto 58°C. Produkty PCR boli separované v 2% agarózovom géli (Sigma, Germany) s obsahom 1 µl/ml etídium bromidu (Sigma) za použitia TAE pufra (Merck, Germany). Fragmenty PCR produktu boli vizualizované pomocou UV svetla. Ako pozitívne kontroly boli použité nasledovné kmene: *E. faecium* EF55, *E. faecium* EK13 (naše izoláty) a *E. faecium* L50 (Dr. Cintas, FVUC, Madrid, Španielsko).

Tab. č. 1: PCR primery na detekciu génov pre produkciu enterocínov

Bakteriocín	Sekvencia (5'–3')	Veľkosť (bp)	Referencie
Ent A	F: GAGATTTATCTCCATAATCT R: GTACCACTCATAGTGGAA	452	Aymerich a kol., 1996
Ent P	F: ATGAGAAAAAATTATTTAGTTT R: TTAATGTCCCATACCTGCCAAACC	216	Cintas a kol., 1997
Ent B	F: GAAAATGATCACAGAATGCCTA R: GTTGCATTTAGAGTATACATTTG	159	Casaus a kol., 1997
Ent L50A	F: ATGGGAGCAATCGCAAATTA R: TTTGTTAATTGCCATCCTTC	135	Cintas a kol., 1998
Ent L50B	F: ATGGGAGCAATCGCAAATTA R: TAGCCATTTTTCAATTTGATC	280	Cintas a kol., 1998
Ent 31	F: CCTACGTATTACGGAAATGGT R: GCCATGTTGTACCCAACCATT	130	De Vuyst a kol., 2003
Ent AS48	F: GAGGAGTATCATGGTTAAAGA R: ATATTGTTAAATTACCAA	339	De Vuyst a kol., 2003

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo vzoriek trusu psov (n=90) bolo izolovaných 133 kmeňov rodu *Enterococcus*, pričom najpočetnejší druh bol identifikovaný ako *E. faecium* (74 kmeňov), 30 kmeňov ako *E. faecalis*, 25 kmeňov ako *E. hirae*, 3 kmene ako *E. casseliflavus* a 1 kmeň ako *E. mundtii*. Jackson a kol. (2009) izolovali baktérie z nosa, zubov, rekta, brucha a zadných partií psov z oblasti štátu Georgia, USA (n=155), pričom 80% z nich patrilo do rodu *Enterococcus*. Na rozdiel od našich výsledkov, *E. faecalis* bol v uvedenej štúdii najčastejšie zastúpeným druhom (v rektálnych výteroch, zuboch a nose) nasledovaný druhom *E. faecium* a *E. hirae*. Výsledky detekcie prítomnosti štrukturálnych génov pre produkciu enterocínov u jednotlivých druhov je uvedený v Tab. 2.

Tab. č. 2 : Výskyt génov pre produkciu enterocínov u jednotlivých druhov rodu *Enterococcus*

Enterocín	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. mundtii</i>
A	40	1	0	0	0
P	17	1	0	0	0
B	23	1	2	0	0
L50A	9	1	0	0	0
L50B	11	1	0	0	0
31	1	1	0	0	0
AS-48	0	0	0	0	0

Najvyšší výskyt génov pre produkciu sledovaných enterocínov bol zistený u kmeňov *E. faecium*, pričom najčastejšie sa vyskytovali gény pre enterocín A (54,1 %), enterocín B (31,1 %) a enterocín P (23,0 %). Gény pre produkciu enterocínu L50A obsahovalo 12,2 % kmeňov *E. faecium* a 14,9 % pre enterocín L50B. Podobne prevalentným génom bol Ent A and Ent B u enterokokov izolovaných z faeces divo žijúcich zvierat (Poeta a kol., 2007). U jedného kmeňa *E. faecium* bol potvrdený aj výskyt génu Ent31, ktorý bol doposiaľ popisovaný predovšetkým u izolátov druhu *E. faecalis* (De Vuyst a kol., 2003). Na zriedkavý výskyt génov Ent31 a EntAS48 poukazujú aj ďalšie štúdie (Klibi a kol., 2007, Hassan a kol., 2012). V rámci druhu *E. faecalis*, len 1 kmeň (W1) vykazoval prítomnosť génov pre produkciu enterocínov A, P, B, L50A a L50B a 1 kmeň (P14) pre Ent 31. U 8 % kmeňov *E. hirae* bol potvrdený výskyt génu iba pre produkciu enterocínu B. U kmeňov *E. casseliflavus* a *E. mundtii* nebol potvrdený výskyt sledovaných génov pre produkciu enterocínov. Na základe týchto výsledkov možno konštatovať, že prítomnosť štrukturálnych génov pre produkciu enterocínov je pomerne častá charakteristika najmä zástupcov druhu *E. faecium* izolovaných zo psov. Ďalšie štúdie zamerané na testovanie produkcie bakteriocínov ukázu podiel exprimovaných génov u týchto izolátov.

*Práca bola podporená grantom VEGA 2/0056/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aymerich T., Holo H., Håvarstain L.S., Hugas M., Garriga M., Nes I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996; 62: 1676-1682.
- Baele M., Chiers K., Davriese L.A., Smith H.E., Wisselink H.J., Vaneechoutte M., Haesebrouck F. The gram-positive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 997-1003.
- Bessède E., Angla-gre M., Delagarde Y., Sep Hieng S., Ménard A., Mégraud F. Matrix-assisted laser-decorption/ionization BIOTYPER: experience in the routine of a University hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17: 533-8.
- Casaus P., Nilsen T., Cintas L.M., Nes I.F., Hernández P.E., Holo H. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enteroc. faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 1997; 143:2287-2294.
- Cintas L.M., Casaus P., Håvarstein L.S., Hernández P.E., Nes I.F. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997; 63: 4321-4330.
- Cintas L.M., Casaus P., Holo H., Hernández P.E., Nes I.F., Håvarstein L.S. Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50 are related to *Staphylococcal* hemolysins. *J. Bacteriol.* 1988; 180:1988-1994.
- De Vuyst L., Foulquie Moreno M.R., Revets H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origin. *Int. J. Food Microbiol.* 2003; 84:299-318.
- Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., Shankar N. *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* (Internet). Boston: - Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014.
- Hassan M., Diep D.B., Javadzadeh Y., Dastmalchi S., Nes I.F., Sharifi Y., Yari S., Farajnia S., Lotfipour F. Prevalence of bacteriocin activities and bacteriocin-encoding genes in enterococcal clinical isolates in Iran. *Can. J. Microbiol.* 2012; 58: 359-368.
- Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Davis J.A., Barrett J.B., Frye J.G. Prevalence, species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from dogs and cats in the United States. *J. Appl. Microbiol.* 2009; 107:1269-1278.
- Klibi N., Jouini A., Rojo-Bezares B., Masmoudi A., Ruiz-Larrea, F., Boudabous A., Torres C. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in clinical enterococcal isolates of Tunisia. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2007; DOI 10.1007/s11274-007-9519-z.
- Nes I.F., Holo, H. Class II Antimicrobial Peptides from lactic Acid bacteria. *Biopolym.* 2000; 55:50-61.
- Nes I.F., Diep D.B., Ike Y. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to Niche control. In *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection* (Internet). Eds: Gilmore M.S., Clewell D.B., Ike Y., Shankar N. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. 2014. p:1-24.
- Poeta P., Costa D., Rojo-Bezares B., Zarazaga M., Klibi N., Rodrigues J., Torres C. Detection of antimicrobial activities and bacteriocin structural genes in faecal enterococci of wild animals. *Microbiol. Res.* 2007; 162:257-263.

# **PROTINÁDOROVÝ ÚČINOK PRÍRODNÉHO ANTIBIOTIKA MANUMYCÍNU A NA BUNKOVÚ LÍNIU KOLOREKTÁLNEHO ADENOKARCINÓMU HT-29-OxR REZISTENTNÚ VOČI OXALIPLATINE**

Macejová M., Sačková V., Jendželovský R., Fedoročko P.

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

## **ABSTRAKT**

Jednou z najrozšírenejších foriem liečby onkologických ochorení je chemoterapia, ktorá však v dôsledku pomerne rýchleho nástupu chemorezistencie veľmi často zlyháva. Jedným z možných riešení obnovenia citlivosti chemorezistentných buniek nádorov voči chemoterapii je terapia s prírodnými látkami, ktoré by mohli dopomôcť vstupu chemoterapeutík do bunky, inhibovať bunkovú proliferáciu, či indukovať/reaktívovať bunkovú smrť. Predmetom tejto práce bolo štúdium protinádorového účinku manumycínu A (Manu) na bunky adenokarcinómu hrubého čreva rezistentné voči oxaliplatine HT-29-OxR. Naše výsledky poukázali na schopnosť tohto prírodného antibiotika eliminovať chemorezistentné nádorové bunky, čo sa prejavilo poklesom prežívania, inhibíciou proliferácie a indukciou apoptózy testovaných buniek.

## **ÚVOD**

Najčastejšou príčinou zlyhania protinádorovej terapie je chemorezistencia nádorov, teda schopnosť nádorových buniek tolerovať chemoterapeutiká a odolávať ich účinku. Oxaliplatina (1,2-diaminocyklohexán-oxalát platina), platinový derivát tretej generácie, je štandardne používaným chemoterapeutikom pri liečbe kolorektálneho karcinómu. Problémom však je, že skôr, či neskôr sa všetky metastázujúce kolorektálne karcinómy stanú rezistentnými voči oxaliplatine (Dallas a kol., 2009). Prírodné látky, sekundárne metabolity rastlín, morských mikroorganizmov, mikróbov, či plesní, sú zdrojom rozličných bioaktívnych látok, čoho výsledkom je ich používanie ako liečiv už stáročia. Protinádorový potenciál prírodných látok bol prvýkrát pozorovaný v 50. rokoch 20. storočia. Mnohé prírodné látky sú schopné potlačiť rast nádorov, alebo sú používané ako podporná liečba u onkologických pacientov.

Manumycín A (Manu) je sekundárny metabolit izolovaný z baktérie *Streptomyces parvulus* kmeňa Tü64 (Buzzetti a kol., 1963). Na základe štruktúry bol zaradený do skupiny manumycínových antibiotík. Protinádorový účinok Manu spočíva v selektívnej inhibícii Ras farnezyltransferázy, enzýmu katalyzujúceho esenciálny krok aktivácie Ras proteínov transportujúcich mitogénne signály z povrchu bunky do jadra (Hara a kol., 1993). Manu tak bráni maturácii Ras proteínov, čím blokuje syntézu DNA a bunkovú proliferáciu v ľudských nádorových bunkách (Nagase a kol., 1997). Účinky Manu boli sledované na rôznych nádorových bunkových líniiach, ktoré reagovali na podanie Manu poklesom viability a/alebo proliferácie, zastavením bunkového cyklu a indukciou apoptózy (prehľad Sačková a Fedoročko, 2013). Z hľadiska protinádorovej terapie chemorezistentných buniek je veľmi významná schopnosť Manu iniciovať apoptózu, keďže jej zablokovanie je jednou z príčin rezistencie voči oxaliplatine (Gourdiere a kol., 2002). Jeho účinok na chemorezistentné bunky je takmer neprebádaný, zatiaľ je známe jeho proapoptotické pôsobenie na bunky rezistentné voči dexametazónu a doxorubicínu (Frassanito a kol., 2012).

## **MATERIÁL A METODIKA**

Bunky ľudského kolorektálneho adenokarcinómu rezistentné voči oxaliplatine HT-29-OxR (dar od Dr. Nicol Strakovej, Biofyzikální ústav AV ČR, Brno) boli v jednotlivých experimentoch nasadené do 6- alebo 96-jamkových kultivačných platničiek a kultivované

za štandardných inkubačných podmienok (37°C, 95 % vlhkosť, 5 % CO<sub>2</sub>) v médiu RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA) obohatenom o 10 % FBS (Gibco) a antibiotiká (penicilín, streptomycín, amfotericín; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Manu (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) bol k bunkám pridaný 39 hodín po ich nasadení v rôznych koncentráciách (0,2; 0,5; 0,75; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30 a 50 µM) a po 25 hodinách boli uskutočnené jednotlivé analýzy. Pre stanovenie cytotoxicity Manu bol použitý CCK-8 test (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japonsko) založený na schopnosti buniek metabolizovať vo vode rozpustnú tetrazolióvu soľ WST-8 prostredníctvom bunkových dehydrogenáz na formazán žltej farby. Tento bol detegovaný meraním absorbančie pri vlnovej dĺžke 450 nm na prístroji FluoStar Optima (BMG LABTECH GmbH, Nemecko). Prežívanie buniek bolo vyjadrené ako percento z kontroly, ktorá predstavovala 100 %. Viabilita a počet živých buniek po pôsobení Manu boli stanovené vitálnym farbením buniek eozínom. Viabilita bola vyjadrená ako percento živých buniek z celkového počtu buniek, ktorý predstavoval 100 %. Počet živých buniek bol vyjadrený ako počet buniek v jednom mikrolitri bunkovej suspenzie. Účinok vybraných koncentrácií Manu na bunkovú proliferáciu bol sledovaný dvoma spôsobmi. Testom klonogenicity bol determinovaný dlhodobý účinok Manu na proliferáciu buniek, ktorá spočíva v schopnosti tvoriť kolónie. Krátkodobý účinok na proliferáciu buniek bol určený stanovením inkorporácie BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridín; Sigma-Aldrich) do genomickej DNA prietokovou cytometriou. Schopnosť Manu indukovať apoptózu bola vyhodnotená ELISA metódou (Invitrogen), ktorá spočíva v detekcii prítomnosti štiepeného proteínu cPARP (apoptotický fragment p85) v bunkovom lyzáte. Výsledky jednotlivých experimentov boli štatisticky vyhodnotené použitím jednocestnej ANOVA analýzy a Tukeyho testom (GraphPad Prism 5.0, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo skúmanie protinádorových účinkov prírodného antibiotika manumycínu A na bunky ľudského kolorektálneho adenokarcinómu rezistentné voči oxaliplatine HT-29-OxR. Vychádzajúc z predchádzajúcich výsledkov našej pracovnej skupiny, ktoré odhalili protinádorový účinok Manu na parentálnu líniu ľudského kolorektálneho adenokarcinómu HT-29 (Sačková a kol., 2011), sme predpokladali, že Manu by mohol inhibovať proliferáciu buniek a indukovať apoptózu aj v chemorezistentnom modeli odvodenom od uvedenej línie prostredníctvom jej dlhodobej kultivácie s oxaliplatinou.

Na základe testu cytotoxicity sme zistili, že prežívanie buniek je závislé od použitej koncentrácie. Až vyššie koncentrácie Manu (20 a 30 µM) spôsobili štatisticky významný pokles prežívania buniek približne o 30 % (20 µM:  $p < 0,05$ ; 30 µM:  $p < 0,01$ ) v porovnaní s kontrolou (neovplyvnené bunky). Pre ďalšie analýzy sme vybrali jednu necytotoxickú (10 µM) a jednu cytotoxickú (30 µM) koncentráciu Manu. Vitálne farbenie eozínom potvrdilo, že nižšia koncentrácia Manu nemá vplyv na bunkovú viabilitu, avšak významne znížila počet živých buniek (2770 buniek/µl v kontrole v porovnaní s 2015 buniek/µl v skupine ovplyvnenej 10 µM Manu;  $p < 0,01$ ). Z týchto údajov vyplýva, že už aj nižšia koncentrácia Manu prejavila inhibičný účinok na rast buniek, čo sa však na celkovej viabilite buniek neprejavilo. Vyššia koncentrácia Manu spôsobila pokles viability o takmer 40 % v porovnaní s kontrolou a aj počtu živých buniek (930 buniek/µl;  $p < 0,05$ ). Sledovanie dlhodobého a krátkodobého účinku Manu na proliferáciu buniek potvrdilo účinnosť vyššej koncentrácie (30 µM). Test klonogenicity odhalil oslabenú klonogénnu schopnosť buniek po ovplyvnení 30 µM Manu (109 kolónií;  $p < 0,01$ ) v porovnaní s kontrolou (278 kolónií). Meranie inkorporácie BrdU do genomickej DNA počas S fázy bunkového cyklu prietokovou cytometriou poukázalo na úbytok populácie buniek inkorporujúcich BrdU o polovicu



v porovnaní s kontrolou po pôsobení 30  $\mu$ M Manu. Z týchto výsledkov vyplýva, že Manu dokáže inhibovať tak krátkodobú, ako aj dlhodobú proliferáciu buniek. Mechanizmy tejto inhibície môžu zahŕňať zastavenie bunkového cyklu, ktorý v prípade fázy G2/M (Zhou a kol., 2003; Haddadin, 2010) súvisí so zníženou farnezyláciou a degradáciou proteínu centroméry Cenp-F (Sudakin a Yen, 2007). Schopnosť Manu indukovať apoptózu sme detegovali prítomnosťou fragmentu PARP proteínu p85 v bunkovom lyzáte, ktorý je typickým znakom apoptózy. Množstvo tohto fragmentu detegované po 25 hodinovej inkubácii buniek s Manu bolo takmer päťnásobne vyššie v skupine ovplyvnenej vyššou koncentráciou (30  $\mu$ M) v porovnaní s kontrolou ( $p < 0,01$ ) a skupinou ovplyvnenu nižšou koncentráciou Manu (10  $\mu$ M;  $p < 0,001$ ). Inhibícia proliferácie a indukcia apoptózy bola popísaná aj po pôsobení Manu na leukemických bunkách rezistentných voči dexametazónu a doxorubicínu (Frassanito a kol., 2012).

V našich experimentoch sme zistili, že Manu pôsobí ako inhibítor bunkovej proliferácie a induktor apoptotickej smrti buniek HT-29-OxR, čím sa zaraďuje medzi potenciálnych kandidátov spomedzi prírodných látok, ktoré môžu prispieť k preklenutiu chemorezistencia, alebo aspoň k zvýšeniu citlivosti buniek voči chemoterapeutiku. Tieto výsledky budú slúžiť ako základ pre výskum účinkov tejto prírodnej látky na klinicky relevantnejšom 3D modeli buniek kolorektálneho adenokarcinómu rezistentných voči oxaliplatine.

*Táto práca bola podporovaná grantom poskytnutým Prírodovedeckou fakultou UPJŠ v Košiciach č. VVGS-PF-2014-439 a Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ a SAV č. VEGA 1/0147/15.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Buzzetti F, Gaeumann E, Huetter R, Keller-Schierlein W, Neipp L, Prelog V, Zaehner H. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: Manumycin. *Pharm Acta Helv.* 1963; 38:871-4.
- Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G 2nd, Samuel S, Kim MP, Lim SJ, Ellis LM. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* 2009; 69:1951-7.
- Frassanito MA, Cusmai A, Piccoli C, Dammacco F. Manumycin inhibits farnesyltransferase and induces apoptosis of drug-resistant interleukin 6-producing myeloma cells. *Br J Haematol.* 2002; 118:157-65.
- Gourdier I, Del Rio M, Crabbé L, Candeil L, Copois V, Ychou M, Auffray C, Martineau P, Mechti N, Pommier Y, Pau B. Drug specific resistance to oxaliplatin is associated with apoptosis defect in a cellular model of colon carcinoma. *FEBS Lett.* 2002; 529:232-6.
- Haddadin R. Combination of Manumycin A and Mebendazole in Human Breast Cancer Cell Lines. A Dissertation Presented to the Faculty of the Department of Pharmacological and Pharmaceutical Sciences College of Pharmacy, University of Houston. 2010.
- Hara M, Akasaka K, Akinaga S, Okabe M, Nakano H, Gomez R, Wood D, Uh M, Tamanoi F. Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:2281-5.
- Nagase T, Kawata S, Tamura S, Matsuda Y, Inui Y, Yamasaki E, Ishiguro H, Ito T, Miyagawa J, Mitsui H, Yamamoto K, Kinoshita M, Matsuzawa Y. Manumycin and gliotoxin derivative KT7595 block Ras farnesylation and cell growth but do not disturb lamin farnesylation and localization in human tumour cells. *Br J Cancer.* 1997; 76:1001-10.
- Sačková V, Fedoročko P. Anti-cancer activities of natural farnesyltransferase inhibitor Manumycin A. *The Research and Biology of Cancer I*, 1st edn. Hong Kong, China: iConcept Press Ltd. 2013. ISBN 978-1-922227-225.
- Sačková V, Kuliková L, Kello M, Uhrinová I, Fedoročko P. Enhanced antiproliferative and apoptotic response of HT-29 adenocarcinoma cells to combination of photoactivated hypericin and farnesyltransferase inhibitor manumycin A. *Int J Mol Sci.* 2011; 12:8388-405.
- Sudakin V, Yen TJ. Targeting Mitosis for Anti-Cancer Therapy. *Biodrugs.* 2007; 21:225-33.
- Zhou JM, Zhu XF, Pan QC, Liao DF, Li ZM, Liu ZC. Manumycin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Int J Mol Med.* 2003; 12:955-9.

# HODNOTENIE MIERY NAVIAZANOSTI PSA NA MAJITEĽA PROSTREDNÍCTVOM DOTAZNÍKA C-BARQ A NA ZÁKLADE FYZIOLOGICKÝCH PARAMETROV POČAS TESTU NEZNÁMYCH SITUÁCIÍ

Igor Miňo, Jana Kottferová

Katedra životného prostredia, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Predmetom štúdie bolo sledovanie 30 psov rôzneho veku a rôzneho plemena s cieľom hodnotenia miery naviazanosti psa na majiteľa. Porovnaním zmien fyziologických parametrov s výsledkami etologického dotazníka C-BARQ a dospeli sme zistiť, že až 57% psov v tomto experimente má poruchu naviazanosti a 53% psov trpí separačnými problémami.

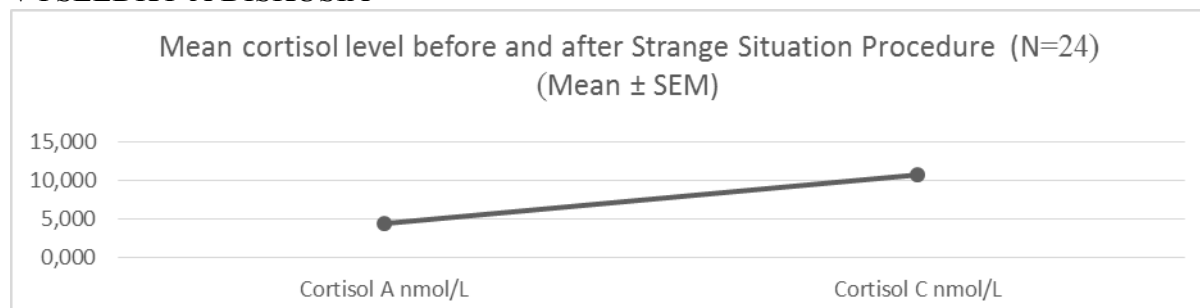
## ÚVOD

Problematike naviazanosti psov na ich majiteľov sa etológovia venujú už celé desaťročia. Teóriu naviazanosti popísal ako prvý John Blowby už v roku 1958. Po viac ako polstoročí je táto téma vždy aktuálna a často diskutovaná najmä v súvislosti s čoraz viac sa vyskytujúcou diagnózou separačnej anxiety. Pojmom separačná anxiety označujeme úzkosť z odlúčenia od majiteľa. Súčasne s touto poruchou sa u psa môžu prejavovať aj iné typy problémového správania, napr. strach z búrok a ohňostrojev, nutkavé správanie či agresivita zo strachu.

## MATERIÁL A METODIKA

Predmetom štúdie bolo sledovanie 30 jedincov (16 psov a 14 súk z toho 12 čistokrvných s preukazom pôvodu a 18 krížencov) vo veku 6 až 120 mesiacov. Na sledovanie miery naviazanosti psov na ich majiteľov sme použili modifikovanú verziu Ainsworth testu neznámych situácií (Ainsworth, 1970). Tento test pozostával z ôsmich epizód počas ktorých bol jedinec umiestnený v neznámej miestnosti, kde prichádzal do styku s neznámou osobou a bol odlúčený od majiteľa. Priebeh experimentu sa zaznamenával na video a neskôr sme tento záznam vyhodnocovali počítačovým programom Observer XT. Psom bola počas celého experimentu neustále meraná tepová frekvencia za pomoci Polar1 Vantage NV systému. Pred začatím testovania a po jeho ukončení sme psom odobrali vzorky slín. Na odber sme použili odberné tampóny "Salivette blau". Z odobratých vzoriek sme metódou ELISA stanovili koncentráciu kortizolu v slinách. Kontaminované vzorky (napr. krvou), alebo vzorky, ktoré neobsahovali dostatočné množstvo slín na analýzu sme vyradili (6 vyradených z celkovo 30 vzoriek). Za bazálne koncentrácie sme považovali pred-experimentálne hodnoty. Celkové hodnotenie správania psov počas testu neznámych situácií sme napokon porovnali s výsledkami etologického dotazníka C-BARQ Canine Behavioral Assessment and Research Questionnaire (Serpell, 2003).

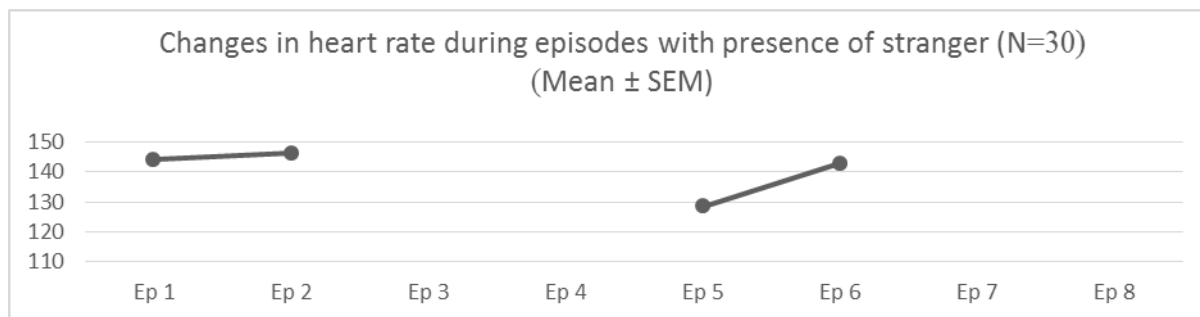
## VÝSLEDKY A DISKUSIA



ID/dog	1/001	2/010	3/013	4/014	5/022	6/027	7/025	8/023	9/020	10/016	11/057	12/007	13/035	14/038	15/044
Cortisol A	1,359	4,361	3,314	1,99	10,336	0,923	0,672	3,829			0,485	2,747	3,938	0,66	3,588
Cortisol C	2,203	19,447	5,257	4,932	16,296	7,347	23,431	13,822			4,627	3,434	12,257	16,346	14,28

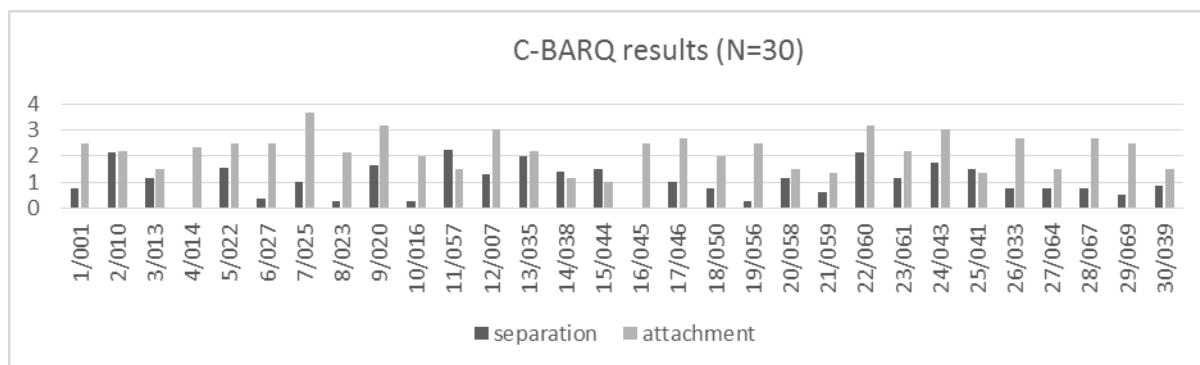
ID/dog	16/045	17/046	18/050	19/056	20/058	21/059	22/060	23/061	24/043	25/041	26/033	27/064	28/067	29/069	30/039
Cortisol A	4,404		1,736	0,741	32,126	3,05		6,275	9,415			4,588	0,527	0,522	3,908
Cortisol C	5,563		5,532	3,717	34,313	13,953		6,69	8,404			3,897	4,349	5,786	22,307

Tabuľka č.1: Koncentrácia kortizolu pred a po vykonaní testu (24 z 30 testovaných psov)



dog	1/001	2/010	3/013	4/014	5/022	6/027	7/025	8/023	9/020	10/016	11/057	12/007	13/035	14/038	15/044
Ep 1	179	140	128	116	143	175	146	180	147	152	138	173	147	127	147
Ep 2	154	148	149	153	152	118	181	136	158	154	133	148	169	139	124
Ep 5	145	114	142	161	127	120	143	127	139	145	118	136	146	148	98
Ep 6	162	119	173	156	146	132	185	150	147	166	139	142	152	164	103
dog	16/045	17/046	18/050	19/056	20/058	21/059	22/060	23/061	24/043	25/041	26/033	27/064	28/067	29/069	30/039
Ep 1	176	76	146	116	139	123	188	118	134	131	137	134	152	180	140
Ep 2	189	98	81	180	152	147	172	147	146	147	145	141	119	161	151
Ep 5	121	124	76	153	137	118	142	121	139	127	89	136	101	121	137
Ep 6	148	121	85	141	162	121	182	132	141	133	104	143	133	143	164

Tabuľka č.2: Zmeny tepovej frekvencie počas testu neznámych situácií (30 testovaných psov)



ID/dog	11/057	12/007	13/035	14/038	15/044	16/045	17/046	18/050	19/056	20/058
separation	2,25	1,29	2	1,38	1,5	0	1	0,75	0,25	1,13
attachment	1,5	3	2,17	1,17	1	2,5	2,67	2	2,5	1,5
ID/dog	21/059	22/060	23/061	24/043	25/041	26/033	27/064	28/067	29/069	30/039
separation	0,63	2,13	1,13	1,75	1,5	0,75	0,75	0,75	0,5	0,88
attachment	1,33	3,17	2,17	3	1,33	2,67	1,5	2,67	2,5	1,5

Tabuľka č. 3: Výsledky dotazníka C-BARQ v kategóriách "separačné problémy" a "naviazanosť/vyžadovanie pozornosti" (30 testovaných psov)

### Koncentrácie kortizolu pred a po teste neznámych situácií

Psi a ich majitelia boli pozorovaní v modelových situáciách, ktorým čelia dennodenne. Sledovali sme reakciu na neznáme prostredie, na neznámou osobu a na odlúčenie od majiteľa. Individuálne rozdiely v koncentráciách kortizolu významne korelovali s behaviorálnymi charakteristikami pozorovaných psov. Naše výsledky (viď tab.č.1) sa zhodujú s predošlými experimentmi, ktoré boli vykonané v tejto oblasti (napr. Horváth a kol., 2008; Stracke a kol., 2011). Potvrdili sme, že rozdiely v koncentráciách kortizolu nezávisia od pohlavia. Dokázali

sme, že malé plemená majú vyššiu koncentráciu kortizolu rovnako ako šteňatá majú vyššiu koncentráciu kortizolu v porovnaní s dospelými psami. Zvýšené hladiny kortizolu v slinách sme pozorovali bezprostredne po stresovej záťaži a priamo súviseli so zvýšenou tepovou frekvenciou.

#### Zmeny tepovej frekvencie

V našej štúdií sme dokázali súvislosť medzi zmenami tepovej frekvencie a absenciou majiteľa (vid' tab.č.2). Zmeny medzi prvou a druhou epizódou, keď po prvý krát do testu vstupuje neznáma osoba, sú minimálne nakoľko sa pes v testovacej miestnosti od začiatku experimentu nachádza spolu so svojim majiteľom. Rozdiel medzi piatou a šiestou epizódou je podstatne výraznejší! V šiestej epizóde je pes opätovne vystavený stretu s neznámou osobou, avšak tento krát bez prítomnosti majiteľa. Náhle zvýšenie koncentrácie kortizolu signalizuje distress, ktorý je spôsobený prítomnosťou neznámej osoby v experimentálnej miestnosti a posilnený absenciou majiteľa. Zvýšená tepová frekvencia priamo súvisí so zvýšenou hladinou kortizolu.

#### Výsledky etologického dotazníka C-BARQ

Výsledky našej štúdie ukazujú, že až 57% psov v tomto experimente má poruchu naviazanosti a 53% psov trpí separačnými problémami (vid' tab.č.3). Nefunkčný vzťah naviazanosti medzi psom a jeho majiteľom môže spôsobiť separačnú anxiétu avšak výsledky predošlých štúdií (napr. Palmer a Custance, 2008) dokázali, že psi trpiace separačnou anxiétou nemusia vykazovať nadmernú naviazanosť na svojich majiteľov. Separačné problémy a naviazanosť/vyžadovanie pozornosti sú dve samostatné poruchy správania, ktoré spolu môžu a nemusia súvisieť preto je dôležité ku každému prípadu pristupovať individuálne.

V oblasti sledovania miery naviazanosti psov na ich majiteľov je potrebné pokračovať vo výskume, nakoľko dodnes nie je úplne ozrejmená súvislosť medzi separačnými problémami a naviazanosťou/vyžadovaním si pozornosti. Je potrebné bližšie ozrejmiť akú úlohu má nefunkčná naviazanosť psa na majiteľa pri vývoji separačnej anxiety. Behaviorálne pozorovania psov za účelom skúmania miery naviazanosti by sa mali viac inšpirovať podobným výskumom z oblasti humánnej psychológie.

*Táto práca bola podporená z projektu KEGA 008UVLF – 4/2015.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ainsworth MDS, Bell SM (1970) Attachment, exploration, and separation: illustrated by the behavior of one-year-olds in a strange situation. *Child Dev.* 41, 49–67
- Bowlby J (1958) The nature of the child's tie to his mother. *Intl. J. Psych. Anal.* 39, 350-373
- Horváth Z (2008) Affiliative and disciplinary behavior of human handlers during play with their dog affects cortisol concentrations in opposite directions. *Hormones and Behavior* 54, 107-114
- Palmer R, Custance D (2008) A counterbalanced version of Ainsworth strange situation procedure reveals secure-base effects in dog-human relationships. *Appl. Anim. Behav. Sci* 109, 306–319
- Serpell JP (2003) Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol. 223, No. 9, Pages 1293-1300
- Stracke J (2011) Assesment of Stress in Laboratory Beagle Dogs Constrained by a Pavlov Sling, *ALTEX* 28, 4/11

## IDENTIFYING AND QUANTIFYING THYMOL IN BROILER PLASMA AND TISSUES BY SOLID – PHASE MICROEXTRACTION – GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY

Ocel'ová V.<sup>1</sup>, Chizzola R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Animal Physiology, SAS, Košice, Slovak Republic*

<sup>2</sup> *Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria*

### ABSTRACT

Taking into consideration that prophylactic use of antibiotic growth promoters for poultry production is banned since 1.1.2006, the development of plant derived feed additives can be desirable for breeding and poultry production. Essential oils (EO) as a new class of feed additives can improve the health of the animals and thereby enhance their performance. Probably major and minor compounds of EO are responsible for the resulting effect. Absorption, metabolism and mode of action of these compounds are still not well known.

Research was focused on the detection of *Thymus vulgaris* EO compounds in duodenum gut content, duodenum wall, plasma, liver, kidney and breast muscle from broiler chickens. Moreover, the amount of thyme EO main compound – thymol was assessed in plasma, liver, kidney and muscle after addition of different EO concentrations (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1% w/w) to the animals diet. Samples were analysed by solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

Thymol and other compounds of thyme essential oil detected during our analysis suggest that plant bioactive compounds from feed additives are absorbed in the digestion system and transported to target tissues, where their biological activity become effective. We found the highest concentration of thymol in kidney and plasma. The lowest concentrations of thymol were analysed in breast muscle and liver. It is necessary to keep in mind the selection of a sufficient concentration of EO in the feed additive for animals and to define available levels improving their health status.

### INTRODUCTION

A number of feed additives were used in the poultry industry in a past. Positive impact of phytogetic (plant derived) feed additives on animal health seems to be actual topic for scientific research. Phytogetics include a broad range of plant materials, which could be effective in poultry nutrition. Essential oils (EO) are considered as one of the alternatives as feed supplement to improve health and performance parameters in animal production. EO is a complex mixture of volatile compounds produced by specialized secretory cells of plants.

Numerous studies have already confirmed the beneficial effects of EOs but there are still some unanswered questions concerning the mode of action, metabolic pathway and optimal dosage of phytogetic additives in poultry.

The present experiment was designed to examine *Thymus vulgaris* EO compounds in different animal tissues, gut content and plasma. Components absorbed in gastrointestinal tract are transported with blood to liver and consequently to other tissues. The concentration of a compound in the blood is pivotal factor influencing its effectiveness in the tissue. Because of lack of information related to EO metabolism in animals and especially in poultry, we investigated the absorption and the tissue deposition of the main compounds from *T. vulgaris* EO, in broiler chickens. The occurrence of thyme EO components in duodenum, plasma and various tissues was investigated. Moreover concentrations of thymol as main compound of thyme EO were examined in plasma and tissues after the addition of different EO concentrations to diet.

## MATERIAL AND METHODS

The current experiment was carried out on 56 one-day old broiler chickens (ROSS 308) divided randomly to 6 experimental groups (n=8) with increasing concentrations of thyme EO in basal diet (BD) : 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.1% w/w and a control group with BD without supplementation of thyme EO. Broiler chickens were reared under the standard conditions required for the current breed with lightening program of 23 hours/light and 1 hour/dark. Water and feed were provided *ad libitum*. Feed intake, weight gain and feed to gain ratio were recorded once a week. Chickens were slaughtered after 4 weeks experimental period and samples of gut content, plasma and tissues were collected.

Quantitative analysis of the thymol in studied oil was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Thymol represented 47.85 % of the examined EO.

The main compound thymol and other components derived from thyme EO in the samples from the animals were detected using solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Prior to analysis, the addition of the enzyme  $\beta$ -glucuronidase was needed to release metabolised thyme oil compounds from chemical bonds.

Statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey multiple comparison test using GraphPad Software (USA). Samples for GC/MS analysis were pooled from eight animals of each groups and divided into four samples. Identification of thymol was proved by specific mass spectra and Kovats indices. Quantification of thymol was calculated by plotting the peak area ratios sample peak to internal standard peak (o-cresol) against thymol concentration. Samples from control group were used for generating of calibration curve by adding known thymol amounts.

## RESULTS AND DISCUSSION

The growth performance of broilers was not influenced by any concentration of thyme EO in the diet, all chickens were in good health condition.

Thymol, carvacrol, p-cymene, thymol methyl ether, carvacrol methyl ether,  $\beta$ -caryophyllene and camphor were detected in experimental samples. Samples from the duodenum, blood plasma and kidney include a wider range of components than breast muscle and liver tissue. The presence of the detected components in tissues suggests their efficient absorption from digestive tract and distribution with blood to tissues where biological activity can occur. Our results indicate specifically which compounds from thyme EO were absorbed in gastrointestinal tract and transferred to tissues.

Concerning the bioactivity of the ingested compounds, their presence in target tissues is essential. Bioavailability of orally administered compounds is determined as proportion of the administered dose that reaches the systemic blood circulation and becomes available at the site of action (Thiessen, 2004). Absorption through intestinal epithelium is a critical factor influencing the availability of these substances (Chan et al., 2004). In our experiment a significant increase of thymol concentration in plasma and kidney in groups of animals with 0.05 and 0.1% EO addition to diet points to the most effective absorption of thymol. We can suggest that enhanced rate of absorption in digestive tract and high thymol concentrations achieved in plasma may improve its biological activity. Significant increases of thymol concentrations in liver and muscle were found only in animals fed with 0.1% EO addition.

Overall the highest amounts of thymol were found in the kidney tissue. Our results seem to indicate intensive metabolism of thymol in kidney tissue being in accordance with the suggestion that kidney can play an important role in the metabolism and elimination of phenols even though the liver is considered the most important organ for biotransformation (Kohlert et al., 2002). Our results suggest that thymol occurs in edible tissues (liver and muscle) only at the highest EO concentration what is in accordance with investigation of

Haselmeyer et al. (2015) who found thymol in traces in muscle and liver only at the highest dietary level. These results are very important from the viewpoint of food quality and safety. It is necessary to keep in mind that at high EO doses, alternative metabolic routes of biotransformation may occur leading to the production of reactive metabolites (EFSA, 2012). It is therefore important to find out the concentration of EO which can improve animal health but decrease consumers health risk.

*The research was supported by the Slovak Scientific Agency VEGA project 2/0052/13.*

## REFERENCES

- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. Scientific opinion on the safety and efficacy of phenol derivatives containing ring-alkyl, ring-alkoxy and side chains with an oxygenated functional group (chemical group25) when used as flavourings for all species. *EFSA Journal*. 2012; 10:1-16.
- Haselmeyer A, Zentek J, Chizzola R. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood, plasma, liver and muscle. *J Sci Food Agric*. 2015; 3: 504-508.
- Chan L M S, Lowes S, Hirst B H. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability, *Eur J Pharm Sci*. 2004; 21:25–51.
- Kohlert C, Schindler G, Marz RW, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, Grafe EU, Veit M. Systemic availability and pharmacokinetic of thymol in humans. *J Clin Pharmacol*. 2002; 42:731-737.
- Thiessen J J. Chapter 8: Bioavailability and Bioequivalence. In *The IUPHAR Compendium of Basic Principles for Pharmacological Research in Humans*. (Ed's P. du Souich, M. Orme and S. Erill) IUPHAR. 2004; 55-66.

## POROVNANIE METÓD IZOLÁCIE DICHELOBACTER NODOSUS A FUSOBACTERIUM NECROPHORUM Z KONČATÍN DOJNÍC

Osová A., Segurado Benito Pilipčincová I.\*, Király J.\*, Mudroň P.

Klinika prežúvavcov, \* Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04186 Košice, Slovenská republika

### ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo zistiť najvhodnejší spôsob spracovania vzoriek a následnej izolácie DNA anaeróbných baktérií. Vzorky boli odobrané od ôsmich dojníc s chorobami paznechtov a následne spracované mikrobiologickými postupmi. Zo vzoriek bola izolovaná DNA anaeróbných baktérií tromi metódami: PBS, AB a ROCHE. *D. nodosus* bol metódou AB izolovaný v 95,31 %, metódou ROCHE v 90,63 % a metódou PBS v 64,06 % vzoriek ( $p < 0,0001$ ). *F. necrophorum* bol metódou AB izolovaný v 39,06 %, metódou ROCHE v 20,31 % a metódou PBS v 4,69 % vzoriek ( $p < 0,0001$ ). Na základe našich výsledkov je možné konštatovať, že najcitlivejšou metódou izolácie *D. nodosus* a *F. necrophorum* je metóda AB.

### ÚVOD

*D. nodosus* a *F. necrophorum* sú pôvodcovia veľmi závažnej choroby postihujúcej paznechty dobytky, ktorá je známa pod viacerými označeniami – nekrobacilóza, phlegmona interdigitalis a iné. Výskyt tohto ochorenia je väčšinou hromadného charakteru a na jeho vznik vplýva veľmi veľa príčin (Egerton, 2002). Pre *D. nodosus* je typické, že jeho biotopom je epidermálne tkanivo nohy prežúvavcov, kde v trhlínach kože a rohoviny dokáže prežívať až 2 roky a vo voľnom prostredí nepreživa viac ako sedem dní. Pri narušení integrity rohovej vrstvy kože sú virulentné kmene schopné tvoriť enzým *proteázu*, ktorý spôsobuje skvapalnenie bielkovín tkaniva paznechta a enzým *keratinázu*, ktorý spôsobuje rozklad keratínu a narušenie štruktúry kože. Tento proces poskytuje výživové médium a rastový stimulátor pre *F. necrophorum* (Altenbrunner-Martinek, 2011; Bennett a kol., 2009b). *F. necrophorum* patrí k normálnej mikroflóre v zažívacom trakte zvierat a ľudí (Bennett a kol., 2009b; Nagaraja a kol., 2005; Egerton, 2002). K faktorom virulencie patria toxíny a produkty metabolizmu, ktoré prispievajú ku vstupu, kolonizácii, šíreniu, a k rozvoju infekcie (Nagaraja a kol., 2005).

Cieľom našej štúdie bolo zistiť najvhodnejší spôsob spracovania vzoriek a následnej izolácie DNA anaeróbných baktérií zo získaných vzoriek.

### MATERIÁL A METODIKA

V rámci nášho sledovania bol uskutočnený odber vzoriek od 8 dojníc, ktoré boli postihnuté rôznymi chorobami paznechtov. Vzorky sa odoberali v pároch z medzipaznechtového priestoru všetkých končatín. Od jednej dojnice bolo odobratých 16 vzoriek a spolu bolo odobraných 128 vzoriek. V ďalšom kroku boli vzorky spracované mikrobiologickými postupmi za účelom získania anaeróbných baktérií a ich DNA z odobratých vzoriek. Následne bola uskutočnená izolácia bakteriálnej DNA, ktorá bola realizovaná tromi rôznymi spôsobmi: **PBS** – izoláciou z fosfátového pufru metódou mraz/var, **AB** – izolácia z anaeróbného bujónu metódou mraz/var, **ROCHE** – izoláciou z fosfátového pufru komerčným kitom. Na detekciu prítomnosti sledovaných patogénov bola použitá metóda PCR.

Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou „GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA“, použitím Fisherovho exaktného testu.

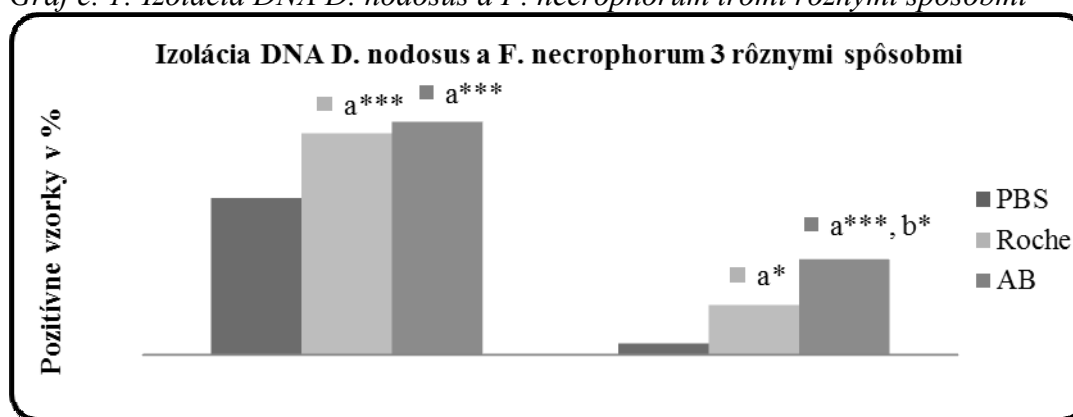


## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na grafe č.1 sú znázornené metódy izolácie DNA. Pre *D. nodosus* sa ako najefektívnejšia ukázala metóda izolácie AB kde bolo pozitívnych 95,31 % vzoriek, nasledovala metóda izolácie ROCHE s 90,63 % pozitívnych vzoriek a tieto dve metódy vykazovali signifikantný rozdiel oproti metóde izolácie PBS s pozitívnymi vzorkami 64,06 % (AB k PBS bolo  $p < 0,0001$ ). V prípade *F. necrophorum* sa ako najefektívnejšia ukázala tiež metóda izolácie AB kde bolo pozitívnych 39,06 % vzoriek, potom metóda izolácie ROCHE s 20,31 % pozitívnych vzoriek a tieto dve metódy vykazovali signifikantný rozdiel oproti metóde izolácie PBS s pozitívnymi vzorkami 4,69 % (AB k PBS bolo  $p < 0,0001$ ).

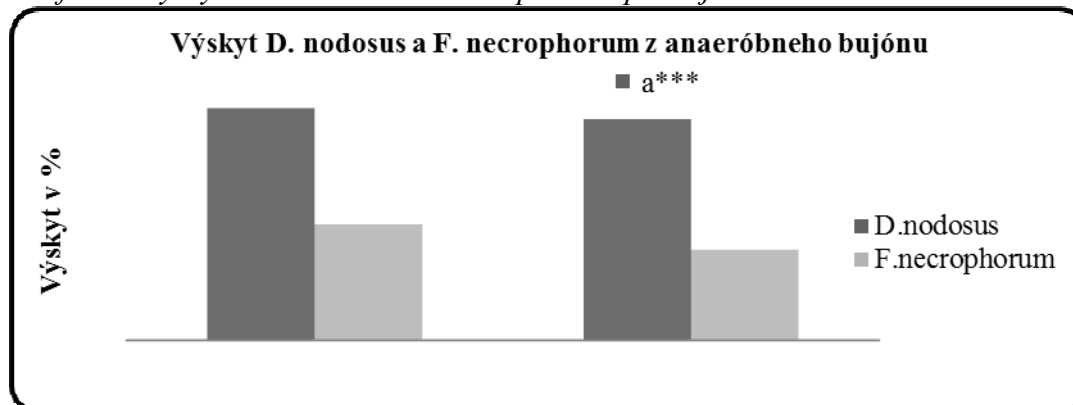
Na grafe č. 2 vidíme znázornený výskyt *D. nodosus* a *F. necrophorum* z anaeróbneho bujónu pri pozitívnych dojniciach a v pozitívnych vzorkách. *D. nodosus* bol detegovaný v 95,31 % všetkých vzoriek čo predstavovalo signifikantný rozdiel oproti výskytu *F. necrophorum*, ktorý bol detegovaný v 30,47 % všetkých vzoriek ( $p < 0,0001$ ).

Graf č. 1: Izolácia DNA *D. nodosus* a *F. necrophorum* tromi rôznymi spôsobmi



a – signifikantný rozdiel oproti PBS, b – signifikantný rozdiel oproti Roche

Graf č. 2: Výskyt *D. nodosus* a *F. necrophorum* pri dojniciach a vo vzorkách z AB



a – signifikantný rozdiel výskytu *D. nodosus* vo vzorkách oproti *F. necrophorum*,  $p < 0,0001$

*F. necrophorum* bol nami izolovaný na základe génu leukotoxín (*lktA*), ktorý je špecifický pre patogénne kmene *F. necrophorum* podobne, ako to vo svojej štúdiu opisuje aj Bennet a kol. (2009a). Na diagnostiku *D. nodosus* boli použité novo navrhnuté primery na základe sekvencie génu 16S rRNA. Diagnostiku *D. nodosus* vo svojej práci opisujú Cheetham a kol. (2006) na základe génu integráza (*intA*) a Bennet a kol. (2009a) a Zhou a kol. (2000) na základe fimbriálneho génu (*fimA*).

Vo svojej štúdiu Bennet a kol. (2009a) zistili výskyt *F. necrophorum* v 53,4 % vzoriek, zatiaľ čo *D. nodosus* zistili len v 4,7 % vzoriek. Nami uvádzané výsledky poukazujú na opačný

výskyt týchto anaeróbných baktérií. Knappe–Poindecker a kol. (2013) opisujú v stádach nórskeho dojníc prevalenciu výskytu *D. nodosus* od 66,1 % do 94,5 %, čo korešponduje s našimi zisteniami.

Vo svojich štúdiách opisujú Zhou a Hickford (2000), Bennet a kol. (2009a) a Knappe–Poindecker a kol. (2013) rôzne spôsoby izolácie DNA zo vzoriek. Ich prvým krokom bolo, že konce tampónov vložili do skúmaviek obsahujúcich PBS s EDTA. V našej štúdií boli použité roztoky PBS bez EDTA a AB. Zhou a Hickford (2000) a Bennet a kol. (2009a) získali DNA izoláciou z PBS s EDTA za použitia metódy SDS/fenol/chloroform. Knappe–Poindecker a kol. (2013) izoloval DNA z PBS s EDTA pomocou Nuclisens easyMAG extraktora. V našej štúdií bola izolovaná DNA z AB a PBS metódou mrazu a varu, a z PBS použitím komerčného kitu ROCHE.

Na základe našich výsledkov je možné konštatovať, že najcitlivejšou metódou izolácie *D. nodosus* a *F. necrophorum* je metóda AB. Tento poznatok je možné použiť pri ďalších sledovaniach zameraných na choroby paznechtov prežúvavcov.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0701-11.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altenbrunner-Martinek, B.: Moderhinke (Dermatitis contagiosa interdigitalis, footrot). *Klauentierpraxis*, 2011, 19; 86–89.
- Bennett, G., Hickford, J., Sedcole, R., Zhou, H. *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe*, 2009b, 15; 173–176.
- Bennett, G., Hickford, J., Zhou, H., Laporte, J., Gibbs, J. Detection of *Fusobacterium necrophorum* and *Dichelobacter nodosus* in lame cattle on dairy farms in New Zealand. *Vet. Sci.*, 2009a, 87; 413–415.
- Egerton, J. R. Management of footrot in small ruminants. 12th International Symposium on Lameness in Ruminants, 2002; 139.
- Cheetham, B.F., Tanjung, L.R., Sutherland, M., Druitt, J., Green, G., McFarlane, J., Bailey, G.D., Seaman, J.T., Katz, M.E. Improved diagnosis of virulent ovine footrot using the *intA* gene. *Vet. Microbiology*, 2006, 116; 166–174.
- Knappe-Poindecker, M., Gilhuus, M., Jensen, T.K., Klitgaard, K., Larssen, R.B., Fjeldaas, T., 2013: Interdigital dermatitis, heel horn erosion, and digital dermatitis in 14 Norwegian dairy herds. *J. Dairy Sci.*, 96; 7617–7629.
- Nagaraja, T.G., Narayanan, S.K., Stewart, G.C., Chengappa, M.M. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe*, 2005, 11; 239–246.
- Zhou, H., Hickford, J.G.H.: Novel fimbrial subunit genes of *Dichelobacter nodosus*: recombination in vivo or in vitro? *Vet. Microbiology*, 2000, 76; 163–174.

## ŽIVOTNÉ PROSTREDIE V OBLÚBENÝCH REKREAČNÝCH LOKALITÁCH Z HĽADISKA PARAZITÁRNEJ KONTAMINÁCIE

Pipiková J., Papajová I.

Parazitologický ústav, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť parazitárnu kontamináciu životného prostredia a výskyt endoparazitov u psov ako jedného z možných zdrojov znečistenia prostredia v obľúbených rekreačných lokalitách Grécka, Bulharska a Talianska. Celkovo bolo mikroskopicky vyšetrených 321 vzoriek trusu psov zozbieraných náhodne na plážach a verejných priestranstvách a 17 vzoriek piesku z pláží a detských pieskovísk. Medzi jednotlivými krajinami sme nezaznamenali výrazné rozdiely v celkovej prevalencii parazitov u psov, ktorá predstavovala v Grécku 35,55%, v Taliansku 37,61% a v Bulharsku 43,48%. Nezávisle od miesta pôvodu sme v truse psov najčastejšie detegovali vajíčka z čeľade Ancylostomatidae. Len v dvoch vzorkách piesku z Bulharska sme potvrdili nález propagatívnych štádií endoparazitov. Vysoká miera parazitárnej infekcie u psov môže viesť k parazitárnej kontaminácii prostredia v dovolenkových letoviskách. Pobyt v takomto prostredí zvyšuje riziko infekcie u ľudí a tiež ďalších zvierat.

### ÚVOD

Psy predstavujú dôležitý zdroj parazitov, pričom niektoré môžu ohroziť aj zdravie ľudí a iných zvierat. Človek aj zvieratá sa obvykle nakazia infekčnými zárodkami, ktorými je kontaminované vonkajšie prostredie. K nákaze dochádza väčšinou perorálnou cestou prehltnutím infekčných zárodkov. Niektoré druhy (napríklad z rodu *Ancylostoma*, *Strongyloides*) sú schopné hostiteľa aktívne infikovať prestupom lariev cez neporušenú kožu. Rekreačné lokality sú počas dovolenkovej sezóny charakteristické vysokou koncentráciou ľudí, čím narastá aj riziko infekcie. V predloženej štúdií sme sa zamerali na výskyt zárodkov endoparazitov v truse psov a v piesku z vybraných rekreačných oblastí Grécka, Bulharska a Talianska.

### MATERIÁL A METODIKA

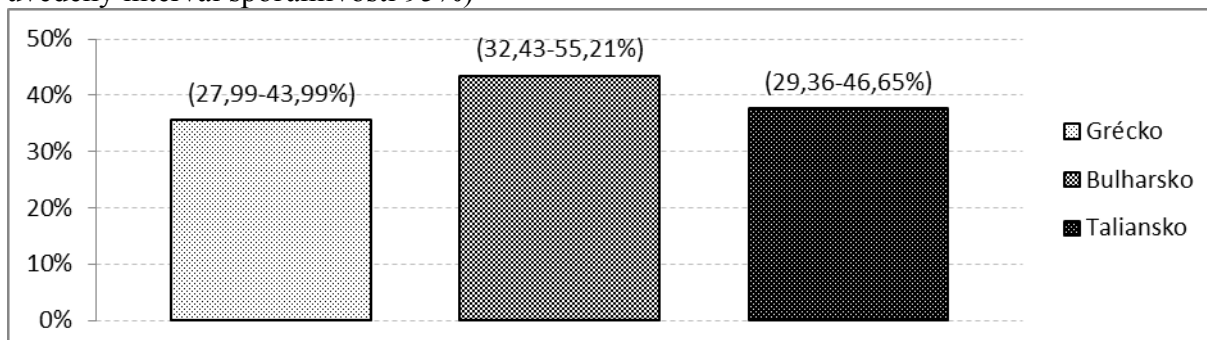
Celkovo bolo mikroskopicky vyšetrených 321 vzoriek trusu psov a 17 vzoriek piesku. V modelových dovolenkových destináciách Grécka (Paralia-Katerini, Olimpiaki Akti, Nei Pori, Leptokarya a Meteora) bolo zozbieraných 135 vzoriek trusu a 4 vzorky piesku. Z rekreačných oblastí Bulharska (Plovdiv, Chepelare a Primorsko) bolo vyšetrených 69 vzoriek trusu a 13 vzoriek piesku. V rekreačných lokalitách Talianska (Milano, San Valentino, Limone sul Garda, okolie jazera Garda a Ledro) bolo zozbieraných 117 vzoriek trusu. Vzorky piesku o hmotnosti 500 – 1000 g boli odoberané z detských pieskovísk a pláží. Na vyšetrenie bola použitá sedimentačno-flotačná metóda podľa Kazacosa (1983). Vzorky trusu pochádzali od neznámych zvierat a boli zozbierané náhodne na verejných priestranstvách miest a na plážach. Trus bol na prítomnosť zárodkov parazitov vyšetrený flotačnou metódou pomocou dvoch flotačných roztokov – roztok sacharózy so špecifickou hmotnosťou 1300 g/cm<sup>3</sup> a roztok síranu zinočnatého so špecifickou hmotnosťou 1180 g/cm<sup>3</sup>. Interval spoľahlivosti (konfidenčný interval CI) bol vypočítaný na 95% hladine významnosti s použitím online kalkulačky (<http://vassarstats.net>).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celková prevalencia parazitov v jednotlivých krajinách sa pohybovala od 35,55% do 43,48% (Obr. 1.). Zaznamenali sme spolu 10 taxónov (Obr. 2.). Vo všetkých troch krajinách sme

zaznamenali výskyt vajíčok z čeľade Ancylostomatidae, a vajíčka z rodov *Toxocara*, *Trichuris* a *Capillaria*.

Obr. 1. Celková prevalencia parazitov v truse psov v jednotlivých krajinách (v zátvorkách je uvedený interval spoľahlivosti 95%)

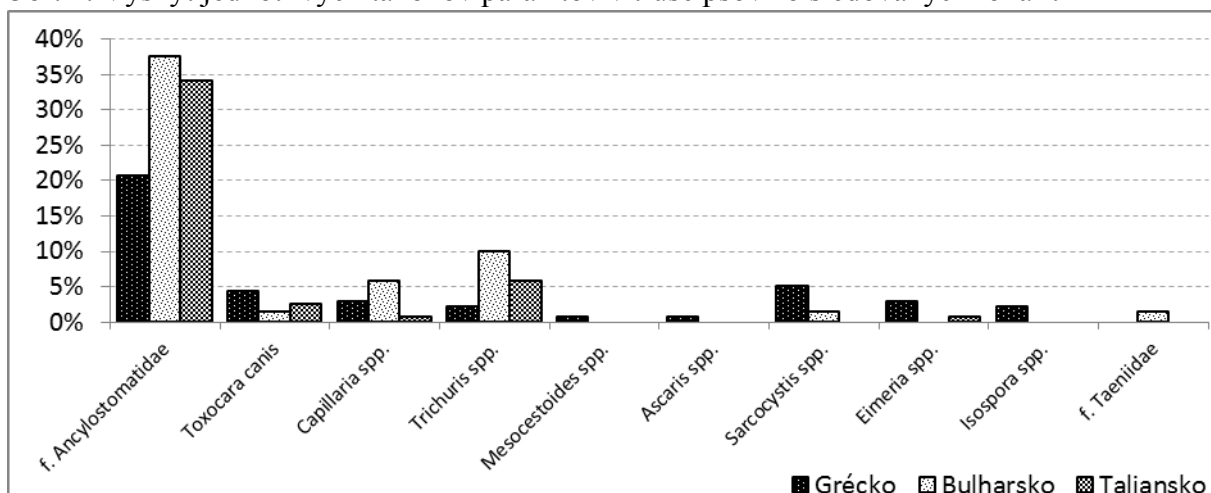


Zárodky aspoň jedného druhu parazitov obsahovalo 35,56% (95% CI = 27,99 – 43,93%) vzoriek trusu psov zozbieranom v Grécku. Spolu sme zaznamenali 9 taxónov (Obr. 2.). Najčastejší bol výskyt vajíčok z čeľade Ancylostomatidae (20,74%; 95% CI = 14,76 – 28,34%), potom vajíčok *Toxocara canis* (4,44%; 95% CI = 2,05 – 9,35%), *Capillaria* spp. (2,96%; 95% CI = 1,16% – 7,37%), *Trichuris* spp. (2,22%; 95% CI = 0,76 – 6,33%), *Mesocestoides* spp. (0,74%; 95% CI = 0,13 – 4,08%) a *Ascaris* spp. (0,74%; 95% CI = 0,13 – 4,08%). V truse psov z Grécka boli prítomné aj sporocysty *Sarcocystis* spp. (5,19%; 95% CI = 2,54 – 10,32%), oocysty *Eimeria* spp. (2,96%; 95% CI = 1,16% – 7,37%) a *Isospora* spp. (2,22%; 95% CI = 0,76 – 6,33%). Vo vzorkách piesku z pláží v sledovaných lokalitách sa parazitárne zárodky nenachádzali. Naše výsledky korešpondujú s výsledkami Haralabidisa a kol. (1988), Papazahariadou a kol. (2007) ako aj Lefkaditisa a kol. (2010), podľa ktorých sa prevalencia endoparazitov u psov v Grécku pohybuje od 25,20% do 39,20%.

V truse psov z modelových lokalít Bulharska boli zárodky 6 taxónov endoparazitov zistené v 43,48% vzoriek (95% CI = 32,43 – 55,21), pričom sa najčastejšie vyskytovali vajíčka z čeľade Ancylostomatidae (37,68%; 95% CI = 27,18 – 49,48%), *Trichuris* spp. (10,14%; 95% CI = 5,00 – 19,49%) a *Capillaria* spp. (5,80%; 95% CI = 2,28 – 13,98%). Vajíčka z čeľade Taeniidae, *T. canis* a sporocysty *Sarcocystis* spp. boli detegované iba v 1,45% (95% CI = 0,26 – 8,89%) vzoriek (Obr. 2.). Radev a kol. (2015) uvádzajú, že celková prevalencia endoparazitov u túlavých psov v Bulharsku je až 65,00% a dominujú u nich vajíčka *Ancylostoma* spp.. V piesku z detského pieskoviska v meste Plovdiv sme detegovali len vajíčka strongylidného typu a v piesku z detského pieskoviska v meste Chepelare sme zistili až 13 vajíčok *Toxocara* spp. na 100 g piesku. Všetky vajíčka boli embryonované a obsahovali vitálnu larvu.

V sledovaných lokalitách v severnom Taliansku bolo na prítomnosť zárodok endoparazitov pozitívnych 37,61% (95% CI = 29,36 – 46,65%) vzoriek trusu psov. Podobné výsledky uvádzajú Riggio a kol. (2013), ktorí u psov v Taliansku zaznamenali 31,00 % prevalenciu endoparazitov. V nami zozbieranom truse sme identifikovali iba 5 taxónov parazitov (Obr. 2.). Najčastejšie sa v truse nachádzali vajíčka z čeľade Ancylostomatidae (34,19%; 95% CI = 26,22 – 43,16%). Menej často boli prítomné vajíčka *Trichuris* spp. (5,98%; 95% CI = 2,93 – 11,83%), *T. canis* (2,56%; 95% CI = 0,87 – 7,26%), *Capillaria* spp. (0,85%; 95% CI = 0,15 – 4,68%) a oocysty *Eimeria* spp. (0,85%; 95% CI = 0,15 – 4,68%).

Obr. 2. Výskyt jednotlivých taxónov parazitov v truse psov zo sledovaných lokalít



Vysoký výskyt parazitov u psov môže viesť ku kontaminácii vonkajšieho prostredia. Prostredie kontaminované vývinovými štádiami endoparazitov tak môže predstavovať zdroj infekcií u ďalších zvierat i človeka. Významným zistením bol častý nález vajíčok z čeľade Ancylostomatidae vo vzorkách trusu, pretože larvy, ktoré sa z vajíčok vyliahnu prechádzajú do pôdy a sú schopné penetrovať nepoškodenú kožu. Ľudia na plážach často chodia bosí, alebo sú v priamom kontakte s pieskom, čo vytvára príležitosť pre prestup lariev, ktoré u človeka vyvolávajú syndróm *larva migrans cutanea*.

*Táto práca bola podporená projektom Vega č. 2/0140/13 (0,8) a projektom ŠF ITMS: 26220220116 na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (0,2).*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Haralabidis S. T., Papazachariadou M. G., Koutinas A. F., Rallis T. S. A survey on the prevalence of gastrointestinal parasites of dogs in the area of Thessaloniki, Greece. *Journal of Helminthology*, 1988; 62:45-49.
- Kazacos, K. R. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *American Journal of Veterinary Research*, 1983; 44:896-900.
- Lefkaditis M., Koukeri S., Cozma V. Estimation of Gastrointestinal Helminth Parasites in Hunting Dogs from the Area of Foothills of Olympus Mountain, Northern Greece. *Bulletin Of University Of Agricultural Sciences And Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Veterinary Medicine*, 2010; 66(2):108-111.
- Papazahariadou M., Founta A., Papadopoulos E., Chliounakis S., Antoniadou-Sotiriadou K., Theodorides Y. Gastrointestinal parasites of shepherd and hunting dogs in the Serres Prefecture, Northern Greece. *Veterinary Parasitology*. 2007; 148(2):170-173.
- Radev, V., Lalkovski, N., Zhelyazkov, P., & Kostova, T. Prevalence of gastrointestinal parasites and *Dirofilaria* spp. in stray dogs from some regions in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2015 (online first).
- Riggio F., Mannella R., Ariti G., Perrucci S. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Veterinary Parasitology*. 2013; 193(1-3):78-84.  
<http://vassarstats.net>

## DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS) STUDIES ON DILUTE SOLUTIONS OF BOVINE SKIN GELATIN

Pisarčíková J.<sup>1</sup>, Farrugia C.<sup>2</sup>, Sinagra, E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Animal Physiology, SAS, Košice, Slovakia*

<sup>2</sup>*Department of Chemistry, UoM, Msida MSD 2080, Malta*

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the behaviour of dilute solutions of bovine skin gelatin using Dynamic Light Scattering (DLS). Three gelatin concentrations (0.2, 0.1, 0.05% w/w), adjusted to pH values ranging from 4 to 8, and incubated at temperatures from 25 °C to 45 °C, were analysed for scattering intensity, polydispersity index and zeta potential. Two measurement methods were compared – Single Mode measurements, where the solutions were pre-incubated and subsequently analysed by DLS, and Temperature Trend measurements, where changes in temperature were preprogrammed and controlled by the instrument. The results obtained indicated that at 0.2% w/w concentration the behaviour of gelatin in solution began to deviate from that of a dilute solution. Moreover, statistical analysis by multivariate ANOVA resulted in distinct homogeneous data subsets for the Temperature Trend analytical method rather than the Single Mode method, indicating that the former is more suitable for examination of gelatin behaviour in dilute solution using DLS.

### INTRODUCTION

Gelatin is a polypeptide produced by the partial hydrolysis of collagen derived from animal skin, connective tissue and bones (Sarbon *et al.*, 2013) and its properties are affected by variations in pH and temperature (Farrugia and Groves, 1999). Dynamic Light Scattering (DLS) is an appropriate method to study the behaviour of proteins in dilute solution. DLS measures the speed of particles undergoing Brownian motion and uses the intensity fluctuations of scattered light to measure both the protein size and zeta potential, the latter being a fundamental parameters known to affect protein stability in solution (Application notes, Malvern Instruments, 2015).

### MATERIAL AND METHODS

Three aqueous solutions of bovine skin gelatin type B, bloom strength 225 (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany), of concentrations 0.2%, 0.1%, and 0.05% w/w, were prepared by heating with stirring in water at 40 °C for 30 minutes. The pH of the solutions was adjusted to 4, 5, 6, 7, or 8 using dilute hydrochloric acid or potassium hydroxide. A first set of these solutions was incubated for 30 minutes at 25, 37 or 45 °C and their light scattering intensity, polydispersity index and zeta potential determined using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd., UK), with the temperature of the cuvette chamber set at 25, 37 and 45 °C, respectively, for the appropriate sample (*Single Mode*). A second set of solutions was subjected to light scattering intensity and zeta potential readings directly in the Zetasizer Nano ZS with a temperature program set to cover the range 25 to 45 °C, with readings taken at 4 °C intervals. Three readings for all samples were performed. The data was subjected to multivariate ANOVA statistical analysis using IBM SPSS Statistics 20.

### RESULTS AND DISCUSSION

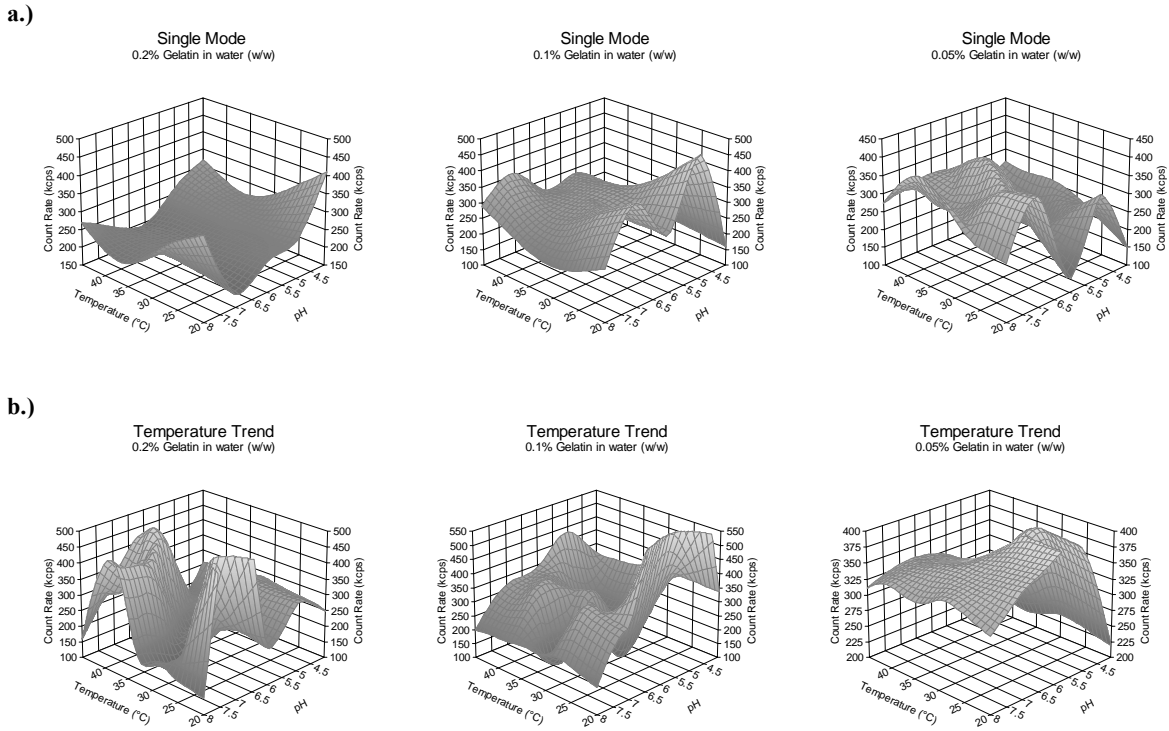
We noticed a different behaviour of 0.2% w/w gelatin solutions compared to solutions of lower concentration. In particular, for the temperature trend experiments, the highest degree of scattering was observed at pH 5, an observation consistent with the isoelectric point (IEP) of B-type gelatin, and where gelatin renaturation is most likely to occur. A possible explanation for this phenomenon is that the concentration of 0.2% w/w may represent the

limit at which renaturation behaviour is consistent with that of dilute protein solutions, as opposed to the formation of a network typical of gelation processes. Thus, at the highest concentration of 0.2% w/w gelatin, networks of gelatin molecules modified the free diffusion of particles and this lead to an atypical pH-dependency of aggregation (Fig. 1) Furthermore, this distinction was only observed in Temperature Trend mode, and not in Single Mode. Trends in polydispersity index with temperature were also observed, where the highest values were found at temperature 25 °C at all concentrations of gelatin solutions, probably due to protein renaturation resulting in a more heterogeneous protein dispersion, and decreasing with increasing temperature due to denaturation processes resulting in a more homogenous protein mixture. However, these differences were only observed to be statistically significant ( $p < 0.05$ ) in *post hoc* multivariate ANOVA analysis in Temperature Trend mode, rather than in Single Mode, indicating that the former method is probably more sensitive to such changes. Differences in the zeta potential of gelatin at different pH values were, as expected, with the isoelectric point occurring around pH 5.0. A variation in zeta potential that matches the typical titration curve of proteins was noted in Temperature Trend mode below 0.2% w/w concentration (Fig. 2), once again indicating that such a concentration may be at the borderline between dilute solution and networking behaviours. Moreover, a statistically significant temperature dependance of zeta potential, with increasingly negative zeta potential values at higher temperatures, presumably due to increased dissociation of the predominant carboxylic acid groups, was observed but only in Temperature Trend mode, once again indicating the sensitivity of this measurement method. We can therefore conclude that the behaviour of gelatin in dilute solution is best studied at concentrations below 0.2% w/w. Moreover, when the temperature of the gelatin solutions is set automatically by the DLS instrumentation, better observations of gelatin behaviour were recorded, and thus the Temperature Trend method was found to be a more suitable and powerful method for evaluation of gelatin behaviour in dilute solution.

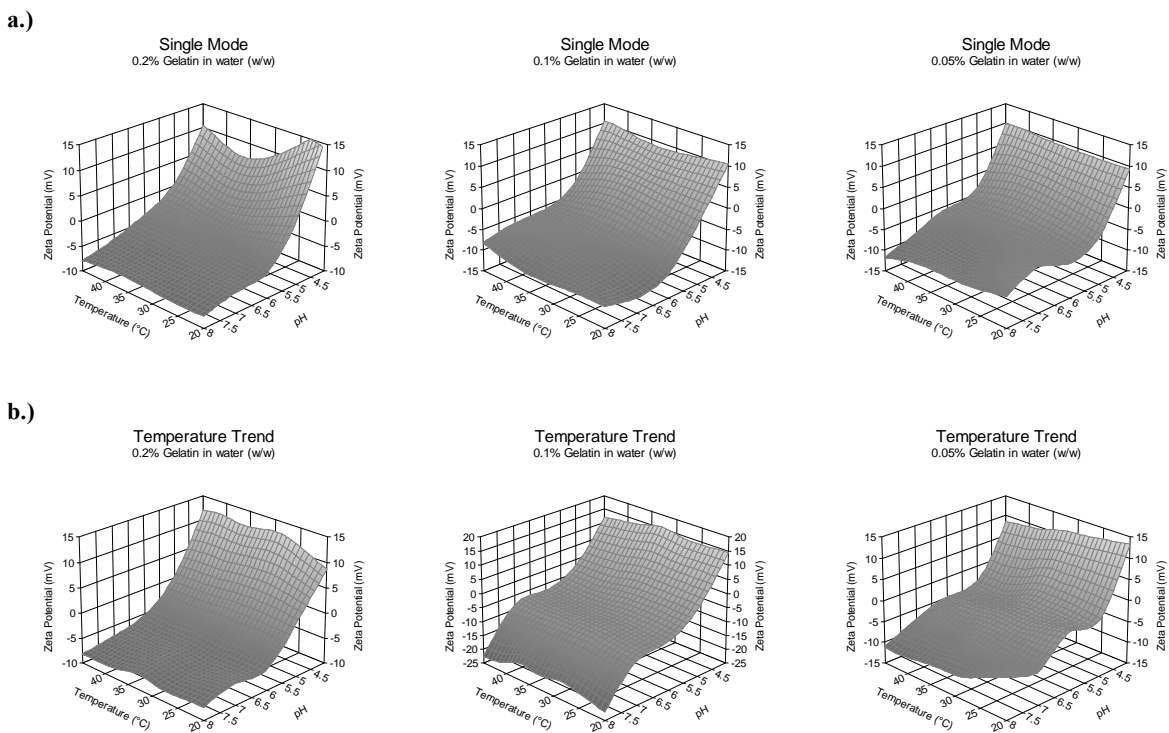
*The author would like to acknowledge the contribution of the COST Action FA1302 [www.methagene.eu](http://www.methagene.eu)*

## REFERENCES

- Farrugia CA, Groves MJ. Gelatin behaviour in dilute aqueous solution: designing a nanoparticle formulation. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999; 51:643-649.
- Malvern Instruments LTD. Zetasizer Nano Application note: Enhanced Protein Aggregation Detection Using Dual Angle Dynamic Light Scattering. 2015.
- Sarbon NM, Badii F, Howell NK. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids.* 2013; 30:143-151.



**Fig. 1 (a,b)** 3D graphs of count rate vs temperature and pH for 0.2, 0.1 and 0.05% w/w gelatin solutions for Single Mode and Temperature Trend Settings



**Fig. 2 (a,b)** 3D graphs of zeta potential vs temperature and pH for 0.2, 0.1 and 0.05% w/w gelatin solutions for Single Mode and Temperature Trend Settings



# POROVNANIE DETEKČNEJ SCHOPNOSTI MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV S MAXIMÁLNYMI LIMITMI REZÍDUIÍ VYBRANÝCH ANTIBIOTÍK POUŽÍVANÝCH VO VETERINÁRNEJ PRAXI U POTRAVINOVÝCH ZVIERAT

Poláková, Z., Kožárová, I.

*Katedra hygieny a technológie potravín , UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Zásadnou podmienkou pre produkciu bezpečných potravín je zaistenie, aby produkty živočíšneho pôvodu boli prosté škodlivých rezíduí antibiotík. Kontrola prítomnosti týchto rezíduí sa vykonáva v každej fáze produkcie až po konečný predaj spotrebiteľovi a to prostredníctvom rôznych monitorovacích programov, plánov, cielených kontrol a inšpekcií. K výkonu tejto kontroly sú potrebné citlivé a spoľahlivé testy schopné zachytiť prítomnosť rezíduí antibiotík v hladinách záujmu (maximálny limit rezíduí, /MRL/). Cieľom našej práce bolo porovnať citlivosť testovacích kmeňov dvoch mikrobiálnych inhibičných testov (MIT) s legislatívne stanovenými MRL vybraných antibiotík používaných u potravinových zvierat (penicilín, streptomycín, erytromycín, tetracyklín, ciprofloxacín a sulfadimidín). Na porovnanie bola využitá metóda STAR (úradne schválená metóda v Slovenskej republike) a relatívne novo vyvinutá alternatíva metódy STAR, skriningový test NAT (The Nouws Antibiotic Test úradne schválený v Holandsku). Oboma metódami boli príslušné antibiotiká detegované na alebo pod úrovňou MRL s výnimkou penicilínu a testovacieho kmeňa *Kocuria rhizophila*, kde bol detekčný limit oboch metód na úrovni dvojnásobne vyššej hodnoty MRL.

## ÚVOD

Základnými skriningovými metódami, ktoré sú určené pre rýchle stanovenie prítomnosti rezíduí veterinárnych liečiv v potravinách živočíšneho pôvodu sú mikrobiologické metódy. Tieto metódy sú založené na detekcii veľkého množstva vzoriek, majú vysokú priepustnosť vzoriek, relatívne nízku cenu a schopnosť detekcie látky alebo skupiny látok v hladinách záujmu. V prípade MRL musia byť tieto skriningové metódy schopné zachytávať reziduá na alebo pod týmto limitom. Podľa rozhodnutia Komisie 2002/657/ES musia byť validované a mať detekčnú schopnosť ( $CC\beta$ ) s možnosťou chýb ( $\beta$ ) nižšiu ako 5 %. Nesmú poskytovať veľké množstvo falošne - zhodných výsledkov, ktoré sa konfirmačnou analýzou určia ako negatívne. V prípade MIT detekčná schopnosť testovacieho kmeňa predstavuje najnižší obsah látky vo vzorke, ktorý môže byť stanovený a pri platňových metódach predstavuje najnižšiu koncentráciu vyšetrovanej látky, ktorá má za následok tvorbu inhibičných zón (Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES).

V našej práci boli použité dve platňové skriningové metódy so zhodným princípom detekcie (agarová difúzia), metóda STAR a NAT. Obe metódy predstavujú 5-platňový skriningový systém s príslušnými testovacími kmeňmi umožňujúci zisťovanie prítomnosti rezíduí beta-laktámových, makrolidových, aminoglykozidových, tetracyklínových antibiotík, chinolónov a sulfónamidov vo vyšetrovaných vzorkách.

Predmetom našej práce bolo porovnať detekčnú schopnosť testovacích kmeňov týchto MIT s MRL vybraných antibiotík, ktoré sa používajú vo veterinárnej praxi u potravinových zvierat. MRL sú legislatívne stanovené nariadením Komisie č. 37/2010 v platnom znení.

## MATERIÁL A METODIKA

Štandardné roztoky antibiotík: Zásobné roztoky penicilínu (PNC), streptomycínu (STR), erytromycínu (ERY), tetracyklínu (TTC), ciprofloxacínu (CFC) a na sulfadimidínu (SD) s koncentráciou  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  boli pripravené rozpustením 10 mg príslušného štandardu v demineralizovanej vode, v 2 ml 0,1N NaOH v prípade CFC alebo v 2,4 ml 5 % metanolu v prípade SD a doplnením do 10 ml sterilnou demineralizovanou vodou. Následne boli

pripravené pracovné roztoky štandardov antibiotík riedením zásobných roztokov sterilnou demineralizovanou vodou na koncentrácie 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (PNC, TTC, CFC a SD), 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (STR) a 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (ERY). STAR: Kultivačné médiá a testovacie kmene boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia), Difco (USA) a Českej zbierky mikroorganizmov (Česká republika) a pripravené podľa postupu metódy uvedenej v Zozname úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (CH 12.19., 2006). V kultivačnom médiu boli použité nasledovné koncentrácie spór: *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149  $5\times 10^6$  spór. $\text{ml}^{-1}$  (trimetoprim 0,005  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), *B. subtilis* BGA  $5\times 10^4$  spór. $\text{ml}^{-1}$ , *E. coli* ATCC 11303  $10^5$  spór. $\text{ml}^{-1}$ , *K. rhizophila* ATCC 9341  $5\times 10^4$  spór. $\text{ml}^{-1}$  a *B. cereus* ATCC 11778  $3\times 10^4$  spór. $\text{ml}^{-1}$ . Disky filtračného papiera ( $\varnothing$  9 mm, Whatman International, L.t.d., Veľká Británia) napustené 30  $\mu\text{l}$  príslušnej koncentrácie štandardu boli aplikované na povrch testovacieho agaru v Petriho miskách. Takto pripravené Petriho misky boli inkubované pri stanovenej kombinácii teploty a času inkubácie. Platne s testovacím kmeňom *Bacillus cereus* ATCC 11778 sa inkubovali pri teplote  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  počas 24 hodín. Platne s testovacím kmeňom *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus subtilis* BGA a *Escherichia coli* ATCC 11303 boli inkubované pri teplote  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  po dobu 24 hodín. Inkubácia platní s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 prebiehala pri  $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  počas 12-15 hodín.

NAT: Kultivačné médiá a testovacie kmene boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia), ), Difco (USA), CCM (Česká republika) a NCIMB Ltd. (Veľká Británia) a pripravené podľa postupu metódy Pikkemaat a kol. (2008). Použité testovacie médiá obsahovali nasledujúcu koncentráciu spór: *Bacillus pumilus* NCIMB 10822  $10^6$  spór. $\text{ml}^{-1}$ , *Bacillus subtilis* BGA  $10^5$  spór. $\text{ml}^{-1}$ , *Yersinia ruckeri* NCIM 13282  $10^6$  spór. $\text{ml}^{-1}$ , *Kocuria rhizophila* ATCC 9341  $10^6$  spór. $\text{ml}^{-1}$  a *Bacillus cereus* ATCC 11778  $10^5$  spór. $\text{ml}^{-1}$ . Na stanovenie sulfónamidov je pri metóde NAT určená testovacia platňa s prídavkom 1ml zásobného roztoku trimetoprimu ( $0,7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) tak, aby jeho výsledná koncentrácia v testovacom agare bola  $0,007\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  agaru. Na detekciu tetracyklínov je určená platňa s prídavkom 1 ml zásobného roztoku chloramfenikolu ( $62,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) tak, aby výsledná koncentrácia CAP v agarovom médiu bola  $0,625\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Disky filtračného papiera ( $\varnothing$  12,7 mm, Albet-Hahnemühle, Nemecko) napustené 100  $\mu\text{l}$  príslušnej koncentrácie štandardu boli aplikované do otvorov v testovacom agare s priemerom 14 mm. K diskom v jednotlivých otvoroch boli pridávané platňovo špecifické tlmivé roztoky: 200  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfátového tlmivého roztoku s pH 6,0 (*B. cereus*), 200  $\mu\text{l}$  0,1 M fosfátového tlmivého roztoku s pH 6,5 (*Y. ruckeri*), 200  $\mu\text{l}$  1,5 M fosfátového tlmivého roztoku s pH 8 (*K. rhizophila*), 200  $\mu\text{l}$  0,1 M TRIS tlmivého roztoku s pH 8,5 (*B. subtilis*) a 300  $\mu\text{l}$  0,133 M fosfátového tlmivého roztoku s pH 8 (*B. pumilus*). Inkubácia Petriho misiiek prebiehala pri teplote  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (platne s testovacím kmeňom (*Yersinia ruckeri* NCIM a *Bacillus cereus* ATCC 11778) a pri teplote  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (platne s testovacím kmeňom *Bacillus pumilus* NCIMB 10822, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 a *Bacillus subtilis* BGA) počas 24 hodín.

## VÝSLEDKY

Veľkosti inhibičných zón (IZ) boli merané v mm od okraja papierového disku po vonkajší okraj IZ (STAR) alebo ako priemer IZ od jedného okraja k druhému (NAT) pomocou digitálneho posuvného meradla s presnosťou na 0,01 mm (Mitutoyo, Japonsko).

Na základe nami získaných výsledkov môžeme zhodnotiť, že z pohľadu detekčnej schopnosti testovacích kmeňov sú oba skriningové testy porovnateľné. V oboch prípadoch jednotlivé testovacie kmene zachytili prítomnosť reziduí na alebo hlboko pod úrovňou MRL. Iba v prípade testovacie kmeňa *K. rhizophila* u metódy STAR a aj NAT sa nepodarilo zachytiť prítomnosť reziduálnych koncentrácií PNC ani na dvojnásobnej úrovni MRL. Metóda STAR

však na testovanie prítomnosti rezíduí beta-laktámových antibiotík využíva aj kmeň *B. stearothermophilus*, ktorého použitím bol PNC detegovaný hlboko pod úrovňou MRL. Dosaiahnuté výsledky sú prezentované v Tab. 1. ako priemerné veľkosti IZ mm  $\pm$  smerodajná odchýlka (SD).

Tab. 1: Priemerné veľkosti IZ (mm  $\pm$  SD) vytvorené reziduálnymi koncentraciami štandardných roztokov antibiotík pri metóde STAR a NAT

Metóda	Testovací kmeň	IZ (mm $\pm$ SD)					
	<b>PNC</b> (beta-laktámové antibiotiká)	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b> (MRL)	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>K. rhizophila</i>	-	-	-	-	3,12 $\pm$ 1,79	5,76 $\pm$ 1,99
	<i>B. stearothermophilus</i>	9,8 $\pm$ 1,11	10,66 $\pm$ 0,62	11,57 $\pm$ 0,55	13,11 $\pm$ 1,20	13,38 $\pm$ 1,01	18,9 $\pm$ 1,17
<b>NAT</b>	<i>K. rhizophila</i>	-	-	-	-	20,72 $\pm$ 0,0	28,76 $\pm$ 1,86
	<b>STR</b> (aminoglykozidové antibiotiká)	<b>0,1</b>	<b>0,2</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,5</b> (MRL)	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>B. subtilis</i>	1,22 $\pm$ 0,48	1,02 $\pm$ 0,35	1,65 $\pm$ 0,43	1,26 $\pm$ 0,41	1,56 $\pm$ 0,37	1,95 $\pm$ 0,26
<b>NAT</b>		-	16,55 $\pm$ 0,87	17,03 $\pm$ 0,74	16,62 $\pm$ 0,58	16,37 $\pm$ 0,00	18,64 $\pm$ 1,23
	<b>ERY</b> (makrolidové antibiotiká)	<b>0,05</b>	<b>0,1</b>	<b>0,2</b> (MRL)	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>K. rhizophila</i>	1,76 $\pm$ 0,55	1,84 $\pm$ 0,45	4,26 $\pm$ 0,94	5,31 $\pm$ 0,50	5,18 $\pm$ 0,65	3,95 $\pm$ 0,67
<b>NAT</b>		-	17,82 $\pm$ 0,17	22,96 $\pm$ 0,91	24,48 $\pm$ 0,63	24,82 $\pm$ 0,80	21,37 $\pm$ 0,73
	<b>CFC</b> (chinolóny)	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b> (MRL)	<b>0,2</b>	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>E. coli</i>	3,78 $\pm$ 0,64	4,17 $\pm$ 0,75	4,88 $\pm$ 0,65	6,68 $\pm$ 0,66	7,46 $\pm$ 0,82	11,25 $\pm$ 0,76
<b>NAT</b>	<i>Y. ruckeri</i>	-	-	1,17 $\pm$ 0,32	17,66 $\pm$ 0,94	20,43 $\pm$ 1,13	33,14 $\pm$ 0,24
	<b>TTC</b> (tetracyklínové antibiotiká)	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b> (MRL)	<b>0,2</b>	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>B. cereus</i>	3,65 $\pm$ 0,58	3,50 $\pm$ 0,43	4,04 $\pm$ 0,51	4,95 $\pm$ 0,61	6,27 $\pm$ 0,58	9,18 $\pm$ 0,86
<b>NAT</b>		19,49 $\pm$ 0,22	26,26 $\pm$ 1,20	26,00 $\pm$ 1,08	27,46 $\pm$ 0,02	28,43 $\pm$ 0,66	33,24 $\pm$ 2,26
	<b>SD</b> (sulfónamidy)	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,1</b> (MRL)	<b>0,2</b>	<b>1</b>
<b>STAR</b>	<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	2,81 $\pm$ 1,01	3,46 $\pm$ 0,86	8,22 $\pm$ 2,17
<b>NAT</b>	<i>B. pumilus</i>	30,66 $\pm$ 0,86	34,39 $\pm$ 1,19	35,76 $\pm$ 0,95	30,93 $\pm$ 3,15	30,54 $\pm$ 4,94	38,25 $\pm$ 1,44

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že detekčná schopnosť testovacích kmeňov oboch skríningových metód je porovnateľná. Použitím metódy STAR a NAT boli pod alebo na úrovni MRL detegované všetky testované štandardy antibiotík. Výnimku tvoril len testovací kmeň *K. rhizophila* oboch metód, ktorý detegoval prítomnosť reziduálnych koncentrácií štandardu PNC až na úrovni dvojnásobku MRL (0,2  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Pre relevantný skrining rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu oba MIT vykazujú požadovanú úroveň detekcie.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- CH 12.19. Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR). Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky, Doplnok 1/2006, 38, 2006, 68 – 81.
- Nariadenie Komisie (EÚ) č. 37/2010 z 22. decembra 2009 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. In: Úradný vestník Európskej únie, L 15, 1 - 72.
- Pikkemaat, M. G., Dijk, S. O., Schouten, J., Rapallini, M., Egmond, H. J. A new microbial screening method for the detection of antimicrobial residues in slaughter animals: The Nouws antibiotic test (NAT-screening). Food control. 2008; 19: 781 – 789.
- Rozhodnutie Komisie 2002/657/ES z 12. augusta 2002, ktorým sa implementuje smernica Rady 96/23/EHS, ktorá sa týka uplatňovania analytických metód a interpretácie výsledkov. In: Úradný vestník Európskej únie, L 221, 17. 8. 2002, 10 s.

## EXPRESIA PROZÁPALOVÝCH CYTOKÍNOV V IZOLOVANÝCH KURACÍCH PMBCS PO ICH STIMULÁCII PROBIOTICKÝMI BAKTÉRIAMI A INFEKCIÍ *C. JEJUNI* V *IN VITRO*

Stašová D.<sup>1</sup>, Bobíková K.<sup>2</sup>, Husáková E.<sup>2</sup>, Karaffová, V.<sup>2</sup>, Lauková, A.<sup>3</sup>, Levkutová M.<sup>1</sup>, Levkut M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Katedra epizootológie a parazitológie, UVLF Košice

<sup>2</sup>Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice

<sup>3</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV Košice

### ABSTRAKT

Cieľom tejto *in vitro* experimentálnej štúdie bolo otestovať imunomodulačnú schopnosť vybraných probiotických baktérií odpovedať na infekciu *C. jejuni* cez expresiu prozápalových cytokínov. K izolovaným periférnym krvným PMBCs bol pridaný *Campylobacter jejuni* CCM619 a vybrané probiotické baktérie: *E. faecium* EF55, *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1. Stupeň relatívnej expresie mRNA pre vybrané cytokíny bol stanovený 24h a 48h po infekcii použitím qRT-PCR metódy. Stupeň expresie IL-1 $\beta$ , LITAF a MIP-1 $\beta$  bol signifikantne zvýšený ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.001$ ) v LAD+CJ (*L. fermentum* AD1+*Campylobacter jejuni*) skupine, v porovnaní s kontrolnou skupinou (C), CJ skupinou (*Campylobacter jejuni*) a ostatnými kombinovanými skupinami (EF55+CJ, AL41+CJ, H31+CJ) 24 h po infekcii. Výsledky preukázali najvyššiu imunomodulačnú aktivitu *L. fermentum* AD1 a *E. faecium* AL41 oproti kampylobakteriovej infekcii v *in vitro* podmienkach.

### ÚVOD

Kampylobakteriôza spôsobená baktériami rodu *Campylobacter* sa považuje za jednu z najčastejších gastroenteritíd zvierat a ľudí (Alter a kol., 2005). Najčastejším pôvodcom akútnych enteritíd je baktéria *Campylobacter jejuni*. Hydina je považovaná za primárneho rezervoárového hostiteľa kampylobakterov, pričom pre dospelú hydinu sú väčšinou nepatogénne. V súčasnosti existuje niekoľko patogenetických markerov, no patogenéza infekcie u hydiny nie je stále dobre preštudovaná (Fernandes a kol., 2010).

Vo všeobecnosti je známe, že aplikácia probiotických baktérií môže efektívne ovplyvniť zlepšenie mikroflóry a tým znížiť výskyt mnohých črevných infekcií, ktoré sú najčastejším dôvodom úhynu mladých kurčiat. Medzi tieto črevné infekcie v chovoch hydiny patrí hlavne salmonelóza a kampylobakteriôza. Probiotické kmene regulujú imunitnú elimináciu antigénov patogénnych mikroorganizmov a taktiež ovplyvňujú systémovú imunitnú odpoveď hostiteľa (Nemcová a kol., 2010). Patogén *C. jejuni* aktivuje imunitnú odpoveď kurčiat aj cez produkciu prozápalových cytokínov, ktorá je zväčša nepostačujúca na elimináciu patogéna z organizmu hostiteľa (Tu a kol., 2008). Pochopenie mechanizmov účinku probiotických baktérií na hostiteľský organizmus môže výrazne prispieť k efektívnemu potlačaniu tejto infekcie (Willis a Reid, 2008). Kmene *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* a iné patria k početným mikroorganizmom, u ktorých boli dokázané pozitívne vlastnosti zahŕňajúce antibakteriálny efekt na možné patogénne kmene rovnako ako imunomodulačný efekt súvisiaci s redukciou infekcii a lepším zotavovaním (Heineman a kol., 2012; Hemarajata a kol., 2013).

K výberu probiotických baktérií sme uskutočnili *in vitro* štúdiu ktorá poskytla hodnotné informácie o ich prospešnom pôsobení a následne na základe týchto poznatkov sme hodnotili či môžu byť vybrané probiotické kmene imunologicky efektívne pre prevenciu a liečbu infekcie u kurčiat vyvolanej *C. jejuni*.

## MATERIÁL A METODIKA

Krv bola odobratá z *vena cutanea ulnaris* do 1,5% EDTA z klinicky zdravej hydiny, chovanej v štandardných podmienkach chovu. Následne bola nariadená v PBS v pomere 1:2 a prenesená do Leucoseps skúmavok (Greiner bio-one, DE) s obsahom hustotného gradientu Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, UK). Po centrifugácii 19000 rpm pri 20°C 40 min. vzniknutý prstenec buniek bol prenesený do 1ml PBS a následne 2x premytý pri 16000 rpm 5min. Životaschopnosť buniek bola stanovená pomocou trypanovej modrej a počet získaných buniek počítaný v Bürkerovej komôrke v 50 malých štvorcoch.

Izolované bunky PMBCs (*peripheral mononuclear blood cells*) boli kultivované na 12-jamkovej kultivačnej platničke (Orange Scientific, BE) v počte  $1 \times 10^7$  buniek/ml a kultivované cez noc v CO<sub>2</sub> termostate (5% CO<sub>2</sub>) pri teplote 39°C v médiu RPMI 1640 obohatenom s 10mM HEPES (Lonza, BE) a 10% bovinným fetálnym sérom (Lonza, BE). Po kultivácii cez noc k PMBCs boli do príslušných jamiek kultivačnej platničky pridané 200 µl *C. jejuni* CCM6191 v počte  $1 \times 10^8$  CFU/ml a 200 µl vybraných probiotických kmeňov: *E. faecium* EF 55, *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1 v počte  $1 \times 10^9$  CFU/ml. (poskytnuté: Dr. Lauková, IAP SAS, Košice, Slovensko). Po pridaní baktérií boli PMBCs kultivované počas 24 a 48 hodín.

Po 24 a 48 hodinovej kultivácii boli bunky z jednotlivých jamiek odsaté pomocou pipety a centrifugované pri 12900 rpm 1min. K vzniknutému peletu buniek bol pridaný lyzačný pufer s obsahom β-merkaptóetanolu (Qiagen, USA). K získanému celobunkovému lyzátu bol pridaný 70% etanol v pomere 1:1 a celá zmes bola homogenizovaná pomocou vortex mixéra (Labnet, USA) 1min. Vzniknutý celobunkový lyzáat bol ďalej použitý na samotnú izoláciu RNA. Izolácia total RNA sa vykonala použitím RNAasy mini kitu podľa inštrukcií výrobcu (Qiagen, USA).

Stupeň relatívnej expresie cytokínov IL-1β, LITAF, chemokínov MIP1β, K60 (IL-8) bol stanovený pomocou qRT-PCR. Stupeň expresie cieľových génov bol normovaný voči 2 referenčným génom: glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) a ubikvitínín (UB).

Na štatistickú analýzu získaných údajov bola použitá jednocestná ANOVA a Tukey test v programe Minitab 16 (SCaC Partner, Brno).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo všetkých testovaných probiotických kmeňov bol zaznamenaný signifikantne najvyšší stupeň relatívnej expresie vybraných cytokínov a chemokínov po kultivácii s *L. fermentum* AD1 (24 h p.i.) a *E. faecium* AL41 (48 h p.i.). V našom experimente sme potvrdili, že použité kmene sú schopne navodiť zvýšenie expresie IL-1β, LITAF a chemokínu MIP1β v *in vitro* podmienkach, čo poukazuje ich imunomodulačný účinok.

V práci Bobíková a kol. (2014) poukázali na prozápalovú aktivitu *E. faecium* AL41 v krvi hydiny infikovanej *Salmonella* Enteritidis PT4. Výsledky prezentované v práci Chaveraach a kol. (2004) rovnako dokumentovali, že *Lactobacillus* P93 izolovaný z čriev hydiny vykazoval baktericídnu aktivitu voči testovaným kmeňom *Campylobacter* spp. V prácach autorov Jin a kol., (1996) a Todorov a kol., (2005) bol taktiež dokázaný inhibičný vplyv bakteriocínov produkovaných kmeňom *Lactobacillus* spp. na gramnegatívne baktérie.

Na záver je možné konštatovať, že nami testované probiotické kmene *E. faecium* AL41 a *L. fermentum* AD1 sú schopné stimulovať PMBCs zvýšením expresie prozápalových cytokínov v *in vitro* podmienkach.

Dosiahnuté výsledky v tejto práci významne poukazujú na opodstatnenosť výskumu, ktorý sa venuje štúdiu probiotických baktérií.

*Táto práca bola podporená grantovými úlohami VEGA č. 1/0483/15 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0302-11.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alter T, Gaulle F, Kasimir S, Gürtler M, Mielke H, Linnebur M, Fehlhaber K. Prevalences and transmission routes of *Campylobacter spp.* strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiol.* 2005; 108: 251-61.
- Willis WL, Reid L. Environment, well-being, and behavior, investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science.* 2008; 87:606–611, doi: 10.3382/ps.2006-00458.
- Heineman J, Bubenik S, McClave S, Martindale R. Fighting fire with fire: is it time to use probiotics to manage pathogenic bacterial diseases? *Current Gastroenterology Reports.* 2012; 14: 343–348, doi:10.1007/s11894-012-0274-4.
- Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology.* 2013; 6(1): 39–51, doi:[10.1177/1756283X12459294](https://doi.org/10.1177/1756283X12459294).
- Bobíková K, Husáková E, Spišáková V, Levkutová M, Lauková A, Levkut M. The dynamic effect of a probiotic strain for the expression of cytokine in blood of chickens infected with *S. Enteritidis* PT4. *Infectious and parasitic diseases of animals 5th international Scientific Conference.* 2014; 144, ISBN 978-80-8077-411-0.
- Chaveerach P, Lipman LJ, Knapen F. Antagonistic activities of several bacteria on in vitro growth of 10 strains of *Campylobacter jejuni/coli*. *International Journal of Food Microbiology.* 2004; 90(1): 43–50, doi:10.1016/S0168-1605(03)00170-3.
- Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Ali MA, Jalaludin S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in Applied Microbiology.* 1996; 23(2): 67–71, doi: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb00032.x.
- Fernandes M, Mena C, Silva J, Teixeira P. Study of cytolethal distending toxin (cdt) in *Campylobacter coli* using a multiplex polymerase chain reaction assay and its distribution among clinical and food strains. *Foodborne Pathog Dis.* 2010; 7(1): 103-106.
- Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology.* 2005; 36(2-3): 318-326.
- Nemcová R, Grančíková S, Mudroňová D, Koščová J, Buleca V. Probiotiká a naturálne látky v chove hospodárskych zvierat. Editorial Centre UVM Košice, 2010, s.44, ISBN 978-80-8077-185-0.
- Tu, Q.V., McGuckin, M.A., Mendz, G.L., *Campylobacter jejuni* response to human mucin MUC2: modulation of colonization and pathogenicity determinants. *Journal of Medical Microbiology.* 2008; 57: 795-802, doi: 10.1099/jmm.0.47752-0.

## MORFOLOGICKÉ A PROLIFERAČNÉ VLASTNOSTI MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK DERIVOVANÝCH Z TUKU

Székiová E.<sup>1</sup> Slovinská L<sup>1</sup>, Blaško J<sup>1</sup>, Plšíková J.<sup>2</sup> Harvanová D<sup>2</sup> a Čížková D<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice

<sup>2</sup>Združená tkanivová banka LF UPJŠ, Košice

### ABSTRAKT

Mezenchýmové kmeňové bunky sú multipotentné bunky (MSCs), ktoré je možné izolovať z rôznych tkanív. Pre svoj terapeutický efekt si našli uplatnenie v liečbe rôznych ochorení vrátane poškodenia CNS. V našej práci sme sledovali morfológické, fenotypové a proliferačné vlastnosti MSCs izolovaných z podkožného tuku potkanov kmeňa Wistar.

**Kľúčové slová:** mezenchýmové kmeňové bunky, *in vitro* kultivácia, špecifické povrchové markery

### ÚVOD

Poranenie miechy (PM) patrí k vážnym ochoreniam CNS, ktoré vedie k čiastočnému alebo úplnému ochrnutiu pacientov. Z hľadiska výsledkov biomedicínskeho výskumu, sú mezenchýmové kmeňové bunky (MSCs) vhodným zdrojom kmeňových buniek pre terapiu PM. MSCs sú schopné diferenciácie do mnohých bunkových typov, produkujú dôležité rastové, antiapoptotické faktory a cytokíny, a majú schopnosť ovplyvňovať bunky imunitného systému. V *in vitro* podmienkach sú schopné vysokej proliferačnej aktivity, avšak majú svoj expanzný limit (J. Rosocha a kol., 2008). Vďaka týmto vlastnostiam a možnosti získať veľký počet buniek v laboratórnych podmienkach, sú vhodným kandidátom na liečbu širokej škály tkanív, medziinými aj nervového tkaniva (Zhilai Zhou a kol., 2013). Pre ich úspešnú aplikáciu v klinickej praxi je dôležité selektovať optimálny typ MSCs, zvládnuť ich *in vitro* kultiváciu, poznať ich vlastnosti a možný terapeutický efekt. V súčasnosti sa MSCs získavajú z rôznych typov tkanív, napr. z kostnej drene, pupočníkovej krvi, pupočníkov, placenty, zubnej pulpy, tukového tkaniva (Venkata Ramesh Dasari a kol., 2014).

V našej práci sme sa zamerali na: i) izoláciu MSCs z podkožného tuku (ATMSCs) potkana, ii) *in vitro* kultiváciu s cieľom identifikovať morfológické vlastnosti, iii) fenotypovú charakterizáciu v 2. a 3. pasáži pomocou prietokovej cytometrie (prítomnosť špecifických povrchových markerov pre MSCs (CD90+, CD291) a stanovenie proliferačnej aktivity buniek v jednotlivých časových úsekoch (0., 2., 3., 5. a 7. deň *in vitro* kultivácie) pomocou CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay Kitu.

Na základe súčasných vedeckých poznatkov, boli Medzinárodnou spoločnosťou pre bunkovú terapiu stanovené minimálne kritériá, pomocou ktorých sú MSCs definované (J. Rosocha kol.):

1. Adherenciou k povrchu kultivačne fľaše v štandardnej statickej kultúre
2. Minimálne 95% MSCs musí exprimovať povrchové molekuly CD105, CD73, CD90 a nesmie exprimovať hematopoetické markery ako sú CD45, CD34, CD14 alebo CD11b, CD79 alebo CD19 a HLA-DR.
3. MSCs musia byť schopné diferencovať sa do osteoblastov, adipocytov a chondroblastov *in vitro*.

### MATERIÁL A METÓDY

Bunky boli izolované z podkožného tuku potkana kmeňa Wistar o hmotnosti 360g po terminálnej anestézii tiopentalom (50mg/kg i.p.). Sterilne odobratý tuk bol prenesený do odberového média s antibiotikami (ATM, Biowest) a ďalej spracovaný v laminárnom boxe. Tu bolo tkanivo po niekoľkonásobnom antibiotickom oplachu disekované a prenesené do 0,25% roztoku kolagenázy typ I (Gibco) na hodinovú inkubáciu pri 37°C za stáleho miešania.

Po inkubácii sme pridali na inaktiváciu ďalšieho pôsobenia kolagenázy kultivačné médium so sérom. Tkanivový debris bol odstránený filtráciou cez 100µm filter a bunkovú suspenziu sme centrifugovali ( 400 x g /10min.). Získaný sediment bol resuspendovaný v kultivačnom médiu (MEM, 10% fetálne bovinné sérum, 1% antibiotiká) a nasadený na kultivačnú fľašu. Inkubácia prebiehala v CO<sub>2</sub> termostate pri 37<sup>0</sup>C, médium bolo menené v intervale 3 dní. Približne o 5-7 dní kedy dosahujú bunky 90% konfluenciu, bola kultúra pasážovaná aspirovaním kultivačného média a pridaním 4 ml 0,25% trypsinsin-EDTA do každej fľaše. Po niekoľkominútovej inkubácii v termostate bolo k uvoľneným bunkám pridané rovnaké množstvo sérového média na inaktiváciu účinku trypsínu a získaná suspenzia bola centrifugovaná ( 400 x g /10min.) . Bunky boli na kultivačnú fľašu nasadené v koncentrácii 2500/cm<sup>2</sup>. Pre potvrdenie MSCs fenotypovej charakteristiky boli bunky v 2. a 3. pasáži analyzované prietokovou cytometriou na prítomnosť špecifických povrchových markerov (CD90, CD 29 ) a neprítomnosť špecifických markerov hematopoetických a endoteliálnych buniek (CD 45 a CD 31). Vzorky boli spracované na prietokovom cytometri FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) s využitím CellQuest softvéru .

Výsledky a diskusia: 24 hodín po izolácii z tukového tkaniva časť buniek adheruje k povrchu kultivačnej fľaše a morfológicky môžeme detekovať bunky vretienkovitej morfológie typickej pre MSCs. Bunky vykazujú veľmi dobrú proliferáciu schopnosť, jednotlivé pasáže boli uskutočňované v 5 až 7 dňových intervaloch. Prietokovou cytometriou sme už v druhej pasáži potvrdili 95% prítomnosť MSCs v ešte heterogénnej bunkovej kultúre. Záverom môžeme konštatovať, že tukové tkanivo je vhodným zdrojom mezenchýmových kmeňových buniek pre *in vitro* kultiváciu, avšak naďalej ostáva otázkou spôsob odlišenia MSCs od fibroblastov, s ktorými majú veľmi podobnú morfológiu a špecifické povrchové markery, ako aj ich vhodnosť pre využitie v terapii poškodeného nervového tkaniva.

*Práca vznikla vďaka podpore v rámci projektu VEGA-2/0169/13, VEGA/0125/15*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- J. Rosocha, P. Cibur –Lidské mezenchymové kmenové bunky. Biologické aspekty regenerační medicíny, 2008
- Zhilai Zhou, Yinhai Chen, Hui Zhang - Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. Cytotherapy, Vol. 15, Issue 4, April 2013
- Venkata Ramesh Dasari, Krishna Kumar Veeravalli, and Dzung H Dinh - Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. World J Stem Cells. 2014 Apr 26; 6(2): 120–133



## SENZITIVITA A ŠPECIFICITA SÉROLOGICKÝCH ELISA TESTOV NA DETEKCIU ŠPECIFICKÝCH PROTILÁTKOVI PROTI *ECHINOCOCCUS* SPP.

Škutová M., Antolová D., Reiterová K.

Parazitologický Ústav SAV, Košice

### ABSTRAKT

Echinokokóza, ako jedna z najzávažnejších parazitozoonóz cirkulujúcich na území Slovenska, môže v neliečených prípadoch spôsobiť smrť človeka a preto je jej včasná diagnostika obzvlášť dôležitá. Citlivosť a špecificita sérologických testov, ktoré predstavujú východisko pre diagnostiku, sú predmetom mnohých diskusií. Cieľom práce bolo overenie a porovnanie týchto parametrov, prediktívnych hodnôt a koeficientov pravdepodobnosti u somatického antigénu *E. multilocularis* (AgEm) a antigénu B *E. granulosus* (AgB) a u komerčných testov NovaLisa™ *Echinococcus* IgG a *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier. Vyšetrením 81 vzoriek bolo zistené, že najrelevantnejšie výsledky v rámci sérodiagnostiky protilátok proti *E. multilocularis* poskytol ELISA test s použitím somatického Em antigénu. Hodnoty sledovaných parametrov zoradili použité antigény/testy v poradí AgEm, *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier, NovaLisa™ *Echinococcus* IgG a ako najmenej významný AgB, ktorý bol najmenej špecifický a teda najmenej vhodný na odlíšenie ochorenia *E. multilocularis* a *E. granulosus*.

### ÚVOD

Echinokokóza je jedna z najzávažnejších parazitozoonóz cirkulujúcich na území Slovenska. Na Slovensku sa vyskytujú dve formy tohto ochorenia: menej závažná cystická echinokokóza, ktorej pôvodcom je pásomnica *Echinococcus granulosus* a alveolárna echinokokóza spôsobená pásomnicou liščou, *E. multilocularis*. Ochorenie je v prípade nakazenia človeka mimoriadne nebezpečné. V dôsledku pomaly sa vyvíjajúcich nešpecifických príznakov a nesprávnej diagnostiky ostáva nákaza mnohokrát neodhalená. Pri neliečení alebo nesprávnej terapii ochorenie často končí v priebehu 10-15 rokov smrťou pacienta. Včasné odhalenie a správne odlíšenie pôvodcu nákazy sú preto obzvlášť dôležité a rozhodujúce pre vedenie terapie a určenie prognózy pacienta. Pri podozrení na ochorenie je základnou diagnostickou metódou sérologické vyšetrenie na prítomnosť protilátok proti *Echinococcus* spp. v krvi. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) test využíva väzbu prítomných protilátok na antigény. Trh ponúka množstvo sérologických testov fungujúcich na podobnom princípe. Avšak citlivosť a špecificita testov je predmetom mnohých diskusií. Preto sa odporúča overiť správnosť výsledku špecifickejším testom Western Blotom. Súčasne sa pre potvrdenie ochorenia u ľudí využívajú zobrazovacie metódy (USG, CT, MR), priama detekcia parazita z histologického preparátu a molekulárne metódy (PCR). Cieľom práce bolo overenie a porovnanie citlivosti, špecificity a skríženej reaktivity sérologických ELISA testov založených na väzbe špecifických protilátok z krvného séra ľudí na antigény *E. multilocularis* (AgEm), *E. granulosus* (AgB) a komerčných testov NovaLisa™ *Echinococcus* IgG (NovaTec Immunodiagnostica GmbH, Nemecko) a *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier (Bordier Affinity Products SA, Švajčiarsko).

### MATERIÁL A METODIKA

Do výskumu bolo zaradených spolu 81 vzoriek sér, pričom 51 vzoriek pochádzalo od klinicky zdravých osôb, ktoré v čase odberu netrpeli žiadnym ochorením. Dvanásť vzoriek pochádzalo od pacientov s potvrdenou alveolárnou echinokokózou, štyri séra od osôb s potvrdenou cystickou echinokokózou. Z dôvodu overenia výskytu krížových reakcií s inými parazitózami bolo do prieskumu zaradených 11 sér vykazujúcich pozitivitu na toxokarózu a dve séra od

osôb s trichinelózou. U šiestich osôb bola potvrdená toxoplazmóza, jedna vzorka bola od pacienta s podkožnou dirofilariózou a jedna od pacienta s riketsiózou.

Na stanovenie prítomnosti protilátok proti *E. multilocularis* bol použitý somatický antigén *E. multilocularis* (AgEm) (Turčeková a kol., 2004) a na detekciu protilátok proti *E. granulosus* bol použitý antigén B (AgB) (Ioppolo a kol., 1996). ELISA testy boli vykonané podľa vypracovanej metodiky (Reiterová a kol., 2014). Ako pozitívne boli hodnotené tie séra, ktorých absorbancia bola vyššia ako 40% hodnoty priemeru pozitívnych kontrol. Prítomnosť protilátok proti *Echinococcus* spp. bola detegovaná komerčným sérologickým testom NovaLisa™ *Echinococcus* IgG (NovaTec Immunodiagnostica GMBH, Nemecko), metodikou odporúčanou výrobcom. Vzorky boli vyšetrené aj komerčným sérologickým testom *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier (Bordier Affinity Products SA, Švajčiarsko) podľa návodu odporúčaného výrobcom. Ako indikátory diagnostickej významnosti testu boli sledované hodnoty senzitivity - citlivosti (Se), špecificity (Šp), pozitívnej prediktívnej hodnoty (PH+) a negatívnej prediktívnej hodnoty (PH-). Pre posúdenie hodnoty diagnostického testu boli využité aj koeficienty pravdepodobnosti pre pozitívny a negatívny výsledok testu (LR+ a LR-) (Altman a kol., 1994; Kováč, 1994; Deeks a kol. 2004; Knapp a kol., 2014). Významnosť rozdielov sledovaných parametrov testov bola analyzovaná chi-square testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Desať z dvanástich sér pacientov pozitívnych na alveolárnu echinokokózu bolo pozitívnych v ELISA teste s použitím Em antigénu (83,3% senzitivita), teda Em antigén zachytí protilátky proti alveolárnej echinokokóze u 83% prípadov ochorenia. Veľmi podobná citlivosť bola pozorovaná pri komerčnom teste *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier, kde z jedenástich sér test neodhalil ochorenie taktiež v dvoch prípadoch (81,8% senzitivita) a komerčný test NovaLisa, ktorý z 15 sér pozitívnych na alveolárnu a cystickú echinokokózu identifikoval protilátky v dvanástich prípadoch, čo zodpovedá 80% senzitivite testu. Najvyššia citlivosť bola zaznamenaná antigénom B pri diagnostike cystickej echinokokózy (100% senzitivita), ale s ohľadom na malú vzorku pozorovaných pacientov pozitívnych na toto ochorenie nie je výsledok sledovaného parametra štatisticky vyhodnotiteľný.

Antigén Em a test *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier rovnako iba v jednom prípade určili falošne pozitívnu vzorku zo skupiny vzoriek pozitívnych na *E. granulosus*, čím bola vypočítaná aj najvyššia hodnota špecificity pre dané testy (98,5%), NovaLisa test určil dve falošne pozitívne vzorky, avšak zo skupiny klinicky zdravých osôb (96,9% špecificita) a antigén B až v 13 prípadoch (10 zo skupiny pozitívnych na *E. multilocularis* a 3 zo skupiny klinicky zdravých osôb) určil falošne pozitívne výsledky, čo zodpovedá najnižšej hodnote špecificity (83,1%). Významnosť rozdielov senzitivity a špecificity sledovaných testov nebola v ani jednom prípade signifikantná ( $p < 0.05$ ). Výsledky ostatných parametrov porovnávaných testov (PH+, PH-, LR+, LR-) zoradili testy podľa hodnoty významnosti v rovnakom poradí ako hodnoty senzitivity a špecificity, a to AgEm, *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier, NovaLisa™ *Echinococcus* IgG a ako najmenej významný antigén B (Tab. 1).

Môžeme konštatovať, že vyšetrením 81 vzoriek bolo zistené, že najrelevantnejšie výsledky v rámci sérodiagnostiky protilátok proti *E. multilocularis* poskytol ELISA test s použitím somatického Em antigénu. Test *Echinococcus multilocularis* firmy Bordier sa ukázal ako druhý v poradí s najvyššou diagnostickou hodnotou. Oba testy určené na detekciu protilátok proti *E. multilocularis* iba v dvoch prípadoch nezachytili prítomnosť protilátok v krvnom sére napriek prebiehajúcej ochoreniu. Tento jav sa môže vyskytnúť aj v prípadoch absencie tvorby protilátok. Napriek tomu, sa tento komerčný sérologický test zdá byť diagnosticky

vhodnejší ako NovaLisa™ *Echinococcus* IgG, ktorý nezachytil prítomnosť protilátok v troch prípadoch.

Najmenej vhodný na odlišenie alveolárnej a cystickej echinokokózy bol sledovaný AgB antigén, ktorý poukázal v 13 prípadoch prítomnosť protilátok proti *E. granulosus* u pacientov s potvrdenou alveolárnou echinokokózou. Príčinou tohto javu je krížová reakcia protilátok, vďaka niektorým spoločným povrchovým antigénom *E. multilocularis* a *E. granulosus* a preto odporúčame v prípade použitia antigénu správnosť výsledku overiť špecifickejšim testom, napríklad Western Blotom. Na druhej strane sa zdá byť antigén B vysoko účinný pri odhaľovaní cystickej echinokokózy. Krížové reakcie medzi alveolárnou a cystickou echinokokózou boli zachytené aj pri použití Em antigénu a pri teste Bordier a to rovnako, v jednom prípade. Tento parameter nebol hodnotený pri NovaLisa teste, ktorý je určený len na identifikáciu protilátok proti rodu *Echinococcus* spp. Na druhej strane krížové reakcie s inými sledovanými parazitózami neboli zachytené u žiadneho použitého testu.

Antigén/ELISA set	Senzitivita (%)	Špecificita (%)	PH+ (%)	PH- (%)	LR+	LR-
AgEm (95% CI)	83,3 (54,0-96,5)	98,5 (92,6-99,9)	90,9 (60,1-99,9)	97,1 (89,6-99,8)	55,5 (35,4-82,4)	0,17 (0,02-0,19)
AgB (95 % CI)	100,0 (54,3-100,0)	83,1 (76,2-91,3)	23,5 (9,1-47,8)	100,0 (95,1-100,0)	5,9 (0,01-45,7)	0 (0,02-0,79)
NovaLisa <i>Echinococcus</i> IgG (95 % CI)	80,0 (54,1-93,7)	95,5 (86,9-98,9)	85,7 (58,8-97,2)	95,5 (86,9-98,9)	17,8 (11,1-37,4)	0,20 (0,03-0,81)
<i>Echinococcus multilocularis</i> Bordier (95% CI)	81,8 (51,2-96,0)	98,5 (95,7-99,9)	90,0 (57,4-99,9)	97,1 (89,4-99,8)	54,5 (35,4-82,4)	0,18 (0,02-0,79)

Tab.1. Sledované hodnoty diagnostickej významnosti jednotlivých ELISA testov.

Práca bolo podporená grantom VEGA 2/0127/13.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ*. 1994; 308:1552.
- Altman D.G., Bland J.M. Diagnostic tests 2: predictive values. *BMJ*. 1994; 309:102.
- Deeks J.J., Altman D.G. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ*. 2004; 329:168-9.
- Ioppolo S., Notargiacomo S., Profuma E., Franchi C., Ortona E., Rigano R., Siracusano, A. Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol*. 1996; 18:571-8.
- Knapp J., Sako Y., Grenouillet F., Bresson-Hadni S., Richou C., Gbaguidi-Haore H., Ito A., Millon L. Comparison of the serological tests ICT and ELISA for diagnosis of alveolar echinococcosis in France. *Parasite*. 2014; 21:34.
- Kováč, G. Diagnostická hodnota. *Diagnóza*. 1994; 1:6-9.
- Reiterová K., Auer H., Altintas N., Yolasigmaz K. Evaluation of purified antigen fraction in the immunodiagnosis of cystic echinococcosis. *Parasitol. Res.* 2014; 113:2861-7.
- Turčeková Ľ., Kinčeková J., Regensbogenová M., Reiterová K., Dubinský P. Immunochemical analysis of *Echinococcus granulosus* and *Echinococcus multilocularis* antigens. *J. Helminthol*. 2004; 41:179-183.

## VÝSKYT *STRONGYLOIDES STERCORALIS* U DETÍ A PSOV V RÓMSKEJ OSADE NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

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

Cieľom našej práce bolo zistiť predpokladaný výskyt *Strongyloides stercoralis* vo fécach detí, psov a dokázať prítomnosť špecifických IgG protilátok v ich sérach. Od marca 2013 do októbra 2014 bolo vyšetrených 73 detí z rovnakého mesta ( 55 detí z rómskej osady v juhovýchodnom okraji mesta Medzev a 18 z majoritnej populácie, ktorá slúžila ako kontrolná skupina). Z vyšetrených 50 psov bolo 30 z rómskej osady z mesta Medzev a 20 z útulku Únie vzájomnej pomoci ľudí a zvierat. Vzorky stolíc rómskych a nerómskych detí boli KAP, Baermannovou a Faustovou metódou negatívne na prítomnosť lariiev *Strongyloides stercoralis*. Metódou KAP boli z fécach potvrdené filariformné larvy u 23,3 % psov z osady (7/30) a u 20 % psov z útulku (4/20). Faustovou metódou boli určené rabditiformné larvy *S. stercoralis* u 13,3 % psov z osady (4/30). Baermannovou metódou sme nedetegovali žiadne larvy. Séroprevalencia u rómskych detí bola 36,36 % (20/55), u kontrolnej skupiny 27,77 % (5/18). Z vyšetrených sér psov bola zistená 68,75 % séroprevalencia strongyloidózy.

### ÚVOD

Strongyloidóza spolu s ďalšími intestinálnymi nematódami ako sú *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* a *Ancylostoma* spp. patria medzi tzv. "soil transmitted helminths" (STH), čiže pôdou prenášané helminty. STH infikujú viac ako 1 miliardu ľudí na celom svete a spôsobujú obrovskú záťaž na verejné zdravotníctvo. Sú taktiež nazývané aj ako "neglected tropical diseases" tzv. zanedbávané tropické choroby (Brooker a kol., 2006; Bethony a kol., 2006). V krajinách s komunitami marginalizovaných skupín obyvateľstva (ako sú napríklad rómske osady) dochádza v posledných rokoch k nárastu ochorení spôsobovaných STH. V týchto komunitách sú vhodné podmienky na šírenie sa týchto STH ako sú napr. obydlia s chýbajúcim zdrojom pitnej vody, kanalizáciou a sociálnym zariadením, s nedostatočnou likvidáciou odpadkov. Rómovia často trpia podvýživou a imunosupresiami rôznej etiológie. Navyše v podmienkach globálneho otepľovania infekčné larvy STH dlhodobo prežívajú v prostredí infekcieschopné (Genta, 1989; Rudohradská a kol., 2012).

*Strongyloides stercoralis* je črevný parazit ľudí, psov, mačiek, primátov, vyskytujúci sa častejšie v trópech, subtropoch, ale aj v miernom pásme na miestach s nízkym hygienickým štandardom. Odhaduje sa, že asi približne 30-100 miliónov ľudí na celom svete je infikovaných touto parazitózou (Olsen a kol., 2009). Biologický cyklus parazita je mnohotvárnny so striedaním parazitickej a voľne žijúcej generácie, preto môže byť rozdelený na 3 fázy: voľne žijúcu, parazitickú a autoinfekciu. Častejšie sú postihnutí ľudia, ktorí sú v kontakte s pôdou (poľnohospodári, farmári, lesní robotníci a pod.). Strongyloidóza patrí medzi oportúnne nákazy. Väčšinou prebieha bezpríznakovo, až pri zlyhaní, či oslabení imunitného systému môže dôjsť k hyperinfekcii, pričom hlavne postihuje dýchací a gastrointestinálny systém (Totková a kol., 2008).

### MATERIÁL A METODIKA

Vyšetřili sme 55 rómskych a 18 detí z majoritnej populácie (kontrolná skupina), ktoré boli rozdelené podľa veku na 1-5 ročné, 6-9 ročné, 10-14 ročné. Z vyšetřených 50 psov bolo 30 z rómskej osady z mesta Medzev a 20 z útulku Únie vzájomnej pomoci ľudí a zvierat. Boli rozdelení podľa veku na psy mladšie ako 7 mesiacov a psy staršie ako 7 mesiacov. Vzorky fécach boli vyšetřené tromi metódami: Koga agarové platne (Koga a kol., 1991); Baermanová

metóda (Garcia a Bruckner, 1997); flotačná metóda podľa Fausta (Faust a kol., 1938, Garcia a Bruckner, 1997). Pod svetelným mikroskopom sme vyšetrili vzorky na prítomnosť vajíčok helmintov a prítomnosť rabditiformných a filariformných lariev. Pozorovali sme morfológické charakteristiky, t.j. dĺžku larvy, tvar pažeráka, veľkosť ústnej dutiny, prítomnosť genitálneho primordia. Na kvalitatívny dôkaz špecifických IgG protilátok proti *Strongyloides stercoralis* v sére detí a psov nepriamou imunoenzymovou reakciou (ELISA) sme použili komerčný test *Strongyloides* IgG ELISA (Demeditec Diagnostics GmbH, Germany. V prípade pozitívnej imunologickej reakcie na prítomnosť IgG protilátok, absorbanca (450/630 nm, ELISA Reader OPTYS MR Thermo Labsystems) bola 0,2 OD jednotiek a vyššie.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzorky stolíc rómskych a nerómskych detí boli KAP, Baermannovou a Faustovou metódou negatívne na prítomnosť lariev *Strongyloides stercoralis*. Väčšina detí nemala žiadne klinické príznaky, ale 13 detí (17,80 %) malo ľahkú hnačku, 10 detí (13,70 %) malo bolesti brucha a svrbenie okolo perianálnej oblasti.

Z 55 rómskych detí (30 chlapcov; 25 dievčat) vykázali pozitívne IgG protilátky proti *Strongyloides stercoralis* 20 (36,36 %). Séroprevencia bola 42,1% u detí predškolského veku mladších ako 5 rokov (8/19), 27,77 % u detí školského veku 6-9 ročných (5/18) a 38,88 % u starších žiakov 10-14 ročných (7/18). Séroprevencia u kontrolnej skupiny bola 27,77 % (5/18). U rómskych detí sme tiež diagnostikovali aj iné endoparazity: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* a *Giardia intestinalis*. U jedného dievčaťa z kontrolnej skupiny sme zistili *Enterobius vermicularis* (tab. 1).

Tab.1. *Strongyloides stercoralis* – porovnanie séropozitívnych a séronegatívnych prípadov medzi rómskymi deťmi a kontrolnou skupinou

	ELISA		Risk
	+	-	
Rómske deti	20	35	0,4
Kontrolná skupina	5	13	0,3
			RR = 1,3

Metódou KAP boli z féces potvrdené filariformné larvy u 23,3 % psov z osady (7/30) a u 20 % psov z útulku (4/20). Faustovou metódou boli určené rabditiformné larvy *S. stercoralis* u 13,3 % psov z osady (4/30). Baermannovou metódou sme nedetegovali žiadne larvy *S. stercoralis*. Diagnostikovali sme tiež širokú škálu endoparazitov mäsožravcov: *Ancylostoma* / *Uncinaria* spp., *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina*, *Trichuris vulpis*, *Capillaria* spp., *Isospora* spp., *Giardia intestinalis*, zaznamenali sme aj pasážované vajíčka ľudí a prasiat – *Ascaris* spp., *Trichuris trichiura*.

Séra 16 psov z útulku boli vyšetrené na prítomnosť *anti-Strongyloides* protilátky pomocou ELISA metódy. Z vyšetrených sér bola zistená 68,75 % séroprevencia strongyloidózy. U psov mladších ako 7 mesiacov bola 100 % (5/5), u psov starších ako 7 mesiacov bola 54,5 % (6/11).

Na území Slovenska bola sporadicky zaznamenaná strongyloidóza. Prvé záznamy sú z Podkarpatskej Rusi u troch pacientov, ktoré ako prvý zaznamenal Dziuban (1928). Neskôr vyšetrením 3 500 pacientov zistil ďalších 16 prípadov strongyloidózy ľudí, pričom až 11 pacientov pochádzalo z juhovýchodného Slovenska (Dziuban, 1962). V bývalej ČSSR do roku 1982 bolo opísaných 44 prípadov autochtónnej strongyloidózy, z toho 16 prípadov bolo zistených v južnej oblasti východného Slovenska (Giboda a Maloveska, 1982). V ČSSR

v rokoch 1983-1987 bolo hlásených ďalších 15 prípadov, v roku 1995 boli opísané tri prípady strongyloidózy ľudí, pričom v dvoch z nich sa jednalo o fatálnu diseminovanú formu pri imunitnej nedostatočnosti (Jíra, 1998). V našej práci sme potvrdili prítomnosť rabditiformných a filariformných lariiev *Strongyloides stercoralis* parazitologickým vyšetrením trusu psov a sérologickým vyšetrením u detí a psov. Práve nízky hygienický štandard, vlhko, obydlia s hlinenými podlahami a spoločné spolunažívanie psov a ľudí v domoch v tejto osade, vytvára vhodné podmienky na šírenie a udržiavanie tohto parazita.

*Práca je podporovaná grantovou úlohou VEGA 1/0455/15, VEGA 1/0063/13.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 2006; 367: 1521-1532.
- Brooker S, Clements ACA, Bundy DAP. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. *Adv. Parasitol.* 2006; 62: 221-261.
- Dziuban M. Niektoré pozorovania a poznatky týkajúce sa strongyloidózy na Slovensku. *Čs. epidemiol.* 11, 1962; 2: 139-144.
- Dziuban M. Príspevek k problému intestinálnych parazitov na Podkarpatské Rusi. *Čas. lék. čes.* 67, 1928; 42: 1432-1434.
- Faust EC, D'Antonio JS, Odom V, Miller MJ, Peres C, Sawitz W, Thomen LF, Tobie J, Walker JH. 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.
- Garcia LS, Bruckner DA. *Diagnostic medical Parasitology*, 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC, ASM 1997; Press: 937 p.
- Genta RM. Global prevalence of strongyloidosis: critical review with epidemiologic insights into the prevention of disseminated disease. *Rev. Infect. Dis.* 1989; 5: 755-767.
- Giboda M, Maloveská M. Strongyloidóza na východnom Slovensku. *Bratisl. Lek. Listy*, 77, 1982; 2: 197-201.
- Jíra J. *Lekárska helmintologie. Helminthoparazitární nemoci.* Galen. 1998; 495p.
- Koga K, Kasuya S, Khamboonruang C, Sukhvat K, Ieda M, Takatsuka N, Kita K, Ohtomo H. A modified agar plate method for detection of *Strongyloides stercoralis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 54: 518-521.
- Nolan TJ, Nutman TB, Schad GA. Strongyloidosis. In: Palmer S.R., Soulsby L., Torgerson P. R., Brown, D.W.G.: *Oxford Textbook of Zoonoses. Biology, Clinical Practice, and Public Health Control.* Oxford University Press . Second Edition, 2011; Ch.57, 717-726.
- Olsen A, van Lieshout I, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis-the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2009; 103: 967-972.
- Rudohradská P, Halánová M, Ravaszová P, Goldová M, Valenčáková A, Halán M, Papajová I, Pohorencová A, Valko J, Čisláková L, Juriš P. Prevalence of intestinal parasites in children from minority group with low hygienic standards in Slovakia. *Helminthologia* 2012; 49: 63 – 66.
- Totková A, Klobušický M, Valent M. *Lekárska parazitológia.* Osveta Martin, 2008; 400 p.

## TUBULIZAČNÉ TECHNIKY PRE OPRAVU POŠKODENÝCH PERIFÉRNÝCH NERVOV

Tomko P., Vanický I.

*Neurobiologický ústav Slovenskej akadémie vied, Košice*

### ABSTRAKT

Prerušenie periférneho nervu je závažné ochorenie. K najbežnejším postupom liečby patrí zošitie alebo zlepenie koncov prerušeného nervu. K menej známym, avšak v dnešnej dobe úspešným metódam opravy patrí tubulizácia. Pri tubulizácii sa využívajú trubice vyrobené z rôznych materiálov (biologických alebo syntetických). Tieto trubice slúžia na premostenie vzniknutej medzery a navigovanie regenerujúceho sa nervu. Tento príspevok pojednáva o historickom vývoji tubulizačných techník a ich výhodách oproti iným technikám.

### ÚVOD

Poškodenie periférneho nervu má za následok úplnú alebo čiastočnú stratu fyziologických funkcií v inervovaných oblastiach tela. Základným prostriedkom pre zabezpečenie regenerácie je mikrochirurgická rekonštrukcia prerušeného nervu. V posledných rokoch sa pre regeneráciu periférneho nervu intenzívne študuje využitie tzv. tubulizačnej techniky, pri ktorej sa poškodený nerv premostí pomocou špeciálne pripravenej trubice. Tá môže byť biologická alebo syntetická, prázdna alebo naplnená bunkami a inými chemickými látkami. Ukazuje sa, že výsledky s využitím tubulizácie sú porovnateľné s najjemnejšou mikrochirurgiou.

### HISTÓRIA TUBULIZAČNÝCH TECHNÍK

Používanie autológnych štepov umožňuje úspešnú rekonštrukciu rozsiahlych poranení s preukázateľným zlepšením výsledkov, a využíva sa najmä pri chirurgii ruky. Nevýhody spojené s týmto postupom zahŕňajú 1, potrebu ďalšieho chirurgického zásahu 2, odstránenie zdravého sensorického nervu a následný sensorickým deficitom, 3, množstvo materiálu pre štep je obmedzené. Pre tieto dôvody sa v poslednom období stupňuje úsilie nájsť efektívne alternatívy k riešeniu pomocou autológnych štepov. Objavila sa možnosť využitia rúrok z nenervového materiálu a tento postup sa označuje ako tubulizácia (tubulizačná technika premostenia).

Tubulizačné techniky sa využívajú najmä posledných cca 20 rokov. Prvý pokus o premostenie bol pravdepodobne urobený Glückom už v roku 1880, pri ktorom bol použitý kostný štep (Glück, 1880). Aj keď Glück nemal úspech, pokusmi ho nasledoval Vanlair, ktorému sa podarilo zregenerovať nervové vlákno cez 3 cm dlhú rúrku vyrobenú z dekalifikovanej kosti (Vanlair, 1882).

Historicky existujú opisy použitia biologických aj syntetických rúrok. V prípade biologických rúrok sa najčastejšie pracovalo s krvnými cievami a kostrovým svalstvom. Vo väčšine prípadov sa využívali žily, pretože získanie dostatočne veľkej tepny od pacienta je často náročné a zahŕňa závažné komplikácie. Prvé použitie publikoval Wrede v roku 1909, pričom opísal regeneráciu stredného nervu na vzdialenosť 45mm (Wrede, 1909). Viacerí autori skúšali do žily umiestniť ďalší materiál (nervové tkanivo alebo vlákna kostrových svalov) a opísali vylepšenie regenerácie na vzdialenosť väčšiu ako 30mm (Tang, 1993). Použitie priečne pruhovaných svalov ako substrátu pre regeneráciu bolo prvýkrát zaznamenané v roku 1940 (Kraus & Reisner, 1940), ale väčšia pozornosť tejto alternatíve bola venovaná až v osemdesiatych rokoch (Keynes & Huang, 1984). Svaly sa začali používať z dôvodu podobnosti bazálnych lamín svalových vlákien so štruktúrou endoneuriálnych trubíc degenerujúcich nervov (Fawcett et al., 1986). Testovalo sa použitie preddegenerovaných svalov a ukázalo sa, že takýto sval je dobrým substrátom pre regenerujúci nerv (Mligiliche et al., 2001).

Veľký počet vojnových zranení počas 1. a 2. svetovej vojny motivoval testovanie regeneračných vodičov pripravených z rozličných (z dnešného pohľadu kuriózných) materiálov ako horčík, guma, želatína, pergamenový papier a tantal. Tieto materiály sa však pre svoju nízku biokompatibilitu neukázali ako vhodné. Rúrky zo syntetických materiálov sa aj napriek prvotným neúspechom (Garrity, 1955) začali v poslednej dobe viac používať. Silikónové rúrky sa v klinickej praxi používajú len na premostenie veľmi krátkych vzdialeností. Ich použitie sa však ukázalo minimálne rovnako dobré ako mikrochirurgické zošitie (Dahlin et al., 2001). V klinickej praxi sa na opravu nervov použil aj tetrafluoroetylén s dobrými výsledkami (Stanec & Stanec, 1998). Obe tieto rúrky sú z biologicky neabsorbovateľného materiálu.

Rúrky vyrobené z bioabsorbovateľných materiálov (napríklad polyglykolové kyseliny) ukazujú dobré výsledky ako pri regenerácii na krátke vzdialenosti (menej ako 4mm), tak aj pri dlhších (do 30mm) (Mackinnon & Dellon, 1990). Sú to napríklad PGA (polyglykolid), PLLA (polylaktid) a PGA/PLLA zmesi.

Rozsiahle pokusy boli s využitím Millipore (celulóзовý acetát - pórovitý materiál), ktorý spočiatku ukázal pozitívne výsledky ale pri testoch na pacientoch dochádzalo ku jeho kalcifikácii a následnému rozpadu. Rúrky zo silastic (silikónový elastomér) v experimentoch umožnili regeneráciu u viacerých druhov experimentálnych zvierat a nerozpadali sa ani po dlhšom čase.

V poslednej dobe sa veľmi rozvinulo tkanivové inžinierstvo, ktoré sa využíva aj pri tubulizácii. Využívajú sa dva prístupy. Prvým je snaha o úpravu rôznych tkanív do podoby vodičov, ktoré by mali vlastnosti čo najviac podobné tomu v intaktnom nerve. Druhým prístupom je snaha obohatiť vodiče o rôzne prvky, ktoré by mohli podporovať regeneráciu axónov. Veľmi sľubným sa ukazuje využitie rúrok vytvorených z komponentov extracelulárneho matrixu, ako je kolagén (Harley et al., 2004). Vhodná je pórovitosť takéhoto kolagénu, ktorá umožňuje komunikáciu s okolím. Do takýchto rúrok sa vkladajú ďalšie látky ktoré stimulujú rast axónov najčastejšie NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), GGF (glial growth factor), SC, CNTF (ciliary neurotrophic factor), NT-3,4 (neuronotrophin 3 a 4), IGF-1,2 (insulinelike growth factor 1 a 2), PDGF (platelet-derived growth factor), aFGF (acidic fibroblast growth factor) a bFGF (basic fibroblast growth factor) (Valentini, 2000).

## VÝHODY TUBULIZÁCIE

Tubulizácia vytvára priamu cestu medzi proximálnym a distálnym koncom prerušeného nervu, prevenciu pred vstupom tkaniva vytvárajúceho jazvu, umožňuje priame navádzanie prerastajúcich axónov a migrujúcich buniek, komunikáciu distálneho a proximálneho kýmpt'a, bez zbytočného napätia na axóny. Minimalizuje vplyv sutúr na regeneráciu, a udržiava všetky súčasti regeneračnej jednotky pokope (Battiston et al., 2005). Tubulizácia má význam aj pre vedecké experimenty a to preto, lebo vieme kontrolovať vzdialenosť medzi pahýľmi nervového vlákna, tekutiny a tkanivo vstupujúce do rany je merateľné, takýto kanál môže byť modifikovaný a vieme ho plniť rôznymi liečivami, géľmi, podpornými látkami, atď. (Valentini, 2000). Pri aplikácii tubulizačných techník musí dôjsť k priblíženiu proximalného a distálneho konca. Nesmie dôjsť k prílišnému napätiu a nemalo by dôjsť k torzii kýmpt'ov a zlej orientácii fasciklov vo vlákne. Konce prerušeného vlákna sú zasunuté do pripravenej rúrky, ktorá je buď urobená vopred alebo pomocou materiálu obtočeného priamo okolo koncov nervov. Rúrka môže ale aj nemusí byť zložená z viacerých druhov materiálov. Konce nervov sú následne uchytené k rúrke. Uchytenie sa robí buď pomocou stehov alebo lepením (Fields et al., 1989). Ďalšou výhodou tubulizačných techník je možnosť ovplyvňovať niektoré ich vlastnosti a tak optimalizovať regeneračné vlastnosti. Stena vodiča ovplyvňuje komunikáciu regenerujúcej časti s prostredím. Preto je jednou z dôležitých vlastností



permeabilita steny rúrky. Semipermeabilné rúrky vytvárajú vhodné prostredie pre rast axónov, ktoré sú po prerastení viac podobné normálnemu stavu, sú viac myelinizované a obsahujú menej spojivového tkaniva. Taktiež takéto nervové vlákna si uchovávajú kruhový tvar na priereze a nie sú zrastené s trubicou.

Ďalšou vlastnosťou, ktorá sa v experimentoch ukazuje dôležitou je mikrogeometria pri ktorej sa ukazuje, že ak je vnútorný povrch zdrasnený tak dochádza k rastu v celej trubici, orientácii fibrínových molekúl podľa týchto nerovností a preto aj migrujúce bunky sa rozdelia v celom lumene a nevytvárajú len jednu zhustenú centrálnu štruktúru.

*Práca bola financovaná projektom VEGA č. 2/0183/13 s názvom Transplantácia tkanivových konštruktov pre regeneráciu poškodených nervových vlákien.*

## POUŽITÁ LITERÁTURA

- Battiston B., Guena S., Ferrero M. & Tos P. 2005. Nerve repair by the means of tubulization: Literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery*. 25, 258-267.
- Dahlin L.B., Anagnostaki L. & Lundborg G. 2001. Tissue response to silicone tube sused to repair human median and ulnar nerves. *Scand.J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.* 35, 29-34
- Fawcett J.W. & Keynes R.J. 1986. Muscle basal lamina: a new graft material for peripheral nerve repair. *J. Neurosurg.* 65, 354-363.
- Fields R.D., Le Beau J.M., Longo F.M. & Ellisman M.H. 1989. Nerve regeneration through artificial tubular implantants. *Prog. Neurobiol.* 33, 87-134.
- Garrity R.W. 1955. The use of plastic and rubber tubing in the management of irreparable nerve injuries. *Surg. Forum.* 6, 517-520.
- Glück T. 1880. Ueber Neutroplastic Auf dem Wege de Transplantation. *Arch. Klin. Chir.* 25, 606-616.
- Harley B.A., Spilker M.H., Wu J.W., Asano K., Hsu H.P., Spector M. & Yannas I.V. 2004. Optimal degradation rate for collagen chambers used for regeneration of peripheral nerves over long gaps. *Cells Tissues Organs.* 176, 153-165.
- Keynes R.J., Hopkins W.G. & Huang L.H. 1984. Regeneration of mouse peripheral nerves in degenerating skeletal muscle: guidance by residual muscle fibre basement membrane. *Brain. Res.* 295, 275-281.
- Kraus H. & Reiser H. 1940. Behandlungsergebnisse von Verletzungen pripherer Nerven mit besonderer Berücksichtigung der Schussverletzungen del Jahre 1919, 1927, und 1934. *Arch. Klin. Chir.* 199, 318-336.
- Mackinnon S.E. & Dellon A.L. 1990. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast. Reconstr. Surg.* 85, 419-424.
- Mligiliche N., Tabata Y., Endoh K. & Ide C. 2001. Peripheral nerve regeneration through a long detergent-denatured muscle autografts in rabbits. *Neuroreport.* 12, 1719-1722.
- Stanec S. & Stanec Z. 1998. Reconstruction of upper-extremity peripheral nerve injuries with ePTFE conduits. *J. Reconstr. Microsurg.* 14, 227-232.
- Tang J.B. 1993. Group fascicular vein grafts with interposition of nerve slices for long ulnar nerve defects: report of three cases. *Microsurgery.* 14, 404-408.
- Valentini R.F. 2000. Nerve guidance channels. *The biomedical engineering handbook: Second edition.*
- Vanlair C. 1882. De la régénération des nerfs périphériques par le procédé de la suture tubulaire. *Arch. Biol. Paris.* 3, 379-496.
- Wrede L. 1909. Überbrueckung eines Nervendefektes mit tels Seidennaht und leben Venenstueckes. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 35, 1125-1160.

## VÝZNAM NOMOGRAMOV V SÚDNOM VETERINÁRSKOM LEKÁRSTVE

Vargová G., Takáčová D.

Ústav súdneho a verejného veterinárskeho lekárstva a ekonomiky, UVLF Košice

### ABSTRAKT

Veterinárska prax doposiaľ nedisponuje nomogramom, ktorý by bol nápomocný pri zisťovaní času úhynu zvierat. Cieľom našej práce bolo získanie podkladov pre vyhotovenie nomogramu, využiteľného v súdnom veterinárskom lekárstve, pri zisťovaní predpokladaného času úhynu zvierat. Príprava podkladov pozostávala z merania poklesu telesnej teploty kadáveru v prostredí, v ktorom sa kadáver nachádzal, až do vyrovnania týchto teplôt. Samotné merania boli uskutočňované na zvieratách eutanazovaných na klinikách UVLF Košice. Meranie poklesu telesnej teploty bolo vykonávané špeciálnym dvojkanálovým teplomerom TESTO 175 T3 so sondou pre meranie teploty prostredia a meranie teploty kadáveru v rekte. Meranie prebiehalo paralelne do vyrovnania teplôt kadáveru s teplotou prostredia. Výstupom boli namerané hodnoty vyjadrené vo forme grafu alebo tabuľky. Doposiaľ využívané pravidlo chladnutia kadáveru využíva poznatok, že pokles telesnej teploty o 0,8 – 0,6 °C za hodinu síce poskytuje uspokojivé výsledky, avšak vykazuje veľkú chybovosť, najmä v priebehu chladnutia, ktoré trvá dlhšie ako 24 hodín v rôznych podmienkach prostredia. Vyhotovením nomogramu by bolo možné rozpätie výskytu chýb znížiť, a tým poskytnúť presnejšie údaje o predpokladanom čase úhynu zvierat. Tieto údaje môžu poslúžiť pre orgány štátnej správy vo veterinárnej oblasti, či pre orgány činné v trestnom konaní v súvislosti s týraním zvierat, pytliactvom alebo poškodzovaním cudzej veci.

KEY WORDS: nomogram, čas smrti, predpokladaný čas úhynu zvierat'a

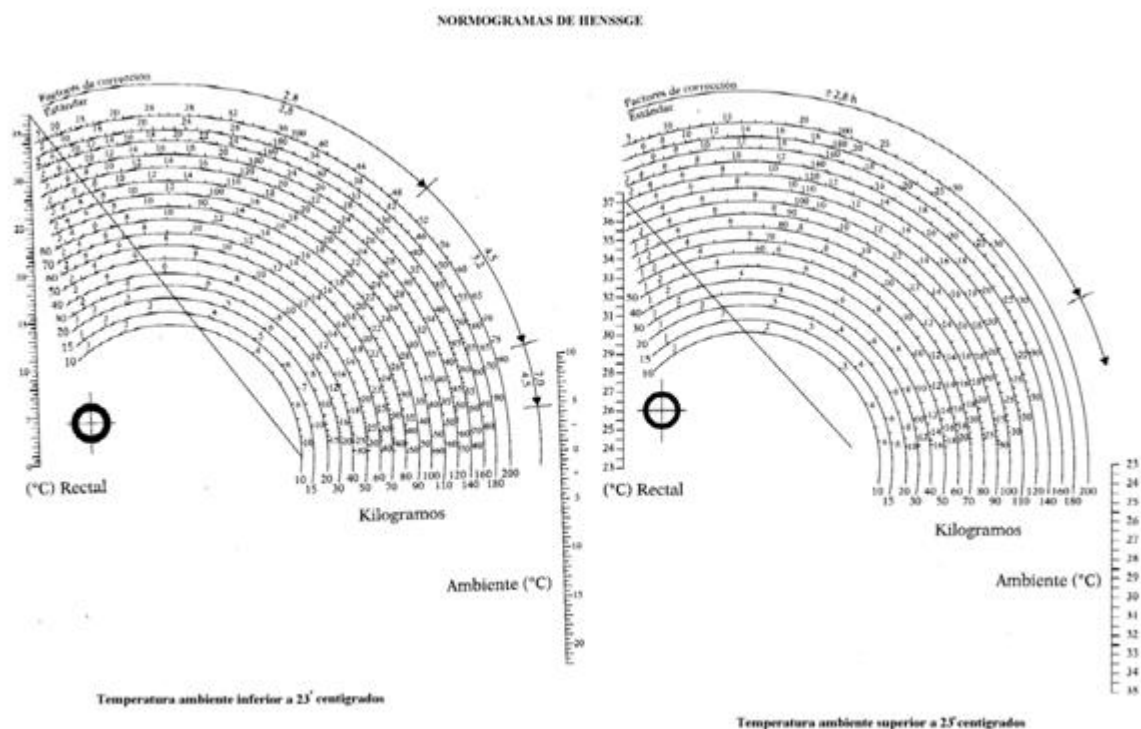
### ÚVOD

Chladnutie je fyzikálny proces pozostávajúci z konvekcie, kondukcie, radiácie a evaporácie. Vždy však ide o odovzdávanie tepla telesa teplejšieho chladnejšiemu. Metóda sledovania poklesu telesnej teploty je vhodná len pre mierne a studené klimatické pásma, v tropických podmienkach, kde teplota prostredia sa takmer rovná telesnej teplote, je táto metóda nevyhovujúca a v praxi nevyužiteľná. Nomogram je grafickým vyjadrením matematických alebo fyzikálnych vzťahov, či závislostí troch a viac neznámych veličín. V humánnej praxi majú nomogramy široké využitie napr. pri stanovovaní rizík v onkológii, oftalmológii, neonatológii, výžive a dietetike pri stanovovaní BMI (body mass index), kardiovaskulárneho rizika, a pod. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Nomogram>).

V súdnom lekárstve bol nomogram prvýkrát popísaný v roku 1988 Dr. Henssge v práci „*Death time estimation in case work I., The rectal temperature time of death nomogram*“.

Henssgeho nomogram (Obr. č.1) slúži ako pomôcka pre obhliadajúcich súdnych lekárov pre stanovenie predpokladaného času smrti. Jeho podkladom sú namerané hodnoty teplôt z miesta činu, teplota prostredia, teplota nameraná v rekte, hmotnosť jedinca a vyhodnotenie podmienok, v ktorých sa jedinec nachádzal v čase nájdenia (prostredie vonkajšie alebo vnútorné, podložie, na ktorom sa telo nachádza, poprípade počet vrstiev, ktorými je telo prikryté). Henssgeho nomogramy sú vyhotovené pre teploty prostredia pod a nad 23 °C (Henssge, C., 1988). Veterinárna oblasť nedisponuje takýmito nomogramami pre stanovenie predpokladaného času úhynu zvierat, nakoľko existuje veľa limitujúcich faktorov, akými sú druhová variabilita, fyziologická konštitúcia, množstvo podkožného tuku, pokrývka tela, pohlavie, hmotnosť, fyzická aktivita a prípadné ochorenia zvierat tesne pred smrťou a rôzne podmienky prostredia.

Obr. č.1 Henssgeho nomogram pre odčítanie času smrti v prostredí nad a pod 23 °C



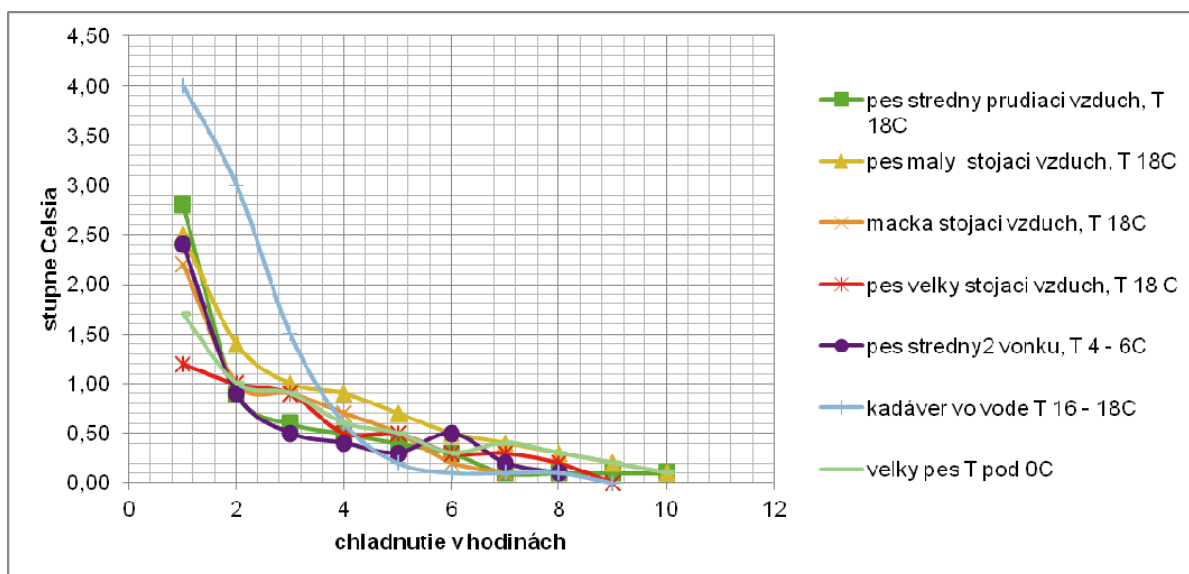
#### MATERIÁL A METODIKA

Doposiaľ sme mali možnosť uskutočniť merania na 17 zvieratách, ktoré boli rozdelené do 7 skupín v závislosti od druhu, hmotnosti a vonkajších podmienok, za ktorých nastal úhyn (ročné obdobie, poveternostné podmienky, simulácia utopenia – stojaca voda). Výsledky meraní a priebeh krivky chladnutia rôznych kadáverov v rôznych podmienkach prostredia zaznamenáva tabuľka č.1 a graf č.2.

Tab. č. 1

hod.	pes stredný	pes malý	macka	pes veľký	pes stredný 2	kadáver vo vode	veľký pes
	prúdiaci vzduch, T 18 °C	stojaci vzduch, T 18 °C	stojaci vzduch, T 18 °C	stojaci vzduch, T 18 °C	vonku, T 4 – 6 °C	T 16 – 18 °C	T pod 0 °C
4	2,80	2,50	2,20	1,20	2,40	4,00	1,70
6	0,90	1,40	1,00	1,00	0,90	3,00	1,00
10	0,60	1,00	0,90	0,90	0,50	1,50	0,90
15	0,50	0,90	0,70	0,50	0,40	0,60	0,60
19	0,40	0,70	0,50	0,50	0,30	0,20	0,50
20	0,30	0,50	0,20	0,30	0,50	0,10	0,30
22	0,10	0,40	0,10	0,30	0,20	0,10	0,40
25	0,10	0,30		0,20	0,10	0,10	0,30
30	0,10	0,20		0,2 - 0,1		plató fázy	0,20
30 h	0,10	0,10					0,10

Graf č. 2



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Meraniami sme zistili, že hlavnými faktormi ovplyvňujúcimi priebeh chladnutia, sú hmotnosť jedinca a prostredie, kde sa telo po úhyne nachádza. Možno konštatovať, že najrýchlejšie prebieha chladnutie v prvých 4 hodinách, t. j. približne pokles o 1,2 °C / h u mačiek, 2,5°C / h u malých a stredných psov. Pri prúdiacom vzduchu klesá teplota o 2,8 °C / h. Kadáver o hmotnosti 56 kg, vo vonkajšom prostredí pri teplote pod 0°C, chladol v priemere 1,7°C / h, ale 20 kg kadáver pri vonkajšej teplote 4 - 6°C chladol 2,4°C / h. Kadáver ponorený vo vode teplej 16 – 18°C chladol priemerne 4°C / h. Po 15 hodinách sa chladnutie spomalilo na 0,7 – 0,5°C / h. Zaznamenali sme výskyt aj tzv. plató fáz (niekoľko hodín trvajúcich bez poklesu teploty), po ktorých nasledoval pokles o 0,3 – 0,2°C / h. Posledné hodiny kadáver chladol 0,1 °C / h až do úplného vyrovnania teplôt s prostredím. Z uvedeného vyplýva, že pravidlo, ktoré využíva poznatky o poklese telesnej teploty o 0,6 – 0,8°C, je veľmi všeobecné, rovnako, ako vzorec odvodený od Newtonovho zákona chladnutia<sup>(2)</sup> je značne limitujúci, čím sú obe pravidlá použiteľné iba za štandardných podmienok ako je napr. izbová teplota.

$$t = -10 \ln [T - Rt + 37,2 - Rt] \quad (2)$$

Zdroj: <http://www.regentsprep.org/math/algtrig/ate9/>

Nakoľko nájdené zvieracie kadávery sa často vyskytujú v neštandardných podmienkach, tým aj určenie času ich úhynu metódou merania poklesu telesnej teploty je náročné, preto určovanie času smrti pomocou nomogramu vyžaduje ďalšie experimentálne skúmania.

## POUŽITÁ LITERATÚRA:

Henssge C., Forensic Science International, 38 (1988) 209 - 236

The Case of the Murdered Accountant, [http:// www.regentsprep.org/math/algtrig/ate9](http://www.regentsprep.org/math/algtrig/ate9)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Nomogram>

## STANOVENIE FYZIOLOGICKÝCH HODNÔT OČNÝCH IMPEDANČNÝCH INDEXOV U PSOV MALÝCH PLEMIEN

Vrbovská T., Trbolová A.

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

### ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo stanoviť fyziologické hodnoty očných impedančných indexov u psov plemena malý bradáč a krížencov malých plemien. Vyšetřili sme 18 psov (35 očí), zaradených do dvoch skupín (malé bradáče: n = 10 psov, 20 očí; krížence: n = 8 psov, 15 očí). Fyziologická hodnota impedančných indexov (RI; PI) pre malé plemená psov s mezaticefalickým utváraním lebky bola ( $0,65 \pm 0,07$ ;  $1,14 \pm 0,20$ ).

### ÚVOD

Ultrasonografia je v súčasnosti vo veterinárnej oftalmológii rozšírená a ľahko dostupná diagnostická zobrazovacia metóda (Hazdira, 2008). Je to presná, relatívne lacná a neinvazívna metóda, umožňujúca charakterizovať orbitálnu a okulárnu anatómiu a ich patologické alterácie (Gelatt – Nicholson a kol., 1999). Ultrasonografia je vo veterinárnej oftalmológii indikovaná vo všetkých prípadoch, kedy nie je možné vyšetřiť hlbšie štruktúry oka z dôvodu ich nepriehľadnosti (rohovka, predná očná komora, šošovka, sklovec). Je bežne používaná pri diferenciacii a meraní veľkosti vnútroočných mäs, pri hodnotení rozsahu poškodenia oka spôsobeného traumou, pri meraní axiálnej dĺžky mikroftalmického oka (Vosough a kol., 2008). Rovnako umožňuje určiť prítomnosť cudzích telies, katarakty, odlúčenia sietnice a lézií zaberajúcich retrobulbárny priestor (Mitchell, 2011). Výrazným benefitom je možnosť kombinovať konvenčný dvojdimenzionálny B-mód s farebným dopplerovským zobrazením (Gelatt a kol., 2013), kedy ku zobrazeniu očných alterácií pribúda aj možnosť demonštrovať zmeny na stenách ciev, zmeny v rýchlosti prietoku a zmeny v tlakovom gradiente krvi v cievach (Şindak a kol., 2003). Výsledkom dopplerovskej ultrasonografie je spektrálna dopplerovská krivka, ktorá umožňuje semikvantitatívnu analýzu krvného toku. Môžeme z nej odčítať maximálnu systolickú rýchlosť, minimálnu diastolickú rýchlosť, systolické zrýchlenie a umožňuje výpočet impedančných indexov (index odporový- RI a pulzačný- PI). Hodnoty RI a PI hodnoty majú význam pre posúdenie hemodynamiky v danom mieste krvného obehu (Hazdira, 2008).

### MATERIÁL A METODIKA

*Zvieratá:* V práci bolo použitých 18 zdravých nesesedovaných psov rozdelených do dvoch skupín. Prvú skupinu tvorilo 10 dospelých jedincov plemena malý bradáč vo veku 2 - 4 roky (5 ♂: 5 ♀). Druhá skupina bola zložená z 8 psov malých plemien vo veku 2 – 5 rokov (4♂:4♀). Psy boli vyšetřené so súhlasom majiteľa. Vyšetřenie bolo vykonané u zdravých, klinicky vyšetřených psov. Na vylúčenie očných ochorení boli psy vyšetřené podľa štandardného oftalmologického protokolu používaného na KMZ UVLF v Košiciach. Následne boli oči vyšetřené ultrasonograficky.

*Postup dopplerovského vyšetřenia očí:* Psy boli vyšetřované po 15 minútovej adaptácii na prostredie vyšetřovacej miestnosti v sternálnej polohe. Fixované boli s minimálnym tlakom na oblasť krku a hrudníka. U psov boli vyšetřované obe oči, pričom ľavé oko bolo vždy vyšetřené ako prvé. Na ultrasonografické vyšetřenie očí bol použitý prístroj ALOKA ProSound Alpha 6 a lineárna sonda s frekvenciou 5 – 12 MHz najskôr v B – móde (na konvenčné posúdenie anatomického stavu očného bulbu v B – móde a následne v dopplerovskom móde s impulzne modulovanou nosnou vlnou (PW – Pulsed-Wave Doppler). Pred ultrasonografickým vyšetřením bolo do oka aplikované lokálne anestetikum

s účinnou látkou 0,4 % oxibuprokaín a následne sterilný ultrasonografický gél. Na vyšetrenie bola použitá korneálna technika. Pri vyšetrení sme sa zamerali na *a. ciliaris posterioris longae*. Základným princípom bolo vytvorenie spektrálnej dopplerovskej krivky s minimálne tromi zobrazenými vlnami. Impedančné indexy boli vypočítané softvérom ultrasonografického prístroja po manuálnom ohraničení priebehu rýchlostnej krivky.

*Štatistická analýza:* Získané hodnoty boli spracované a vyhodnotené pomocou programu GraphPad Prism version 6.01 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com). Na získanie rozsahu hodnôt RI a PI zdravých nesesdovaných psov bol použitý 95% konfidenčný interval. Na porovnanie hodnôt medzi pravým a ľavým okom bol použitý Studentov *t*-test a na porovnanie hodnôt impedančných indexov jednotlivých skupín psov Mann – Whitney U – test. Štatistická významnosť bola definovaná ako  $P < 0,05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerná hodnota impedančných indexov  $\pm$  štandardná odchýlka bola v skupine malých bradáčov RI  $0,68 \pm 0,07$  a PI  $1,18 \pm 0,21$ . V skupine krížencov bola hodnota RI  $0,63 \pm 0,06$  a hodnota PI  $1,08 \pm 0,15$ . Nepozorovali sme štatistickú významnosť medzi hodnotami impedančných indexov pravého a ľavého oka v skupinách psov. Keďže pri porovnaní hodnôt impedančných indexov (RI; PI) oboch skupín psov taktiež nebola preukázaná štatistická významnosť ( $P=0,051$ ;  $P=0,211$ ), výsledky boli použité na kvantifikáciu fyziologických hodnôt impedančných indexov pre psy malých plemien s mezaticefalickým utváraním lebky. Výsledky sledovania sú zhrnuté v tabuľke č. 1. Pre minimalizáciu variability výsledkov boli vyšetrenia vykonávané jedným sonografistom, s pomocou jedného fixatéra, v rovnakej miestnosti, po 15 minútovej adaptácii na prostredie a podľa stabilného protokolu. U všetkých psov boli vyšetrené obe oči, s výnimkou pravého oka u jedného kríženca z dôvodu slabej kooperácie.

Počet štúdií vo veterinárnej oftalmológii s tematikou ultrasonografie s využitým Dopplerovho javu je stále limitovaný. Taktiež využiteľnosť Dopplerovho efektu v ultrasonografii, taktiež postupy vyšetrenia sú v súčasnej dobe viac rozpracované v humánnej medicíne a humánnej oftalmológii.

Gelatt – Nicholson a kol. (1999) zobrazili a identifikovali väčšinu ciev oka, pričom *a. ciliaris posterioris longae* bola vyhodnotená ako veľmi jednoducho identifikovateľná, s najlepšou kvalitou zobrazenej dopplerovskej krivky. Podobne Novellas a kol. (2007), považujú *a. ciliaris posterioris longae* za najjednoduchšie a najspolahlivejšie rozpoznateľnú cievu oka, zobrazovanú buď na 9 alebo 3 hodine v oblasti skléry.

Viacerí autori uvádzajú fyziologické hodnoty RI a PI u sedovaných psov (Şindak a kol., 2003, Lee a kol., 2002, Gelatt – Nicholson a kol., 1999). Bolo potvrdené, že aplikácia anestetík výrazne mení hodnoty impedančných indexov. V prípade kombinácie butorfanol, midazolam dochádza ku výraznému zvýšeniu RI a PI (Novellas a kol., 2007). Novellas a kol. (2007) uvádza hodnoty RI a PI u zdravých nesesdovaných psov. Hodnoty RI  $0,63 \pm 0,06$  a PI  $1,15 \pm 0,21$  sú veľmi blízke nami získaným hodnotám impedančných indexov RI  $0,65 \pm 0,07$  a PI  $1,14 \pm 0,20$ .

Farebné dopplerovská ultrasonografia sa úspešne využíva ako jedna z možností panelu vyšetrovacích metód pre stanovenie diagnózy ochorení orbity a očnej gule (Şindak a kol., 2003). Oko patrí medzi mimoriadne dobre cievnené orgány, z čoho plynie jeho senzitivita na zmeny tlaku v krvnom riečišti. Podľa nášho názoru je preto potrebné definovať fyziologické hodnoty očných impedančných indexov u rozličných skupín psov s cieľom identifikovať prípadné odchýlky a zabezpečiť dôslednejšiu diagnostiku niektorých očných ochorení.

*Práca vznikla s podporou Vedeckej grantovej agentúry MŠVVaŠ SR a SAV (VEGA), projekt č. 1/0225/15.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ .Veterinary ophtalmology. Fifth edition. Iowa: Willey-Blackwell, 2013. Two volume set, p. 2260, ISBN 978-0-470-96040-0.
- Gelatt-Nicholson KJ, Gelatt KN, MacKay E, Brooks DE, Newell SM. Doppler imaging of the ophtalmic vasculature of the normal dog: blood velocity measurements and reproducibility. Vet Ophtalmol. 1999; 2: 87 – 96.
- Hazdira I. Úvod do ultrasonografie v otázkach a odpovedích pro studenty lékařské fakulty. Část I. Principy ultrazvukových diagnostických metod a způsoby jejich využití. 2008; s. 35.
- Lee H, Chang D, LeeY, Eom K, Choi H, Seo K, Choi M, Yoon J. Use of colour Doppler imaging for determining the resistive index of the medial long posterior ciliary artery in clinically normal conscious dogs. Am J Vet Res. 2002; 63: 211 – 214.
- Mitchell N. Approach to ocular examination in small animals. In Practise. 2011; 33: 146 – 154.
- Novellas R, Espada Y, Ruiz de Gopegui R. Doppler ultrasonographic estimation of renal and ocular resistive and pulsatility indices in normal dogs and cats. Vet Radiol Ultrasound. 2007; 48 (1): 69 – 73.
- Novellas R, Ruiz de Gopegui R, Espada Y. Effect of sedation with midazolam and butorphanol on resistive and pulsatility indices in healthy dogs. Vet Radiol Ultrasound. 2007; 48 (3): 276 – 280.
- Şındak N, Öztürk A, Biricik HS. Color Doppler Imaging of the Internal Ophthalmic and Long Posterior Ciliary Arteries in the Dog. Turk J Vet Anim Sci. 2003; 27: 1219 – 1224.
- Vosough D, Masudifard M, Sajadian SM, Kaamouzian M. Two and three dimensional color and power doppler ultrasonography of the ophthalmic vasculature of the normal dog. IJVS. 2008; 3 (3, 8):77 – 85.

Tabuľka č. 2: Namerané hodnoty impedančných indexov pre *a. ciliaris posterioris longae* u jednotlivých skupín psov.

	Mean±SD ĽO	Mean±SD PO	P	Mean ±SD	95% CI
<b>bradáče; n=20</b>					
RI	0,67±0,07	0,69±0,06	<b>0,706</b>	<b>0,68±0,07</b>	<b>0,65 – 0,71</b>
PI	1,21±0,24	1,17±0,18	<b>0,211</b>	<b>1,18±0,21</b>	<b>1,09 – 1,28</b>
<b>krížence; n=15</b>					
RI	0,60±0,06	0,65±0,06	<b>0,151</b>	<b>0,63±0,06</b>	<b>0,59 – 0,66</b>
PI	1,04±0,11	1,12±0,19	<b>0,391</b>	<b>1,08±0,15</b>	<b>0,99 – 1,17</b>
<b>spolu; n=35</b>					
RI	0,64±0,07	0,67±0,06	<b>0,204</b>	<b>0,65±0,07</b>	<b>0,63 – 0,68</b>
PI	1,13±0,21	1,15±0,18	<b>0,654</b>	<b>1,14±0,20</b>	<b>1,07 – 1,21</b>

n – počet vyšetrených očí, Mean - priemerná hodnota, SD - štandardná odchýlka, ĽO - ľavé oko, PO – pravé oko, P – hodnota P medzi ĽO a PO jednotlivých indexov (štatistická významnosť, ak  $P < 0,05$ ), CI – konfidenčný interval ĽO a PO, RI – odporový index, PI – pulzačný index

## MODULÁCIA LIPIDOVÉHO METABOLIZMU V BACHORE OVIEC ZMESOU MEDICINÁLNYCH RASTLÍN A ZDROJMI RASTLINNÝCH TUKOV

Wencelová M.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Štyri bachorovo fistulované barany (zošľachtená valaška) boli náhodne rozdelené podľa latinského štvorca (4×4) s cieľom stanoviť vplyv dvoch zdrojov rastlinných tukov – slnečnicového oleja (SO, pokus č.1) a slnečnicových semien (SS, pokus č.2) v kombinácii so zmesou medicínálnych rastlín (MRSO, MRSS) ako doplnkov diéty na lipidový metabolizmus v bachore oviec. V oboch pokusoch sme zaznamenali signifikantne vyššie koncentrácie kyseliny steárovej a nižšie koncentrácie kyseliny linolovej,  $\alpha$ -linolénovej a  $\gamma$ -linolénovej pri diétach s SO (SS) a MPSO (MPSS) v porovnaní s kontrolami a zmesou medicínálnych rastlín (MP). Zdroje rastlinných tukov v asociácii s medicínálnymi rastlinami v diétach ovplyvnili lipidový metabolizmus bachora oviec a tieto kombinácie môžu byť v budúcnosti zaujímavé pre strategické kŕmenie prežúvavcov s cieľom zlepšiť profil mastných kyselín.

### ÚVOD

V posledných rokoch sa vyvíja úsilie modifikovať fermentáciu a lipidový metabolizmus v bachore prežúvavcov s cieľom zvýšiť produkčný potenciál zvierat. Lipidový metabolizmus v bachore je komplex procesov, ktoré ovplyvňujú zloženie mastných kyselín v tkanivách a mliečnom tuku. Konečným produktom biohydrogenácie polynenasýtených mastných kyselín (PUFA) je nasýtená kyselina steárová (SA), avšak neúplnou biohydrogenáciou dochádza v bachore k tvorbe zdraviu prospešných medziproduktov, ako kyseliny vakkénovej (TVA) a konjugovanej kyseliny linolovej (CLA). Niektoré medicínálne rastliny však dokážu ovplyvniť posledný krok biohydrogenácie a to premenu TVA na SA (Durmic a kol., 2008; Jayanegara a kol., 2012). Prídavok rastlinného tuku a manipulácia bachorovej fermentácie endogénnymi rastlinnými faktormi môže ovplyvniť proces lipolýzy a biohydrogenácie v bachore (Buccioni a kol., 2012). Cieľom týchto dvoch experimentov bolo stanoviť vplyv slnečnicového oleja a slnečnicových semien v kombinácii so zmesou vybraných medicínálnych rastlín na lipidový metabolizmus v bachore oviec.

### MATERIÁL A METODIKA

V latinskom štvorci (4×4) boli použité 4 barany (zošľachtená valaška; vek 1,5 roka; hmotnosť 45,4±0,5 kg) s permanentne zavedenou bachorovou fistulou. Zvieratá prijímali v oboch pokusoch rovnakú bazálnu diétu (kontrola, K) pozostávajúcu z 540 g sušiny mletého jačmeňa/deň a 720 g sušiny lúčneho sena/deň. V pokuse č.1 bola bazálna diéta doplnená o zmes medicínálnych rastlín (MR, 67 g sušiny/deň), slnečnicový olej (SO, 36 g/deň) a kombináciu oboch (MRSO). V pokuse č.2 bola bazálna diéta obohatená o zmes medicínálnych rastlín (MR, 67 g sušiny/deň), slnečnicové semená (SS, 36 g/deň) a kombináciu oboch (MRSS). Zmes sušených MR bola totožná v oboch pokusoch a popísaná a otestovaná *in vitro* podmienkach v našom laboratóriu (Wencelová a kol., 2014). Experimenty pozostávali zo 4 experimentálnych fáz. Vzorky bachorovej tekutiny boli odoberané posledné dva dni každej experimentálnej fázy. Koncentrácie vyšších mastných kyselín boli stanovené na plynovom chromatografe Perkin-Elmer Clarus 500 (Perkin - Elmer, Inc. Shelton, Connecticut, USA). Výsledky pokusov boli štatisticky vyhodnotené ako opakované merania v 4×4 latinskom štvorci pomocou analýzy variancie (Graphpad Instat, Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA). Štatistický model zahŕňal vplyv periódy,



vplyv zvierat'a a vplyv pokusu. Individuálne rozdiely v rámci pokusu boli porovnané nepárovým *t*-testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prídavok SO a MRSO do diéty v pokuse č.1 spôsobil pokles kyseliny palmitovej a zvýšil koncentráciu kyseliny steárovej (Tabuľka č.1). Koncentrácie kyseliny linolovej,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -linolénovej štatisticky významne poklesli v SO a MRSO diétach. Podobne v pokuse č.2 sme pozorovali pokles koncentrácie kyseliny palmitovej a nárast koncentrácie kyseliny steárovej v SS a MRSS diétach (Tabuľka č.2). V diétach s prídavkom SS a MRSS boli znížené koncentrácie kyseliny olejovej, linolovej,  $\alpha$ - a  $\gamma$ -linolénovej. Štatisticky významný nárast koncentrácie kyseliny vakcénovej oproti kontrole sme zaznamenali v MR, SS, MRSS diétach. Podobné zvýšenie koncentrácie kyseliny vakcénovej pri skrmovaní na rastliny bohatej alpskej horskej pastvy bolo pravdepodobne následkom prítomnosti bioaktívnych rastlinných metabolitov (Falchero a kol., 2010; Khiaosa-Ard a kol., 2011). Avšak schopnosť individuálnych alpských rastlín modifikovať bachorovú biohydrogenáciu mastných kyselín v in vitro inkubáciách s ľanovým olejom nebola zatiaľ celkom dokázaná (Jayanegara a kol., 2012). Je zrejmé, že zdroje použitých rastlinných tukov vo forme oleja a semien v kombinácii s medicínami rastlinami v diétach v našich experimentoch ovplyvnili lipidový metabolizmus bachora oviec. V budúcnosti by mohli byť podobné kombinácie zmesí vybraných rastlín a tukov zaujímavé pre strategické kŕmenie prežúvavcov s cieľom zlepšiť profil mastných kyselín.

### Tabuľka č.1

Koncentrácia mastných kyselín (MK) v bachore oviec kŕmených diétami: bazálna diéta bez aditíva (K), s prídavkom zmesi medicínami rastlín (MR), s prídavkom slnečnicového oleja (SO), s prídavkom MR a SO (MRSO) (Pokus č.1)

MK (g/kg MK)	K	MR	SO	MRSO	SEM	<i>P</i> -value
Palmitová	314 <sup>b</sup>	290 <sup>ab</sup>	239 <sup>a</sup>	228 <sup>a</sup>	13,7	0,021
95% CI of mean	259-370	214-365	216-262	175-281		
Steárová	415 <sup>a</sup>	436 <sup>a</sup>	534 <sup>b</sup>	570 <sup>b</sup>	19,4	0,009
95% CI of mean	333-496	353-519	487-582	458-682		
Olejová	46,0	43,2	37,6	34,2	3,40	0,337
95% CI of mean	26,2-65,8	23,0-63,4	25,7-49,5	25,4-43,1		
Vakcénová	32,6	32,7	40,8	36,5	4,05	0,747
95% CI of mean	18,1-47,2	13,8-51,5	10,6-62,4	23,8-57,9		
Linolová	66,4 <sup>b</sup>	65,6 <sup>b</sup>	39,7 <sup>a</sup>	38,1 <sup>a</sup>	3,06	0,001
95% CI of mean	53,7-79,1	47,2-84,0	26,8-52,7	29,1-47,0		
c9t11 Linolová	0,41	0,77	0,52	0,69	0,128	0,069
95% CI of mean	0,19-0,64	0,20-1,33	0,41-0,63	0,21-1,17		
$\alpha$ -Linolénová	26,2 <sup>b</sup>	29,5 <sup>b</sup>	19,5 <sup>b</sup>	13,8 <sup>a</sup>	2,22	0,001
95% CI of mean	19,4-33,0	19,5-39,4	9,4-29,7	7,3-20,4		
$\gamma$ -Linolénová	2,06 <sup>b</sup>	2,02 <sup>b</sup>	1,41 <sup>a</sup>	1,32 <sup>a</sup>	0,124	0,005
95% CI of mean	1,46-2,67	1,71-2,32	1,10-1,76	0,91-1,72		

Indexy (a,b) vyjadrujú rozdiely v rámci riadku.

## Tabuľka č.2

Koncentrácia mastných kyselín (MK) v bachore oviec kŕmených diétami: bazálna diéta bez aditíva (K), s prídavkom zmesi medicínálnych rastlín (MR), s prídavkom slnečnicových semien (SS), s prídavkom MR a SS (MRSS) (Pokus č.2)

MK (g/kg MK)	K	MR	SS	MRSS	SEM	P-value
Palmitová	306 <sup>b</sup>	308 <sup>b</sup>	155 <sup>a</sup>	177 <sup>a</sup>	20,5	0,001
95% CI of mean	224-389	302-314	86-224	73-280		
Steárová	428 <sup>a</sup>	424 <sup>a</sup>	622 <sup>b</sup>	641 <sup>b</sup>	40,4	0,009
95% CI of mean	350-506	406-441	417-827	428-855		
Olejová	38,9 <sup>b</sup>	42,7 <sup>b</sup>	23,6 <sup>a</sup>	23,1 <sup>a</sup>	3,80	0,007
95% CI of mean	26,5-51,3	21,5-64,0	15,9-31,3	16,0-30,1		
Vakcénová	31,0 <sup>a</sup>	35,1 <sup>ab</sup>	62,4 <sup>b</sup>	43,9 <sup>b</sup>	5,22	0,025
95% CI of mean	21,4-40,7	23,2-47,0	28,8-96,0	32,6-55,2		
Linolová	59,3 <sup>b</sup>	63,2 <sup>b</sup>	24,9 <sup>a</sup>	26,2 <sup>a</sup>	6,05	0,004
95% CI of mean	45,8-72,8	46,7-79,7	1,5-48,2	2,5-49,9		
c9t11 Linolová	0,37	0,45	0,74	0,56	0,183	0,648
95% CI of mean	-0,17-0,90	0,10-0,81	0,24-1,23	-0,39-1,51		
α-Linolénová	28,6 <sup>b</sup>	23,7 <sup>b</sup>	9,9 <sup>ab</sup>	8,9 <sup>a</sup>	4,52	0,036
95% CI of mean	5,5-51,6	13,7-33,8	-6,4-26,1	0,6-17,2		
γ-Linolénová	2,00 <sup>b</sup>	2,19 <sup>b</sup>	0,77 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,254	0,010
95% CI of mean	1,42-2,59	1,15-3,23	0,41-1,12	-0,33-2,17		

Indexy (a,b) vyjadrujú rozdiely v rámci riadku.

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2012; 174: 1-25.
- Durmic Z, McSweeney CS, Kemp GW, Hutton P, Wallace RJ, Vercoe PE. Australian plants with the potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2008; 145: 271-284.
- Falchero L, Lombardi G, Gorlier A, Lonati M, Odoardi M, Cavallero A. Variation in fatty acid composition of milk and cheese from cows grazed on two alpine pastures. *Dairy Sci Technol.* 2010; 90: 657-672.
- Jayanegara, A., Kreuzer, M., Leiber, F., 2012. Ruminal disappearance of polyunsaturated fatty acids and appearance of biohydrogenation products when incubating linseed oil with alpine forage plant species in vitro. *Livest. Sci.* 147, 104-112.
- Khiaosa-Ard R, Soliva CR, Kreuzer M, Leiber F. Influence of alpine forage either employed as donor cow's feed or as incubation substrate on in vitro ruminal fatty acid biohydrogenation. *Livest. Sci.* 2011; 140: 80-87.
- Wencelová M, Váradyová Z, Mihaliková K, Jalč D, Kišidayová S. Effects of selected medicinal plants on rumen fermentation in a high-concentrate diet in vitro. *J. Anim. Plant Sci.* 2014; 24: 1388-1395.



Názov: **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2015**  
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu  
X. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Rok vydania: 2015  
Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

Počet strán: 100

**ISBN 978-80-971428-2-7**