



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2016

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

XI. ročník

Košice, 5. a 6. september 2016

**Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Bod'ú
5. a 6. septembra 2016
v Košiciach**

Usporiadali:

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

Zostavil:

MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Recenzovali:

Doc. MVDr. Alexandra Valenčáková, PhD.

Doc. MVDr. Katarína Beňová, PhD.

Organizačný a programový výbor:

MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD.

Neprešlo jazykovou úpravou

ISBN 978-80-971428-3-4

Obsah

IMPACT OF ANGIOGENESIS INHIBITION ON POSTNATAL NEUROGENESIS IN THE ROSTRAL MIGRATORY STREAM Angelidis A., Martončíková M., Fabianová K., Raček A., Račeková E.	7
DIFERENCIÁCIA INFEKČNÝCH LARIEV GASTROINTESTINÁLNYCH NEMATÓDOV VYSKYTUJÚCICH SA NA FARMÁCH KÔZ NA SLOVENSKU Babják M., Königová A., Urda Dolinská M., Várady M.	10
ANALÝZA ZÁPALOVEJ REAKCIE V MIECHE PO TRAUMATICKOM POŠKODENÍ PRED A PO PODANÍ ATORVASTATÍNU Bimbová K., Svatová M., Lukáčová N.	13
ZMENY V SUBPOPULÁCIÁCH LYMFOCYTOV V TENKOM ČREVE MYŠÍ PO PROBIOTICKEJ TERAPII A INFEKCII TRICHINELLA SPIRALIS Bucková B., Dvorožňáková E., Lauková A.	16
ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA KOZÍCH LAKTOBACILOV Čuvalová A., Kmet' V.	19
OSTEOPROTEGERÍN – BIOMARKER MNOHÝCH TVÁRÍ Demková K., Kozárová M	22
DOPAD 5-FLUOROURACILU VYUŽITÍM LEMNA SP. TESTU PRE INHIBÍCIU RASTU Eckerová R., Toropila M., Toropilová D., Stepnowski P.	25
GRAVIOLA, JEJ ÚČINKY VOČI REAKTÍVNYM FORMÁM DUSÍKA Haus M., Vašková J., Vaško L.	28
HODNOTENIE TESTIMETRIE A OBSAHU TESTOSTERÓNU V PERIFÉRNEJ A LOKÁLNEJ KRVI PSOV. Horňáková E., Vrbovská T., Hajurka J.	31
ZAVEDENIE IN VITRO SKRÍNIGOVÉHO MODELU NA TESTOVANIE IMUNOMODULAČNÝCH VLASTNOSTÍ PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA FENOTYPICKÚ A FUNKČNÚ DIFERENCIÁCIU ĽUDSKÝCH MONOCYTOV Hradická P., Demečková V., Kassayová M.	34
IDENTIFIKÁCIA GRAMNEGATÍVNYCH BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z EXOTICKÝCH KORYTNAČIEK Hrehová E., Konieczna O., Wasyl D., Pristaš P.	37
OVPLYVNENIE CEKÁLNEJ SLIZNIČNEJ IMUNITY KURČIAT APLIKÁCIOU PROBIOTICKÉHO KMEŇA AKO PREVENCIA KAMPYLOBAKTERIÓZY Kavušová A., Bobíková K., Herich R.	40
TRANSFER FAKTOR V ADJUVANTNEJ TERAPII LARVÁLNEJ CESTODÓZY Mačák Kubašková T., Hřčková G., Mudroňová D., Velebný S., Grohoľová M.	43
REZISTENCIA NA ANTIBIOTIKÁ A VÝSKYT GÉNOV FAKTOROV VIRULENCIE U ENTEROKOKOV ZO PSOV Kubašová I.	46
ÚLOHA MITOCHONDRIÁLNYCH ELEKTRÓN-TRASPOTNÝCH PROTEÍNOV V REGULÁCII MITOCHONDRIÁLNEHO OXIDAČNÉHO STRESU Lysáková V., Leňová K., Tomášková N., Musatov A.	49

DEFICIT VITAMÍNU D A METABOLICKÁ KOMPENZÁCIA DIABETES MELLITUS 2.TYPU	
Malachovská Z., Kozárová M.	52
VPLYV KONDIČNÉHO STAVU PRED OTELENÍM NA POSTPARTÁLNU R UMINÁCIU	
Mihajlovičová X.	55
KORELÁCIA SPRÁVANIA SA DOSPELÝCH PSOV S VÝSLEDKAMI TESTOV TEMPERAMENTU V ŠTEŇACOM VEKU	
Miňo I., Kottferová J.	58
THYMOL AS MAIN COMPOUND OF THYME ESSENTIAL OIL IN BROILER CHICKEN NUTRITION	
Oceľová V., Chizzola R.	61
MULTIREZISTENTNÝ BAKTERIÁLNY IZOLÁT 20B Z KORYTNAČKY STEPNEJ TESTUDO HORSEFIELDII	
Onderková A., Konieczna O., Wasyl D., Pristaš P.	64
VÝSKYT DICHELOBACTER NODOSUS A FUSOBACTERIUM NECROPHORUM V INTERDIGITÁLNOU PRIESTORE ZDRAVÝCH DOJNÍC A DOJNÍC S OCHORENIAMI PAZNECHTOV	
Osová A., Segurado Benito Pilipčincová I., Király J., Mudroň P.	67
THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UHPLC-QTOF-MS METHOD FOR DETERMINATION OF THYMOL METABOLITES IN LIVER AND DUODENAL WALL OF BROILER CHICKENS	
Pisarcikova J., Calderon AI.	70
HISTOPATOLOGICKÉ HODNOTENIE ZMIEN V SEMENNÍKOCH PUBERTÁLNYCH POTKANOV ZAPRÍČINENÝCH NEIONIZUJÚCIM ELEKTROMAGNETICKÝM ŽIARENÍM	
Šimaiová V., Almášiová V., Holovská K., Cigánková V., Račková E.	73
NEUROPROTEKTÍVNY VPLYV KONDICIOVANÉHO MÉDIA ZÍSKANÉHO Z MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK TUKU POTKANA	
Székiová E., Slovinská L., Blaško J., Čížková D.	76
KAMPYLOBAKTERY Z HYDINY A ICH CITLIVOSŤ K BIOAKTÍVNYM SUBSTANCIÁM	
Ščerbová J.	79
VPLYV FRAGMENTOV ĽUDSKÉHO LYZOZÝMU NA AMYLOIDNÚ AGREGÁCIU LYZOZÝMU	
Uličná K., Bednáriková Z., Bhunia A., Gažová Z.	82
VÝZNAM NOMOGRAMOV V SÚDNOM VETERINÁRSKOM LEKÁRSTVE	
Vargová G., Takáčová D.	85
RÖNTGENOLOGICKÉ POROVNANIE VYBRANÝCH GONIOMETRICKÝCH INDEXOV STEHNOVEJ KOSTI U PSOV S MEDIÁLNOU LUXÁCIU PATELY	
Žilinčík M., Ledecký V., Hluchý M.	88

IMPACT OF ANGIOGENESIS INHIBITION ON POSTNATAL NEUROGENESIS IN THE ROSTRAL MIGRATORY STREAM

Angelidis A.¹, Martončíková M., Fabianová K.¹, Raček A.², Račeková E.¹

¹*Neurobiologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice, Slovenská republika*

²*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, Slovenská republika*

ABSTRACT

New neurons that are destined for the olfactory bulb are generated throughout the life in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles. Recently, it was found that blood vessels represent migratory scaffold for neuroblasts migrating from the SVZ via the rostral migratory stream (RMS) to the olfactory bulb. The aim of our study was to examine if the inhibition of angiogenesis during early postnatal period, when the vasculature of the RMS is reorganized into the scaffold, may affect the arrangement of blood vessels as well as the migration and the proliferation of the neuroblasts within the RMS.

Rat pups were administered with inhibitor of angiogenesis - endostatin for 5 days during the first postnatal week and then they survived for 10 days. After the survival time they were administered with endogenous marker of proliferation - BrdU. To study the arrangement of blood vessels as well as the relationship between vessels and migrating neuroblasts, fixed brain sections were processed for double immunohistochemistry using antibodies against blood vessels (RECA-1) and neuroblasts (DCX). To study cell proliferation, immunohistochemistry was performed with antibody against BrdU.

Our results revealed that inhibition of angiogenesis disrupted the arrangement of blood vessels into the migratory scaffold. This disruption consequently influenced migration of neuroblasts in the RMS. We have also found that the number of proliferating cells in the RMS of endostatin-treated rats is higher than in control rats.

INTRODUCTION

The birth of neurons, neurogenesis, occurs mainly during embryonic development. However, there are two areas in the adult brain where neurogenesis continues throughout the life. Postnatal neurogenesis has been confirmed in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus and the subventricular zone (SVZ) lining the lateral ventricles of the brain. Neurogenesis is quite robust in these regions and originates from glial fibrillary acidic protein (GFAP) – expressing stem cells which form transit amplifying cells capable of generating neuroblasts (Alvarez-Buylla et al., 2001; Doetsch et al., 1999).

Endothelial cells are critical components for neurogenesis as they secrete soluble factors that enhance CNS neural stem cells proliferation and maintain their self renewal and neurogenic potential (Shen et al., 1999). Indeed, there is much crosstalk between endothelial cells and neurons as the processes of angiogenesis and neurogenesis are strongly linked in both the SGZ and SVZ germinal zones of the adult brain. In these regions, blood vessels are associated with neuronal precursors forming the neurovascular niche (Palmer et al., 2000; Mercier et al., 2002; Ohab et al., 2008). Additionally, astrocytes may influence the proliferation and differentiation of neuronal precursors, although these mechanisms are not fully understood (Parent et al., 2003). Neuroblasts originating from the largest area of postnatal neurogenesis, the SVZ, migrate along a well defined pathway, the rostral migratory stream (RMS), and they differentiate into interneurons in the olfactory bulb (OB). Recently, it was found that blood vessels in the RMS represent migratory scaffold for the neuroblasts (Snayyan et al., 2009).

The aim of this study was to examine the effect of angiogenesis inhibition on the arrangement of blood vessels, on proliferation and on migration of cells in the rat RMS.

MATERIALS AND METHODS

In experiments we used Wistar albino rats of both genders.

Rat pups were administrated with inhibitor of angiogenesis - endostatin (1 dose daily - subcutaneously, 100µg/ml, 0.1ml/10g of body weight) for 5 days, from the first postnatal day (P1) till P5 and then they survived for one week (till P14).

Endostatin is a C-terminal fragment of collagen XVIII present in circulation in small amount (approximately 40-100 ng/ml in the serum) and may interfere with the pro-angiogenic action of growth factors such as basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF) (Whitman et al., 2009).

To study the arrangement of blood vessels as well as the relationship between vessels and migrating neuroblasts double immunohistochemistry was performed with antibodies RECA-1 (blood vessels marker) and DCX (marker of neuroblasts). Fluorescent secondary antibodies were used according to the specificity. Slides were coverslipped with Vectashield with DAPI. The sections were analyzed using the fluorescent microscope Olympus BX51 equipped with Olympus DP72 digital camera. We selected only these sections where the whole extent of the RMS was visible. Images were acquired with QuickPHOTO MICRO 2.3 software and processed (merged) by Photoshop 7.0 software.

To study the cell proliferation, BrdU was administered two hours before transcordial perfusion. Immunohistochemistry was performed with antibody against BrdU The sections were analyzed under light microscope. We selected only these sections where the whole extent of the RMS with proliferating cells was visible. Proliferating cells were counted by Disector software.

RESULTS AND DISCUSSION

For the purpose of this study we divided the RMS into the vertical arm (a segment descending from the SVZ, routing ventrally), the elbow (the ventralmost segment of the migratory pathway turning in rostral direction), and the horizontal arm. Angiogenesis was inhibited by endostatin administration during the first postnatal week when the RMS vasculature undergoes rearrangement. Light microscopic observation revealed that the arrangement of blood vessels differs from that in control animals. Blood vessels in endostatin-treated animals were arranged rather randomly in all parts of the RMS. In control animals blood vessels began to be aligned parallel in the border of the RMS in the elbow and horizontal arm. In comparison with control animals, blood vessels in the RMS of endostatin-treated animals were of lower density. In endostatin-treated animals we have found that some migrating neuroblasts (DCX positive cells) are not associated in chains as it is seen in control animals. It means that some of neuroblasts move individually. We suppose that angiogenesis inhibition influenced also homophilic mode of migration. Moreover, we have found that DCX positive neuroblasts are localized out of the migratory stream in the elbow and prominently in the horizontal arm. While the RMS was almost devoid of DCX positive neuroblasts, most of them were found in the outer border of respective parts of the RMS. There were a large amount of DCX positive cells but they were not associated in chains. One of possible effects of endostatin is interaction with VEGF receptors. It was found that down-regulation of VEGF *in vivo* affects the vasculature scaffold development in the mouse RMS and that it leads to the alteration in the neuronal migration and to decreased number of dividing cells arriving into the RMS (Bozoyan et al., 2012). For the pups that survived one week after the inhibition of angiogenesis and treated with BrdU we have found that the number of proliferating cells was significantly higher in the vertical arm and the elbow of the RMS. In the horizontal arm of the RMS the number of BrdU positive cells was higher than in control rats but this increase was not significant.

The study was supported by VEGA Grants: 2/0179/14; 2/0069/15

REFERENCES

1. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2:287-293
2. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97: 703-716
3. Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y et al. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science.* 2004; 304: 1338-1340
4. Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2000; 425: 479-494
5. Ohab JJ, Carmichael ST. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist.* 2008; 14: 369-380
6. Mercier F, Kitasako JT, Hatton GI. Anatomy of the brain neurogenic zones revisited: fractones and the fibroblast/macrophage network. *J Comp Neurol.* 2002; 451: 170-188
7. Parent JM. Injury-induced neurogenesis in the adult mammalian brain. *Neuroscientist.* 2003; 9: 261-272
8. Snayyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, et al. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 2009; 29:4172-4188
9. Whitman MC, Fan W, Relu L, Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. Blood vessels form a migratory scaffold in the rostral migratory stream. *J Comp Neurol.* 2009; 516: 94-104.
10. Bozoyan L, Khghatyan J, Saghatelian A. Astrocytes control the development of the migration-promoting vasculature scaffold in the postnatal brain via VEGF signaling. *J Neurosci.* 2012; 32:1687-1704

DIFERENCIÁCIA INFEKČNÝCH LARIEV GASTROINTESTINÁLNYCH NEMATÓDOV VYSKYTUJÚCICH SA NA FARMÁCH KÔZ NA SLOVENSKU

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

Parazitologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom prieskumu bolo detegovať jednotlivé rody resp. druhy gastrointestinálnych (GI) parazitov kôz vyskytujúcich sa na slovenských farmách. Do štúdie bolo zahrnutých 22 chovov situovaných v rôznych častiach Slovenska. Od zvierat boli odobraté vzorky trusu, z ktorých sa metódou koprokultúr vykultivovali larvy do infekčného štádia L₃. Larvy boli diferencované na základe morfológických znakov charakteristických pre jednotlivé rody a druhy GI parazitov. Najčastejšie sa vyskytujúcimi GI parazitmi na farmách boli *Teladorsagia/Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp.

ÚVOD

GI parazity sú jednou z najčastejších príčin chorobnosti a zníženej úžitkovosti na farmách malých prežúvavcov. Negatívne ovplyvňujú mliečnu a mäsovú produkciu, hmotnostné prírastky, reprodukčné parametre a v prípade ťažších a zmiešaných infekcií s pásomnicami a kokciíami spôsobujú oslabenie imunitného systému a zvýšenú mortalitu hlavne u mladých zvierat. Podobne ako u oviec aj u kôz sa v chovoch najčastejšie vyskytujú zmiešané infekcie, v ktorých sú zastúpené rôzne druhy parazitov. U parazitov ako sú *Trichuris* spp., *Nematodirus* spp. a *Strongyloides papillosus* je možné previesť diagnostiku už na základe nálezu charakteristických vajíčok vo vzorke trusu. U hlavnej skupiny nematódov postihujúcich gastrointestinálny trakt malých prežúvavcov z čeľadí *Trichostrongylidae* a *Chabertiidae* podobný tvar, vnútorná štruktúra a rovnaká veľkosť vajíčok znemožňujú rodové/druhové rozlíšenie bežnými flotačnými metódami. Pre veľké rozdiely medzi jednotlivými druhmi GI parazitov v ich patogénnom pôsobení na organizmus hostiteľa, fertilitu a klimatických podmienkach optimálnych pre ich vývinový cyklus je ale dôležité pri zmiešaných infekciách vykonať diferenciáciu jednotlivých rodov/druhov na základe kultivácie lariev do infekčného štádia L₃. Poznatky o percentuálnom zastúpení parazitov nachádzajúcich sa na pasienkoch sú dôležité z hľadiska správneho prevedenia antihelmintickej terapie a taktiež pri identifikácii rezistentných druhov pri výskyte antihelmintickej rezistencie v chove.

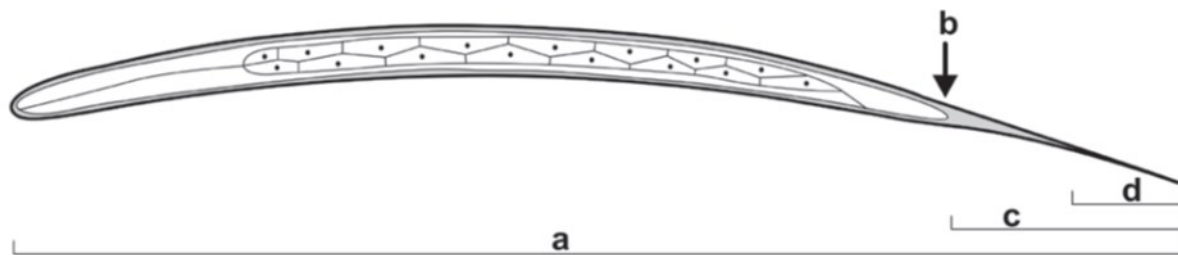
MATERIÁL A METODIKA

Do prieskumu bolo zahrnutých 22 fariem kôz nachádzajúcich sa v rôznych častiach SR. Kultiváciu lariev parazitov z čeľadí *Trichostrongylidae* a *Chabertiidae* do infekčného štádia L₃ uskutočňujeme metódou koprokultúr. Časť jednotlivých vzoriek získaných z farmy sa zmieša, čím sa vytvorí súhrnná vzorka, ktorá sa premieša v tretej miske so sterilnými dubovými pilinami. Týmto postupom získame kyprú drobnú hmotu, ktorú preniesieme do pohárov alebo igelitových sáčkov a kultivujeme v termostate pri teplote 27 °C po dobu 7-10 dní. Koprokultúra sa vlhčí podľa potreby a denne sa 15-20 minút nechá prevetrať. Po týždni keď sú larvy plne vyvinuté, môžeme ich z kultúry izolovať a diagnostikovať.

Suspenziu s larvami kvapneme na podložné sklíčko a larvy usmrtime teplom. Pridaním 1-2% formalínu do suspenzie lariev a ohrievaním sklíčka pri teplote 55-57 °C dosiahneme lepšie zvýraznenie vnútorných štruktúr lariev v porovnaní s larvami, ktoré boli usmrtené v čistej suspenzii (Van Wyk a kol. 2004). Následne pridáme Lugolov roztok jódu a prikryjeme krycím sklíčkom. Larvy diferencujeme na základe kľúča v ktorom posudzujeme jednotlivé morfológické znaky ako utváranie hlavovej časti, dĺžku tela, dĺžku pažeráka, počet črevných buniek, dĺžku chvostovej časti, prítomnosť a dĺžku filamentu atď.

Obr. 1 Základné morfológické znaky pri diferenciácii infekčných lariev L₃ u GI nematódov

a) celková dĺžka larvy, b) špička chvosta larvy, začiatok chvostovej časti, c) dĺžka chvostovej časti, d) dĺžka filamentu (ak je prítomný). Zdroj: Van Wyk a Mayhew, 2013



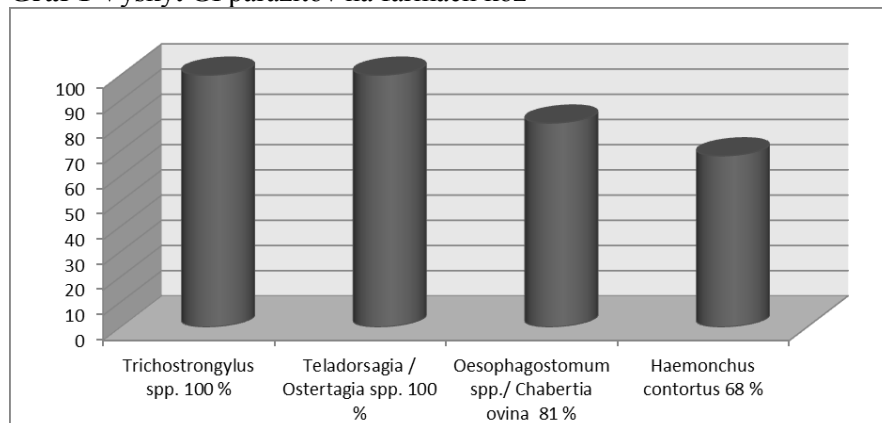
Rod/Druh	Tvar hlavovej časti	Dĺžka tela (µm)	Dĺžka chvostovej časti (µm)	Filament	Počet črevných buniek
<i>Trichostrongylus</i> spp.	Oválny	560-790	30-45	Nie	16
<i>Teladorsagia/Ostertagia</i> spp.	Oválny, mierne zúžený	797-907	35-45	Nie	16
<i>Haemonchus contortus</i>	Úzky a zaoblený	650-850	75-80	Áno	16
<i>Oesophagostomum/Chabertia</i> spp.	Široký a guľatý	Oe. 726-923 Chab. 650-789	Oe. 155-170 Chab. 125-155	Áno	32

Zdroj: Van Wyk a Mayhew, 2013, www.rvc.ac.uk

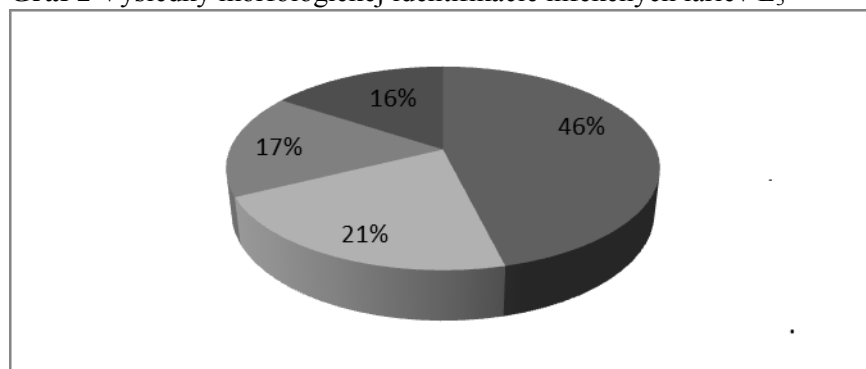
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky znázornené v grafe č.1 potvrdzujú skutočnosť, že dominantnými rodmi GI parazitov v oblastiach s miernym podnebím sú *Teladorsagia/Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. V týchto regiónoch prežívajú vďaka väčšej odolnosti voči vysychaniu a schopnosti vyvíjať sa aj pri nižších teplotách (Anderson a kol., 1978). *Teladorsagia/Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. boli zastúpené na všetkých vyšetovaných farmách. *Haemonchus contortus* je dominantným druhom predovšetkým v tropických a subtropických oblastiach s vysokou vlhkosťou a častými zrážkami. Postupnou zmenou klimatických podmienok a vplyvom globálneho otepľovania bol už jeho zvýšený výskyt zaznamenaný aj v severských krajinách ako Dánsko (Holm a kol., 2014), Švédsko (Hoglund a kol., 2009) a Nórsko (Domke a kol., 2012). Na Slovensku v prieskume realizovanom pred viac ako 20 rokmi bol jeho výskyt potvrdený v 20 % vyšetrených stád oviec (Várady a Praslička, 1993). V našom prieskume sme zaznamenali prítomnosť tohto parazita na 68% fariem čo predstavuje zvýšenie skoro o 50%. Diferenciálnou diagnostikou bolo z každej farmy rodovo/druhovo určených 100 lariev, celkovo 2200 lariev.

Graf 1 Výskyt GI parazitov na farmách kôz



Graf 2 Výsledky morfologickej identifikácie infekčných lariev L₃



Teladorsagia/Ostertagia spp. 46%

Trichostrongylus spp. 21%

Haemonchus contortus 17 %

Oesophagostomum /Chabertia spp. 16 %

Práca bola podporená grantom APVV 14-0169 a VEGA 2/0120/16

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Anderson, N., Dash, K.M., Donald, A.D., Southcott, W.H., Waller, P.J. Epidemiology and control of nematode infections. In: Donald, A.D., Southcott, W.H., Dineen, J.K. (Eds.), The Epidemiology and Control of Gastrointestinal Parasites of Sheep in Australia. CSIRO, Australia, 1978 pp. 23–51
2. Domke, A.V., Chartier, C., Gjerde, B., Höglund, J., Leine, N., Vatn, S., Stuen, S. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. Parasitol. Res. 2012; 111: 185–193
3. Höglund, J., Gustafsson, K., Ljungström, B.L., Engström, A., Donnan, A., Skuce, P. Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. Vet. Parasitol. 2009; 161: 60–68
4. Holm, S.A., Sorensen C.R.L., Thamsborg, S.M. and Enemark H.L. Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. Parasite 2014; 21: 37
5. Van Wyk, J.A., Cabaret, J. & Michael, L.M. Morphological identification of nematodes of small ruminants and cattle simplified. Vet. Parasitol. 2004; 119: 277–306
6. Van Wyk, J.A. & Mayhew, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide', Onderstepoort Journal of Veterinary Research 2013; 80(1), Art. #539, 14
7. Várady, M., Praslička, J. Výskyt a druhové zastúpenie gastrointestinálnych nematódov v chovoch oviec na Slovensku. Veterinárství, 1993 ; 4 :142

ANALÝZA ZÁPALOVEJ REAKCIE V MIECHE PO TRAUMATICKOM POŠKODENÍ PRED A PO PODANÍ ATORVASTATÍNU

Bimbová K., Svatová M., Lukáčová N.

Neurobiologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Zápalová reakcia, ktorá vzniká po traumatickom poškodení miechy má za následok sekundárne poškodenie a spôsobuje až smrť neurónov. Tento proces negatívne ovplyvňuje regeneráciu tkaniva ako aj prerastanie axónov v mieste poškodenia. Preto útlm zápalovej odpovede môže zmierniť šírenie poškodenia a môže napomáhať pri regenerácii miechy. V našej práci sme sledovali uvoľňovanie mediátorov zápalu a bunkové zmeny v mieche po kompresii Th9 segmentu u potkanov kmeňa Wistar. Porovnávali sme priebeh zápalovej odpovede po kompresii a podaní protizápalového liečiva atorvastatínu (ATR). ATR bol experimentálnym zvieratám podaný v dávke (5mg/kg; i.p.) hneď po kompresii. Zvieratá preživali 4 a 24 hodín. Po poškodení miechy dochádza ku zvýšeniu koncentrácie interleukínu 1 β (IL-1 β) v krvom sére, k infiltrácii makrofágov a k aktivácii mikroglie a astrocytov v mieste poškodenia. Po aplikácii ATR sme pozorovali znížené uvoľňovanie IL-1 β až na kontrolnú úroveň. Pomocou imunohistochemickej analýzy sme zistili, že atorvastatín signifikantne znižuje migráciu makrofágov do miesta poškodenia a zabraňuje aktivácii rezidentných buniek-astrocytov a mikroglie na reaktívnu formu. Tieto výsledky ukazujú, že ATR ako protizápalové liečivo utlmuje zápalovú reakciu v mieche po kompresnom poškodení. Predpokladáme, že ATR zmierni edém tkaniva po traumatickej lézii a pri dlhodobom prežívaní zvierat pozitívne ovplyvní regeneráciu tkaniva.

ÚVOD

Traumatické poškodenie miechy patrí medzi jedno z najzávažnejších neurologických ochorení. V posledných desaťročiach bol dosiahnutý enormný pokrok v pochopení bunkových a molekulárnych mechanizmov, ktoré vznikajú v dôsledku poškodenia miechy. Tieto mechanizmy, ktoré komplexne nazývame ako sekundárne poškodenie, zahŕňajú okrem iného cievnú zmenu, tvorbu voľných radikálov, apoptózu alebo zápalovú reakciu. Zápalová reakcia je kombináciou viacerých dejov, ktoré nastupujú v relatívne krátkom čase- niekoľko hodín po poškodení (Nuno a kol., 2015). Ako prvé sa po poškodení miechy uvoľňujú prozápalové cytokíny (interleukín1 β - IL-1 β , tumor nekrotizujúci faktor α -TNF- α) a chemoatraktanty, ktoré sú produkované endotelovými bunkami a neskôr (4-6 hodín po poškodení) aj aktivovanými rezidentnými bunkami- mikrogliaou a astrocytmi. IL-1 β je kľúčový mediátor zápalu v mieche. Vplyvom chemoatraktantov sa zvyšuje expresia adhezívnych molekúl (ICAM1, VCAM1), čo má za následok infiltráciu leukocytov a neutrofilov už 4 hodiny po poškodení. Migrácia makrofágov je oneskorená, prvé bunky sú viditeľné približne po 6 hodinách. Neutrofilý a makrofágy fagocytujú v poškodenom tkanive debris, čo vyvoláva tzv. oxidatívne vzplanutie, teda produkciu voľných radikálov (ROS, RNS). Aktivácia rezidentných buniek, prílív buniek imunitného systému, tvorba voľných radikálov ako aj uvoľňovanie cytokínov sa spolupodieľa na šírení sekundárneho poškodenia v mieche (Carlson a kol., 1998; Hausmann, 2003; Pannu a kol., 2005). Pri regulácii zápalovej odpovede je kľúčové načasovanie, keďže imunitný systém môže ako poškodiť, tak aj napomáhať pri regenerácii tkaniva (Laliberte a kol., 2013). Preto cieľom výskumníkov pri liečbe traumatických poškodení je určiť správne načasovanie a koncentráciu protizápalového liečiva (Nuno a kol., 2015). V súčasnosti sa v experimentálnych štúdiách používajú rôzne skupiny protizápalových liečiv. Atorvastatín, ktorý sme použili v našej štúdii patrí do skupiny statínov. Statíny sú primárne určené na liečbu vysokého cholesterolu, na zníženie triacylglycerolov a na prevenciu srdcových infarktov a mŕtvice. Pannu a kol.

(2005,2007) zistili, že atorvastatín má pleiotropné účinky- podporuje vaskulogenézu, pôsobí preventívne voči osteolýze, má imunomodulačné a protizápalové účinky. Ako anti-inflamačné liečivo spôsobuje zníženie uvoľňovania hlavných mediátorov zápalu- IL-1 β a TNF- α , znižuje infiltráciu makrofágov a aktiváciu mikroglie a astrocytov. Cieľom našej práce bolo znížiť zápalovú odpoveď v poškodenom tkanive po kompresii a zmierniť rozsah šírenia sekundárneho poškodenia.

MATERIÁL A METODIKA

V našich experimentoch sme použili 16 dospelých potkanov (3-mesačné samice) kmeňa Wistar o váhe 250-300g. Traumatické poškodenie bolo vyvolané v celkovej anestéze pomocou kompresného zariadenia na úrovni Th9 segmentu o sile 40g/15min. Zvieratá boli rozdelené do 4 experimentálnych skupín: 1-2 skupina) kompresia miechy a prežívanie po dobu 4 hod. (n=4) a 24 hod. (n=4); 3-4 skupina) kompresia miechy + ATR (5mg/kg; i.p.) a prežívanie po dobu 4 hod. (n=4) a 24 hod. (n=4). Kontrolným zvieratám a zvieratám po zásahu a liečbe bola odobratá krv z chvostovej žily (250 μ l) pre stanovenie hodnôt IL-1 β pomocou ELISA kitu. Potkany boli po 4 a 24 hodinách hlboko anestetizované pomocou thiopentálu (50mg/kg) a následne boli transkardiálne prepláchnuté so 4% paraformaldehydrom. Miecha v rozsahu traumatickej lézie (0,5 cm) bola vypreparovaná a postfixovaná 2 hodiny v 4% paraformaldehyde. Po 2 hodinách bolo tkanivo preložené do 15% sacharózy a nasledujúci deň do 30% sacharózy na ďalších 24 hodín. Následne bolo tkanivo nakrájané na kryostate (Leica CM1850) na 25 μ m rezy, ktoré boli uložené priamo na sklíčka a použité na imunohistochemické farbenie zápalových buniek v mieche a na určenie rozsahu zápalovej reakcie pred a po podaní ATR. Použité boli 3 primárne protilátky: ED-1 (makrofágy), GFAP (astrocyty) a IBA-1 (mikroglia). Sklíčka s rezmi boli cez noc vysušené v exikátore. Následne boli 4 x 5 minút premyté v 0,05% PBS-T a 1,5 hodín blokované v 5% NGS

(normal goat serum) alebo NRS (normal rabbit serum). Po blokovaní sa na sklíčka pridala primárna protilátka, ktorá bola ponechaná na sklíčkach cez noc (v chlade) pre optimálne pôsobenie. Nasledujúci deň sa sklíčka s rezmi miechy opäť premyli 4 x 5 minút v 0,05% PBS-T a vzorky boli inkubované v sekundárnej protilátke počas 2 hodín. Zvyšky protilátok boli odstránené premývaním v 0,05% PBS-T po dobu 4 x 5 minút a 2-3 sekundy v destilovanej vode. Sklíčka s rezmi sa nechali vysušiť do nasledujúceho dňa v chladničke a následne sa zamontovali s montovacím médiom Prolong.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Koncentrácia IL-1 β , ktorú sme detekovali pomocou Elisa kitu, dosahovala pred poškodením hodnoty 40 \pm 1,33 pg/ml. Vo vzorkách, ktoré sme odobrali 4 hodiny po poškodení, stúpla jeho koncentrácia na 490 \pm 32,08 pg/ml. Po 24 hodinách sa hodnoty IL-1 β znížili na 60 \pm 3,86 pg/ml. Podanie atorvastatínu znížilo koncentráciu IL-1 β 4 hod. po poškodení približne na kontrolnú úroveň (50 \pm 2,94 pg/ml) a po 24 hodinách dosahovala koncentrácia IL-1 β rovnaké hodnoty, ako v kontrolnej skupine (60 \pm 3,91 pg/ml). Pri imunohistochemickej analýze sme sa zamerali na rozdiely medzi infiltráciou makrofágov a aktiváciou mikroglie a astrocytov po kompresii a po liečbe. V skupinách so 4 hodinovým prežívaním sme nezaznamenali migráciu makrofágov do poškodeného tkaniva, keďže prvé makrofágy sa objavujú až po 6 hodinách (Carlson a kol., 1998). V skupine s 24 hodinovým prežívaním bez podania atorvastatínu sme pozorovali výrazný prísun makrofágov do miesta poškodenia. Kvantitatívna analýza buniek, uskutočnená pomocou programu ImageJ ukázala, že počet infiltrovaných buniek v sivej hmote je podstatne vyšší (300 \pm 22,96) ako v bielej hmote (250 \pm 20,42). Po podaní atorvastatínu sme po 24 hodinovom prežívaní pozorovali výrazne menší počet makrofágov ako po kompresii. V sivej hmote sme zaznamenali 150 \pm 40,16 a v bielej hmote 100 \pm 33,35 buniek. Rozdiely medzi

kontrolnou a liečenou skupinou boli v sivej aj v bielej hmote signifikantné ($p < 0.05$). Astrocyty a mikroglia majú za fyziologických podmienok malé jadro a dlhé výbežky. Po kompresii a 4 hodinovom prežívaní sme pozorovali astrocyty v reaktívnom stave s veľkými jadrami a kratšími výbežkami. V liečenej skupine si väčšina astrocytov zachovala pôvodnú morfológiu. Podobne ako astrocyty, aj mikroglia po poškodení mení svoju morfológiu na tzv. aktivované štádium. V skupine so 4 hodinovým prežívaním bez podania atorvastatínu sme pozorovali mikroglia s veľkými jadrami a skrátenými výbežkami a v skupine s atorvastatínom mali niektoré mikrogliové bunky len mierne zväčšené jadrá. Po 24 hodinách sme pozorovali mikroglia a astrocyty s veľkými jadrami a takmer žiadnymi výbežkami. V skupine s atorvastatínom si zachovali astrocyty aj mikrogliové bunky podobnú morfológiu ako 4 hodiny po poškodení.

Výsledky našich experimentov ukazujú, že po traumatickom poškodení miechy dochádza ku zápalovej reakcii, pri ktorej sa uvoľňujú prozápalové cytokíny, aktivujú sa rezidentné bunky a dochádza k infiltrácii buniek imunitného systému. Atorvastatín, ako protizápalové liečivo, zmiernil priebeh zápalovej odpovede. Znížil uvoľňovanie prozápalových cytokínov takmer na kontrolnú úroveň, zabránil nadmernej infiltrácii makrofágov a aktivácii rezidentných buniek v poškodenom tkanive. Keďže zápalová reakcia sa podieľa na šírení sekundárneho poškodenia, atorvastatín môže pri dlhodobom prežívaní zlepšiť proces regenerácie tkaniva a prerastania axónov v mieste poškodenia.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0173/14 a APVV- 15-0766.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Carlson S L, Parrish M E, Springer J E, Doty K, Dossett L. Acute Inflammatory Response in Spinal Cord Following Impact Injury. *Experimental Neurology*. 1998; 151: 77-88.
2. Chan C M. Inflammation: Beneficial or Detrimental After Spinal Cord Injury? *Recent Patentson CNS Drug Discovery*. 2005; 3: 189-199.
3. Hausmann O. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2003; 41: 369-378.
4. Laliberte A M, Fehlings M G. The immunological response to spinal cord injury: Helpful or harmful? *Experimental Neurology*. 2013; 247: 282-5.
5. Pannu R, Barbosa E, Singh K A, Singh I. Attenuation of Acute Inflammatory Response by Atorvastatin After Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neuroscience Research*. 2005; 79: 340-350.
6. Pannu R, Douglas K Ch, Barbosa E, Singh I, Singh A K. Post- trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*. 2007; 101: 181-200.
7. Silva A N, Sousa N, Reis L R, Salgado J A. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*. 2014; 114: 25-57.

ZMENY V SUBPOPULÁCIÁCH LYMFOCYTOV V TENKOM ČREVE MYŠÍ PO PROBIOTICKEJ TERAPII A INFEKЦИИ *TRICHINELLA SPIRALIS*

Bucková B.¹, Dvorožňáková E.¹, Lauková A.²

¹Parazitologický ústav, SAV, Košice,

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo sledovať výskyt pomocných a cytotoxických T lymfocytov a B lymfocytov v epiteli a *lamina propria* tenkého čreva u myši po podávaní probiotických kmeňov a infekcii *Trichinella spiralis*. Kmene (*Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558, *Enterococcus durans* ED26E/7, *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7421, *Lactobacillus plantarum* 17L/1) boli podávané myšiam denne v dávke 100 µl (10⁹ KTJ/ml) a myši boli infikované 400 larvami *T. spiralis* na 7. deň probiotickej terapie. Fenotyp lymfocytov (CD4, CD8 a CD19) bol stanovený prietokovou cytometriou. *L. fermentum* AD1 = CCM7421 a *L. plantarum* 17L/1 zvýšili počty pomocných CD4 T lymfocytov v epiteli a cytotoxických CD8 T lymfocytov v *lamina propria* čreva na 7. deň aplikácie, pred parazitárnou infekciou. Infekcia *T. spiralis* spôsobila významnú inhibíciu sledovaných lymfocytárných subpopulácií od 5. do 25. dňa po infekcii (p.i.). *L. fermentum* AD1 = CCM7421 a *L. plantarum* 17L/1 zreštaurovali počty CD4 T buniek v epiteli aj v *lamina propria* na úroveň zdravej kontroly od 11. dňa p.i. Všetky kmene stimulovali počty CD8 T buniek u infikovaných myši, ale oproti kontrole boli CD8 T bunky zredukované v epiteli do 25. dňa p.i. a v *lamina propria* len na 5. deň p.i. Inhibícia B buniek (CD19) v tenkom čreve po infekcii *T. spiralis* nebola ovplyvnená probiotickou terapiou do 25. dňa p.i., ale na 32. deň p.i. bola zistená stimulácia B buniek po aplikácii *E. durans* ED26E/7 a *L. fermentum* AD1 = CCM7421. Najvýraznejší imunomodulačný účinok na CD4 T subpopuláciu počas črevnej fázy infekcie *T. spiralis* vykazovali kmene *L. fermentum* AD1 = CCM7421 a *L. plantarum* 17L/1, subpopulácia CD8 T buniek bola aktivovaná aj kmeňmi *E. faecium* AL41 = CCM8558 a *E. durans* ED26E/7.

ÚVOD

Infekcia *Trichinella spiralis* je charakteristická enteritídou (vyvolanou pohlavne zrelými trichinelami) a zápalom s degeneratívnymi zmenami v priečne pruhovanom svalstve (vyvolané larvami). Patológia trichinelózy je v podstate reakciou na iniciálnu zápalovú odpoveď počas črevnej fázy a na následné alergické a zápalové odpovede počas migrácie lariiev a svalovej invázie hostiteľa (Dvorožňáková a Dubinský, 2014). Efektorové mechanizmy proti trichinelám sú závislé od T buniek, ktoré indukujú zápalové zmeny, cytokínovú a protilátkovú odpoveď. Dôležitými zložkami črevnej imunity sú voľné intraepitelové lymfocyty a lymfocyty v *lamina propria*, ktoré sa zapájajú do regulácie a priebehu imunitnej odpovede. Črevný epitel zahŕňa heterogénnu populáciu T lymfocytov, väčšina z nich sú cytotoxické CD8 T bunky, ďalej pomocné CD4 T bunky a regulačné T bunky (Delcenserie a kol., 2008). Výkonnú zložku črevnej imunity tvoria bunky *lamina propria*, obsahujúce prevažne pomocné T lymfocyty, B lymfocyty a IgA produkujúce plazmatické bunky, menej dendritické bunky, makrofágy, neutrofil, eozinofily a mastocyty (Toman a kol., 2009).

Črevná mikroflóra výrazne ovplyvňuje rozvoj, maturáciu a moduláciu imunitného systému pri infekciách. Zdraviu prospešné probiotické kmene v čreve hostiteľa, ako sú napr. laktobacily, bifidobaktérie, enterokoky, sú schopné zvyšovať aktivitu črevnej sliznice, inhibovať patogénnu mikroflóru a modulovať imunitnú odpoveď, avšak tieto ich vlastnosti sú kmeňovo špecifické (Donelli a kol., 2013; Butel, 2014). Črevné parazity ovplyvňujú mikroflóru čreva a modifikujú rovnováhu medzi mikroorganizmami, imunitným systémom a patogénmi. Črevná

mikroflóra zasa výrazne ovplyvňuje patofyziológiu parazitárnej infekcie (Travers a kol., 2011). Preto sa zvyšuje záujem vysvetliť interakcie medzi mikroorganizmami, imunitnou odpoveďou, črevnými zápalovými procesmi a parazitmi.

V našej práci sme sa zamerali na kvantitatívne zmeny lymfocytárnych subpopulácií v epiteli a *lamina propria* tenkého čreva myši po imunomodulácii bakteriocín-produkujúcimi a probiotickými kmeňmi a parazitárnej infekcii *T. spiralis*.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 126 myši BALB/c. Samce s hmotnosťou 18-20 g boli rozdelené do šiestich skupín: Kontrola (n = 21) – zdravé myši bez infekcie a bez probiotickej terapie. 1. skupina (n = 21) – infekcia *T. spiralis* bez probiotickej terapie. 2. skupina (n = 21) – *Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558 a infekcia *T. spiralis*. 3. skupina (n = 21) – *E. durans* ED26E/7 a infekcia *T. spiralis*. 4. skupina (n = 21) – *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7421 a infekcia *T. spiralis*. 5. skupina (n = 21) – *L. plantarum* 17L/1 a infekcia *T. spiralis*. Bakteriálne kmene boli podávané *per os* denne v dávke 100 μ l (10^9 KTJ/ml v Ringerovom roztoku). Myši boli infikované *per os* dávkou 400 lariev *T. spiralis*/myš na 7. deň aplikácie bakteriálnych kmeňov.

Bakteriocín-produkujúce kmene s probiotickým účinkom *E. faecium* AL41 = CCM8558 – environmentálny izolát, produkujúci enterocín (*Ent*) M; *E. durans* ED26E/7 – izolát z ovčieho mlieka, produkujúci durancin-like bakteriocín; probiotický kmeň *L. fermentum* AD1 = CCM7421, izolát z trusu psa; boli pripravené na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice. Bakteriálny kmeň *L. plantarum* 17L/1 – izolát z ovčieho sudovaného syra pochádzal z Výskumného ústavu mliekarenskeho, Žilina.

Intraepitelové (IEL) a *lamina propria* lymfocyty (LPL) boli izolované modifikovanou metódou podľa Solano-Aguilar a kol. (2000). Imunofenotypizácia lymfocytov bola vykonaná metódou priamej imunofluorescencie použitím anti-myšacích monoklonálnych protilátok, CD4(FITC), CD8(PE) a CD19(FITC) (všetky PharMingen) a analýzou na prietokovom cytometri (Becton Dickinson Biosciences). Výsledky boli spracované one-way ANOVA a post hoc Tukey testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Už po 7 dňoch aplikácie laktobacilov (*Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7421 a *L. plantarum* 17L/1) sme zaznamenali signifikantný ($P < 0,05$; $P < 0,01$) nárast počtu CD4 T buniek v črevnom epiteli a CD8 T buniek v *lamina propria* čreva, teda ešte pred infekciou *T. spiralis*. Počas črevnej fázy a skorej svalovej fázy infekcie (od 5. do 25. dňa p.i.) došlo k výraznému ($P < 0,05$; $P < 0,01$) poklesu lymfocytárnych subpopulácií v epiteli a *lamina propria* tenkého čreva. Morales a kol. (2002) zistili rovnaké zmeny oboch subpopulácií po nakazení a predpokladajú, že pokles CD4 T buniek je spojený s redukciami počtu naivných buniek a zvyšovaním počtu pamäťových buniek.

V našom experimente laktobacily zreštaurovali infekciou indukovanú inhibíciu pomocných CD4 T buniek v epiteli aj v *lamina propria* na úroveň zdravej kontroly od 11. dňa p.i. Enterokoky (*Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558 a *E. durans* ED26E/7) nemali vplyv na CD4 T lymfocyty, s výnimkou 11. dňa p.i., keď boli CD4 T lymfocyty v *lamina propria* stimulované na úroveň kontroly. CD4 T lymfocyty výrazne prispievajú k odstráneniu parazita cez aktiváciu MHC II. triedy, ale CD8 T bunky nemajú vplyv na vypudenie červov z čreva (Vallance a kol., 1999). Podľa nálezu dospelých trichinel v čreve v našich pokusoch bolo rýchlejšie odstránenie parazita z čreva u myši modulovaných kmeňmi *E. faecium* AL41 = CCM8558 a *E. durans* ED26E/7 so 65 % redukciami na 11. deň p.i. (Bucková a kol., 2015). Na 18. deň p.i. už neboli zistené adulty v čreve, iba u infikovaných myši modulovaných *L. fermentum* AD1 = CCM7421. Predpokladáme, že na odstránení červov z čreva sa aktívne

zúčastnili vysoké počty slezinových CD4 T buniek po terapii enterokokmi (Dvorožňáková a kol., 2014; McDermott a kol., 2005). Mukozálne CD4 T bunky regulujú fyziológiu čreva (zápal, hyperkontraktilita, hypersekrecia mucínu), ktorá sa podieľa na vypudení červov. Pravdepodobne dlhšia prítomnosť parazita v čreve myši modulovaných laktobacilmi antigénne stimulovala črevnú CD4 T subpopuláciu dlhšiu dobu.

Na 11. a 18. deň p.i. došlo k výraznej ($P < 0,05$) stimulácii intraepitelových CD8 T buniek po aplikácii všetkých kmeňov, avšak, nedosiahli úroveň kontroly. Po podávaní laktobacilov a enterokokov boli hodnoty CD8 T lymfocytov v epiteli čreva znormalizované na úroveň zdravých myši na 25. resp. 32. deň p.i., t.j. vo svalovej fáze infekcie. V *lamina propria* boli CD8 T lymfocyty zreštaurované už od 11. dňa p.i. pri všetkých probiotických kmeňoch, so signifikantnou stimuláciou ($P < 0,05$; $P < 0,01$) v porovnaní s infikovanou skupinou bez terapie.

Zvyšovanie zastúpenia oboch populácií T buniek počas svalovej fázy trichinelózy môže súvisieť s vývinom lariev v živných bunkách, ktoré majú úzky vzťah s makrofágmi, CD4 a CD8 T lymfocytmi a B lymfocytmi (Beiting a kol., 2007). Pri sledovaní zastúpenia CD19 B buniek v tenkom čreve bol ich výskyt významne ($P < 0,05$; $P < 0,01$) redukovaný vo všetkých experimentálnych skupinách do 11. dňa p.i., potom ich počty v epiteli a *lamina propria* mierne narastali. Novonarodené larvy (NBL) môžu byť eliminované za pomoci bunkovej cytotoxicity závislej na protilátkach ešte predtým, než napadnú svaly (Wang a Bell, 1988). Až na 32. deň p.i. bola zistená stimulácia B lymfocytov po aplikácii kmeňov *E. durans* 26E/7 a *L. fermentum* AD1 = CCM7421. Vo svalovej fáze infekcie *T. spiralis* sme v našich pokusoch (Bucková a kol., 2015) zistili prvé svalové larvy na 18. deň p.i. a v priemere 55 % redukcii svalových lariev u infikovaných myši s aplikáciou všetkých testovaných probiotických kmeňov na 25. deň p.i. K tejto redukcii mohli prispieť aj stimulované CD8 T lymfocyty z *lamina propria* čreva po probiotickej terapii, ktoré svojim cytotoxickým účinkom môžu eliminovať novonarodené larvy ešte pred ich migráciou do svalov.

Zmeny v subpopuláciách intraepitelových lymfocytov a lymfocytov v *lamina propria* indukované aplikáciou probiotických kmeňov naznačujú pozitívnu moduláciu črevnej imunity pri trichinelovej infekcii a perspektívne uplatnenie testovaných kmeňov v terapii trichinelózy. Aktivácia T buniek v tenkom čreve myši infikovaných *T. spiralis* môže prispieť k odstráneniu červov z čreva a stimulovať protiparazitárnu imunitnú odpoveď aj vo svalovej fáze infekcie.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Beiting DP., Gagliardo LF., Hesse M. a kol. J. Immunol. 2007; 178: 1039-1047.
2. Bucková B., Dvorožňáková E., Hurníková Z. a kol. Folia Vet. 2015; 59: 241-246.
3. Butel MJ. Med. Mal. Infect. 2014; 44: 1-8.
4. Delcenserie V., Martel D., Lamoureux M. a kol. Curr. Issues Mol. Biol. 2008; 10: 37-54.
5. Donelli G., Vuotto C., Mastromarino P. Microb. Ecol. Health. Dis. 2013; 24: doi:10.3402/mehd.v24i0.20105.
6. Dvorožňáková E., Hurníková Z., Revajová V. a kol. Slov. Vet. Čas. 2014; 39: 71-74.
7. Dvorožňáková E., Dubinský P. Imunita pri tkanivových helmintózach. 1. vyd., 2014, 164.
8. McDermott JR., Humphreys NE., Forman SP. a kol. J. Immunol. 2005; 175: 3207-3213.
9. Morales MA., Mele R., Sanches M. a kol. Infect Immun. 2002; 70: 233-239.
10. Solano-Aguilar GI., Vengroski KG., Beshah E. a kol. J. Immunol. Methods 2000; 241: 185-199.
11. Toman M. a kol. Veterinárni imunológie. 2. vyd., 2009, 392.
12. Travers MA., Florent I., Kohl L. a kol. J. Parasitol Res. 2011; 2011:doi:10.1155/2011/610769.
13. Vallance BA., Galeazzi F., Collins SM. a kol. Infect. Immun. 1999; 67: 6090-6097.
14. Wang CH., Bell RG. Parasite Immunol. 1988; 10: 293-308.

ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA KOZÍCH LAKTOBACILOV

Čuvalová A., Kmeť V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Štúdia sa zamerala na účinky kozích laktobacilov na tvorbu biofilmu u kmeňov *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* a troch kmeňov *Escherichia coli* a ovplyvňovanie quorum sensing. Tvorba biofilmu a antibiofilmová aktivita laktobacilových supernatantov bola stanovená použitím Nunc Maxisorp mikrotitračných platničiek. Vplyv laktobacilov na quorum sensing bol testovaný v SPL Immuno platničkách. Všetky supernatanty mali inhibičný účinok na tvorbu biofilmu. Výraznejší antibiofilmový účinok mali laktobacilové supernatanty na kmene *Escherichia coli* v porovnaní so stafylokokmi. Predbežné výsledky štúdie ukázali, že laktobacilové supernatanty sú použiteľné na antibiofilmovú aktivitu.

ÚVOD

Tvorba biofilmu je viacstupňový proces, v ktorom mikrobiálne bunky priľnú k povrchu a následne produkujú extracelulárnu matrix, čo má za následok pevné uchytenie (Sauer, 2003; Stoodley a kol. 2002). Komunikácia baktérií v biofilme je sprostredkovaná mechanizmom quorum sensing. Tvorba biofilmu je dôležitým faktorom patogenity mikroorganizmov (Mah, O'Toole, 2001).

Antibakteriálne látky v supernatantoch laktobacilov, môžu inhibovať rast patogénnych baktérií (Tsai a kol., 2008; Tomas a kol., 2003), ovplyvňovať expresiu faktorov virulencie a tvorbu biofilmu a quorum sensing (Cadieux a kol., 2009).

Cieľom práce bolo testovať anti-biofilmový účinok supernatantov laktobacilových kmeňov ako aj ovplyvňovanie quorum sensing.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálne kmene, média, kultivačné podmienky- V práci bolo použitých 5 laktobacilových kmeňov: K1- *L. reuteri*, K2- *L. mucosae*, K3- *L. mucosae*, KB- *L. johnsonii*, 21L- *L. paracasei*, ktoré boli izolované z kôz a kozích syrov. Použité patogénne kmene boli *S. aureus* 2, *S. aureus* 133, *S. intermedius* 5738 a *Escherichia coli* 14, 21, 24. Na ovplyvňovanie quorum sensing boli použité klinické izoláty *Pseudomonas aeruginosa* 32, 50, 119 a referenčný kmeň *P. aeruginosa* PAO1. *E. coli* pSB 1142 meria homolaktóny AHLs s dlhým reťazcom (C10-C14) u *Pseudomonas aeruginosa*.

Príprava laktobacilových extraktov- Laktobacilové supernatanty boli pripravené podľa Lin a kol. (2015). Laktobacilové kultúry boli centrifugované, filtrované a na odstránenie účinkov kyseliny mliečnej bolo neutralizované pH. Supernatanty boli skladované pri teplote 4 ° C.

Meranie koncentrácie bielkovín- Absorbancia (280 nm) laktobacilových supernatantov bola meraná na prístroji NanoDrop.

Tvorba biofilmu- Kvantifikácia tvorby biofilmu bola vykonaná za použitia Nunc Maxisorp mikrotitračných platničiek (O'Toole, 2011). Ako kontrola bol použitý čistý MH bujón.

Antibiofilmová aktivita laktobacilových extraktov- Efekt piatich laktobacilových supernatantov (K1, K2, K3, KB, 21L) na tvorbu biofilmu u stafylokokov a *E. coli* bol testovaný pridaním 10 µL supernatantu.

Ovplyvňovanie quorum sensing- Vplyv laktobacilových supernatantov (KB a 21L) na quorum sensing u *E. coli* 1142 a *P. aeruginosa* (32, 01, 50, 119) bol testovaný pridaním 10 µL supernatantu. Luminiscencia sa merala pri absorbancii 570 nm v SPL Immuno platničkách.

Štatistika- Výsledky boli štatisticky spracované v programe STATISTICA 9.0 s použitím One Way ANOVA testu a Tukey- testu.

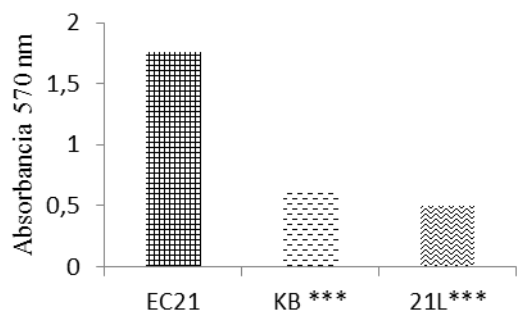
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané koncentrácie laktobacilových supernatantov sú: K1- 21,05 mg/ml, K2- 23,7 mg/ml, K3- 25,2 mg/ml, KB- 15,8 mg/ml, 21L- 16,17mg/ml.

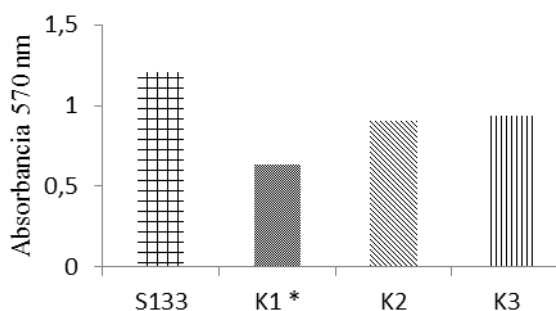
U kmeňov *Escherichia coli* bola tvorba biofilmu približne rovnaká, alebo inhibovaná laktobacilovými supernatantmi. Najväčší inhibičný účinok sme zaznamenali pri supernatantoch KB (*L. johnsonii*) a 21L (*L. paracasei*). Supernatant K3 (*L. mucosae*) mal silný inhibičný účinok len pri kmeni *E. coli* 14 a supernatant K2 (*L. mucosae*) mal výrazný antibiobilmový účinok na dve tretiny z použitých kmeňov. Supernatant K1 (*L. reuteri*) mal len slabý inhibičný účinok.

Vplyv laktobacilových supernatantov na kmeň *Staphylococcus* bol výrazne menší. Výraznejšie rozdiely sme zaznamenali pri supernatantoch K3 (*L. mucosae*) a K2 (*L. mucosae*) len pri kmeni *S. aureus* 2 a supernatant K1 (*L. reuteri*) len pri kmeni *S. aureus* 133. Supernatanty KB (*L. johnsonii*) a 21L (*L. paracasei*) nemali na tvorbu biofilmu stafylokokov výrazný vplyv.

Graf 1. Účinok laktobacilového supernatantu KB a 21L na tvorbu biofilmu u *E. coli* 21, EC21- kontrola

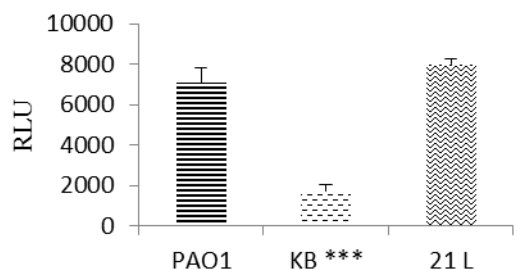


Graf 2. Účinok laktobacilového supernatantu K1, K2 a K3 na tvorbu biofilmu u *S. aureus* 133, S133- kontrola

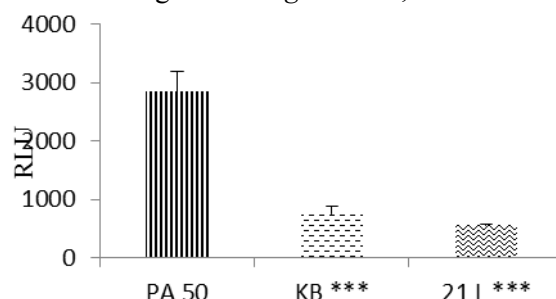


Supernatant KB (*L. johnsonii*) inhiboval quorum sensing u všetkých kmeňov okrem *P. aeruginosa* 119. Laktobacilový supernatant 21L (*L. paracasei*) inhiboval quorum sensing iba u kmeňov *P. aeruginosa* 32 a 50, naopak stimuloval quorum sensing *P. aeruginosa* 119 a PAO1.

Graf 3. Účinok laktobacilov na quorum sensing u *P. aeruginosa* PAO1, PAO1- kontrola



Graf 4. Účinok laktobacilov na quorum sensing u *P. aeruginosa* 50, PA50- kont.



V našej práci sme ukázali, že laktobacilové supernatanty mali výraznejší antibiobilmový účinok na *E. coli* v porovnaní s účinkom na stafylokoky. Sadowska a kol. (2010) zaznamenala zníženie tvorby biofilmu u stafylokokov vplyvom laktobacilov. Inhibičný účinok laktobacilov na *E. coli* zaznamenala v práci Bujňáková a Kmet' (2012), Bujňáková a kol. (2014). Gudina a kol. (2010) uvádza vysokú antiadhezívnu aktivitu pre stafylokoky a naopak nízku pre *E. coli* vplyvom laktobacilov. Účinok laktobacilov na rast a tvorbu biofilmu rôznych patogénnych

Gram–pozitívnych a Gram- negatívnych baktérií uvádza aj Rybalchenko a kol. (2015), ktorý zaznamenali potenciálne inhibičnú aktivitu stafylokokov, *E. coli* a iných baktérií.

Pozorovaná anti-biofilmová aktivita laktobacilových supernatantov proti niekoľkým patogénnym mikroorganizmom z rodu *Staphylococcus* a *E. coli* je nádejná pre ďalšie štúdie s cieľom znížiť mikrobiálnu kolonizáciu na rôznych materiáloch.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bujňáková, D., Kmeť, V. Inhibitory potential of lactobacilli against *Escherichia coli* internalization by HT 29 cells. *Folia Microbiol.* 2012; 57: 269-272.
2. Bujňáková, D., Straková, E., Kmeť, V. In vitro evaluation of the safety and probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from chicken and calves. *Anaerobe.* 2014; 29: 118-127.
3. Cadieux P.A., Burton J.P., Devillard E., Reid G. Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*, *J. Physiol. Pharmacol.* 2009; 60: 13-18.
4. Gudina, E. J., Rocha, V., Teixeira, J. A., Rodrigues, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Applied Microbiology.* 2010; 50: 419-424.
5. Lin, X., Chen, X., Chen, Y., Jiang, W., Chen, H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Diseases.* 2015; 21: 128-134
6. Mah, T.-F. C., O'Toole, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 34–39.
7. O'Toole G.A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. JoVE, 2011, 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi: 10.3791/2437
8. Rybalchenko, O. V., Bondarenko, V. M., Orlova O, G., Markov, A. G., Amasheh, S. Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. *Arch Microbiol.* 2015; 197: 1027-1032.
9. Sadowska, B., Walencka, E., Wieckowska- Szakiel, M., Rozalska, B. Bacteria Competing with the Adhesion and Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol.* 2010; 55: 497-501.
10. Sauer, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol.* 2003; 4: 219.
11. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002; 56: 187–209.
12. Tomas M.S.J., Ocana V.S., Wiese B, Nader- Macias M.E. Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52: 1117-1124.
13. Tsai C.C., Lin P.P., Hsieh Y.M. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe.* 2008; 14: 61-67.

OSTEOPROTEGERÍN – BIOMARKER MNOHÝCH TVÁRÍ

Demková K., Kozárová M.

IV. interná klinika Lekárskej fakulty UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Osteoprotegerín (OPG) sa v súčasnosti nepovažuje už len za kľúčový faktor v regulácii kostnej remodelácie (najmä v procese osteoklastogenézy), ale zohráva dôležitú úlohu aj v procese ektopickej vaskulárnej kalcifikácie, ktorá je dôležitá pri ateroskleróze. Sérová hladina osteoprotegerínu by mohla byť potenciálnym markerom vaskulárnych kalcifikácií s vysokou prediktívnou hodnotou. Cieľom predkladanej štúdie bolo posúdiť vzťah medzi hladinou osteoprotegerínu a prítomnosťou a závažnosťou periférneho artériového ochorenia dolných končatín, aterosklerózou na karotidách, prítomnosťou diabetickej neuropatie vyjadrenej prahom vibračnej citlivosti a jeho asociáciu s prekonanými kardio- a cerebrovaskulárnymi príhodami u pacientov s diabetes mellitus 2. typu.

ÚVOD

Osteoprotegerín (OPG) patrí do rodiny receptorov pre tumor nekrotizujúci faktor. Je to solubilný receptor pre RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), ktorý inhibuje interakciu medzi RANKL a jeho membránovým receptorom RANK (receptor activator of nuclear factor kappa-B). Os RANKL/OPG/RANK má úlohu v regulácii kostnej remodelácie (najmä osteoklastogenéze, t.j. diferenciácii, funkcii a prežívaní osteoklastov), v karcinogéze a centrálnej termoregulácii. Tento systém má pravdepodobne úlohu aj v procese aterogenézy a destabilizácii aterosklerotického plátu tým, že ovplyvňuje ektopickú vaskulárnu kalcifikáciu. Diabetes mellitus 2. typu (DM2) urýchľuje proces aterosklerózy, dôsledkom čoho sú závažné kardio- a cerebrovaskulárne príhody. Ateroskleróza pri DM2 je typicky polyvaskulárna a multifokálna a môže dlho prebiehať asymptomaticky. Sérová hladina osteoprotegerínu by mohla byť potenciálnym markerom vaskulárnych kalcifikácií s vysokou prediktívnou hodnotou.

MATERIÁL A METODIKA

Cieľom štúdie je zistiť asociáciu karotídových a/alebo periférnych aterosklerotických lézií na dolných končatinách, chronickej ischemickej choroby srdca (ICHS), infarktu myokardu (IM) a cievnej mozgovej príhody (CMP) so sérovou hladinou osteoprotegerínu u 114 konsekutívnych pacientov s diabetes mellitus 2. typu. Priemerný vek pacientov bol $62,6 \pm 8,8$ r., 47,3% predstavovali muži ($n=54$).

Pacienti boli vyšetrení pomocou Doppler ultrazvuku, meraná bola intimomediálna hrúbka a vypočítané členkovo-ramenné indexy (ABI) a prstovo-ramenné indexy (TBI). Testovaný bol vplyv metabolickej kompenzácie vyjadrený hodnotou glykovaného hemoglobínu (HbA1c %, DCCT). Sérový osteoprotegerín bol stanovený ELISA metódou v certifikovanom biochemickom laboratóriu. Práh vibračnej citlivosti (VPT) bol meraný prístrojom Biothesiometer. Údaje o komorbiditách (ICHS, IM, CMP), pacientov boli získané z elektronickej zdravotnej dokumentácie. Štatistické analýzy boli realizované v programe SigmaStat 13.0. Výsledky sú uvádzané ako priemer \pm smerodajná odchýlka pri normálnom rozložení hodnôt, resp. ako medián (25., 75. percentil) v prípadoch, kedy namerané hodnoty neboli normálne rozložené. Na štatistické vyhodnotenie rozdielov medzi kvantitatívnymi parametrami v dvoch skupinách sme použili nepárový Studentov t-test pri normálnom rozložení hodnôt, resp. neparametrický Mannov-Whitneyho U-test, v prípade, keď namerané hodnoty neboli normálne rozložené. Rozdiely pri porovnávaní viacerých skupín boli vyhodnotené použitím jednorozmernej analýzy rozptylu (ANOVA). Zastúpenie kategorických premenných v rámci jednotlivých skupín sme testovali chi-kvadrátovým testom

(χ^2). Na overovanie vzťahov medzi kvantitatívnymi premennými sme použili Pearsonove korelačné koeficienty. Viacrozmerná postupná lineárna regresia bola použitá v multivariátnej analýze. Rozdiely a závislosti boli pokladané za štatisticky významné pri hladine významnosti $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Súbor pacientov sme rozdelili na základe nameraných ABI na 3 skupiny – bez periférneho artériového obliterujúceho ochorenia, PAOO (ABI $>0,9$), s PAOO (ABI $<0,9$) a s mediokalcinózou (ABI $>1,3$). Pacienti sa v jednotlivých skupinách signifikantne nelíšili v hodnote sérového osteoprotegerínu, i keď bol naznačený trend k najvyššej hodnote osteoprotegerínu u pacientov s mediokalcinózou (Tabuľka 1). Asociáciu sérovej hladiny osteoprotegerínu k jednotlivým nameraným parametrom pri neinvazívnom angiologickom vyšetrení DK dokumentuje Tabuľka 2. Vzťah osteoprotegerínu k prstovobrachiálnym indexom (TBI) nedosiahol hladinu štatistickej významnosti.

Pearsonove korelačné indexy boli najsignifikantnejšie pre vzťah sérového osteoprotegerínu k veku ($r=0,487$, $p < 0,0001$), pozitívna bola aj jeho asociácia s trvaním diabetu ($r=0,239$, $p=0,03$). Vzťah osteoprotegerínu k fajčiarskemu statusu nebol signifikantný. Ženy-diabetičky 2.typu mali signifikantne vyššiu hladinu osteoprotegerínu oproti mužom (medián 6,967 ng/ml vs. 5,897 ng/ml, $p=0,010$). Asociácia OPG s metabolickým kompenzáciou diabetu vyjadrenou hodnotou glykovaného hemoglobínu (HbA1c %, DCCT) takisto nebola potvrdená.

Hrúbka intimomediálneho komplexu (IMT) na karotidách signifikantne nekorelovala s hladinou sérového osteoprotegerínu. Po rozdelení súboru na kvartily podľa hrúbky IMT bolo OR pre osteoprotegerín v kvartile s najširším IMT oproti kvartilu s najužším IMT 1,424 (CI 1,057-1,92, $p=0,020$). Sérová hladina osteoprotegerínu neovplyvnila prítomnosť plátov v karotickom riečisku.

Pre prah vibračnej citlivosti (VPT) l.dx. bol korelačný index s OPG ($r=0,22$, $p=0,055$) pre VPT l.sin ($r=0,264$, $p=0,023$)

Analýzou prítomnosti multifokálnej aterosklerózy sme nepotvrdili asociáciu s ICHS, infarktomyokardu, ale zistili sme signifikantné rozdiely v skupine pacientov s prekonanou CMP. Pacienti s prekonanou CMP mali signifikantne vyššiu osteoprotegerín ako pacienti bez CMP (medián 7,118 ng/ml vs. 6,201 ng/ml, $p=0,011$).

V multivariátnej lineárnej regresnej analýze boli najsilnejšími prediktormi hladiny sérového osteoprotegerínu vek pacientov ($\beta=0,137$, $p < 0,001$) a trvanie diabetu ($\beta=0,113$, $p=0,021$).

Tab. 1 Sérová hladina osteoprotegerínu v závislosti na hodnote ABI

	Bez PAOO (ABI $>0,9$) n=64	S PAOO (ABI $<0,9$) n=23	Mediokalcinóza (ABI $>1,3$) n=16	p
Osteoprotegerín ng/ml medián (25., 75.percentil)	6,358 (5,127; 8,558)	6,041 (5,093; 7,408)	6,931 (5,424; 9,017)	NS

Tab. 2. Pearsonove korelačné indexy sérovej hladiny osteoprotegerínu k nameraným hodnotám členkových tlakov na arteria dorsalis pedis (ADP), arteria tibialis posterior (ATP) a vypočítaným členkovo-brachiálnym indexom (ABI) na základe týchto hodnôt (ABI-ADP, ABI-ATP), resp. priemerného ABI (average ABI), l.sin vľavo, l.dx. vpravo.

	ADP l.dx.	ATP l.dx.	ABI l.dx.-ADP	ABI l.dx.-ATP	ABI average l.dx.	ADP l.sin	ATP l.sin.	ABI l.sin.-ADP	ABI l.sin.-ATP	ABI average l.sin
r	0,171	0,256	0,066	0,144	0,112	0,271	0,299	0,217	0,235	0,239
p	0,117	0,0186	0,545	0,192	0,309	0,012	0,006	0,0470	0,032	0,0296

V súbore diabetikov 2.typu sme dokázali silnú asociáciu hladiny sérového osteoprotegerínu s vekom pacientov a trvaním diabetu. Zároveň sme potvrdili, že najvyššie hladiny osteoprotegerínu sú v skupine pacientov s najširším IMT meranom na karotidách. Vzťah osteoprotegerínu k neinvazívnym angiologickým parametrom stanovovaným pri periférnom artériovom ochorení nebol konzistentný. Potvrdili sme však asociáciu s prahom vibračnej citlivosti ako markerom diabetickej neuropatie. Hladina sérového osteoprotegerínu bola významne vyššia v skupine pacientov s prekonanou cievnou mozgovou príhodou, kým jeho vzťah k ischemickej chorobe srdca a infarktu nebol potvrdený.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0389/14

POUŽITÁ LITERATÚRA:

1. Y. Niu, W. Zhang, Z. Yang, X. Li, J. Wen, S. Wang, *et al.* Association of plasma osteoprotegerin levels with the severity of lower extremity arterial disease in patients with type 2 diabetes. *BMC Cardiovasc Disord.* 2015; 15: 86
2. N. Soysal-Atile, S. Guldiken, T. Sipahi, F. Yukcu, B. Ekiz-Bilir, S. Huseyin, *et al.* Relationship between an osteoprotegerin gene polymorphism and diabetic vascular complications. *Clin Lab.* 2015; 61 (5–6): 595–601
3. Y. Niu, Z. Yang, X. Li, W. Zhang, S. Lu, H. Zhang, *et al.* Association of osteoprotegerin with impaired glucose regulation and microalbuminuria: the REACTION study. *BMC Endocr Disord.* 2015; 15 (1):75
4. S. Yaturu, J. Rains, S.K. Jain Relationship of elevated osteoprotegerin with insulin resistance, CRP, and TNF-alpha levels in men with type 2 diabetes. *Cytokine.* 2008. 44: 168–171
5. S. Kiechl, P. Werner, M. Knoflach, M. Furtner, J. Willeit, G. Schett The osteoprotegerin/RANK/ RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006. 4: 801–811

DOPAD 5-FLUOROURACILU VYUŽITÍM LEMNA SP. TESTU PRE INHIBÍCIU RASTU

Eckerová R.¹, Toropila M.¹, Toropilová D.¹, Stepnowski P.²

¹Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF, Košice

²Department of chemistry, University of Gdansk, Poland

ABSTRAKT

Lemna minor L. patrí medzi široko používané modelové organizmy v štúdiu rastlinnej fyziológie, genetiky, ekológie a monitorovania životného prostredia. Podľa štandardizovaných pokynov pre OECD testovanie chemikálií, revidovaným návrhom smernice 221 inhibície rastu *Lemna* sp. bolo testované cytostatikum zo skupiny antimetabolitov, derivátu pyrimidínov, 5-fluorouracil, ktoré má uplatnenie v paliatívnej liečbe diseminovaných kolorektálnych karcinómov a nádorov prsníka. Navrhovaná metóda bola validovaná medzinárodne platným krúžkovým testom. Sledovanie toxicity vybraného liečiva o koncentrácii 10 mg/L v troch nezávislých testoch a následný výpočet EC₅₀ použitím matematického softwaru R, špecializovaného na štatistiku so sumarizáciou výsledkov, bolo hlavným cieľom experimentálneho výskumu.

ÚVOD

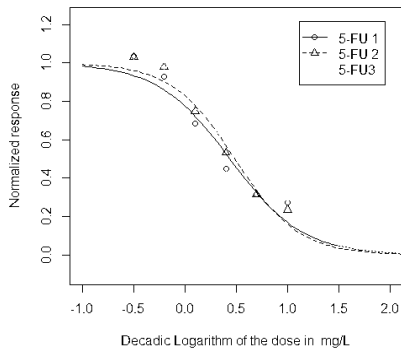
Žaburinka menšia (*Lemna minor* L.) sa zaraďuje medzi jednoklíčnolistové vodné rastliny patriace do čeľade *Araceae*, triedy *Spermatopsida* (Systema Naturae, 2000). Vzhľadom na ich malý vzrast a ľahkú schopnosť manipulácie, rýchlosť vegetatívneho množenia s tvorbou geneticky identických klonov a vysokou senzitivitou pre anorganické / organické látky, patrí medzi široko používané modelové organizmy v štúdiu rastlinnej fyziológie, genetiky, ekológie a monitorovania životného prostredia (Brain a kol., 2007; Scherr a kol., 2008). Rastliny ako modelové organizmy prinášajú do vedeckej sféry omnoho viac výhod ako zvieracie modely, nevynímajúc vytvorenie prirodzených podmienok, schopnosť rozmnožovať sa, no jedným z najdôležitejších faktorov je, využívanie rastlín eliminujúcich právne a etické aspekty spojené s používaním cicavčích modelových organizmov (Guttman, 2004; Starkey a kol., 2009; Van Baarlen P a kol., 2007). Rastlinné modely čelia niekoľkým obmedzeniam, ako je napr. rast v axenickom prostredí z čoho vychádza nerovnomerný rast a vývin subjektov vyskytujúci sa medzi jednotlivcami.

MATERIÁL A METODIKA

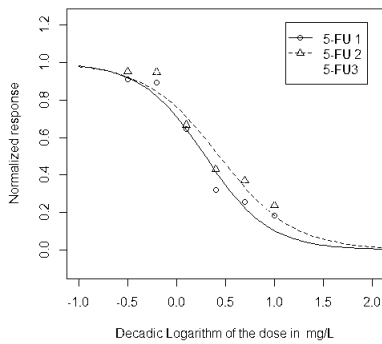
Experimentálny výskum podlieha štandardizovaným pokynom pre OECD testovanie chemikálií, revidovaným návrhom smernice 221, júl 2002. Sledovaná bola toxicita liečiva 5-fluorouracil zo skupiny antimetabolitov, derivát pyrimidínov, o koncentrácii 10 mg/L v troch nezávislých opakovaníach. Pre výpočet EC₅₀ bol použitý matematický software R, špecializovaný na štatistiku, ktorý poskytol nielen čiastkové výsledky, ale aj ich sumarizáciu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

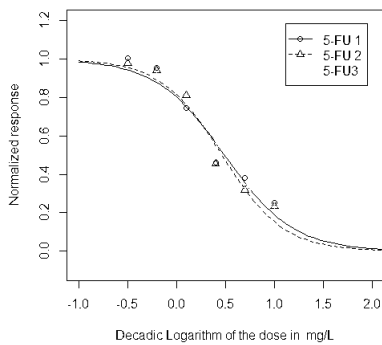
Sumarizáciou grafov a ich následných údajov dostávame priemerné hodnoty pre inhibíciu kultúry *Lemna minor* L..

Obr.1**Tab.1**

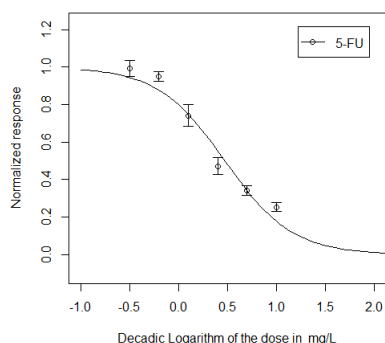
Dátum	Substancia	EC50	EC50	
			2,5%	97,5%
5.2.2016	5-FU 1	2,738	1,700	4,818
	5-FU 2	3,068	2,198	4,425
	5-FU 3	3,179	1,851	6,408

Obr.2**Tab.2**

Dátum	Substancia	EC50	EC50	
			2,5%	97,5%
12.2.2016	5-FU 1	1,954	1,351	2,901
	5-FU 2	2,726	1,756	4,520
	5-FU 3	3,113	1,995	5,295

Obr.3**Tab.3**

Dátum	Substancia	EC50	EC50	
			2,5%	97,5%
19.2.2016	5-FU 1	3,085	2,051	4,943
	5-FU 2	2,916	2,055	4,300
	5-FU 3	2,923	2,338	3,698

Obr.4**Tab.4**

Substancia	EC50	EC50	EC50
		2,5%	97,5%
5-FU	2,972	2,704	3,274

Väčšina modelových organizmov zdieľa niekoľko spoločných rysov, ktoré ich robia prístupné pre štúdiu v laboratóriách ako je malý vzrast, ľahko vytvárajúce životné podmienky, rýchly životný cyklus. Tieto kritéria spĺňa vybraný modelový organizmus *Lemna minor L.* Vybraná chemická látka, cytostatikum 5- fluorouracil, vykázal v experimente toxicitu pri množstve 10 mg/L priemernú hodnotu toxicity z troch nezávislých stanovení EC_{50} 2,972. Podľa hodnotenia Európskej Únie je 5-fluorouracil hodnotený ako vysoko toxická látka pre vodné organizmy s toxicitou $EC_{50} < 1$ mg/L (Zounkova a kol., 2010).

Pod'akovanie patrí prof. Stepnowskému, môjmu školiteľovi počas výskumnej stáže na Univerzite v Gdansk, Katedre chémie, kde bol experiment realizovaný.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Brain R A, Solomon KR. A protocol for conducting 7-day daily renewal tests with *Lemna gibba*. Nat Protoc 2007; 2: 979–987.
2. Guttman DS. Plants as models for the study of human pathogenesis. Biotechnol Adv. 2004; 22: 363–382.
3. Scherr C, Simon M, Spranger J, Baumgartner S. Test system stability and natural variability of a *Lemna gibba L.* bioassay. PLoS One. 2008; 3: e3133.
4. Starkey M, Rahme LG. Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. Nat Protoc. 2009; 4: 117–124.
5. Systema Naturae 2000. On-line databáza.
6. Van Baarlen P, van Belkum A, Thomma BPHJ. Disease induction by human microbial pathogens in plant-model systems: potential, problems and prospects. Drug Discov Today. 2007; 12: 167–173.
7. Zounkova, R., L. Kovalova, L. Blaha, W. Dott. Ecotoxicity and genotoxicity assessment of cytotoxic antineoplastic drugs and their metabolites. Chemosphere. 2010; 81(2): 253-260.

GRAVIOLA, JEJ ÚČINKY VOČI REAKTÍVNYM FORMÁM DUSÍKA

Haus M., Vašková J., Vaško L.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

ABSTRAKT

Extrakt gravioly sú v tradičnej medicíne využívané vďaka ich výrazným protizápalovým, analgetickým, antiparazitárnym, hypoglykemickým ale aj antikanceróznym, či iným účinkom. Overenie účinku a objasnenie ich mechanizmov je prospešné z hľadiska využiteľnosti týchto látok v rámci liečby či prevencie. V práci sme sledovali účinnosť extraktu zo sušených listov gravioly voči oxidu dusnatému a peroxynitritovému aniónu, ktorých ovplyvnenie môže aj za fyziologických podmienok viesť k modulácii signálnych dráh. Nepriamym stanovením oxidačných derivátov NO sme zistili, že so zvyšovaním koncentrácie extraktu sa znižuje koncentrácia dusitanov. Naopak, už pri nízkych koncentráciách extrakt spôsobuje zvýšenie koncentrácie peroxynitritu. Zo samotných výsledkov vyplýva, že účinok gravioly nie je sprostredkovaný NO ale pravdepodobne je dôsledkom zvýšenej tvorby peroxynitritu.

ÚVOD

Druhy rodu *Annona*, vždzeleného stromu z tropických oblastí Afriky a Južnej Ameriky mali oddávna vďaka pozoruhodým účinkom svoje miesto v etnomedicíne. Ich listy, plody a kôra sa využívajú hlavne pri liečbe artritídy a artitickej bolesti, neuralgiách, migréne, nespavosti, hnačkách, úplavici, horúčke, malárii, kožných infekciách, zápaloch močového mechúra, ale obzvlášť pri liečbe rakovinových ochorení a parazitárných infekcií (Mishra a kol., 2013; De Sousa a kol., 2010; Yang a kol., 2015). Od minulého storočia sa látky, ktoré obsahujú stali predmetom štúdií, objasňujúcich ich biologickú aktivitu a mechanizmy pôsobenia na organizmus. Umožňujú tak ich široké farmaceutické ale aj potravinárske využitie. Za tieto účinky sú zodpovedné rôzne zložky ako alkaloidy, megastigmány, flavonolové triglykozidy, fenolové zlúčeniny, cyklopeptidy a silice. Obzvlášť výrazne sú však zastúpené acetogeníny (Moghadamtousi a kol., 2015). DRSA (DPPH radical scavenging assay), FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) a HRSA (hydroxyl radical scavenging activity) testy vodných a metanolových roztokov poukázali na výrazné antioxidačné účinky, ktoré môžu byť podkladom popísaných schopností. Pričom najvýraznejší prejav bol pozorovaný u druhu *Annona muricata* (George a kol., 2015). Schopnosť ovplyvnenia tvorby reaktívnych foriem kyslíka a dusíka (RNOS) a ich zhasania biologicky aktívnymi látkami obsiahnutými v rastlinných extraktoch môže zasiahnuť do týchto fyziologických procesov od modulácie bunkovej signalizácie až po indukciu oxidačného poškodenia. Cieľom našej práce bolo zistiť účinnosť vodného extraktu z drvených listov *Annona muricata* (anony mäkkoostnatej, gravioly) voči NO a peroxynitritu.

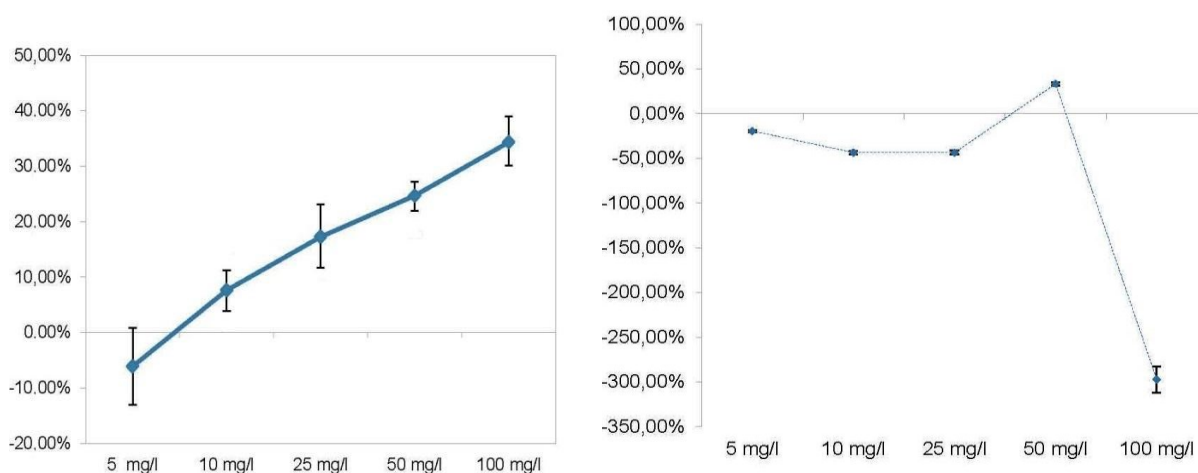
MATERIÁL A METODIKA

Použité boli sušené drvené listy gravioly (*Annona muricata* Linn.) získané za účelom experimentov od Rafael Alvis (v súčasnosti EKS-Gránit Kft.) pôvodom z Peru určené pre ľudskú spotrebu. Pre samotnú analýzu sme použili vodný výluh z listov (5mg/ml) vo finálnych koncentráciách 5, 10, 25, 50 a 100 mg/l. NO sme stanovovali nepriamo detekciou dusitanov podľa Beda a Nedospasov (2005). Princípom stanovenia je, že nitroprusid sodný produkuje pri fyziologickom pH oxid dusnatý, ktorý reaguje s kyslíkom za vzniku dusitanov v Griessovej reakcii. Po diazotácii sulfanilamidom a následnej kopulácii vzniknutej diazóniovej soli s činidlom *N*-(1-naftyl)etyléndiamín dihydrochloridom sme sledovali absorbanciu vzniknutého chromofóru pri 546 nm. Nitroperoxylový anión (ONO_2^-) sme stanovovali podľa Beckman a kol. (1990). Vytvorený bol zmesou roztokov H_2O_2 v HCl, NaNO_2 a NaOH. Táto

zmes roztokov bola počas noci vymrazená pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Absorbancia bola meraná pri 302 nm.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Medzi základné mechanizmy účinku možno považovať schopnosť fytoaktívnych látok v extrakte ovplyvňovať koncentráciu RNOS. NO je všadeprítomný vnútrobunkový posol, ktorý reguluje prietok krvi, zrážanie krvi a aktivitu neurónov. Dôležitý je aj pri nešpecifickej bunkovej imunite. Samotný NO pre organizmus škodlivý nie je (Pacher a kol., 2007). Nitrozačný stres a indukcia apoptózy sprostredkované NO vyplývajú z jeho relatívne dlhého biologického polčasu životnosti, schopnosti pasívneho prechodu membránami a najmä účinnej koncentrácie. NO je potom schopné reagovať s rôznymi zložkami ako sú kovy, tioly, O_2 ale najmä superoxidový anión ($\text{O}_2^{\cdot-}$), pričom sa tvoria rozličné sekundárne produkty ako dusičnany, dusitany ale aj reaktívne formy dusíka ako nitrozóniový ión, peroxynitrit (ONO_2^-), nitrozotioly, nitroxylový anión, dinitrogén trioxid a oxid dusičitý (Kim a kol., 2002). Aktivitu extraktu gravioly voči NO sme stanovovali nepriamo, prostredníctvom detekcie dusitanov. Zistili sme, že so zvyšujúcou sa koncentráciou extraktu v zmesi klesalo množstvo oxidačných derivátov NO. Pri koncentrácii 100 mg/l dosahovala účinnosť extraktu až 34%. Takmer 25% účinnosť mal extrakt pri koncentrácii 50 mg/l, ale účinnosť pri nižších koncentráciách bola veľmi slabá. Pri najnižšej koncentrácii (5 mg/l) sme dokonca zistili vyššie množstvo dusitanov (Obr. 1 – vľavo).



Obr. 1 Účinok gravioly voči oxidačným derivátom NO (vľavo) a peroxynitritu (vpravo) v závislosti od použitej koncentrácie.

Dusitany vznikajú v reakcii NO s O_2 . Táto reakcia je pri fyziologických koncentráciách O_2 pomalá, avšak NO prudko reaguje s $\text{O}_2^{\cdot-}$, pričom sa tvorí silný prooxidant a cytotoxický modulátor, ONO_2^- (Kim a kol., 2002). Už pri najnižšej testovanej koncentrácii neprejavoval extrakt žiadne vychytacie schopnosti voči ONO_2^- a pri koncentráciách 10 a 25 mg/l jeho prítomnosť spôsobovala takmer 44% nárast koncentrácie ONO_2^- . Pri najvyššej testovanej koncentrácii extraktu 100 mg/l sme zaznamenali takmer 300% nárast koncentrácie ONO_2^- (Obr. 1 – vpravo). ONO_2^- je veľmi stabilný a neobvykle selektívny oxidant. V organizme je účinne využívaný pri nešpecifickej bunkovej imunitnej odpovedi avšak mimo fagocytujúcich buniek spôsobuje oxidáciu lipidov a už za fyziologických podmienok reaguje s CO_2 (väčšinou vo forme hydrogénuhličitanov) pričom sa tvorí silný oxidant, peroxynitrozokarbonátový anión (ale aj karbonátový radikál), ktorý vedie k nitrácii proteínov a porfyrínov (Rubbo a kol., 2005).

Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že pripravený vodný extrakt zo sušených listov

gravioly prejavuje značne špecifické účinky voči NO a ONO₂⁻. Iba z posúdenia aktivít voči oxidačným derivátom NO vyplýva, že extrakt gravioly v biologickom systéme nie je schopný sprostredkovať účinok NO. Taktiež sa nedá predpokladať jeho pôsobenie v zmysle vyvolania nitrozačného stresu - glutatiolácia ani nitrozylácia, čo najmä v prípade kaspáz blokuje spustenie apoptózy. Naopak, už veľmi nízke koncentrácie iniciujú tvorbu neobvykle selektívneho ONO₂⁻, ktorý má výraznejší vplyv na zvrat v priebehu biologických procesov než hydroxylový radikál.

Práca s podporou grantu VEGA 1/0782/15.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Beckman, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87, 1620-1624.
2. Beda, N. – Nedospasov, A. A spectrometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide Biol. Ch.* 2005, 13, p. 93-97.
3. De Sousa O.V., Vieira G.D.-V., de Pinho J.D.J.R., Yamamoto C.H., Alves M.S.: Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. *Int J Mol Sci.* 2010; 11: 2067–2078.
4. George V.C., Kumar D.N., Suresh P., Kumar R.A.: Antioxidant, DNA protective efficacy and hplc analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. *J Food Sci Technol.* 2015; 52: 2328–2335.
5. Kim KM, Kim PKM, Kwon YG, Bai SK, Nam WD, Kim YM.: Regulation of apoptosis by nitrosative stress. *J Biochem Mol Biol.* 2002; 35: 127-133.
6. Mishra S., Ahmad S., Kumar N., Sharma B.K.: *Annona muricata* (the cancer killer): A review. *Glob J Pharm Res.* 2013; 2: 1613–1618.
7. Moghadamtousi SZ, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali HM, Kadir HA.: *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *Int J Mol Sci.* 2015 Jul; 16: 15625–15658.
8. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L.: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87: 315-424.
9. Yang C., Gundala S.R., Mukkavilli R., Vangala S., Reid M.D., Aneja R.: Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. *Carcinogenesis.* 2015; 2015 doi: 10.1093/carcin/bgv046.

HODNOTENIE TESTIMETRIE A OBSAHU TESTOSTERÓNU V PERIFÉRNEJ A LOKÁLNEJ KRVI PSOV.

Horňáková Ľ., Vrbovská T., Hajurka J.

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

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo stanoviť koncentráciu testosterónu v periférnej aj lokálnej krvi u psov pred a po stimulácii produkcie testosterónu, ako aj morfometrické parametre u psov a ich posúdenie s ohľadom na vek a hmotnosť u psov. Vyšetřili sme 31 psov rozdelených do 4-och skupín podľa veku a hmotnosti. Výsledky odhalili pozitívnu koreláciu medzi hmotnosťou a všetkými sledovanými morfometrickými parametrami semenníkov ($p < 0,001$). Vplyv veku na všetky testimetrické parametre a koncentráciu testosterónu sa nepotvrdil ($p > 0,05$).

ÚVOD

Testosterón (TST) je samčie pohlavné hormón, ktorý je produkovaný Leydigovými bunkami semenníka. Regulovaný je prostredníctvom inhibínu cez hypotalamus, v ktorom utlmí hormón uvoľňujúci gonadotropíny (GnRH). Jeho produkcia je stimulovaná cez GnRH, luteinizačným hormónom z hypofýzy a ten pôsobí na Leydigové bunky semenníka s následnou produkciou testosterónu. Plní dôležitú úlohu v priebehu spermatogenézy, udržiava *libido sexualis*, je nevyhnutný pri prejavoch pohlavného dimorfizmu, ovplyvňuje rast a funkciu prostaty. Testosterón je esenciálnym hormónom v procese zostupu semenníkov do skróta a jeho nedostatočné pôsobenie vedie k vzniku kryptorchizmu. Vzhľadom na pulzatívny charakter vylučovania TST počas dňa sa odporúča merať a hodnotiť jeho obsah po GnRH stimulačnom teste. U zdravých samcov po podaní GnRH dôjde k uvoľneniu TST za 60 minút. Taktiež sa tento test používa na potvrdenie prítomnosti semenníka u abdominálnych kryptorchidov, kedy zvýšenie obsahu testosterónu v druhej vzorke jednoznačne potvrdzuje jeho prítomnosť (Hajurka, 2014). Bazálna hodnota TST krvnom sére je $6,3 \pm 3$ nmol/l (De Souza a kol., 2015). Obsah TST v lokálnej testikulárnej krvi je niekoľkonásobne vyššia ako v periférnej krvi (Castro a kol., 2002). Výhodou stanovenia koncentrácie TST v periférnej krvi je diferenciálna diagnostika intaktných, kastrovaných a kryptorchidných jedincov. Sledovanie testimetrických parametrov je súčasťou komplexného andrologického vyšetrenia. Plne vyvinuté a utvárané semenníky sú predpokladom správne fungujúcej spermatogenézy a vysokej plodnosti samca. U rôznych druhov zvierat bola zistená priama súvislosť medzi hmotnosťou semenníkov a koncentráciou spermíí. Veľkosť semenníkov je totiž výsledkom celkového objemu semenných kanálikov, ktoré tvoria podstatnú časť semenníkov (Caldeira a kol., 2010).

MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie bolo zaradených 31 psov rôznej hmotnostnej a vekovej kategórie, ktorí boli prijatí na našu kliniku za účelom preventívnej kastrácie. Na základe hmotnosti boli zaradení do 4 kategórií (do 5 kg, >5-10 kg, >10-20 kg a nad 20 kg). Psi boli podľa veku zaradení taktiež do 4 kategórií (do 2 ; >2-5; >5- 8 ; a nad 8 rokov). Psi zaradení do štúdie boli komplexne klinicky a andrologicky vyšetrení. Adspekčným a palpačným vyšetrením sme hodnotili utváranie, konzistenciu semenníkov a ich uloženie v miešku.

Testimetria: Veľkosť semenníkov sme hodnotili testimetriou po kastrácii. Pri každom semenníku sme merali jeho hmotnosť v gramoch, jeho výšku, šírku a hĺbku v milimetroch. Na testimetrické vyšetrenie sme použili digitálne presné posuvné meradlo (PMS 150 s presnosťou 0,01 mm) a hmotnosť sme zisťovali na digitálnej laboratórne presnej váhe (KERN 572-37 s presnosťou 0,01 g).

Stanovenie testosterónu: Obsah TST v krvnom sére psov sme sledovali pred stimuláciou a 60

minút po stimulácii jedinca gonadotropín uvoľňujúcim hormónom (GnRH). Na stimuláciu sme použili gonadorelín (Fertagyl[®], Intervet, Holandsko) v dávke 0,1 ml/kg ž.hm. Periférnu venóznú krv sme získali punkciou v *cephalica antebrachii* do skúmavky s aglutinačným gélom a následne sme ju centrifugovali pri 3500 otáčkach počas 10 minút (Eppendorf centrifuge 5702), čím sa odseparovalo krvné sérum s jeho uskladnením pri teplote -24 °C až do ich analýzy. Rovnakým spôsobom sme odobrali a spracovali lokálnu venóznú krv z *plexus pampiniformis* každého semenníka. Hodnota TST bola kvantitatívne stanovená v špecializovanom RIA laboratóriu pomocou chemiluminiscentnej mikročasticovej imunoanalýzy (Architect[®] Testosterone).

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. Na získanie rozsahu hodnôt testimetrických parametrov a koncentrácie testosterónu pred a po stimulácii bol použitý 95% konfidenčný interval. Na porovnanie hodnôt medzi pravým a ľavým semenníkom bol použitý párový Studentov *t*-test a na porovnanie hodnôt medzi semenníkmi v rámci jednotlivých skupín psov Mann-Whitney U – test. Na porovnanie hodnôt medzi jednotlivými skupinami bola použitá jednocestná ANOVA. Štatistická významnosť bola definovaná ako $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané hodnoty sme vyjadrili ako priemer \pm SD (Tab. 1). Nezistili sme štatistickú významnosť medzi pravým a ľavým semenníkom v rámci jednotlivých hmotnostných kategórií ($p > 0,05$). Výsledky však odhalili pozitívnu koreláciu medzi hmotnosťou a všetkými sledovanými morfometrickými parametrami semenníkov ($p < 0,001$). Vplyv veku na všetky testimetrické parametre a koncentráciu testosterónu sa nepotvrdil ($p > 0,05$).

Tab. 1 Priemerné hodnoty \pm štandardná odchýlka pre testimetrické hodnoty namerané v oboch semenníkoch u psov podľa hmotnostnej kategórie

	váha (g) mean \pm SD	CI 95%	šírka (mm) mean \pm SD	CI 95%	dĺžka (mm) mean \pm SD	CI 95%	hlĺbka (mm) mean \pm SD	CI 95%
do 5 kg	2,8 \pm 0,7	2,4 - 3,2	15,0 \pm 1,5	11,2 - 15,8	21,1 \pm 2,1	20,0 - 22,2	16,4 \pm 1,7	15,5 - 17,3
do 10 kg	5,3 \pm 1,5	4,5 - 6,1	17,7 \pm 1,8	16,8 - 18,7	27,2 \pm 3,5	25,3 - 29,0	20,2 \pm 2,2	19,0 - 21,3
do 20 kg	8,1 \pm 2,6	6,6 - 9,6	20,5 \pm 2,2	19,3 - 21,8	31,4 \pm 2,9	29,7 - 33,1	23,3 \pm 2,2	22,0 - 24,6
nad 20,01 kg	20,3 \pm 6,8	16,6 - 23,9	28,8 \pm 4,0	26,6 - 30,9	42,4 \pm 5,7	39,3 - 45,4	33,3 \pm 4,4	31,0 - 35,6

mean – priemerná hodnota, SD – štandardná odchýlka, CI – konfidenčný interval

Zvýšenie hodnoty TST v periférnej krvi po stimulačnom teste sa líšilo u jednotlivých hmotnostných skupín. U všetkých hmotnostných aj vekových skupín sme zaznamenali koreláciu medzi koncentráciou testosterónu pred a po podaní GnRH v periférnej krvi a v oboch semenníkoch ($p < 0,05$) (Tab. 2). V pravom semenníku došlo k menšiemu nárastu koncentrácie testosterónu ako v ľavom semenníku po podaní GnRH v priemere od 5,9% u skupiny psov do 20 kg až po 49,5% u malých plemien psov do 5 kg. Rozdiel medzi nárastom koncentrácie v pravom a ľavom semenníku nebol štatisticky významný ($p > 0,05$).

Tab. 2 Rozpätie koncentrácie testosterónu v periférnej krvi podľa hmotnostných kategórií pred a po stimulačnom teste

	koncentrácia testosterónu (ng/ml) pred ST mean ± SD	CI 95%	koncentrácia testosterónu (ng/ml) po ST mean ± SD	CI 95%	P
do 5 kg	2,1 ± 1,7	0,7 - 3,6	4,1 ± 2,3	2,2 - 6,0	*
do 10 kg	2,3 ± 1,6	1,0 - 3,6	2,9 ± 1,6	1,6 - 4,2	*
do 20 kg	1,6 ± 1,4	0,3 - 2,8	3,0 ± 2,0	1,2 - 4,9	*
nad 20,01 kg	4,1 ± 3,6	1,1 - 7,1	5,7 ± 4,3	2,2 - 9,3	**

mean – priemerná hodnota, SD – štandardná odchýlka, CI – konfidenčný interval, ST – stimulačný test, p – štatistická významnosť medzi priemernou koncentráciou testosterónu v periférnej krvi pred a po stimulačnom teste v jednotlivých hmotnostných skupinách, hviezdička (*) označuje hladinu štatistiky významnosti, p < 0.05 * p < 0.01 ** p < 0.001 *** p < 0.0001 ****

Obsah TST po stimulačnom teste vzrástol z priemernej hodnoty $8,8 \pm 8,2$ nmol/l na priemernú hodnotu $13,8 \pm 9,9$ nmol/l. Nami namerané hodnoty TST v periférnej krvi pred stimulačným testom sú veľmi podobné ako referenčné hodnoty pre psov publikované Feldmanom a Nelsonom (2004). Podľa týchto autorov je referenčné rozpätie testosterónu 1,4 – 34,7 nmol/l. U kryptorchidných psov je koncentrácia TST v periférnej krvi nižšia (0,3 – 6,9 nmol/l) a v prípade kastrovaných psov je to menej ako 0,1 nmol/l (Feldman a kol., 2004). Ortega - Pacheco a kol. (2006) tiež potvrdzujú naše výsledky, keďže aj v ich štúdií došlo k nárastu koncentrácie testosterónu v krvi hodinu po intravenózne aplikácii GnRH z pôvodnej hodnoty $4,2 \pm 3,5$ na $10,1 \pm 3,8$ nmol/l.

Hodnotením jednotlivých testimetrických parametrov u zdravých psov rozdelených do hmotnostných kategórií sme získali hodnoty, ktoré môžu slúžiť ako referenčné hodnoty pre posúdenie morfometrických parametrov semenníkov pri rôznych patologických stavoch na semenníkoch psov. Tieto výsledky môžeme využiť aj ako východisko pri komplexnom posúdení reprodukčného zdravia psa.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0090/14.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hajurka J. Endokrinná kontrola reprodukcie. In: Hajurka J. a kol., Reprodukcia psov a mačiek. Košice: UVLF. 2014; 300
2. Feldman EC., Nelson RW. In Canine and feline endocrinology and reproduction. 3rd edition. St. Luis: WB Saunders, An Imprint of Elsevier. 2004; 943-963.
3. De Souza MB., England GCW., Filho ACM., Ackermann CL., Sousa CVS., DeCarvalho GG., Silva HVR., Pinto JN., Linhares JCS., Oba E., DaSilva LDM. Semen quality, testicular B-mode and Doppler ultrasound, and serum testosterone concentrations in dogs with established infertility. Theriogenology. 2015; 84:805-810.
4. Caldeira BC., De Paula TAR., Da Matta LP., Balarini MK., Campos PKA. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Rev. Ceres. 2010; 57:569-575.
5. Ortega – Pacheco A., Rodríguez-Buenfil JC., Segura-Correa JC., Jiménez-Coello M., Linde Forsberg C. Pathological Conditions of the Reproductive Organs of Male Stray Dogs in the Tropics: Prevalence, Risk Factors, Morphological Findings and Testosterone Concentrations. Reproduction in Domestic Animals. 2006; 41: 429-437.

ZAVEDENIE *IN VITRO* SKRÍNIGOVÉHO MODELU NA TESTOVANIE IMUNOMODULAČNÝCH VLASTNOSTÍ PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ NA FENOTYPICKÚ A FUNKČNÚ DIFERENCIÁCIU ĽUDSKÝCH MONOCYTOV.

Hradická P., Demečková V., Kassayová M.

Ústav biologických a ekologických vied, Katedra fyziológie živočíchov UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

V prípade rôznych patologických stavov, akým je aj rakovina hrubého čreva, sa v posledných rokoch kladie veľký dôraz práve na štúdium mikrobiómu, keďže dysbióza je jedným z rizikových faktorov tohto ochorenia. Baktérie mliečneho kvasenia prispievajú k správne fungovaniu organizmu pomocou rôznych mechanizmov, medzi ktoré patrí aj ovplyvňovanie črevného imunitného systému (IS). Makrofágy črevnej sliznice regulujú proces homeostázy prostredníctvom tolerogénnych odpovedí na zložky potravy a komenzálne baktérie ako aj aktiváciou imunitnej zápalovej odpovede v prípade prítomnosti patogénov. Lokálne mikroprostredie a typ makrofágov určuje imunitnú odpoveď na príslušný podnet. Kým makrofágy fenotypu M1 sa považujú za prozápalové, klasicky aktivované bunky - makrofágy M2 predstavujú alternatívne aktivované makrofágy zabezpečujúce imunologickú toleranciu. Imunomodulačný vplyv probiotických baktérií je následne závislý od prevahy konkrétneho fenotypu makrofágov v črevnej sliznici. Cieľom tejto štúdie bolo preto zaviesť a otestovať in vitro metodiku analýzy imunodulačných vlastností potenciálne prospešných baktérií na M1 a M2 makrofágy. Na zistenie zmien v produkcii prozápalového cytokínu TNF- α vplyvom probiotických baktérií boli využité THP-1 ľudské monocytické bunky. Z výsledkov je zrejmé, že imunomodulačný efekt probiotických baktérií sa líši v závislosti od ich koncentrácie. Keďže k indukcii produkcie cytokínov je nevyhnutný proces fagocytózy, súčasťou experimentu bolo aj sledovanie fagocytárnej aktivity makrofágov M1 v ko-kultivácii s vybranými kmeňmi laktobacilov. Z výsledkov je možné konštatovať, že fagocytárna aktivita je druhovo špecifická. Tieto predbežné výsledky naznačujú, že daná in vitro metodika predstavuje vhodný experimentálny skríngový model na testovanie imunomodulačných vlastností potenciálne prospešných baktérií pre náš nadväzujúci in vivo výskum.

ÚVOD

Výskum rakoviny sa v súčasnosti čoraz intenzívnejšie posúva smerom k pochopeniu komplexných vzťahov a komunikácie nádorových buniek v rámci ich lokálneho mikroprostredia, ale aj vo vzťahu k neoddeliteľnej fyziologickej interakcii organizmu s jeho mikrobiómom. Len samotné mikroprostredie nádorov je predmetom záujmu veľkého počtu súčasných onkologických štúdií (Bissell a kol., 2005), ktoré jednoznačne potvrdili fakt, že počas progresie nádorov dochádza k ich infiltrácii cirkulujúcimi monocytmi a makrofágmi, kde svojou činnosťou môžu prispievať k nádorovej progresii a proliferácii. Vo všeobecnosti tvoria makrofágy heterogénnu bunkovú populáciu, ktorá je schopná zmeniť svoj fenotyp na základe rôznych environmentálnych vplyvov (Cassetta a kol., 2011). Po aktivácii a diferenciacii monocytov rozpoznávame klasicky aktivovaný pro-zápalový podtyp (M1) a alternatívne aktivovaný protizápalový podtyp (M2). M2 tumor-infiltrujúce makrofágy sú spájané so zlou prognózou, indukciou angiogenézy, remodeláciou tkaniva a podporou rastu metastáz (Bogels a kol., 2012). Z tohto hľadiska je nevyhnutné skúmanie možností ovplyvňovania týchto buniek samostatne ako aj v prítomnosti rôznych imunomodulačných faktorov. Práve črevná mikroflóra sa stala centrom záujmu viacerých vedeckých skupín, pričom bola označená aj ako zabudnutý orgán (O'Hara a kol., 2006). Čo sa týka mechanizmov, ktorými črevný mikrobióm vplyva na viaceré ochorenia, je veda ešte len na samom začiatku. Pri výbere probiotických kmeňov sú predovšetkým skúmané a testované procesy ako adhézia na epitelové bunky čreva, rezistencia na žalúdočnú a črevnú sekréciu,

produkcia antimikrobiálnych látok a pod. Avšak práve modulačné efekty na IS sú nevyhnutné pre pochopenie tohto zložitého systému, pričom fakt, že mikroflóra jedinca do veľkej miery ovplyvňuje rôzne imunologické procesy v organizme, je nepopierateľný. Z tohto dôvodu sú komerčne predávané probiotiká označované ako posilňovače IS. Charakteristika a mechanizmus imunomodulačného účinku však nie sú po vedeckej stránke dostatočne objasnené (Habil a kol., 2014; Baba a kol., 2008). Ďalším dôležitým faktorom pri popise účinkov probiotík je ich rozdielny vplyv na IS zdravého a chorého jedinca (Roessler a kol., 2008). Antigén-prezentujúca bunka (APC), teda aj makrofág, zohráva rozhodujúcu úlohu pri aktivácii IS alebo indukcii imunologickej tolerancie. Preto sledovanie účinkov rôznych probiotík na odpoveď APC buniek nám poskytne ďalšie dôkazy imunomodulačného potenciálu daných baktérií a ich prípadné využitie pre klinickú prax (Fong a kol., 2015). Meraním produkcie pro/anti-zápalových cytokínov je možné určiť prípadný vplyv probiotík na imunitnú odpoveď rôznych buniek. Medzi základné prozápalové cytokíny patria TNF- α , IL-1 β , IL-6 alebo IL-12. Na strane druhej, k najtypickejším protizápalovým cytokínom zaraďujeme IL-10 a TGF- β . Zároveň však bolo zistené, že indukcia produkcie cytokínov je podmienená fagocytózou (Cai a kol., 2010). Aj z tohto dôvodu by malo byť testovanie fagocytárnej aktivity bežnou súčasťou in vitro skríningového modelu pri výbere baktérií s imunomodulačnými vlastnosťami.

MATERIÁL A METODIKA

Imunomodulačné vlastnosti a úroveň fagocytózy boli zisťované na ľudskej monocytickej bunkovej línii THP-1 (ECACC, UK) s využitím 7. až 35. pasáže. Bunky boli kultivované v R10 médiu (RPMI-1640, 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-glutamín, 100 U.ml⁻¹ penicilín a 100 μ g.ml⁻¹ streptomycín). Prozápalové (M1) a protizápalové (M2) makrofágy boli generované podľa Habil a kol. (2014). Na testovanie imunomodulačných charakteristík probiotických baktérií bol použitý druh *Lactobacillus casei* kmeň Shirota (LcS) (Yakult Honza Ltd., Tokio, Japonsko) v zostupných koncentráciách 10⁸ cfu/ml až 10⁴ cfu/ml. Usmrtené aj živé probiotiká boli v rôznych koncentráciách kultivované s makrofágmi po dobu 18 hodín. Usmrtenie baktérií bolo prevedené antibioticky podľa Cai a kol. (2010). Následne bola produkcia cytokínu TNF- α analyzovaná sendvičovou ELISA metódou s použitím komerčne dostupnej väzbovej a detekčnej protilátky (Oxford, UK) podľa inštrukcií výrobcu. Pre zisťovanie úroveň fagocytózy sme použili baktérie *Lactobacillus salivarius* (kmene MS3 a MS6) a *L. plantarum* (kmeň MS18) (Plymouth University, UK). Baktérie o koncentrácii 10⁶ cfu/ml boli po dobu 30 minút inkubované s 100 μ M fluorescenčným farbivom CFSE (37°C, 5% CO₂). Inhibíciu fagocytózy sme dosiahli pridaním cytochalazínu D (10 μ g/ml) k makrofágom M1. Nasledovala kokultivácia značených baktérií s makrofágmi M1 po dobu 60 minút. Vzorky boli analyzované použitím BD FACSAria™II (Becton Dickinson Biosciences, USA). Výsledky sme vyhodnotili pomocou štatistického softvéru Minitab v 16 (Minitab Inc., 2013).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky predloženej štúdie jasne preukázali schopnosť probiotických baktérií modulovať vrodenu imunitu. V prípade antibioticky usmrtených LcS bola hladina TNF- α po 18 hodinách signifikantne zvýšená len v prípade bakteriálnej koncentrácie 10⁸ cfu/ml, avšak pri použití živých probiotík sa hladina TNF- α zvýšila už pri koncentrácii 10⁷ cfu/ml. Pri ostatných koncentráciách môžeme vidieť zvyšujúci sa trend hladín vybraného cytokínu (tab. 1), z čoho je možné usúdiť, že nielen prítomnosť bunkových štruktúr, ale aj ich viabilita je dôležitým imunomodulačným atribútom. Preliminárne výsledky nám naznačujú, že pokiaľ chceme ovplyvňovať IS v nižších kompartmentoch tráviaceho systému, nestačí prijímať probiotické baktérie v koncentráciách, aké sú komerčne bežne dostupné. S postupným prechodom

gastrointestinálnym traktom sa koncentrácia živých baktérií znižuje, a ako sme preukázali, nižšie koncentrácie nemajú žiadny alebo len minimálny efekt na vrodenuú imunitu. Štúdiom úrovne fagocytózy sme zistili, že v prípade *L. salivarius* (MS3) sú rozdiely vo fluorescenčnej odpovedi medzi makrofágmi, u ktorých sme fagocytózu inhibovali, a fagocytujúcimi makrofágmi minimálne. Zároveň pri druhoch *L. salivarius* (MS6) a *L. plantarum* (MS18) sa významne zvýšila fluorescenčná odpoveď po použití látky inhibujúcej fagocytózu. Z výsledkov môžeme predpokladať, že v prípade týchto kmeňov došlo pravdepodobne k fúzii fagozómu a lyzozómu, ktorá zapríčinila zníženie fluorescenčného signálu. Pre potvrdenie týchto domniek je do budúca nutné vytvoriť časovú krivku fagocytózy v rôznych časových odstupoch. Shida a kol. (2009) tiež preukázali, že schopnosť fagocytózy a rýchlosť fagolyzozomálnej fúzie sú závislé od bakteriálneho kmeňa.

c TNF- α [pg/ml]	LcS [cfu/ml]					
	kontrola	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
M1+ uLcS	90,6 \pm 9,3 ^{BC}	111,7 \pm 9,2 ^{BC}	132,7 \pm 9,2 ^{AB}	72,2 \pm 20,6 ^C	125,2 \pm 16,7 ^{ABC}	171,4 \pm 10,4 ^A
M2+ uLcS	3 \pm 3	0	13,8 \pm 8,9	0	8 \pm 5,3	0,3 \pm 0,3
M1+ žLcS	14,9 \pm 4,8 ^A	22,6 \pm 12,2 ^A	15,8 \pm 6,6 ^A	24,3 \pm 6,6 ^A	37,9 \pm 4,3 ^B	54,8 \pm 4 ^C
M2+ žLcS	0	0	0	1,9 \pm 1,9	0	3,1 \pm 3,1

Tab.1 Cytokinová odpoveď makrofágov po stimulácii probiotickým kmeňom *Lactobacillus casei* Shirota (LcS). Namerané hodnoty sú vyjadrené ako priemer \pm SD; číselné hodnoty označené rovnakým indexom A,B,C nie sú štatisticky významné (uLcS-usmrtené LcS, žLcS-živé LcS)

Práca bola podporená grantom VVGS-2016-291. Vďaka patrí Dr. A. Foey z Plymouth University.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baba N, Samson S, Bourdet-Sicard R, Rubio M, Sarfati M. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J. Leukoc. Biol.*2008; 84(2):468-476.
- Bissell MJ, Labarge MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell.* 2005;7(1):17-23.
- Bögels M, Braster R, Nijland PG, Gul N, van de Luitgaarden W, Fijneman RJ. Carcinoma origin dictates differential skewing of monocyte function. *OncImmunity.* 2012; 1(6):798-809.
- Cai S, Bay BH, Lee YK, Lu J, Mahendran R. Live and lyophilized *Lactobacillus* species elicit differential immunomodulatory effects on immune cells. *FEMS Microbiol. lett.* 2010; 302(2):189-196
- Cassetta L, Cassol E, Poli G. Macrophage polarization in health and disease. *Scientific World J.* 2011; 11:2391-2402.
- Fong FLY, Kirjavainen P, Wong VHY, El-Nezami H. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on dendritic cells, macrophages and monocytes from healthy donors. *J. Funct. Foods.* 2015; 13:71-79.
- Habil N, Abate Woldie W, Beal J, Foey AD. Heat killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human beta-defensin-2. *Benef. Microbes.* 2014; 5(4):483-495.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO J.* 2006; 7:688-693.
- Roessler A, Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler UC, Schmidt I, Jahreis G. The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin. Exp. Allergy.* 2008; 38(1):93-110.
- Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology.* 2009; 128:858-869

IDENTIFIKÁCIA GRAMNEGATÍVNYCH BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z EXOTICKÝCH KORYTNAČIEK

Hrehová L.^{1,2}, Konieczna O.³, Wasyl D.³, Pristaš, P.^{1,2}

¹Ústav biologických a ekologických vied PF UPJŠ, Košice

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

³Zakład mikrobiologii, Państwowy instytut weterynaryjny- Państwowy instytut badawczy, Puławy

ABSTRAKT

Exotické korytnačky sú bežne chované ako domáce zvieratá. Na územie nášho štátu sú importované z exotických krajín a môžu byť zdrojom nie len nepatogénnych, ale aj patogénnych druhov baktérií. V našej práci sme sa zamerali na identifikáciu gramnegatívnych cefotaxim rezistentných baktérií, ktoré boli izolované z vnútorných orgánov a čreva korytnačiek uhynutých pri prevoze z Afriky a Uzbekistanu do Poľska. Izoláty sme identifikovali na základe MADI- TOF hmotnostnej spektrometrie a metódy sekvenovania génu pre 16S rRNA. Pomocou fylogenetických analýz sme izoláty zaradili do 13 biotypov. Najvyššiu prevalenciu mal rod *Citrobacter* spp. a druhy *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. V našej štúdii sme potvrdili prítomnosť gramnegatívnych baktérií typických pre vnútorné prostredie živočíchov, ale aj druhy, ktoré sú pre človeka potenciálne patogénne, čím si vyžadujú zvýšenú pozornosť.

ÚVOD

V súčasnosti sú v domácnostiach chované rôzne druhy plazov, ktoré sú na naše územie mnohokrát importované z exotických krajín. Oblúbené sú hlavne korytnačky, ktoré so zreteľom na úzky kontakt s človekom, môžu predstavovať vektor baktérií potenciálne nebezpečných pre jeho zdravie. Príkladom môžu byť malé vodné korytnačky, na ktoré upozornila FDA (U. S. Food and Drug Administration) ako na zdroj salmonelových infekcií (<http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm048151.htm>). Prítomnosť salmonel u korytnačiek potvrdilo aj množstvo štúdií (Hidalgo- Vila a kol., 2008; Harris a kol., 2010; Martin a kol., 2013) . Vo všeobecnosti väčšinu bakteriálnych infekcií u plazov vyvolávajú gramnegatívne baktérie, z ktorých mnohé sú považované za komenzálne (Jacobson, 2007). Vzhľadom na uvedené fakty, je dôležité poznať zloženie bakteriálnej mikroflóry korytnačiek chovaných ako domáce zvieratá, za účelom prevencie ochrany zdravia ľudí. V našej práci sme sa venovali identifikácii gramnegatívnych baktérií izolovaných z orgánov a čreva exotických druhov suchozemských korytnačiek.

MATERIÁL A METODIKA

Skúmané izoláty (41) pochádzali z korytnačky stepnej (*Testudo horsfieldii*), korytnačky leopardkej (*Psammobates pardalis*) a korytnačky škárovej (*Malacochersus tornieri*), ktoré uhynuli pri transporte z Tanzánie, Toga a Uzbekistanu do Poľska. Prvotné mikrobiologické spracovanie vzoriek a selekciu izolátov vykonali kolegovia z Národného veterinárno výskumného inštitútu v Puławy v Poľsku. V našej práci sme sa venovali identifikácii gramnegatívnych cefotaxim rezistentných baktérií, ktoré boli izolované z čreva a vnútorných orgánov. Bakteriálne izoláty sme identifikovali pomocou Matrix- assisted laser desorption ionization time- of- flight hmotnostnej spektrometrie na prístroji MALDI- TOF Biotyper (Bruker Daltonics, Germany). Izoláty, ktoré sa touto metódou nepodarilo spoľahlivo charakterizovať, sme podrobili analýze 16S rRNA. Bakteriálnu DNA sme izolovali kitom Gen Elute Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma Aldrich). V PCR reakcii na amplifikáciu sekvencie pre 16S rRNA sme použili primery fD1 a rP2 (Weisburg a kol., 1991). Amplikóny sme prečistili kitom Wizard SV Gel and PCR Clean- Up System (Promega). Ligačnú zmes

sme pripravili podľa protokolu pomocou kitu InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) a následne transformovali bunky *E. coli* ER2267. Rekombinantné plazmidy sme odoslali na sekvenovanie. Získané sekvencie sme porovnávali s GenBank databázou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci našej štúdie zameranej na druhové zloženie gramnegatívnych baktérií u exotických korytnačiek, sme zaznamenali výraznú variabilitu. Najvyššie zastúpenie mal rod *Citrobacter* spp. a druh *Enterobacter cloacae* (Tab. 1).

Tab. 1 Výsledky identifikácie a fylogenetických analýz.

Biotyp	MALDI identifikácia	Počet izolátov	Pôvod izolátov	
		Celkovo	Orgány	Črevo
1.	<i>Citrobacter</i> spp.	7	6	1
2.	<i>Escherichia coli</i>	4	0	4
3.	<i>Enterobacter cloacae</i>	7	5	2
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	5	1
5.	<i>Morganella morganii</i>	3	3	0
6.	<i>Comamonas aquatica</i>	1	0	1
7.	<i>Acinetobacter pittii</i>	2	2	0
8.	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	1	0
9.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	1	1
10.	<i>Stenotropohomonas maltophila</i>	1	0	1
11.	<i>Pseudomonas putida</i>	1	0	1
12.	<i>Pseudomonas mendocina</i>	2	0	2
13.	<i>Myroides odoratimimus</i>	3	3	0

V korelácii s našimi výsledkami je aj štúdia Heynol a kol. (2015), v ktorej mal hlavné zastúpenie v orálnom výtere korytnačiek taktiež rod *Citrobacter* spp.. Santoro a kol. (2006) vo svojej práci zaznamenali u karety obrovskej v rámci čeľade *Enterobacteriaceae* najvyššie zastúpenie druhov *E. agglomerans*, *E. colacae*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* a *S. marcescens*. Benevidas de Morias a Rodrigues de Souza (2011) detegovali vo výtere z kloaky korytnačiek *Podocnemis expansa* a *P. unifilis* vysoký výskyt *E. coli* a baktérie *Shigella flexnerii*. Vysokú prevalenciu medzi našimi izolátmi mali aj baktérie rodu *Pseudomonas* s prevažným zastúpením druhu *P. aeruginosa*. Tento patogén spôsobuje u ľudí ochorenia vďaka viacerým faktorom virulencie a produkcii viacerých toxínov (Štefanovič- Hanzen, 2013). Riziko predstavuje najmä pre pacientov s oslabenou imunitou. Liečebné možnosti sú obmedzené v dôsledku výskytu a šírenia kmeňov rezistentných voči antibiotikám. Výsledkom je, že infekcie spôsobené *P. aeruginosa* demonštrujú vysokú chorobnosť a úmrtnosť (Gellantly- Hancock, 2013). Neobvyklým nálezom nebol druh *Morganella morganii*, ktorý sa bežne vyskytuje v pôde, vode alebo tráviacom trakte človeka a zvierat vrátane plazov. Pokladá sa za pôvodcu detských letných hnačiek (Štefanovič- Hanzaen, 2013), ale aj iných nozokomiálnych infekcií.

Niektoré druhy enterobaktérií, ako napríklad *E. coli* sme detegovali iba v čreve, čo je prirodzený nález pre GIT. Druhy čeľade *Moraxellaceae*- *A. pittii* a *A. calcoaceticus* sme izolovali iba z orgánov korytnačiek (Tab. 1).

Len v orgánoch sme detegovali aj *Myroides odoratimimus*. Táto baktéria je u človeka zdrojom nákazy iba vzácné. Avšak bežne sa vyskytuje v životnom prostredí, pričom infekcie sú zvyčajne pripisované kontaktu s kontaminovanou vodou a najčastejšie prezentované u imunokompromitovaných jedincov (Endicott- Yazdani a kol., 2015).

Naša analýza potvrdila výskyt baktérií charakteristických pre vnútorné prostredie živočíchov,

ale zároveň aj výskyt patogénnych druhov, ktoré môžu byť nebezpečné pre zdravie ľudí. Z toho dôvodu sú nevyhnutné preventívne opatrenia, a to opatrnosť pri manipulácii s korytnačkami a dodržiavanie hygienických návykov.

Práca vznikla za podpory grantu VEGA 2/0087/14

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Benevides de Morias, P.- Rodrigues de Souza, D. Enterobacteriaceae in mouth and cloaca od *Podocnemis expansa* and *P.unifilis* (Testudines: Chelonia) populations of national park of Araguaia plains, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2011; 42: 526- 530.
2. Endicott- Yazdani, T. R. *Myroides odoratimimus* bacteremia in diabetic patient. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* 2015; 28: 342- 343.
3. Gellatly, S. L.- Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* 2013; 67: 159- 173.
4. Harris, J. R. et al. Recent multistate outbreaks of human *Salmonella* infections acquired from turtles: A continuing public health challenge. *Clin Infect Dis.* 2010; 50: 554- 559.
5. Heynol, V. et al. Detection of bacterial in oral swabs from healthy Common musk turtles (*Sternotherus odoratus*) and West African Mud turtles (*Pelusios castaneus*). *J. Herpetol. Med. Surg.* 2015; vol. 25, no. 1-2, pp. 33-39
6. Hidalgo- Vila, J. et al. *Salmonella* in free- living exotic and native turtles and in pet exotic turtles from SW Spain. *Res Vet Sci.* 2008; 85: 449- 452.
7. Jacobson, E. R. *Infectious diseases and pathology of reptiles: Color atlas and text.* CRC Press. 2007; 736 p.
8. Martin, C. et al. Free- living turtles are reservoir for *Salmonella* but not for *Campylobacter*. *PloS ONE.* 2013; 8, e72350.
9. Santoro, M. Aerobic bacterial flora of nesting green turtles (*Chelonia mydas*) from Tortuguero national park, Costa Rica. *J Zoo Wildl Med.* 2006; 37: 549- 552.
10. Štefanovič, J., Hanzen, J. *Lexikón lekárskej bakteriológie.* Bratislava: HPL SERVIS, 2013, 259 p.
11. Weisburg, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173: 687- 703.
12. U. S. Food and Drug Administration. Pet turtles: Cute but commonly contaminated with *Salmonella*. Dostupné na internete: <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm048151.htm>

OVPLYVNENIE CEKÁLNEJ SLIZNIČNEJ IMUNITY KURČIAT APLIKÁCIOU PROBIOTICKÉHO KMEŇA AKO PREVENCIA KAMPYLOBAKTERIÓZY

Kavul'ová A., Bobíková K., Herich R.

Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice

ABSTRAKT

V experimente bol sledovaný účinok probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na počty IgA+, IgM+ a CD3+ lymfocytov v céku kurčiat po infikovaní *Campylobacter jejuni*. Kurčatá boli rozdelené do štyroch skupín: kontrolná skupina (C), skupina, ktorej bol podaný probiotický kmeň *E. faecium* AL41 (EFAL41), skupina infikovaná s *Campylobacter jejuni* (CJ) a skupina, ktorej bol aplikovaný probiotický kmeň *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaná *Campylobacter jejuni* (EFAL41+CJ). Najvyšší počet IgA+ buniek sme zaznamenali v neskorej fáze infekcie *Campylobacter jejuni* (7 p.i.) v céku kurčiat s aplikovaným kmeňom *E. faecium* AL41 (EFAL41). Najväčšia hustota IgM+ buniek bola pozorovaná v skupine kurčiat infikovaných *Campylobacter jejuni* (CJ) v skorej fáze infekcie (4 p.i.). Počet CD3+ buniek bol najvyšší v skupine kurčiat, ktorým bol aplikovaný probiotický kmeň *E. faecium* AL41 (EFAL41). Sedem dní po infekcii bola najvyššia hustota CD3+ buniek zaznamenaná v kombinovanej skupine (EFAL41+CJ). Výsledky preukázali pozitívny efekt *E. faecium* AL41 na počet IgA+, IgM+ a CD3+ lymfocytov v céku u kurčiat infikovaných *Campylobacter jejuni*.

ÚVOD

Črevná sliznica je iniciálne miesto hostiteľskej infekcie a poskytuje prvú líniu obrany proti patogénnym baktériám (Berndt a kol., 2007). Lymfatické tkanivo, ktoré je spojené s črevným traktom tzv. na črevo asociované lymfatické tkanivo (GALT), je u kurčiat dobre vyvinuté (Casteleyn, 2010). GALT umožňuje nepatogénnym mikroorganizmom, ako sú komenzálne baktérie prežiť a má schopnosť tolerovať potravinové antigény a zároveň chrániť hostiteľa pred patogénnymi mikroorganizmami a inými potenciálne toxickými látkami (Ruth a Field, 2013). Kurčatá sú na kolonizáciu patogénmi najviac náchylné počas raného obdobia života, kedy ešte nie je vyvinutá stabilná črevná mikroflóra (Levkut a kol., 2012). Infekcie spôsobené *Campylobacter jejuni* sú považované za jednu z najčastejších príčin bakteriálnej gastroenteritídy zvierat a ľudí (Alter, 2005). V dnešnej dobe je *Campylobacter* považovaný za dôležitého pôvodcu zoonóz (Nichols, 2012). Základnou vlastnosťou probiotických baktérií z pohľadu hostiteľa je zdraviu prospešný účinok ich adhérencie k bunkám črevnej sliznice (Hrubíško, 2006). Probiotické baktérie urýchľujú vytvorenie stabilnej mikroflóry v čreve novovyliahnutých kurčiat a tým vytvárajú bariéru proti patogénom (Herich a Levkut, 2002). Cieľom experimentu bolo sledovať vplyv probiotického kmeňa *Enterococcus faecium* AL41 na cekálnu slizničnú imunitu kurčiat po infikovaní *Campylobacter jejuni*.

MATERIÁL A METODIKA

40 kurčiat plemena Cobb 500 bolo rozdelených do 4 skupín (n=10): C – kontrolná skupina, EFAL41 – *E. faecium* AL41, CJ – *Campylobacter jejuni* a EFAL41+CJ – kombinovaná skupina. Probiotický kmeň *Enterococcus faecium* AL41 (EFAL41) (poskytnuté: Andrea Lauková, IAP SAS, Košice, Slovensko) bol individuálne *per os* aplikovaný skupinám EFAL41 a EFAL41+CJ na 1 – 7 deň pokusu v dávke 1×10^9 CFU/0,2 ml PBS. Na štvrtý deň pokusu bola uskutočnená experimentálna infekcia v CJ a EFAL41+CJ skupinách individuálnym *per os* podaním *Campylobacter jejuni* (poskytnuté: Andrea Lauková, IAP SAS, Košice, Slovensko) v dávke 1×10^8 CFU/0,2 ml PBS. Vzorky z céka pre hodnotenie IgA+, IgM+ a CD3+ buniek boli odobraté na 4 a 7 deň po infekcii *C. jejuni*. Imunohistochemické stanovenie IgA, IgM a CD3 pozitívnych lymfocytov bolo vykonané

pomocou Streptavidín-biotín peroxidáza detekčného kitu (VECTASTAIN Elite ABC kit; Mouse IgG, PK 6102, Vector Laboratories, USA). Na detekciu boli použité neznačené primárne myšacie antikuracie monoklonové protilátky IgA (IgA-UNLB, Clone A-1, Cat. No. 8330-01), IgM (IgM-UNLB, Clone M-1, Cat. No. 8300-01) and CD3 (CD3-UNLB, Clone CT-3, Cat. No. 8200-01; Southern Biotech, USA). Ako negatívna kontrola bola použitá myšacia IgG1-UNLB protilátka (clone 15H6, Cat. No. 0102-01, Southern Biotech, USA). Špecifická farebná reakcia bola vykonaná použitím diaminobenzidínu (DAB, Sigma, Germany). Po dofarbení vzoriek hematoxylinom a zalepení Pertexom (Histolab AB, Švédsko) bola kvantifikácia IgA+, IgM+ a CD3+ lymfocytov uskutočnená svetelným mikroskopom (NIKON Labophot 2, Germany) pri 200x zväčšení s použitím kalibrovannej okuliarovej mriežky LTD 0.25 mm IdXG rd (Tonbridge, Kent, Elektronmikroskopie, UK). Každý preparát bol hodnotený v tripletoch. Na štatistickú analýzu dát bola použitá jednocestná ANOVA a Tukey Cramerov test v programe GraphPad (USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Epidemiologické štúdie v posledných rokoch poukázali na celosvetovo zvýšenú incidenciu prípadov kampylobakterovej nákazy (Sahin a kol., 2002). Infekcia nie je prítomná u kurčiat mladších ako 2 – 3 týždne, aj keď experimentálna inokulácia novovyliahnutých kurčiat kampylobaktermi môže viesť k úspešnej kolonizácii. Jedným z možných faktorov pre túto rezistenciu môže byť prítomnosť špecifických materských protilátok (Lin, 2009). Transportované protilátky sú prevažne IgG, zatiaľ čo prenos IgA a IgM je zvyčajne na nižšej úrovni (Sahin a kol., 2001). Probiotiká môžu zvýšiť hladinu IgA produkujúcich buniek v sliznici (Levkut a kol., 2014). Predchádzajúce štúdie poukázali na to, že probiotický kmeň *E. faecium* ovplyvňuje expresiu IgA+ buniek v sliznici čreva u vtákov (Revajová a kol., 2013). Naš experiment preukázal zvýšený počet IgA+ buniek v céku kurčiat, ktorým bol aplikovaný probiotický kmeň EFAL41 7 dní po infekcii s *Campylobacter jejuni*. Bobíková a kol. (2014), zaznamenala pozitívny efekt *E. faecium* AL41 na produkciu celkového sIgA v čreve a orgánoch u kurčiat infikovaných *S. Enteritidis* PT4. V ďalšej štúdii bola zistená zvýšená koncentrácia sIgA v čreve kurčiat ovplyvnených s *E. faecium* AL41 a zároveň infikovaných s *Campylobacter jejuni*, čo je pravdepodobne výsledkom pôsobenia oboch baktérií (Bobíková a kol., 2015). *E. faecium* AL41 pôsobí stimulačne aj na expresiu IL-17 a TGF- β 4, ktoré majú vplyv na sekréciu IgA v čreve (Karaffová, 2015). Produkcia IgM nastáva po počiatočnej expozícii novým antigénom (Tirziu, 2010). Najvyšší počet IgM+ buniek bol pozorovaný v skupine kurčiat infikovaných s *Campylobacter jejuni* (CJ), teda 4 dni po podaní *C. jejuni*. Najvyššia hustota CD3+ lymfocytov bola v skupine kurčiat s aplikovaným *E. faecium* AL41, čo poukazuje na pozitívny vplyv na túto subpopuláciu lymfocytov. V neskorej fáze infekcie bol najvyšší počet CD3+ buniek zaznamenaný v kombinovanej skupine (EFAL41+CJ). Predchádzajúce štúdie preukázali vplyv probiotík aj na počet lymfocytov v periférnej krvi kurčiat a nárast CD3, CD4, CD8 a IgM pozitívnych buniek po infekcii *S. Enteritidis* (Levkut a kol., 2011). V závere môžeme dodať, že naše výsledky preukázali pozitívny vplyv *E. faecium* AL41 na počet IgA+, IgM+ a CD3+ lymfocytov v céku u kurčiat infikovaných *C. jejuni*.

Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-0302-11, APVV-15-0165 a grantovými úlohami VEGA-1/0562/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. 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 Microbiology*. 2005; 108: 251-61.
2. Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, Ch., Pieper, J., Sachse, K., Methner, U. Chicken cecum immune response to

- Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. Infection and Immunity. 2007; 75: 5993-6007.
3. Bobíková, K., Husáková, E., Stašová, D. Vplyv probiotického kmeňa *E. faecium* AL41 na produkciu IgA v slezine, burze Fabricii a v čreve kurčiat infikovaných *Salmonella* Enteritidis PT4. Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu IX. ročník. Košice. 2014; 12-13.
 4. Bobíková, K., Husáková, E., Stašová, D. Vplyv probiotického kmeňa *E. faecium* AL41 na produkciu IgA v jejunu, ileu a céku v čreve kurčiat infikovaných *Campylobacter jejuni*. Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu X. ročník. Košice. 2015; 10-11.
 5. Casteleyn, C., Doom, M., Lambrechts, E., Van den Broeck, W., Simoens, P., Cornillie, P. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken: a review. Avian Pathology. 2010; 39: 143-150.
 6. Herich, R., Levkut, M. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Veterinary medicine - Czech. 2002; 47, 169-180.
 7. Hrubíško, M. Probiotiká a imunitný systém. Kuchta, M., Pružinec, P.: Probiotiká, ich miesto a využitie v medicíne. 2006; 80-93.
 8. Karaffová, V., Bobíková, K., Husáková, E., Levkut, M. Jr., Herich, R., Revajová, V., Levkutová, M., Levkut, M. Interaction of TGF- β 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, 2016/j.rvsc.2015.04.005.
 9. Levkut, M. Jr., Revajová, V., Lauková, A., Ševčíková, Z., Spišáková, V., Faixová, Z., Levkutová, M., Stromfová, V., Pítl, J., Levkut, M. Sr. Leukocytic responses and intestinal mucin Dynamics of broilers protected with *Enterococcus faecium* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritidis. Res Vet Sci. 2012; 93; 195-201.
 10. 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.
 11. Lin, J. Novel approaches for *Campylobacter* control in poultry. Foodborne Pathogens and disease. 2009; 6: 455 – 65.
 12. Nichols, G. L., Richardson J. F., Sheppard S. K., Lane, Ch., Sarran, Ch. *Campylobacter* epidemiology: a descriptive study reviewing 1 million cases in England and Wales between 1989 and 2011. BMJ Open. 2012; 2: 4.
 13. Revajová, V., Levkut, M. Jr., Levkutová, M., Levkut, M. Sr., Herich, R., Ševčíková, Z. 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.
 14. Ruth, M. R., Field, C. J. The immune modifying effects of amino acids on gut-associated lymphoid tissue. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2013; 4: 27.
 15. Sahin, O., Zhang, Q., Meitzler, J. C., Harr, B. S., Morishita, T. Y., Mohan, R. Prevalence, Antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67: 3951-3957.
 16. Sahin, O., Morishita, T., Zhang, Q. *Campylobacter* colonization in poultry: sources of infection and modes of transmission. Animal Health Research. 2002; 3: 95-105.
 17. Tirziu, E., Şereş, M. Particularities of the avian immune system. Lucrari Stiintifice Medicina Veterinara. 2010; 43: 1.

TRANSFER FAKTOR V ADJUVANTNEJ TERAPII LARVÁLNEJ CESTODÓZY

Mačák Kubašková T. ¹, Hrčková G. ¹, Mudroňová D. ²,

Velebný S. ¹, Grohoľová M. ¹

¹Parazitologický ústav SAV, Košice,

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice

ABSTRAKT

Larválne štádium pásomnice *Mesocestoides vogae* (syn. *M. corti*), nazývané aj tetratyridium, je schopné v organizme medzihostiteľa rásť a asexuálne proliferovať. Typickým miestom lokalizácie u myši je hlavne pečeň a peritoneálna dutina, kde vyvoláva zápal, fibrózu a ascites. Liekom voľby pri medikamentóznej terapii cestodóz je benzimidazolové antihelmintikum albendazol. V experimente sme sledovali imunomodulačné a antifibrotické účinky štandardnej terapie cestodóz - albendazolom (ABZ), ako aj terapie antihelmintikom v kombinácii s transfer faktorom (TF) u myši infikovaných larvami *M. vogae*. TF je súčasťou nízkomolekulárnej frakcie (≤ 10 kDa) získanej z leukocytov zdravých darcov, od ktorého sa očakáva, že normalizuje imunitné mechanizmy. Naše výsledky potvrdzujú, že TF má významné imunomodulačné vlastnosti. V skupine myši, kde bol podávaný ABZ v kombinácii s TF sme zaznamenali stimuláciu proliferácie T-lymfocytov sleziny a nárast CD4⁺/CD8⁻ buniek (T-helper buniek) v peritoneálnej dutine aj v slezine. Signifikantný nárast týchto buniek bol pozorovaný aj po monoterapii s TF, pri ktorej sme v slezine navyše zaznamenali vyššie percento CD4⁺/CD8⁺ buniek (mladé a pamäťové T-lymfocyty) a CD49b⁺/CD8⁺ buniek (NKT-bunky). Koncentrácia IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-17_A a TGF- β bola v skupine s kombinovanou liečbou významne znížená, avšak podávanie samotného TF infikovaným myšiam indukovalo výrazný nárast sérového IL-6 a IL-17_A v supernatantoch nestimulovaných splenocytov. Výsledky nášho experimentu ukazujú, že z hľadiska modulácie imunitnej odpovede, ako aj redukcie počtu larválnych štádií a fibrózy v pečeni, je liečba larválnej cestodózy kombináciou antihelmintika a leukocytárneho extraktu účinnejšia ako liečba samotným albendazolom.

ÚVOD

Larválne štádiá pásomníc ako je *Echinococcus* spp. a *Taenia* spp. sú pôvodcami závažných ochorení u človeka, ale aj u zvierat. K najzávažnejším patrí cystická a alveolárna echinokokóza, neurocysticerkóza u človeka, či cysticerkóza u ošípaných a hovädzieho dobytká. Tieto zoonózy boli podľa WHO zaradené k tzv. *neglected tropical diseases* (2008). Infekcie *Mesocestoides* spp. sú relatívne zriedkavé u ľudí, avšak ako model larválnej cestodózy ponúka výhody v tom, že je ľahko kultivovateľný a pasážovateľný v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach a je vhodným modelom pre štúdium hostiteľsko-parazitických vzťahov a rôznych aspektov biológie či patológie cestodóz.

Väčšina pôvodcov parazitárnych ochorení vyvíja rôzne adaptačné stratégie s cieľom udržať si hostiteľa živého a zároveň modulovať jeho imunitné mechanizmy tak, aby bola zabezpečená ich dlhodobá existencia. Vrodená imunita je prvou líniou obrany, avšak tieto nešpecifické obranné mechanizmy nie sú pri helmintoch stále detailne preskúmané. Z hľadiska špecifickej imunitnej odpovede všeobecne pri infekciách helmintami platí, že bunková imunita je charakterizovaná najprv prechodným Th1 typom imunitnej reakcie, ktorú neskôr nahradí Th2 typ imunitnej odpovede (Girgis a kol., 2013; Hotez a kol., 2008). Ich trvanie, resp. nástup dominantnej Th2 imunity varíruje v závislosti od experimentálneho modelu a konkrétneho ochorenia. Infekcia vyvolaná larválnym štádiom *M. vogae* je už od 7. dňa po nakazení sprevádzaná zvýšenou koncentráciou IL-4 a IL-10 (Th2) (Vendeľová a kol., 2015).

Správne fungovanie imunitného systému je základným predpokladom obranných mechanizmov voči akýmkoľvek infekciám. V prípadoch, ak imunitný systém reaguje

nedostatočne alebo nesprávne, sú navrhované rôzne terapeutické prístupy a látky s cieľom modulovať imunitnú odpoveď. Transfer faktor disponuje prirodzenou schopnosťou prenosu imunitnej odpovede z jedinca na jedinca. Pripravuje sa dialýzou, resp. ultrafiltráciou homogenátu leukocytov periférnej krvi ľudí alebo zvierat, preto je nazývaný aj ako dialyzovateľný leukocytárny extrakt (Rovenský a kol., 2014).

MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonané na ICR myškách (samce), ktoré boli rozdelené do piatich skupín: negatívna kontrolná skupina (neinfikovaná a neliečená); skupina len infikovaných (orálne larvami *M. vogae*); infikované a liečené iba ABZ podávaným *per os*; infikované a liečené kombináciou ABZ a TF (podávaným intraperitoneálne); infikované a liečené iba TF. ABZ a TF bol podávaný počas 10 dní, a to od 14. dňa do 24. dňa infekcie. V našom experimente sme použili prípravok IMMODIN® (IMUNA PHARM, a.s.). Po skončení terapie boli odobrané vzorky séra, sleziny, pečene, buniek a lariev z brušnej dutiny. Expresia povrchových markerov buniek sleziny a peritoneálnej dutiny (CD4+, CD8+, CD49b+) bola detegovaná prietokovou cytometriou pomocou monoklonálnych protilátok značených fluorochrómom FITC (fluoresceín isothiocyánat), PE (phycoerythrin), APC (allophycocyanin) (BD alebo eBioscience). Koncentrácia cytokínov IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, IL-17_A a TGF- β bola meraná v sére a v supernatantoch nestimulovaných splenocytov pomocou ELISA kitov (eBioscience, Nemecko) a proliferácia splenocytov stimulovaných konkanavalínom A bola meraná kolorimetrickou metódou pomocou kitu BrdU cell proliferation KIT (Roche). Účinnosť terapie bola stanovená počítaním lariev pod mikroskopom po ich izolácii z peritoneálnej dutiny a pečene. Kolagén v pečeni bol stanovený nepriamo, a to stanovením najviac zastúpenej aminokyseliny - hydroxyprolínu, kolorimetrickou metódou podľa Wöessnera (1961).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri testovaní účinnosti vybraných liečiv na redukcii počtu lariev sme u všetkých terapeutických skupín zaznamenali nižší počet lariev oproti skupine, ktorá nebola liečená. Vzhľadom na redukcii počtu všetkých lariev v pečeni (bez kolagénovej kapsuly a aj opúzdrených), bolo najviac účinné podávanie kombinácie ABZ a TF (52,5%), pričom podobný trend sme zaznamenali aj v peritoneálnej dutine (74,8%). Zaujímavým výsledkom je, že v skupine, kde bol podávaný iba ABZ sme v pečeni zaznamenali až trojnásobne vyšší počet lariev opúzdrených fibróznym tkanivom oproti neliečenej skupine ($P < 0,01$). Navyše v tejto skupine sme zistili aj vyššiu koncentráciu hydroxyprolínu (274,2 mg/g pečene) v porovnaní so zvieratami, ktoré boli iba infikované (247,7 mg/g pečene).

Pri sledovaní zmien v zastúpení subpopulácií buniek v peritoneálnej dutine sme v terapeutickú skupinu, kde bol podávaný TF, zaznamenali významný nárast CD4+ T buniek ($P < 0,001$), ktorý bol v menšom rozsahu aj pri kombinovanej terapii. Všetky tri spôsoby liečby indukovali mierne zvýšenie populácie CD8+ T-lymfocytov a pokles CD49b+ NK-buniek na lokálnej úrovni. Podobne sme nárast CD4+ T-lymfocytov zaznamenali aj v slezine ($P < 0,001$), a to v skupine s kombinovanou terapiou, ako aj monoterapiou TF. Táto monoterapia TF indukovala v slezine navyše nárast aj CD4+/CD8+ T-buniek a CD49b+/CD8+ NKT-buniek a taktiež aj stimuláciu proliferácie T-lymfocytov oproti skupine, ktorá nebola liečená. Podobne, stimulácia proliferácie T-lymfocytov bola zaznamenaná aj pri kombinovanej terapii. Stanovenie koncentrácie cytokínov v sére potvrdilo, že infekcia larvami *M. vogae* je sprevádzaná až päť násobným zvýšením koncentrácie IL-4 (49 pg/ml) v sére oproti zdravým myškám. Po aplikácii všetkých troch spôsobov liečby sme zaznamenali pokles hladiny IL-4, avšak nedosahovala úroveň ako u zdravých myší (10 pg/ml). Naopak pokles prozápalového IFN- γ v liečených skupinách bol výraznejší, dokonca pod úroveň hodnôt u zdravých, neliečených myší (522,14 pg/ml). Pri sledovaní zmien v koncentracii ďalších prozápalových cytokínov v sére sme zaznamenali, že infekcia je sprevádzaná až trojnásobným zvýšením IL-17_A (63,6 pg/ml), avšak poklesom koncentrácie IL-6 (36,35 pg/ml) oproti skupine zdravých zvierat. Podávanie TF indukovalo

signifikantné zvýšenie IL-6 v sére infikovaných myší (75,60 pg/ml; $P < 0,001$). Experimentom sme potvrdili, že infekcia larvami *M. vogae* je taktiež spojená s výraznou imunosupresiou, na čo poukazuje približne desaťnásobné zvýšenie koncentrácie sérového TGF- β (233,45 pg/ml) v porovnaní so zdravými zvieratami. Podávanie ABZ alebo TF redukovalo hladinu TGF- β ($P < 0,001$) pod hodnoty zaznamenané u zdravých zvierat (19,3 pg/ml).

Pri stanovení koncentrácie cytokínov v supernatantoch nestimulovaných splenocytov sme zaznamenali pri všetkých troch spôsoboch liečby zvýšenú koncentráciu IFN- γ oproti neliečenej skupine. Podobne aj v terapeutickú skupinu, kde bol podávaný TF sme zaznamenali až dvojnásobne vyššiu hladinu IL-17_A produkovaného nestimulovanými splenocytmi ($P < 0,001$) v porovnaní s neliečenou skupinou. Hodnoty IL-1, IL-4 a TGF- β boli v supernatantoch splenocytov pod detekčným limitom.

Na záver, v našej práci sme potvrdili, že TF podávaný samostatne alebo v kombinácii s ABZ má významné imunomodulačné vlastnosti, čo sa prejavilo tým, že potláča imunosupresiu, ktorá sprevádza infekciu, stimuluje proliferáciu T-lymfocytov a nárast populácie T-helper buniek lokálne aj systémovo. Zároveň prispieva k redukcii infekcie a fibrózy v pečeni. Zaujímavým zistením bolo aj zvýšenie percento NKT-buniek v slezine, ktorých úloha je menej známa pri parazitárnych infekciách, avšak je známe, že sa tiež zúčastňujú na polarizácii imunitnej odpovede Th1 alebo Th2 smerom (Faveeuw a kol., 2008). Predpokladáme, že by mohli byť, okrem iných buniek, zdrojom IFN- γ detegovaného v supernatantoch splenocytov.

Je známe, že TF stimuluje expresiu IL-17 (Zajícová a kol., 2014), čo sa nám potvrdilo zvýšením jeho koncentrácie v supernatantoch nestimulovaných splenocytov. Okrem toho bola detegovaná zvýšená hladina IL-6 v sére, ktorý je rozhodujúcim cytokínom pre diferenciáciu Th17 buniek. Tieto pleiotropné cytokíny majú viaceré účinky v rôznych imunologických situáciách, preto cieľom ďalšej práce bude podrobnejšie skúmať aj iné molekuly, signálne dráhy a interakcie, do ktorých sa transfer faktor zapája alebo ich ovplyvňuje a tak objasniť jeho imunonormalizačný účinok.

Práca bola vytvorená v rámci riešenia projektu ITMS 26220220157, na základe podpory operačného programu „Výskum a vývoj“ z fondov Európskej únie pre regionálny rozvoj (1,0).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Faveeuw C., Mallevaey T., Trottein F. Role of Natural Killer T lymphocytes during helminthic infection. *Parasite*. 2008;15, 384-388.
2. Girgis N. M., Gundra U.M., Loke P. Immune Regulation during Helminth Infections. *PLoS Pathog*. 2013; 9(4): e1003250.
3. Hotez P. J., Brindley P.J. , Bethony J. M. , King Ch. H., Pearce E. J., Jacobson J.. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*. 2008; 118(4):1311–1321.
4. Rovenský, J., Blažíčková, S., Hrubíško, M. Transfer faktor v klinickej praxi včera a dnes. 1. vyd. Bratislava: SAP – Slovak Academic Press s.r.o., 2014. 195 s. ISBN 978-80-89607-21-1.
5. Vendelova E, Lutz MB, Hřčková G. Immunity and immune modulation elicited by the larval cestode *Mesocestoides vogae* and its products. *Parasite Immunol*. 2015; doi: 10.1111/pim.12216.
6. Wöessner J.F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys*. 1961; 93:440–447.
7. Zajícová A., Javorková E., Trošan P., Chudíčková M., Krulová M., Holář V. A low-molecular-weight dialysable leukocyte extract selectively enhances development of CD4⁺ROR γ t⁺ T cells and IL-17 production. *Folia Biol (Praha)*. 2014; 60(6):253-60.

REZISTENCIA NA ANTIBIOTIKÁ A VÝSKYT GÉNOV FAKTOROV VIRULENCIE U ENTEROKOKOV ZO PSOV

Kubašová, I.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

Enterokoky patria medzi ubikvitárne mikroorganizmy, ktoré možno izolovať z rôznych ekosystémov. Vyznačujú sa výbornými technologickými vlastnosťami a niektoré kmene aj probiotickým potenciálom. Pri selekcii a výbere kmeňa, vhodného na použitie ako aditíva vo výžive zvierat, je potrebné dodržanie podmienok, ktoré určuje Európsky úrad pre bezpečnosť potravín (EFSA, 2012). Kmeň musí byť vhodnou molekulovou metódou identifikovaný ako *Enterococcus faecium*, nemôže obsahovať žiadne genetické elementy faktorov virulence IS16, *esp* a *hyl_{Efm}* a musí byť citlivý ku antibiotiku ampicilín. V štúdiu sme sledovali výskyt génov pre 10 faktorov virulence a rezistenciu na klinicky významné antibiotiká u 160 kmeňov rodu *Enterococcus*, ktoré boli izolované z trusu psov. Gén pre element IS – IS16 bol detegovaný u 9 kmeňov druhu *E. faecium* (z 92 kmeňov). Početnejšie sa vyskytovali gény pre adhezíny *E. faecium* a *E. faecalis* – *efa_{Afm}* (95% *E. faecium*) a *efa_{Afs}* (91% *E. faecalis*). Najčastejšia rezistencia bola pozorovaná v prípade glykopeptidu – teikoplanin, a to u 71,9% zo všetkých enterokokov. K ampicilínu bolo rezistentných 47 kmeňov *E. faecium* (n=92), 12 kmeňov *E. faecalis* (n=35), 16 kmeňov *E. hirae* (n=28) a 2 kmene *E. casseliflavus* (n=3).

ÚVOD

Baktérie rodu *Enterococcus* sú kontroverznou skupinou baktérií. Na jednej strane môžu byť prospešné pri podpore zdravia zvierat a ľudí ako probiotiká a tiež pri výrobe niektorých fermentovaných produktov (najmä syry v stredomorských oblastiach), ale na druhej strane existujú kmene, ktoré môžu za určitých okolností vyvolávať nozokomiálne infekcie. Až 90% týchto enterokokových infekcií je vyvolaných druhom *E. faecalis* a väčšina ostatných druhom *E. faecium* (Dahlén a kol., 2012). Patogenita enterokokov, ktoré môžu spôsobovať infekcie, je daná najmä produkciou faktorov virulence a rezistenciou k širokému spektru antibiotík (Moreno a kol., 2006). Faktory virulence môžu prispievať k vzniku ochorení viacerými účinkami. Kým niektoré sú spájané s podporou adhézie a kolonizácie patogénnych baktérií (agregačná substancia alebo enterokokový povrchový proteín), iné majú schopnosť poškodzovať tkanivá hostiteľa (hydrolytické enzýmy) alebo lyzovať eukaryotické bunky (cytolyzín). Z hľadiska posúdenia bezpečnosti enterokokov, ktoré by mohli byť použité ako aditíva vo výžive zvierat, je dôležité vylúčiť kmene s markermi IS. Marker IS16 je špecifický pre kmene *E. faecium* spájané s nozokomiálnymi infekciami a tiež bol popísaný u niektorých klinických izolátov *E. faecalis* (Hegstad a kol., 2010). Taktiež je pri selekcii kmeňov pre výživu zvierat dôležité vylúčiť tie, ktoré preukazujú rezistenciu voči klinicky významným antibiotikám.

MATERIÁL A METODIKA

Zo 160 kmeňov rodu *Enterococcus*, ktoré boli izolované z trusu psov, bola izolovaná DNA pomocou alkalickej lýzy (Baele a kol., 2001). Výskyt génov vybraných desiatich faktorov virulence (agregačná substancia, cytolyzín, adhezín *E. faecium*, adhezín *E. faecalis*, enterokokový povrchový proteín, želatináza, 3 pohlavné feromóny a element IS16; sekvencie použitých primerov sú uvedené v Tab. č.1) bol testovaný metódou PCR za použitia C1000TM termocyklera (BioRad Laboratories, USA). Reakčný cyklus pre všetky faktory virulence, okrem elementu IS16, pozostával z nasledujúcich krokov: denaturácia pri teplote 95°C 5 min., 35 opakujúcich cyklov 95°C 30 sek., 55°C 30 sek., 72°C 30 sek., následne 72°C 5 min. a schladenie na 4°C. Reakčný cyklus pre element IS16 bol nasledovný: 94°C 4 min., 30

cyklov 94°C 30 sek., 53°C 30 sek., 72°C 30 sek., následne 72°C 7 min. a schladenie na 4°C. Získané produkty PCR boli separované v 1,2% agarózovom géli (Sigma, Nemecko) s obsahom etídium bromidu (1µl/1ml; Sigma) za použitia pufru TAE (Merck, Nemecko). Ako pozitívne kmene pre uvedené faktory virulencie boli použité *E. faecium* UW9086 (poskytnutý Dr. I. Klare, Nemecko) a *E. faecalis* P36 (od Dr. T. Semedo-Lemsaddek, Portugalsko). Izolované enterokoky boli testované na rezistenciu voči antibiotikám difúznou diskovou metódou za použitia Mueller-Hinton agaru (Oxoid,UK). Boli použité disky trinástich antibiotík v nasledovných koncentráciách (Oxoid): ampicilín 10µg, tetracyklín 30µg, chloramfenikol 30µg, erytromycín 15µg, penicilín G 10 µg, quinupristin-dalfopristin 15µg, vankomycín 30µg, ciprofloxacín 5µg, linezolid 30µg, gentamycín 120 µg, teikoplanin 30 µg, trimetoprim 5µg a rifampicín 30µg. Platne boli inkubované pri teplote 36 °C po dobu 20 hodín a 24 hodín platne s glykopeptidmi. Po odmeraní vytvorených zón boli kmene definované ako rezistentné, intermediárne a citlivé. Ako pozitívne kmene boli použité *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a *E. faecalis* ATCC 29212.

Tab. 1 Sekvencie použitých primerov pre faktory virulencie

Faktor virulencie	Lokus	Sekvencia (5'-3')	Veľkosť (bp)	Referencie
Agregačná substancia	<i>agg</i>	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton a Gasson (2001)
Cytolyzín	<i>cylA</i>	F: TAGCGAGTTATATCGTTCCTGTA R: CTCACCTCTTTGTATTTAAGCATG	1282	Semedo a kol. (2003)
Adhezin <i>E. faecium</i>	<i>efaAfm</i>	F: GACAGACCCTCACGAATA R: AGTTCATCATGCTGTAGTA	705	Eaton a Gasson (2001)
Adhezin <i>E. faecalis</i>	<i>efaAfs</i>	F: AACAGATCCGCATGAATA R: CATTTCATCATCTGATAGTA	735	Eaton a Gasson (2001)
Enterokokový povrchový proteín	<i>esp</i>	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Eaton a Gasson (2001)
Želatináza	<i>gelE</i>	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	419	Eaton a Gasson (2001)
Pohlavný feromón	<i>ccf</i>	F: GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG R: AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	543	Eaton a Gasson (2001)
Pohlavný feromón	<i>cpd</i>	F: TGGTGGGTATTTTTCAATTC R: TACGGCTCTGGCTTACTA	782	Eaton a Gasson (2001)
Pohlavný feromón	<i>cob</i>	F: AACATTCAGCAAACAAAGC R: TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	1405	Eaton a Gasson (2001)
IS element	IS16	F: CATGTTCCACGAACCAGAG R: TCAAAAAGTGGGCTTGGC	547	Werner a kol. (2011)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Baktérie rodu *Enterococcus* (n=160) mali nasledovné druhové zastúpenie: *E. faecium* (n=92), *E. faecalis* (n=35), *E. hirae* (n=28), *E. casseliflavus* (n=3) a *E. mundtii* (n=2). U druhov *E. casseliflavus* a *E. mundtii* neboli detegované žiadne z 10 génov pre faktory virulencie. Zo skupiny enterokokov identifikovaných ako *E. hirae* boli u 1 kmeňa detegované gény pre želatinázu – *gelE*, enterokokový povrchový proteín – *esp* a pohlavný feromón – *ccf*. Najvyšší výskyt bol pozorovaný v prípade adhezínov, až 95,0% *E. faecium* (n=88) bolo pozitívnych na výskyt génu *efaAfm* a 91,4% *E. faecalis* (n=32) na výskyt génu *efaAfs*. U druhov *E. faecalis* mal pomerne časté zastúpenie aj gén pre želatinázu *gelE*, a to až u 68,6% (n=24). Element IS – IS16, ktorý je špecifickým markerom pre kmene *E. faecium* spájané s nozokomiálnymi infekciami bol v našej štúdií potvrdený u 9 kmeňov *E. faecium*. Werner a kolektív (2011) skúmali výskyt tohto génu u izolátov druhu *E. faecium*, a to jednak u izolátov klinických (n=648), humánných komenzálnych (n=68) a taktiež u izolátov zo zvierat (n=32). V prípade klinických izolátov až 98% bolo IS16-pozitívnych, z humánnych izolátov 4,4% IS16-pozitívnych a u izolátov zo zvierat nebol tento gén detegovaný. Čo sa týka rezistencie

enterokokových izolátov ku vybraným, klinicky významným antibiotikám, najvyššie percento rezistencie bolo pozorované ku glykopeptidu – teikoplanín, a to až u 71,9% izolátov. V prípade enterokokov je veľmi dôležitá rezistencia ku druhému významnému glykopeptidu – vankomycínu, nakoľko táto rezistencia je spájaná s nozokomiálnymi infekciami. V našej štúdii bolo 19,4% zo všetkých enterokokov rezistentných ku vankomycínu a 24,4% bolo popísaných ako intermediárnych. Z rezistentných až 77,4% kmeňov bolo identifikovaných ako *E. faecalis*. Pomerne vysoké zastúpenie rezistencie bolo pozorované v prípade penicilínu (33,8%), tetracyklínu (42,5%) a až 48,1% enterokokov bolo rezistentných ku ampicilínu (z toho viac ako polovica *E. faecium*). Damborg s kolektívom (2009) izolovali druh *E. faecium* z trusu 208 psov (183 vo Veľkej Británii a 25 v Dánsku) a 61 z nich bolo potvrdených ako ampicilín-rezistentné *E. faecium* (AREF). Tie boli podrobené testovaniu rezistencie aj k ďalším antibiotikám. Až 84% z AREF bolo rezistentných ku tetracyklínu, 52% ku rifampicínu a 25% ku ciprofloxacínu. Na základe spojitosti rezistencie ku ampicilínu a prítomnosti elementu *IS16* s nozokomiálnymi infekciami, je potrebné pozitívne kmene vylúčiť z možnosti ich uplatnenia ako aditív vo výžive zvierat.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0012/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Baele M., Chiers K., Davriese L.A., Smith H.E., Wisselink H.J. Vaneechoutte M., Haesebrouck F. The grampositive tonsillar and nasal flora of piglets before and after weaning. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91:997-1003.
2. Dahlén G., Blomqvist S., Almståhl A., Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J. Oral. Microbiol.* 2012; 4: doi: 10.3402/jom.v4i0.10855.
3. Damborg P., Top J., Hendrickx A.P.A., Dawson S., Willems R.J.L., Guardabassi. Dogs are a reservoir of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* lineages associated with human infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 2360—2365.
4. Eaton T.J. a Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic Exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67: 1628-1635.
5. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the safety assessment of *Enterococcus faecium* in animal nutrition. *EFSA J.* 2012; 10: 2682 (10strán).
6. Hegstad K., Mikalsen T., Coque T.M., Werner, G., Sundsfjord A. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16:541-554.
7. Moreno M.R., Sarantinopoulou P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food. Microbiol.* 2006; 106: 1-24.
8. Werner G., Fleige C., Geringer U., van Schaik W., Klare I., Witte W. IS element *IS16* as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11:80.

ÚLOHA MITOCHONDRIÁLNYCH ELEKTRÓN-TRANSPORTNÝCH PROTEÍNOV V REGULÁCII MITOCHONDRIÁLNEHO OXIDAČNÉHO STRESU

Lysáková V.¹, Leňová K.¹, Tomášková N.¹, Musatov A.²

¹Katedra biochémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárova 2, 041 80 Košice

²Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Watsonova 47, 040 01 Košice

ABSTRAKT

Reaktívne formy kyslíka (ROS z angl. „reactive oxygen species“) a oxidačný stres môžu vznikajúť na rôznych miestach v bunke, avšak práve mitochondriálny elektrón-transportný reťazec je považovaný za hlavný zdroj ROS. V snahe eliminovať poškodenia vyvolané ROS, mitochondrie disponujú obrannými mechanizmami. Naša hypotéza je, že mitochondriálne elektrón-transportné proteíny môžu byť súčasťou obranných mechanizmov. Bolo preukázané, že cytochróm c oxidáza (CcO) a ferricytochróm c (Cyt c³⁺) dokážu eliminovať peroxid vodíka, avšak mechanizmus tejto peroxidázovej/katalázovej aktivity nie je dones známy. V tejto práci bolo naším cieľom zistiť ako sa prejaví kinetika reakcie v prípade, keď hémové centrá budú destabilizované chemickými denaturantmi. Sledovali sme reakcie CcO a Cyt c³⁺ s H₂O₂ po opracovaní proteínov chemickými denaturantmi (močovina, guanidín hydrochlorid GdnCl) za účelom destabilizácie hémových jadier. Potvrdili sme, že CcO a Cyt c³⁺ sú schopné rozložiť H₂O₂. Modifikácia CcO guanidín hydrochloridom mala za následok inhibíciu peroxidázovej/katalázovej aktivity CcO. Avšak opracovaním Cyt c³⁺ denaturantom sme pozorovali opačný účinok ako pri CcO, teda že rýchlosť reakcie rastie so zvyšujúcou sa koncentráciou močoviny. Naše výsledky naznačujú, že destabilizácia hémového jadra vedie k radikálnym zmenám v rýchlosti eliminácie peroxidu vodíka.

ÚVOD

Mitochondrie hrajú centrálnu úlohu v produkcii energie vo forme ATP. Rovnako sa však podieľajú na tvorbe voľných kyslíkových radikálov a tým aj na vzniku oxidačného stresu. Teória voľných radikálov primárne udávala, že ROS produkované v bunke spôsobujú špecifické alebo nešpecifické zmeny v štruktúre lipidov, nukleových kyselín a proteínov, čo prispieva k procesom starnutia a chorobám spojenými so starnutím. Tento pohľad sa spresnil vtedy, keď došlo k pochopeniu funkcie mitochondrií v produkcii ROS. Dnes sa považuje úloha mitochondrií v produkcii ROS a oxidačnom strese za rozhodujúcu. Je dôležité vedieť ako mitochondrie kontrolujú tvorbu ROS, a ktoré faktory na to pôsobia, pretože v prípade straty kontroly nad ROS dochádza k výraznému zvyšovaniu ich koncentrácie s patologickými následkami ako sú Alzheimerova a Parkinsonova choroba (Cohen G., 2000), ateroskleróza a iné ochorenia súvisiace so starnutím (Lesnefsky EJ a Hoppel CL, 2003). Dôležitou vlastnosťou peroxidu vodíka je, že ľahko prechádza membránami a môže modifikovať proteíny a fosfolipidy. Napriek všadeprítomným bunkovým obranným mechanizmom bola preukázaná úloha peroxidu vodíka v poškodzovaní jednotlivých častí mitochondrie (Musatov A a kol., 2004).

Cytochróm c oxidáza je elektrón – transportný komplex respiračného reťazca, ktorý katalyzuje prenos elektrónov z Cyt c²⁺ na kyslík. Na rozdiel od komplexov I a III zatiaľ nebolo jednoznačne preukázané, že CcO a cytochróm c sú zdrojmi ROS. Avšak ich lokalizácia v blízkosti zdrojov ROS v procese starnutia mitochondrie môže viesť k modifikácii a poškodeniu týchto proteínov. Aby sa nepoškodili redoxne aktívne centrá, je veľmi pravdepodobné, že CcO je vybavená niekoľkými obrannými mechanizmami. Jedným z takýchto obranných mechanizmov proti oxidačnému stresu je peroxidázova/katalázova aktivita CcO, t.j. schopnosť rozkladať peroxid vodíka, a tým zabrániť poškodeniu mitochondriálnych komplexov elektrón transportného reťazca (Jancura D a kol., 2014).

Ferricytochróm c je proteín lokalizovaný v medzimembránovom priestore mitochondrie a je viazaný na vonkajšiu stranu vnútornej mitochondriálnej membrány. Tento proteín je prirodzeným donorom elektrónov pre CcO. Okrem tejto funkcie má ferricytochróm c významnú úlohu pri aktivácii programovanej smrti bunky, apoptóze (Liu X a kol. 1996). Podobne ako CcO je tiež známe, že ferricytochróm c môže eliminovať peroxid vodíka a podieľať sa na regenerácii molekulového kyslíka zo superoxidového radikálu v podmienkach oxidačného stresu (Zhao Y a kol. 2003; Deterding LJ a kol., 1998).

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Dodecyl β -D-maltozid (DDM), bol zakúpený od firmy Avanti Polar Lipids, Inc. Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris-HCl), peroxid vodíka (H_2O_2), xylenová oranžová, síran amónno-železnatý ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$), butylhydroxytoulén (BHT), ditioničnan sodný ($Na_2S_2O_4 \cdot H_2O$) a Cyt c^{3+} izolovaný z konského srdca ($\geq 95\%$ čistota) boli zakúpené od firmy - Sigma–Aldrich Co. Ostatné chemikálie boli čistoty p.a. V našich experimentoch sme použili CcO izolovanú z hovädzích srdce, známu ako „fast“ CcO, reagujúcu veľmi rýchlo s externými ligandami. Získaný enzým mal výslednú koncentráciu približne 223 μM a bol skladovaný pri teplote $-80^\circ C$. Tento enzým nám poskytol RNDr. Marián Fabian, CSc., z PF UPJS, Košice.

Reakcia s chemickými denaturantami.

Absorpčné spektrá a kinetika reakcií boli merané na spektrofotometri JASCO-V-630. Podmienky reakcie pre CcO boli: 20 mM Tris-HCl tlmivý roztok pri pH 7,4; 2 mM DDM, 5 μM CcO, GdnCl a močovina s koncentraciami od 0,5M do 2 M. Podmienky reakcie pre Cyt c^{3+} boli: 10mM fosfátový tlmivý roztok, pH 7,01 a pH 5,00; 0,1 mM Cyt c^{3+} , GdnCl a močovina s koncentraciami od 0,5M do 2 M. Rýchlosť rozkladu H_2O_2 (počiatočná koncentráciou 500 μM) pomocou CcO a Cyt c^{3+} bola detekovaná použitím FOX 2 metódy. FOX 2 metóda je založená na oxidácii železnatých iónov použitím xylenolovej oranžovej.

Kruhový dichroizmus (CD)

CD spektrá boli namerané na spektrometri Jasco J-815. Všetky spektrá boli zmerané pri konštantnej teplote $25^\circ C$ s 3 akumuláciami, s rýchlosťou skenovania 100nm/min pri vlnovej dĺžke 190-260 nm. Použitá bola kremenná kveta o dĺžke 1 cm.

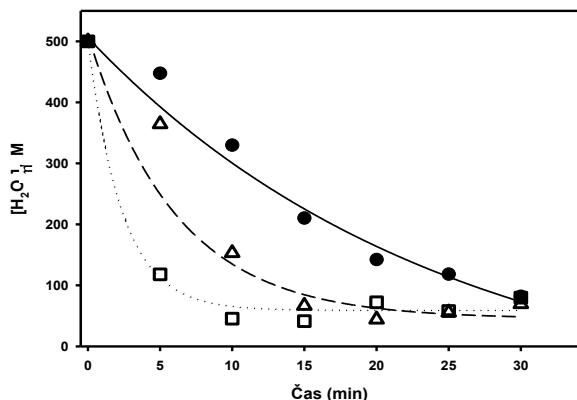
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Močovina a GdnCl sú denaturačné činidlá, často používané k výskumu konformačnej stability proteínov. Naším cieľom bolo použiť tieto činidlá k destabilizácii hémových centier, aby sme odpovedali na otázku ako chemická štruktúra hémov ovplyvňuje rozklad H_2O_2 prostredníctvom CcO a ferricytochrómu c. Pozorovali sme pokles intenzity absorbancie naprieč Soretovou spektrálnou oblasťou, počas zvyšujúcej sa koncentrácie denaturantov, čo sa prejaví tzv. „bielením hémov“ (Hill a kol.; 1988). V práci sme potvrdili, že peroxidázová/katalázová aktivita CcO je jedným z možných obranných mechanizmov proti oxidačnému stresu. Sledovali sme pokles koncentrácie peroxidu vodíka v prítomnosti CcO aj pri modifikácii tohto komplexu guanidín chloridom, avšak so zvyšujúcou koncentraciou denaturantu sa rýchlosť reakcie spomaľovala. Naopak, peroxidázová/katalázová aktivita Cyt c^{3+} sa zvyšuje v prítomnosti močoviny s jej rastúcou koncentraciou. Ferricytochróm c jednak katalyzuje rozklad H_2O_2 a zároveň môže chrániť CcO pred oxidačným stresom.

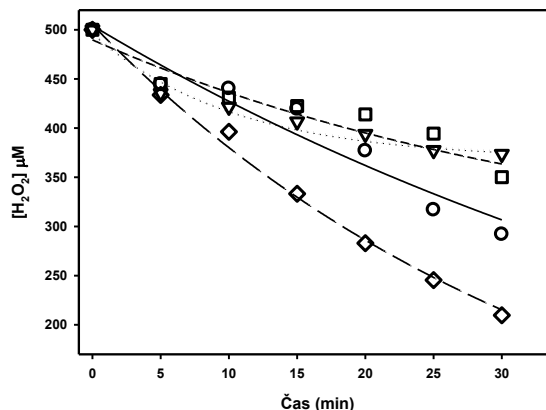
Analýzou CD spektier CcO sme došli k záveru, že v peptidickej oblasti spektra, dáva CcO negatívny CD signál intenzity pri 208 a 222 nm. Signál, ktorý odráža sekundárnu štruktúru, pomaly klesá na intenzite pri tom, ako sa zvyšuje koncentrácia GdnCl. Zdá sa, že CcO stráca štruktúru α - helixu, ale zachováva si podstatnú časť β - štruktúry.

Na základe získaných experimentálnych údajov môžeme konštatovať, že

peroxidázová/katalázová aktivita CcO a Cyt c^{3+} je vo veľkej miere závislá na chemickej štruktúre hémovej zložky. Destabilizácia hémového jadra vedie k radikálnym zmenám v rýchlosti eliminácii peroxidu vodíka.



Obr. 1 Peroxidázová/katalázová aktivita Cyt c^{3+} . Kinetika rozkladu peroxidu vodíka meraná v zmesi 0,1mM Cyt c^{3+} v 10mM fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,01 v prítomnosti 0,5mM H_2O_2 (●) a po pridaní 2M močoviny (Δ) a 4M močoviny (◻). Doba merania 0-30min.



Obr. 2 Peroxidázová/katalázová aktivita CcO. Časová závislosť rozkladu peroxidu vodíka 5 μ M CcO v prítomnosti 20mM TRIS-Cl pH 7,04 + 1mg/ml DDM v prítomnosti 0,5mM H_2O_2 (●) a po pridaní 0,5M GdnCl (◻), 1,5M GdnCl (∇) a 2M GdnCl (◊). Doba merania 0-30 min.

Tato práca bola podporená projektmi VEGA č.2/0062/14 a č.1/0423/16

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Cohen G. Oxidative stress, mitochondrial respiration, and Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2000;899:112–120
2. Deterding LJ, Barr DP, Mason RP, Tomer KB. Characterization of cytochrome c free radical reactions with peptides by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 1998;273:12863–12869
3. Jancura D, Stanicova J, Palmer G, Fabian M. How Hydrogen Peroxide Is Metabolized by Oxidized Cytochrome c Oxidase
4. Liu X, Kim CN, Yang Y, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell.* 1996;86:147–157
5. Lushchak V. Oxidative stress and mechanism of protection against it in bacteria. *Biochemistry.* 2001;66(5):476-489
6. Musatov A, Hebert E, Carroll A.Ch, Weintraub T.S, Robinson C.N. Specific Modification of Two Tryptophans within the Nuclear-Encoded Subunits of Bovine Cytochrome c Oxidase by Hydrogen Peroxide. *Biochemistry* 43, 2004, p.1003-1009
7. Zhao Y, Wang Z-B, Xu J-X. Effect of cytochrome c on the generation and elimination of O^{2-} and H_2O_2 in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2003;278:2356–2360

DEFICIT VITAMÍNU D A METABOLICKÁ KOMPENZÁCIA DIABETES MELLITUS 2.TYPU

Malachovská Z., Kozárová M.

IV.interná klinika Lekárskej fakulty UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Deficit vitamínu D je rizikovým faktorom osteoporózy ale v súčasnosti sa do popredia dostávajú aj jeho nekalcemické (extraskelétálne) účinky vrátane zvýšeného rizika diabetes mellitus 2.typu (DM2). Cieľom štúdie bolo posúdiť vplyv deficitu vitamínu D na metabolickú kompenzáciu DM2. V súbore 88 pacientov s DM2 sme stanovovali hladinu vitamínu 25-(OH)D₃, glykémiu nalačno, glykovaný hemoglobín (HbA_{1c} %, vyjadrený v DCCT norme), lipidogram, antropometrické merania, BMI a vyšetrenie telesného zloženia na princípe bioimpedancie (prístrojom BodyStat). V skupine pacientov s hladinou vitamínu D pod 20nmol/l v porovnaní s pacientmi s hladinou vitamínu D nad 20nmol/l bolo pozorované vyššie percento telesného tuku (40,9% vs. 34,8%, p=0,003), menšie % aktívnej telesnej hmoty (58,7% vs. 65,2%, p=0,002) ako aj nižšie % bezvodnej aktívnej telesnej hmoty (10,45 vs. 13,4 kg, p=0,008) a nižší bazálny metabolizmus (1453 kcal vs. 1693 kcal, p=0,048). Ďalším pozorovaním bola vyššia glykémia nalačno u pacientov s deficitom vitamínu D (7,75 mmol/l vs 6,73 mmol/l, p=0,012) ako aj horšia metabolická kompenzácia diabetu vyjadrená hladinou glykovaného hemoglobínu (7,75% vs. 6,73%, p=0,012).

ÚVOD

Klasická úloha vitamínu D pri metabolizme vápnika a fosforu a jeho pozitívny vplyv na tvorbu zdravých zubov a kostí sú všeobecne známe a rokmi preverené. Pri jeho nedostatku sa u detí vyvíja rachitída, u dospelých osteoporóza. Hlavným zdrojom vitamínu D je dostatočná expozícia slnečného svitu a prísun potravou. Prevalencia deficitu vitamínu D v Slovenskej republike je vo svetle najnovších poznatkov veľmi vysoká. Predpokladá sa, že jeho nedostatok je asociovaný aj s hyperglykémiou, inzulínovou rezistenciou, progresiou diabetu, artériovou hypertenziou a kardiovaskulárnymi aj onkologickými ochoreniami.

MATERIÁL A METODIKA

Cieľom štúdie je zistiť asociáciu medzi metabolickou kompenzáciou diabetu vyjadrenou glykémiou nalačno ako aj hladinou glykovaného hemoglobínu so sérovou hladinou vitamínu 25-(OH)D₃ u 88 konšekutívnych pacientov s diabetes mellitus 2. typu. Sérová hladina vitamínu 25-(OH)D₃ bola stanovená ELISA metódou v certifikovanom biochemickom laboratóriu. Hladina glykovaného hemoglobínu bola stanovená imunoturbidimetrickou metódou. Analýza telesného zloženia bola realizovaná na prístroji Bodystat2000 bioimpedančnou metódou.

Štatistické analýzy boli realizované v programe SigmaStat 13.0. Výsledky sú uvádzané ako priemer ± smerodajná odchýlka pri normálnom rozložení hodnôt, resp. ako medián (25., 75. percentil) v prípadoch, kedy namerané hodnoty neboli normálne rozložené. Na štatistické vyhodnotenie rozdielov medzi kvantitatívnymi parametrami v dvoch skupinách sme použili nepárový Studentov t-test pri normálnom rozložení hodnôt, resp. neparametrický Mannov-Whitneyho U-test, v prípade, keď namerané hodnoty neboli normálne rozložené. Rozdiely pri porovnávaní viacerých skupín boli vyhodnotené použitím jednorozmernej analýzy rozptylu (ANOVA). Na overovanie vzťahov medzi kvantitatívnymi premennými sme použili Pearsonove korelačné koeficienty. Viacrozmerná postupná lineárna regresia bola použitá v multivariátnej analýze. Rozdiely a závislosti boli pokladané za štatisticky významné pri hladine významnosti p<0,05.

VÝSLEDKY

Priemerný vek pacientov s DM2 bol 63,5r., mužov bolo 40 (45,5%), žien bolo 48 (54,5%). Deficit vitamínu D definovaný hladinou 25-(OH)D₃ <20nmol/l malo 35 pacientov (39,8%), hladiny vitamínu D 20-50nmol/l malo 53 pacientov (61,2%). Pacienti v jednotlivých skupinách sa v závislosti na koncentrácii vitamínu 25(OH)D₃ nelíšili v priemernom veku, trvaní diabetu, fajčiarskom statuse vyjadrenom balíčekom xrokmi, antropometrickými parametrami ani základnými hodnotami lipidogramu- až na mierne vyššie triacylglyceroly u pacientov s hypovitaminózou D (1,58 vs. 1,29 mmol/l, p=0,034). V skupine pacientov s hladinou vitamínu D pod 20nmol/l v porovnaní s pacientmi s hladinou vitamínu D nad 20nmol/l bolo pozorované vyššie % telesného tuku (40,9% vs. 34,8%, p=0,003), menšie % aktívnej telesnej hmoty (58,7% vs. 65,2%, p=0,002) ako aj nižšie % bezvodej aktívnej telesnej hmoty (10,45 vs. 13,4 kg, p=0,008) a nižší bazálny metabolizmus (1453 kcal vs. 1693 kcal, p=0,048). Ďalším pozorovaním je vyššia glykémia nalačno u pacientov s deficitom vitamínu D (7,75 mmol/l vs 6,73 mmol/l, p=0,012) ako aj horšia metabolická kompenzácia diabetu vyjadrená hladinou glykovaného hemoglobínu v norme DCCT (7,75% vs. 6,73%, p=0,012). Pozorovaná bola významná inverzná korelácia medzi hladinou vitamínu D a glykovaným hemoglobínom ($r=-0,281$, p=0,0166). Negatívna korelácia medzi vekom pacientov a hladinou 25(OH)D₃ nedosiahla hranicu štatistickej významnosti $r=-0,198$, p=0,0655. V multivariátnej analýze bola hladina 25-(OH)D₃ po trvaní diabetu druhým najsilnejším prediktorom hladiny vitamínu D₃ ($\beta= -0,06$, p=0,027). Viaceré epidemiologické štúdie ukázali, že znížená hladina 25(OH)D₃ koreluje s prejavmi inzulinovej rezistencie a s ňou asociovaného metabolického syndrómu. Napríklad výsledky tretieho Národného prieskumu zdravia a výživy v USA (NHANES) zahrňujúceho viac ako 15 000 jedincov ukázali, že prevalencia hypertenzie, diabetu, obezity a hypertriglyceridémie bola významne vyššia v najnižšom kvartile hladín 25(OH)D₃ v porovnaní so najvyšším kvartilom. Navyše už aj u nediabetických jedincov bola pozorovaná inverzná korelácia medzi koncentraciou 25(OH)D₃ a hladinou HbA_{1c}. Britská prospektívna štúdia Ely ukázala v súbore 524 nediabetických mužov a žien, že bazálne nízke hladiny 25(OH)D₃ boli asociované so zvýšenými hladinami glykémie, inzulinémie, inzulinovej rezistencie meranej HOMA (HOMA-IR), ako aj skóre metabolického syndrómu. K podobným výsledkom dospela aj analýza 808 nediabetikov z Framingham Offspring Study. V novozélandskej štúdii zahrňujúcej 250 jedincov s nadváhou alebo obezitou korelovali hladiny vitamínu D₃ inverzne s telesnou hmotnosťou, BMI a hladinou HbA_{1c}. Asociácia obezity s hypovitaminózou D pritom nie je prekvapujúca, pretože vitamín D deponovaný v tukovom tkanive nie je biologicky dostupný.

Na základe epidemiologických štúdií sa dá predpokladať, že nízke hladiny 25(OH)D₃ zohrávajú úlohu v patogenéze endotelovej dysfunkcie, inzulinovej rezistencie, metabolického syndrómu a cukrovky 2.typu. Niekoľko klinických štúdií vrátane našej pilotnej štúdie dokonca dokázalo, že hladina 25(OH)D₃ mala vzťah k metabolickej kontrole DM2, a to pravdepodobne vplyvom na inzulinovú rezistenciu a sekrečnú funkciu β buniek pankreasu. Ďalším našim pozorovaním je vyššie % telesného tuku, menšie % aktívnej telesnej hmoty ako aj nižšie % bezvodej aktívnej telesnej hmoty a nižší bazálny metabolizmus u pacientov s deficitom vitamínu D, a to nezávisle na základných antropometrických parametroch (výške, hmotnosti, BMI). Ďalším predpokladaným mechanizmom vplyvu vitamínu D na inzulinovú senzitivitu je vyššia expozícia slnečnému žiareniu v dôsledku voľnočasových s fyzickou aktivitou spojených činností, ktoré na ňu priaznivo vplyvajú. Suplementácia vitamínom D u pacientov s DM2 by mohla viesť k potenciálnym dlhodobým priaznivým účinkom, redukcii závažných komplikácií a zlepšeniu kvality života za splnenia podmienok správnej indikácie.

Tab. 1 Deficit vitamínu D a vybrané hodnoty laboratórných a antropometrických parametrov

	25-(OH)D3 <20nmol/l n=35	25-(OH)D3 > 20nmol/l n=53	p
Vek (roky)	64,7±7,3	61,3±9,1	0,068
Trvanie DM2 (roky)	8,379±6,873	6,915± 6,943	0,354
Fajčenie (balíčeka/roky)	5 (0;30)	7,5 (0;18,9)	0,970
pás (cm)	109,7±13,1	104,2±12,9	0,068
hmotnosť (kg)	87,94±19,74	86,11±16,65	0,643
BMI (kg/m ²)	31,3±4,8	29,7±4,4	0,172
% telesného tuku	40,987±9,73	34,828±7,84	0,003
ATH (%)	58,71±10,12	65,15±7,84	0,002
Bezvodá ATH (%)	10,45 (6,925; 15,225)	13,4 (9,4; 19,3)	0,008
Bazálny metabolizmus (kcal)	1453 (1315; 1868,5)	1693 (1403,5; 1943,8)	0,048
Celk chol	4,539 ±2,132	4,376±1,038	0,660
LDL	2,651±0,744	2,736±0,781	0,637
HDL	1,08 (0,877; 1,435)	1,24 (1,02; 1,52)	0,118
TG	1,58 (1,158; 2,483)	1,29 (1,1; 1,77)	0,034
S-glu (mmol/l)	7,99 (6,62; 9,41)	6,89 (5,85; 7,85)	0,016
HbA1c (% DCCT)	7,752±2,08	6,731±1,274	0,012

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0389/14

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Elamin MB, Elnour NO, Elamin KB et al. Vitamin D and cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96:1931-1942
2. Bjelakovic G, Gluud LL, Nikolova D et al. Vitamin D supplementation for prevention of mortality in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011; CD007470.
3. Aloia JF, Talwar SA, Pollack S, Yeh J. A randomized controlled trial of vitamin D3 supplementation in African American women. *Arch Inter Med.* 2005; 165:1618-1623
4. Bolton-Smith C, McMurdo ME, Paterson CR et al. Two-year randomized controlled trial of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin D3 plus calcium on the bone health of older women. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:509-519
5. Cooper L, Clifton-Bligh PB, Nery ML et al. Vitamin D supplementation and bone mineral density in early postmenopausal women. *Am J Clin Nut.* 2003; 77:1324-1329

VPLYV KONDIČNÉHO STAVU PRED OTELENÍM NA POSTPARTÁLNU RUMINÁCIU

Mihajlovičová X.

Klinika prežúvavcov UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo analyzovať vplyv kondičného stavu dojníc na postpartálnu rumináciu. Sledovanie bolo uskutočnené na mliečnej farme pomocou prístroja Heatime. Dojnice boli pred otelením na základe kondičného stavu rozdelené do dvoch skupín: normálna kondícia (3,25 – 3,75) a pretučnené (>4,0). Analýza zaznamenaných údajov neukázala významný rozdiel medzi skupinami v ruminácii za prvých 30 a 60 dní po otelení (372 a 380, resp. 456 a 421 min/deň). Signifikantný rozdiel ($p < 0.01$) bol zaznamenaný medzi jednotlivými obdobiami v rámci skupín. Na základe zistených výsledkov je možné konštatovať, že kondičný stav dojníc pred otelením nemá vplyv na intenzitu prežúvania v postpartálnom období.

ÚVOD

Body condition score (BCS), tzv. kondičný stav zvierat, je v dnešnej dobe považovaný za dôležitý prvok manažmentu chovu dojníc. Sledovanie a stav kondičného stavu pred otelením ovplyvňuje produktivitu, reprodukčné parametre a zdravotný stav v postpartálnom období. BCS je subjektívne, vizuálne alebo taktilné posúdenie množstva podkožného tuku u dojnice (Edmondson a kol., 1989). Väčšina metabolických ochorení sa prejaví pri extrémnej strate BCS, nutričnom nedostatku alebo pri zlyhaní metabolických procesov, ktoré nastávajú v peripartálnom období (nároky na gestáciu sa zmenia na nároky na laktáciu). V dnešnej dobe sa odporúča kondičný stav u holštajnského plemena na úrovni 3,25 až 3,75 pre zasúšené dojnice, je dôležité aby tieto dojnice počas státia na sucho neschudli ani nepribrali (Contreras a kol., 2004). Pretučnené alebo dojnice vo veľmi slabom kondičnom stave vykazujú problémy pri pôrode a často sa u nich vyskytujú postpartálne komplikácie spôsobené imunologickou nedostatočnosťou a metabolickými poruchami (Sordillo, Raphael a kol., 2011).

Ruminácia je cyklický proces charakterizovaný regurgitáciou, remastikáciou a opätovným prehltnutím. Dôležitou úlohou ruminácie je uľahčenie trávenia, redukcia veľkosti partikul krmiva. Ruminácia zvyšuje produkciu slín a zlepšuje bachorovú funkciu, pretože sliny sú hlavným pufrácnym mechanizmom, ktoré udržiavajú fyziologické pH bachora (Beauchemin, 1991). Charakter krmiva, nutričné faktory ako zloženie krmiva a partikul, stráviteľnosť krmiva, príjem NDV a kvalita krmiva ovplyvňujú prežúvanie (Welch a Smith, 1970). Čas ruminácie (ČR) je znížený pri akútnom strese (Herskin a kol., 2004), ako aj pri vyrušovaní zvierat (Holmes, 2007), chorobách (Welch, 1982, Hansen a kol., 2003), pri preplnenosti maštale (Grant a Albright, 2006), pri tepelnom strese (Soriari a kol., 2013) a pri ruji (Reith a Hoy, 2012). Väčšinou sa ruminácia vyskytuje počas nočných hodín a často v spojení s inými aktivitami ako chodenie, škrabanie, defekácia a urinácia (Beauchemin, 1991). Priemerný čas strávený rumináciou sa u vysokoprodukčných dojníc odhaduje na 340 až 540 min/deň (Kononoff a kol., 2003; Beauchemin and Yang, 2005; Yang and Beauchemin, 2006).

MATERIÁL A METODIKA

Do výskumu bolo zaradených 28 dojníc, ktoré boli rozdelené na dve skupiny podľa kondičného stavu. Dojnice s fyziologickým kondičným stavom 3,25 – 3,75 ($n=16$) a dojnice s vyšším kondičným stavom 4,00 – 4,75 ($n=12$). Kondičný stav sa meral vizuálnym posúdením v období státia na sucho. Dojnice boli ustajnené na voľno, mali dostatočný prístup ku krmnej dávke (TMR) a na farme bola priemerná ročná úžitkovosť okolo 8000 litrov

mlieka. Priemerná mesačná ruminácia 30 a 60 dní po pôrode bola zaznamenávaná pomocou prístroja Heatime Pro System (SCR Engineers Ltd.). Systém obsahuje zapisovač ruminácie, stacionárne čítačky a software, ktorý spracováva dáta (DataFlow software, SCR Engineers Ltd.). Obojok so snímačom eruktácie sa zakladal dojniciam tesne po otelení, tak aby snímač ležal na ľavej strane krku. Software zaznamenáva zmeny ruminácie každé dve hodiny a následne vypočíta priemernú rumináciu za deň, mesiac a pod. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou párového t-testu medzi dvoma časovými periódami v rámci skupín a možné rozdiely medzi skupinami boli analyzované pomocou dvojrozsmernej analýzy rozptylu (ANOVA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab. 1 Priemerné časy ruminácie dojníc (min/deň) po otelení s rôznym kondičným skóre pred otelením ($x \pm s$)

	BCS 3,25 – 3,75 n=16	BCS >4,00 n=12
30 dní	386±91	372±51
60 dní	435±60 ^a	456±84 ^a
BCS (pred otelením)	3,48±0,22	4,31±0,26*

BCS – body conditionscore, * – rozdiel medzi skupinami ($p < 0.01$), ^a – rozdiel medzi obdobiami.

Priemerná hodnota prežúvania 30 dní postpartálne bola u pretučnených dojníc 372 min/d a 60 dní po pôrode 456 min/d. Dojnice s BCS medzi 3,25 – 3,75 mali priemernú hodnotu prežúvania 30 dní po pôrode 386 min/d a 60 dní po pôrode 435 min/d. Hodnoty sa postupne zvyšujú, pretože dojnice postupne zvyšujú príjem sušiny. V rámci štatistického vyhodnotenia pomocou párového t-testu sa porovnávali priemerné časy ruminácie v rámci jednej skupiny, výsledkom je štatistická významnosť $p < 0.01$ u oboch skupín dojníc. Analýza rozptylu nepreukázala významný rozdiel medzi oboma skupinami, napriek významnému rozdielu v kondičnom skóre pred otelením (Tab. č. 1). Viacero výskumov analyzovalo korelácie medzi priemerným časom ruminácie a výskytom metabolických, infekčných a reprodukčných ochorení, ako aj prejavov tepelného stresu. DeVries a kol. (2009) vo svojej štúdií udávajú priemer rumináčného času (RT) na 555 min/d u dojníc v strede laktácie a Soriani a kol. (2012) poukazujú na priemer RT 562 min/d u dojníc v období skorej laktácie. Naše priemerné hodnoty sú nižšie, čo môže byť spôsobené viacerými faktormi ako sú dojivosť, príjem krmiva, zloženie TMR, fyziologický a zdravotný stav dojníc a tepelný stres. Dojivosť je jedným z najdôležitejších faktorov, ktorá ovplyvňuje RT, mnoho výskumov potvrdilo fakt, že čím vyššia dojivosť tým vyšší RT (DeVries a kol., 2009; Soriani a kol. 2012). Calamari a kol. (2014) udávajú vo svojej štúdií, že priemerný čas prežúvania po pôrode závisí od metabolických podmienok (zápalové procesy a zdravotný stav). Zápalové procesy prebiehajúce pred a počas obdobia pôrodu sa spájajú s pomalším zvyšovaním prežúvania po pôrode. Výsledky, ktoré sa získali vo viacerých štúdiách napovedajú, že čas ruminácie po pôrode nie je absolútna veličina, ale relatívna, ktorá je ovplyvnená mnohými faktormi (Adin a kol., 2009; Moallem a kol., 2010; Calamari a kol., 2011; Soriani a kol. 2012). V našej časti práce sme zistili, že RT sa po pôrode postupne zvyšuje, ale nezaznamenali sme vplyv kondičného stavu zvierat na intenzitu prežúvania v postpartálnom období.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adin, G., R. Solomon, M. Nikbachat, A. Zenou, E. Yosef, A. Brosh, A. Shabtay, S. J. Mabweesh, I. Halachmi, and J. Miron. Effect of feeding cows in early lactation with diets differing in roughage neutral detergent fiber content on intake or, rumination, and milk production. *J. DairySci.* 2009, 92:3364–3373.
2. Beauchemin, K. A., and W. Z. Yang. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. *J. DairySci.* 2005, 88:2117–2129.
3. Beauchemin, K. A. 1991. Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. FoodAnim. Pract.* 7:439–463.
4. Herskin, M. S., L. Munksgaard, and J. Ladewig. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol. Behav.* 2004. 83:411–420.
5. Calamari, L., N. Soriani, and M. Intini. Automatic measurement of rumination activity in lactating cows during summer season. *Ital. J. Anim. Sci.* 2011. 10(Suppl. 1):119F
6. Calamari L, Soriani N, Panella G, Petrera F, Minuti A, Trevisi E. Rumination time around calving: An early signal to detect cows at greater risk of disease. *J. DairySci.*, 2014, 97:3635-3647.
7. Contreras LL, Ryan, CM, Overton, TR. Effects of dry cow grouping strategy and prepartum body condition score on performance and health of transition dairy cows. *J. DairySci* 2004, 87
8. DeVries, T. J., K. A. Beauchemin, F. Dohme, and K. S. Schwartzkopf-Genswein. Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feeding, ruminating, and lying behavior. *J. DairySci.* 2009, 92:5067–5078.
9. Edmondson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. DairySci.* 1989, 72, p.68-78.
10. Grant, R. J., and J. L. Albright. Feeding behaviour. Pages 365–382 in *FarmAnimalMetabolism and Nutrition*. 2006.
11. Hansen, S. S., P. Norgaard, C. Pedersen, R. J. Jorgensen, L. S. B. Mellau, and J. D. Enemark. The effect of subclinical hypocalcaemia induced by Na₂EDTA on the feed intake and chewing activity of dairy cows. *Vet. Res. Commun.* 2003, 27:193–205.
12. Kononoff, P. J., and A. J. Heinrichs. The effect of reducing alfalfa haylage particle size on cows in early lactation. *J. DairySci.* 2003a, 86:1445–1457.
13. Kononoff, P. J., and A. J. Heinrichs. The effect of corn silage particle size and cotton seedhulls on cows in early lactation. *J. DairySci.* 2003b, 86:2438–2451.
14. Moallem, U., G. Altmark, H. Lehrer, and A. Arieli. Performance of high-yielding dairy cows supplemented with fat or concentrate under hot and humid climates. *J. DairySci.* 2010, 93:3192–3202.
15. Raphael, W., Sordillo, L.M. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammation: The role of phospholipid biosynthesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:21167–21188.
16. Reith, S., and S. Hoy. Relationship between daily rumination time and estrus of dairy cows. *J. DairySci.* 2012, 95:6416–6420.
17. Soriani, N., G. Panella, and L. Calamari. Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production. *J. DairySci.* 2013, 96:5082–5094.
18. Welch, J. G. Rumination, particle size and passage from the rumen. *J. Anim. Sci.* 1982, 54:885–894.
19. Welch, J. G., and A. M. Smith. Forage quality and rumination time in cattle. *J. DairySci.* 1970, 53:797–800.
20. Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage. *J. DairySci.* 2006, 89:217–228.

KORELÁCIA SPRÁVANIA SA DOSPELÝCH PSOV S VÝSLEDKAMI TESTOV TEMPERAMENTU V ŠTEŇACOM VEKU

Miňo, I., Kottferová, J.

Ústav aplikovanej etológie a profesijnej etiky, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Táto práca sa zameriava na hodnotenie viacerých okruhov správania a na sledovanie rôznych behaviorálnych parametrov šteniat vo veku 5, 7 a 9 týždňov za účelom predikcie povahových vlastností psov v dospelosti. V rámci praktickej časti náš výskum analyzuje: správanie psa v neznámom priestore, hodnotenie vokalizačných prejavov, mieru pohybovej aktivity, reakciu na zvuk, sociálne puto, ochotu nasledovania, podriadenosť, sociálnu dominanciu, dominanciu pri zdvíhaní resp. reakciu na manipuláciu, reakciu psa na neznáme predmety a nové podnety, záujem o aport a prejavy agresivity. Výsledky testov v šteňacom veku boli neskôr porovnané so správaním psov v dospelom veku na základe hodnotenia psovodov prostredníctvom dotazníkov. Výsledky tejto práce dokázali, že rozdiely v správaní medzi jednotlivými testovanými psami majú súvislosť s rôznou mierou rozvoja niektorých kognitívnych procesov u rôznych psov. Je však nevyhnutné brať do úvahy i vplyv psovoda a vplyvy prostredia, ktoré takisto do veľkej miery ovplyvňujú správanie psa.

ÚVOD

Temperament psov sa študuje čoraz intenzívnejšie hlavne za účelom využitia ich charakterových vlastností v praxi, kde sa najčastejšie stretávame so špeciálne vycvičenými vodiacimi psami, strážnymi psami či policajnými psami, ktoré musia splňať prísne podmienky pre zaradenie do chovu. Výsledky a publikácie v tejto oblasti sa líšia v závislosti od účelu štúdií, prostredia chovu, veku sledovaných jedincov, pohlavia či výberu jednotlivých plemien. K hlavným metódam skúmania temperamentu psa radíme: batériový test, hodnotenie jednotlivých psov, expertné hodnotenie typu plemena a pozorovacie testy. Ďalšou metódou je kombinácia viacerých spôsobov hodnotenia (Jones a Gosling, 2005). V súčasnej dobe existuje však i veľa osobnostných testov založených na rôznych princípoch bodovania a hodnotenia. Najznámejšie testy osobnosti sú: Cambellov test, Pffafenbergerov test vodiacich psov pre nevidiacich, ATTS - American Temperament test a testy Humhreya a Warnera určené pre šteňatá nemeckého ovčiaka. Avšak tieto testy väčšinou neprešli potrebnými postupmi šandardizácie, takže ich merateľosť a výpovedná hodnota sú otáznе.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaných bolo 50 šteniat plemena nemecký ovčiak. Šteňatá boli rozlišované podľa zástrihov na srsti a špeciálnych reflexných obojkov. Každý jedinec bol pred začatím testovania odvážený a odmeraný. Sledovali sme výšku v kohútiku a obvod hrudníka. Testovanie prebiehalo vždy za rovnakých podmienok, šteňatá boli testované individuálne vo veku 5, 7 a 9 týždňov a priebeh všetkých testov sa zaznamenával videokamerou. Batéria testov obsahovala tieto subtesty: Open field test, Campbell test, Test na strach - ochota vstupu do známej miestnosti s neznámymi predmetmi a reakcia na príchod človeka a búchanie kovovým predmetom na plechové vedro, Testy zamerané na ochotu spolupracovať a agresivitu. Výsledky testov v šteňacom veku a predpokladané povahové vlastnosti jedincov sme overili formou komplexného dotazníka. Prvá časť tohto dotazníka bola vyvinutá na Budapešťanskej univerzite Löranda Eötvösa (Vas a kol., 2007) a vychádzala z dotazníkov, ktoré sú používané pre hodnotenie ľudskej ADHD. Druhá časť dotazníka bola súčasťou výskumu Pensylvanskej univerzity: „ Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs " (Serpell a Hsu, 2001). Prvých 13 otázok bolo navrhnuté tak, aby bolo možné odhadnúť mieru deficitu pozornosti a aktivity –

impulzivitu psov. Šesť otázok bolo zostavených tak, aby poukazovali na deficit pozornosti psa a sedem slúžilo k hodnoteniu motorickej aktivity a impulzivnosti psov (Vas a kol., 2007). Zvyšných 22 otázok bolo zameraných na strach, agresivitu a trénovateľnosť. Dotazníky boli zasielané psovodom prostredníctvom chovateľskej stanice odkiaľ šteňatá pochádzali. Každý psovod honil svojho psa individuálne vo veku 18-24 mesiacov. Tento spôsob hodnotenia umožnil získať ucelenejšie hodnotenie všetkých zúčastnených zvierat.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Údaje výskumu boli spracovávané štatistickými postupmi, ktoré boli uskutočnené pomocou programu IBM SPSS Statistics verzia 23.0. Ako prvá bola urobená základná deskriptívna štatistika, a to výpočet priemerného skóre a štandardnej odchýlky jednotlivých skúmaných charakteristík. Vzťah medzi jednotlivými aspektmi správania psa a dotazníkom bol overovaný prostredníctvom Spearmanovho korelačného koeficientu (tabuľka 1 až 5). Medzi sledovanými premennými sa nepotvrdil žiaden štatisticky významný vzťah.

Tab. 1: Korelácie správania psa (sledovanie a sociálne puto) s dotazníkom

Testovanie	korelácia s dotazníkom
sledovanie 5. Týždeň	0.04
sledovanie 7. Týždeň	-0.01
sledovanie 9. Týždeň	0.11
sociálne puto 5. Týždeň	-0.22
sociálne puto 7. Týždeň	0.15
sociálne puto 9. Týždeň	0.16

Tab. 2: Korelácie správania psa (pohybová aktivita) s dotazníkom

Testovanie	korelácia s dotazníkom
pohybová aktivita 5. Týždeň	-0.10
pohybová aktivita 7. Týždeň	-0.16
pohybová aktivita 9. Týždeň	0.04

Tab. 3: Korelácie správania psa (reakcia na neznáme predmety) s dotazníkom

Testovanie	korelácia s dotazníkom
reakcia na neznáme predmety 5. týždeň	0.23
reakcia na neznáme predmety 7. týždeň	-0.09
reakcia na neznáme predmety 9. týždeň	-0.08

Tab. 4: Korelácie správania psa (väzba na psovoda) s dotazníkom

Testovanie	korelácia s dotazníkom
väzba na psovoda 5. Týždeň	0.12
väzba na psovoda 7. Týždeň	-0.26
väzba na psovoda 9. Týždeň	0.17

Tab. 5: Korelácie správania psa (obmedzovanie a sociálna dominancia) s dotazníkom

Testovanie	korelácia s dotazníkom
obmedzovanie 5. Týždeň	-0.17
obmedzovanie 7. Týždeň	-0.32
obmedzovanie 9. Týždeň	0.07
sociálna dominancia 5. Týždeň	-0.45
sociálna dominancia 7. Týždeň	-0.09
sociálna dominancia 9. Týždeň	0.09

** $p < .01$

V zhode s výsledkami štúdie Slaberta a Odendaala (1999) aj náš výskum dokázal, že veľký počet behaviorálnych charakteristík policajných psov môže byť do určitej miery predikovaný na základe správania v šteňacom veku pomocou špecifických testov. Miera korelácie správania v dospelom veku so správaním šteniat však v našej práci nedosiahla štatisticky

významnú úroveň. Testovanie v šteňacom veku síce poukazuje na individuálne rozdiely medzi jedincami, ale malo by slúžiť skôr na okamžité vyhodnotenie šteňaťa a zaradenie na správny druh výcviku pre konkrétny výkon v rámci služobnej kynológie. Rovnako Jones a Gosling (2005) došli vo svojej práci k záveru, že testy realizované na mladých šteňatách nie sú validnými prediktormi ich výkonu v dospelosti. Autori svoje tvrdenie opierajú hlavne o práce Wilssona a Sundgrena (1998), ktorí testovali rôzne plemená psov za účelom ich selekcie pre výcvik vodiacich psov a dospeli k záveru, že žiaden z použitých testov nedokázal predikovať výkon psa v špecifických úlohách (Goddard a Beilharz, 1986). K podobnému záveru dospel aj Rooney a kol. (2003) v štúdiu realizovanej na labradorských retrívroch pre vojenský špeciálny výcvik. Ani Lindsay (2005) nedoporučuje používať štenacie testy k predikcii ich budúcich schopností, ale navrhuje testovanie šteniat pomocou obvyklých postupov ako napr. zákus na handru, ochota prinášať tenisovú loptičku, reakcia na odlúčenie, reakcia na neznámy zvuk a podobne, neuvádza však žiadne údaje, podľa ktorých by bolo možné si vytvoriť predstavu o validite takéhoto testu. Test je určený skôr pre okamžité vyhodnotenie šteňaťa, za účelom prispôsobenia výcvikových postupov, zlepšenie zanedbanej socializácie atď. (Lindsay, 2005). Týmto sa prikláňame k názoru mnohých uznávaných odborníkov, ktorí v minulosti spochybnili predikčnú hodnotu behaviorálnych testov (Goddard a Beilharz, 1986; Wilsson a Sundgren, 1998; Lindsay, 2005; Rooney a kol., 2003; Jones a Gosling, 2005) a odporúčame tieto testy považovať skôr za indikačné ako za predikčné.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Goddard, M.E., Beilharz, R.G.. Early prediction of adult behavior in potential guide dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1986; 15: 247–260
2. Jones, A.C., Gosling, S.D.. Temperament and personality in dogs (*Canis familiaris*): a review and evaluation of past research. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2005; 95: 1–53
3. Lindsay, S.. *Handbook of Applied Dog Behavior and Training. Volume Three. Procedures and Protocols.* Blackwell Publishing, USA.
4. Rooney et al.. How predictive are puppy tests? Evidence from a puppy walking programme for military search dogs. *Proceedings of the 37th International Congress of the ISAE, Abano Terme, Italy, June 24–28 (2003)*, p. 41
5. Serpell, J.A., Hsu, Y.. Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2011; 72: 347-364
6. Slabbert, J.M., Odendaal, J.S.J. Early Prediction of Adult Police Dog Efficiency –a Longitudinal Study. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 1999; 64: 269-288
7. Vas, Judit, et al. Measuring attention deficit and activity in dogs: a new application and validation of a human ADHD questionnaire. *Applied Animal Behaviour Science* 2007; 103.1: 105-117
8. Wilsson, E., Sundgren, P.. Behaviour test for eight-week old puppies-heritabilities of tested behaviour traits and ist correspondence to later behaviour. *Appl. Anim. Behav. Sci.* ,1998; 58: 151-162

THYMOL AS MAIN COMPOUND OF THYME ESSENTIAL OIL IN BROILER CHICKEN NUTRITION

Oceľová V.¹, Chizzola R.²

¹ Institute of Animal Physiology, SAS, Košice, Slovak Republic,

² Institute of Animal Nutrition and Functional Plant Compounds, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria

ABSTRACT

Because the prophylactic use of antibiotic growth promoters for poultry production is forbidden since 1.1.2006, use of phytogetic feed additives could be reasonable for intensive rearing of broiler chickens. Essential oils (EO) containing wide range of bioactive plant compounds are studied as potential alternative to substitute antibiotic preparations.

Thyme EO with high content of strong antioxidant component– thymol could influence poultry health and performance. The current study was focused on the determination of the monoterpene thymol as the main compound of *Thymus vulgaris* EO (thymol chemotype) in plasma and intestinal gut content of broiler chickens fed a diet containing the mentioned EO in concentration 0.01; 0.05 and 0.1% w/w to the feed. Samples were analysed by head-space solid-phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Our results indicate an intensive absorption of thymol in duodenum and suggested higher excretion of thymol by kidneys after the highest thyme EO addition.

INTRODUCTION

Beneficial effects of plant derived feed additives on animal health are investigated nowadays. Bioactive plant compounds could influence animal production parameters and thus increase the profitability of farming. Essential oils (EO) containing plant bioactive compounds of various chemical structures could be hypothetically used as feed supplement to improve health and performance of farm animals.

Even though the positive effects of EO were already proved their fate in animal organism is not fully illustrated yet. Plant compounds in animal organism undergo biotransformation what could influence their metabolic pathway, mode of action, tissue deposition or excretion. These processes are not sufficiently described, but it is necessary to elucidate them to predict optimal dosage of plant feed additives.

Bioactive plant compounds must be efficiently absorbed from the digestive tract and transported by blood to tissues in sufficient concentration to achieve the desired effect. Intestinal absorption is critical for prediction of bioavailability of plant compounds.

Our experiment was designed to investigate *T. vulgaris* EO main compound – thymol in gut content and plasma of broiler chickens and to outline the relation between thymol intestinal absorption and excretion.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was carried out on 24 one-day old broiler chickens (ROSS 308) divided into four experimental groups (n=6) with concentrations of thyme EO in basal diet (BD): 0.0%, 0.01%, 0.05% and 0.1%. Broiler chickens were reared under the standard conditions required for the current breed. 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 when samples of gut content and plasma were collected. Thymol in plasma as well as in gut content was analysed by head-space solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME-GC-MS). Statistical analysis was done by one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey multiple comparison test using GraphPad Software (USA). Identification of thymol was proved by specific mass spectra.

Quantification of thymol was calculated by plotting the peak area ratios of thymol to o-cresol (o-cresol was used as internal standard solution). Samples from control group were used for generating of the calibration curve by adding known concentrations of thymol.

RESULTS AND DISCUSSION

The growth performance of broilers was not influenced by any concentration of thyme EO in the diet.

Thymol concentration in colon gut content after addition of 0.1% of thyme EO was significantly higher in comparison to group with 0.01% EO supplementation. Surprisingly, this significance was not observed within the duodenum gut content samples. Significantly increased thymol concentration in colon after the highest thyme EO addition but not in duodenum could be caused by intensive thymol absorption in duodenum. Moreover we found the relation between thymol in plasma and duodenum gut content 1:35 and colon content 1:130 in this group. This suggestion is in agreement with study of Michiels et al. (2008) who assume intensive absorption of plant compounds in cranial parts of digestive tract of animals. According to the suggestion that urine of birds is mixed with the gut content in colon (Taylor, 2000) thymol amounts found in colon gut content could origin also from kidney excretion. Thymol and thymol metabolites were found in urine of humans, rats and rabbits (Takada, 1979; Kohlert et al., 2002; Rubió et al., 2012). In relation to the suggestion that kidney tissue is involved in the biotransformation and elimination of phenols (Kohlert et al., 2002) and the fact that the renal portal system in birds is connected with portal circulation of liver (Marettová E., 2007) we could suggest thymol intestinal absorption, transport to liver and possible direct transport to kidneys.

According to our findings, we assume that excretion of thymol after addition of 0.1 % EO to the feed was provided by kidneys in increased extent with following mixing of urine with gut content of colon. We could hypothesised, that animal organism reacts and adapts to the higher concentrations of thyme EO in the diet, and metabolic pathway and/or excretion of thymol could be customised by this way. Our results indicate that animal organism is able to absorb relatively high amount of plant compound from digestive tract whereas we suggest that absorption was so intensive that thymol concentration in duodenum was not significantly higher even after the highest thyme EO supplementation.

This study was supported by the Scholarship Programme of the Aktion Austria - Slovakia: Ernst Mach Grant of the Action for doctoral/PhD students, National CEEPUS Office in Slovakia and the Slovak Scientific Grant Agency VEGA project 2/0078/16. The part of this study was achieved in the framework of the project of bilateral cooperation SAS-CNR (2016-2017).

REFERENCES

1. Kohlert C, Schindler G, Reinhard WM, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, Gräfe EU, Veit M. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; 42: 731-737.
2. Michiels J, Missotten J, Dierick N, Fremaut D, Maene P, De Smet S. *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008; 88: 2371–2381.
3. Marettová E. *Anatomy of domestic birds*. University of veterinary medicine, Košice, ISBN 978-80-8077-074-7, 2007; 89-96 (In Slovak).
4. Rubió L, Serra A, Macia A, Borrás X, Romero MP, Motilva MJ. Validation of determination of plasma derived from thyme bioactive compounds by improved liquid chromatography coupled to tandem mass

- spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2012; 905: 75-84.
5. Takada M, Agata I, Sakamoto M, Yagi N, Hayashi N: On the metabolic detoxification of thymol in rabbit and man. *J Toxicol Sci*. 1979; 4: 341-350.
 6. Taylor M. Anatomy and physiology of the gastrointestinal tract for the avian practitioner. *In Birds*. Post Grad Found in Vet Sci, Uni of Sydney, Aus. Proc. 2000; 334:107- 113.

MULTIREZISTENTNÝ BAKTERIÁLNY IZOLÁT 20B Z KORYTNAČKY STEPNEJ *TESTUDO HORSEFIELDII*

Onderková A.¹, Konieczna O.², Wasyl D.², Pristaš P.^{1,3}

¹Ústav biologických a ekologických vied, PF, UPJŠ, Košice

²Zakład Mikrobiologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy,
Puławy, Poľsko

³Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Bakteriálny izolát 20B bol izolovaný z tráviaceho traktu korytnačky stepnej *Testudo horsfieldii* a pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie bol zaradený do skupiny *Escherichia/Shigella*. Izolát vykazoval rezistenciu voči 9 z 10 testovaných antibiotík, vrátane ampicilínu. PCR analýza potvrdila v genóme izolátu 20B prítomnosť génov pre β -laktamázy CTX, TEM a OXA. Analýzou totálnej DNA bola identifikovaná prítomnosť plazmidu(ov), ktoré u enterobaktérií predstavujú najčastejší spôsob prenosu ampicilínovej rezistencie. Transformáciou sa však túto rezistenciu nepodarilo preniesť do buniek laboratórneho kmeňa *E. coli* ER2267. Pre charakterizáciu plazmidov bola použitá transpozónová mutagenéza a následnou analýzou sme identifikovali prítomnosť 2 plazmidov, na charakterizácii ktorých naďalej pracujeme.

ÚVOD

V tráviacom trakte ektotermných živočíchov sa vyskytuje množstvo baktérií z rodu *Salmonella*. Zatiaľ čo u plazov spôsobuje *Salmonella enterica* prevažne asymptomatické infekcie, u endotermných živočíchov vyvoláva systémové infekcie a predstavuje tak nebezpečný patogén. Výskyt salmonelóz asociovaných s plazmi je najčastejší u detí predškolského veku, starších osôb a pacientov s poruchou imunitného systému. Baktérie z rodu *Salmonella* sú voči vplyvom prostredia veľmi odolné, preto môže byť infekcia prenášaná dokonca aj nepriamym kontaktom so zvierateľom (Corrente a kol., 2004, Harris a kol., 2010). Bakteriálna rezistencia je schopnosť baktérie prežiť a rozmnožovať sa v prostredí s prítomnosťou antibiotík, ktoré by za normálnych okolností inhibovali jej existenciu (Bushman 2002). Ak už baktéria je rezistentná, môže rýchlo vyprodukovať nesmierne množstvo rezistentného potomstva. Antibiotická rezistencia patogénov je značnou príčinou vzostupu morbidity a mortality v ľudskej populácii (Livermore 2003). Baktérie získavajú liekovú rezistenciu 3 hlavnými mechanizmami. Prvým je schopnosť vylúčiť antibiotikum z bunky pomocou proteínov asociovaných s membránou, ktoré tvoria proteínovú pumpu. Druhým spôsobom je modifikácia cieľa antibiotika, napr. mutáciou. Napokon je to syntéza modifikačných enzýmov, ktoré selektívne zasiahnu a zničia antibiotickú aktivitu (Bushman 2002, Livermore 2003, Wright 2005).

V mnohých prípadoch je bakteriálna rezistencia kódovaná extrachromozomálnou plazmidovou DNA. Plazmidy sa v niektorých kmeňoch baktérií vyskytujú prirodzene. Nie sú nositeľmi dôležitých génov, ale bývajú nositeľmi pomocných génov, ktoré môžu bunku v určitých situáciách zvýhodniť. Existujú aj tzv. konjugatívne plazmidy, ktoré sú schopné prechádzať medzi bunkami pomocou konjugácie a tak prenášať gény rezistencie (Björkman a Andersson 2000, Bushman 2002, Bennett 2008). Transpozóny sú segmenty DNA, ktoré sa prenášajú z jedného miesta na iné miesto v rámci genómu. Väčšina z nich iba preskupuje DNA vo vnútri bunky a neopúšťa ju. V rámci prenosu antibiotickej rezistencie však majú veľký význam, pretože môžu inkorporovať gény rezistencie do mobilných elementov (napr. plazmidov) a pomôcť tak k ich prenosu do ďalšej bunky (Bushman 2002, Bennett 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálny izolát 20B bol získaný z tráviaceho traktu korytnačky stepnej *Testudo horsfieldii* z Uzbekistanu, ktorá uhynula počas transportu do Poľska. Hmotnostnou spektrometriou pomocou MALDI-TOF Biotyper-u (Bruker Daltonics, Nemecko) bol identifikovaný (Lay 2001). Antibiotická rezistencia bola testovaná difúznou metódou pomocou vybraných antibiotických diskov (Liofilchem, Taliansko): chloramfenikol (30 µg), tigeicyklín (15 µg), nalidixín (30 µg), gentamycín (120 µg), trimethoprim (5 µg), sulfomethoxazol (25 µg), ampicilín (10 µg), tetracyklín (30 µg), neomycín (30 µg) a streptomycín (300 µg). Výsledky boli vyhodnotené podľa tabuliek EUCAST. Test citlivosti na antibiotiká ampicilín a ampicilín/sulbaktam bol prevedený pomocou antibiotických prúžkov (Liofilchem, Taliansko) so škálou stanovených minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) a vyhodnotený podľa postupu uvedeného výrobcom. Pomocou PCR analýzy bola zisťovaná prítomnosť génov pre β-laktamázy TEM, OXA, CTX, NDM, SHV, KPC. Plazmidová DNA bola izolovaná použitím GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich) a transformačnými experimentmi bola vkladaná do laboratórneho kmeňa *E. coli* ER2267 (Kan^R). Bunky boli transformované metódou tepelného šoku (Inoue a kol., 1990). Následne boli tieto bunky kultivované na selektívnych platniach s ampicilínom a kanamycínom. Pre podrobnejšiu charakterizáciu plazmidov bol použitý kit pre transpozónovú mutagenézu Template Generation System II Kit (Thermo Scientific). Do genómu plazmidov bol podľa protokolu od výrobcu vložený transpozón s veľkosťou 1302 bp, kódujúci chloramfenikolovú rezistenciu (Cam^R). Následne bola plazmidová DNA s transpozónom transformačnými experimentmi prenesená do buniek kmeňa *E. coli* ER2267, ktoré boli kultivované na selektívnych platniach s kanamycínom a chloramfenikolom. Získané mutantné plazmidy boli podrobené restriktívnej analýze enzýmami BamHI a ScaI.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledok identifikácie bakteriálneho izolátu pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie bol v dôsledku vysokej podobnosti rodov *Shigella* a *Escherichia* nejednoznačný, dokázal však, že ide o gramnegatívnu baktériu. Testovanie rezistencie pomocou antibiotických diskov ukázalo, že izolát 20B je multirezistentný, pretože z 10 použitých antibiotík vykazoval rezistenciu voči 9 z nich, senzitívny bol len voči chloramfenikolu. Výsledok testu citlivosti na antibiotiká preukázal vysokú hladinu rezistencie voči ampicilínu pri minimálnej inhibičnej koncentrácii (MIC) 256 µg/ml a senzitivitu voči ampicilín/sulbaktamu pri MIC 8 µg/ml. PCR analýza dokázala v genóme izolátu 20B prítomnosť génov pre β-laktamázy TEM, OXA a CTX. Pretože sulbaktam je inhibítorom β-laktamáz a β-laktamázy OXA a CTX sú inhibítor-rezistentné, vzhľadom na citlivosť voči ampicilín/sulbaktamu exprimuje pravdepodobne izolát 20B len TEM β-laktamázu.

Izoláciou totálnej DNA sme identifikovali prítomnosť plazmidu. Keďže plazmidy bývajú najčastejším spôsobom prenosu ampicilínovej rezistencie, pokúsili sme sa to overiť na našom izoláte. *In vitro* transformačnými experimentmi sme sa ampicilínovú rezistenciu pokúsili preniesť pomocou plazmidovej DNA izolovanej z 20B do laboratórneho kmeňa *E. coli* ER2267 (Kan^R). Kultiváciou buniek na selektívnych platniach s pridaným kanamycínom a ampicilínom sme nezískali žiadne bakteriálne kolónie. Dôvodom môže byť príliš veľký plazmid alebo fakt, že táto rezistencia nie je kódovaná extrachromozómalnou DNA.

Pomocou transpozónovej mutagenézy sme vložili do plazmidového genómu transpozón kódujúci rezistenciu na chloramfenikol (Cam^R). Následnou transformáciou buniek *E. coli* ER2267 a kultiváciou na selektívnych platniach sme získali 6 mutantných kolónií. RFLP analýzou plazmidovej DNA týchto mutantov sme detegovali prítomnosť viacerých typov plazmidov. Restriktívna analýza preukázala, že sa podaril prenos 2 typov plazmidov, na charakterizácii ktorých ďalej pracujeme.

Z našich výsledkov vyplýva, že exotické plazy predstavujú potenciálne riziko pre ich majiteľov. Množstvo baktérií, ktoré tvoria ich prirodzenú mikroflóru, je pre ľudí patogénnych, navyše, antibiotická rezistencia týchto baktérií je veľmi nebezpečná. Preto je nevyhnutné zvýšiť hygienické opatrenia pri manipulácii s takýmito zvieratami a zvážiť ich chov v prítomnosti detí a rizikových skupín.

Táto práca bola realizovaná vďaka grantu VEGA 2/0087/14.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*. 2008; 153: 347-357
2. Björkman J, Andersson DI. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resistance Updates*. 2000; 3: 237-245
3. Bushman F. *Lateral DNA Transfer, Mechanisms and Consequences*. Cold Spring Laboratory Press. 2002; 27-72
4. Corrente M, Madio A, Friedrich KG, Greco G, Desario C, Tagliabue S, D'Incau M, Campolo M, Buonavoglia C. Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of different culture media. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 96: 709-715
5. Harris JR, Neil KP, Barton Behravesh C, Sotir MJ, Angulo FJ. Recent Multistate Outbreaks of Human *Salmonella* Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge. *Clinical Infectious Diseases*. 2010; 50: 554-9
6. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990; 96: 23-8
7. Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass spectrometry reviews*. 2001; 20: 172-194
8. Livermore DM. Bacterial Resistance: Origins, Epidemiology, and Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 2003; 36: 11-23
9. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymation degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005; 57: 1451-1470
10. EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014. [<http://www.eucast.org>]

VÝSKYT *DICHELOBACTER NODOSUS* A *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM* V INTERDIGITÁLNOM PRIESTORE ZDRAVÝCH DOJNÍC A DOJNÍC S OCHORENIAMI PAZNECHTOV

Osová A.¹, Segurado Benito Pilipčincová I.², Király J.², Mudroň P.¹

¹Klinika prežúvavcov, UVLF, Košice

²Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo porovnať výskyt anaeróbných baktérií v interdigitálnom priestore zdravých dojníc a dojníc s rôznymi ochoreniami paznechtov. Dojnice boli rozdelené do troch skupín: A – zdravé dojnice (n=15), B – dojnice s chorobami paznechtov a odberom vzoriek z postihnutej končatiny (n=27) a C – dojnice s chorobami paznechtov a odberom vzoriek zo zdravej končatiny (n=11). *D. nodosus* bol zistený vo všetkých výteroch, čo predstavuje 100%-nú kontamináciu končatín vyšetrených dojníc. Nižšia pozitivita bola zaznamenaná pre *F. necrophorum*, ktorý sa v skupine A vyskytol u 6,67%, v skupine B u 18,5% a v skupine C u 36,4 % dojníc. Analýza frekvencie výskytu jednotlivých baktérií vo výteroch ukázala signifikantne vyššiu ($p < 0,01$) kontamináciu kože interdigitálneho priestoru dojníc s *D. nodosus*. Rozdiely v kontaminácii samotným *F. necrophorum* však neboli medzi skupinami štatisticky signifikantné. Na základe našich výsledkov je možné konštatovať, že *D. nodosus* sa vyskytuje u zdravých aj pri chorých dojniciach v rovnakom zastúpení a vo významne väčšom množstve ako *F. necrophorum*.

ÚVOD

Dichelobacter nodosus a *Fusobacterium necrophorum* sú patogény, ktoré spôsobujú ekonomicky závažné a veľmi bolestivé a rýchlo sa rozvíjajúce zápalové ochorenie u dojníc –phlegmona interdigitalis, footrot. Ide o multifaktoriálne ochorenie s významným príspevkom vyššie spomínaných patogénov. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať výskyt týchto patogénov na koži v interdigitálnom priestore u zdravých dojníc a u dojníc s rôznymi ochoreniami paznechtov.

MATERIÁL A METODIKA

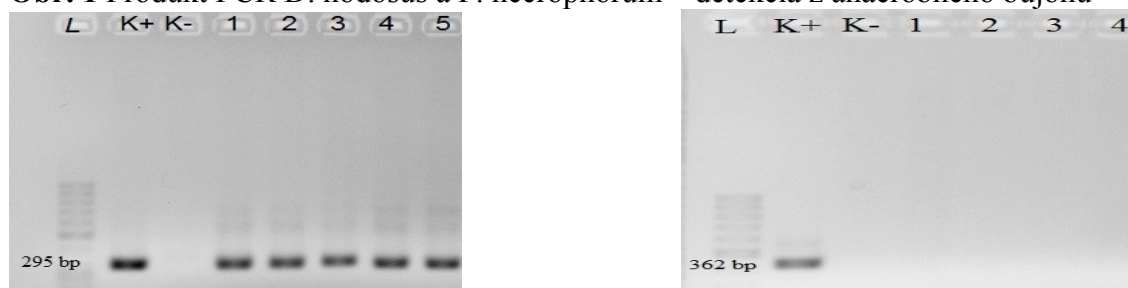
Vzorky od dojníc z farmy na západnom Slovensku boli odobraté z interdigitálneho priestoru pravej alebo ľavej panvovej končatiny. Dojnice boli rozdelené do troch skupín: A – zdravé dojnice (n=15), B – dojnice s chorobami paznechtov a odberom vzoriek z postihnutej končatiny (n=27) a C – dojnice s chorobami paznechtov a odberom vzoriek zo zdravej končatiny (n=11). Celkovo bolo odobraných 53 výterov, ktoré boli naočkované do skúmaviek obsahujúcich anaeróbnou bujón a boli následne inkubované za anaeróbných podmienok po dobu 48 hodín pri teplote 37° C. V ďalšom kroku bola extrahovaná DNA anaeróbných baktérií metódou zmrazovania a následného varenia vzorky. Vzorky boli následne uskladnené pri teplote -20° C do vyšetrenia metódou PCR. Pre diagnostiku *D. nodosus* boli navrhnuté primery pre časť kódujúcu 16S rRNA a pre *F. necrophorum* primery pre vybrané úseky génu pre *leuktoxin A* (*lkt A*) (Obr. č. 1). Získané výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou Fisherovho exaktného testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

D. nodosus bol zistený vo všetkých výteroch, čo predstavuje 100%-nú kontamináciu končatín vyšetrených dojníc. Nižšia pozitivita bola zaznamenaná pre *F. necrophorum*, ktorý sa v skupine A vyskytol u 6,67%, v skupine B u 18,5% a v skupine C u 36,4% dojníc. Analýza frekvencie výskytu jednotlivých baktérií vo výteroch ukázala signifikantne vyššiu ($p < 0,01$)

kontamináciu kože interdigitálneho priestoru dojníc s *D. nodosus*. Rozdiely v kontaminácii samotným *F. necrophorum* však neboli medzi skupinami štatisticky významné.

Ob. 1 Produkt PCR *D. nodosus* a *F. necrophorum* – detekcia z anaeróbného bujónu



L – Ladder 50 bp, K+ - pozitívna kontrola, K- - negatívna kontrola s qH₂O. Stĺpce 1-5 vzorky pre *D. nodosus* s pozitívnym výsledkom, Stĺpce 1-4 vzorky pre *F. necrophorum* s negatívnym výsledkom

Podobne ako Rogdo et. al. (2012) sme v našej štúdií amplifikovali špecifický fragment génu 16S rRNA pre detekciu *D. nodosus*. V nedávnom sledovaní sme pri použití uvedenej amplifikácie zaznamenali prítomnosť *D. nodosus* v 72% vzoriek (Osová a Mudroň 2014), pričom v tejto štúdií to bolo až 100%. Vysoká pozitivita detekcie génu 16S rRNA pre *D. nodosus* bola u dojníc zaznamenaná aj v ďalších sledovaniach (Knappe-Poindecker a kol., 2013; Osová a kol., 2015). Bennet a kol. (2009) použili vo svojej štúdií na diagnostiku *F. necrophorum* PCR primery, navrhnuté pre detekciu génu *lktA*, a zaznamenali pozitivitu u 53,4% vzoriek. Osová a Mudroň (2014) a Osová a kol. (2015) vo svojich štúdiách použili na diagnostiku *F. necrophorum* špecifický gén *lktA* s výsledkom 8 – 39,1 % pozitívnych vzoriek. Podobná pozitivita (6,67 – 36,4 %) bola zaznamenaná aj v súčasnom sledovaní.

V literatúre je opisovaný výskyt *D. nodosus* tak u dojníc s chorými paznechtami (phlegmoma interdigitalis, dermatitis digitalis), ako aj u zdravých (Knappe-Poindecker a kol., 2013; Capión a kol., 2012; Rasmussen a kol., 2012; Zhou a kol., 2009; Bennet a kol., 2009). Rasmussen a kol. (2012) uvádza vo svojej štúdií možnosť spolupôsobenia aj *F. necrophorum* pri vzniku dermatitis digitalis, nakoľko bol tento anaerób zachytený v biopťátov z dvoch lézií tohto ochorenia.

Dosiahnuté výsledky ukazujú, že aj pri klinicky zdravých zvieratách je možné detegovať *D. nodosus* pri vysokom počte dojníc, pričom *F. necrophorum* je výrazne zriedkavejšie. Toto zistenie môže byť použité pri ďalšom monitorovaní a prevencii závažného ochorenia paznechtov – nekrobacilózy.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. 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. *Research Veterinary Sci.* 2009; 87:413–415.
2. Capión, N., Boye, M., Ekstrom, C.T., Jensen, T.K. Infection dynamics of digital dermatitis in first-lactation holstein cows in an infected herd. *J. Dairy Sci.* 2012; 95:6457–6464.
3. Knappe-Poindecker, M., Gilhuus, M., Jensen, T.K., Klitgaard, K., Larssen, R.B., Fjelddaa, T. Interdigital dermatitis, heel horn erosion, and digital dermatitis in 14 Norwegian dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2013; 96:7617–7629.
4. Osová, A., Segurado Benito Pilipčincová, I., Király, J., Mudroň, P. Porovnanie metód izolácie *Dichelobacter nodosus* a *Fusobacterium necrophorum* z končatín dojníc. X.ročník VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV

2015. 8 – 9. September 2015, Košice, Slovensko. ISBN 978-80-971428-2-7. 62 – 66.
5. Rasmussen, M., Capion, N., Klitgaard, K., Rogdo, T., Fjeldaas, T., Boye, M., et. al. Bovine digital dermatitis: Possible pathogenic consortium consisting of *Dichelobacter nodosus* and multiple *Treponema* species. *Vet. Microbiology*. 2012; 160:151–161.
 6. Rogdo, T., Hektoen, L., Slettemeas, J.S., Jorgensen, H.J., Osteras, O., Fjeldaas, T. Possible cross-infection of *Dichelobacter nodosus* between co-grazing sheep and cattle. *Acta Vet. Scand.* 2012; 54(19):1–8.
 7. Zhou, H., Bennett, G., Hickford, J.G.H. Variation in *Fusobacterium necrophorum* strains present on the hooves of footrot infected sheep, goats and cattle. *Vet. Microbiology*. 2009; 135:363–367.

THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF UHPLC-QTOF-MS METHOD FOR DETERMINATION OF THYMOL METABOLITES IN LIVER AND DUODENAL WALL OF BROILER CHICKENS

Pisarcikova J.¹, Calderon AI.²

¹Institute of Animal Physiology, SAS, Kosice, Slovakia

²Department of Drug Discovery and Development, Harrison School of Pharmacy, Auburn University, 4306 Walker Building, Auburn, AL 36849, United States

ABSTRACT

In this work, we present a UHPLC-QTOF-MS method for thymol sulfate and thymol glucuronide determination in tissues without previous enzymatic hydrolysis to free thymol. Due to the absence of method determining thymol metabolites in tissues, our study aimed to characterize thymol metabolite profile in liver and duodenal wall in broiler chickens after *Thymus vulgaris* essential oil supplementation. Different concentrations of thyme oil (0.01%, 0.05%, and 0.1% w/w) were used in this experiment in order to assess thymol absorption from the gastrointestinal tract and transforming into its metabolites. The presence of thymol glucuronide was confirmed by MS software according to molecular formula, score, mass error, and double bond equivalent. In terms of validation, external calibration curves of thymol sulfate were constructed in liver and duodenal wall blank samples with linearity from 3.901 – 250 ng/mL. Limits of detection (LODs) were 0.290 and 0.626 ng/mL and limits of quantification (LOQs) were 0.969 and 2.089 ng/mL for liver and duodenal wall, respectively. Intra-day and inter-day precision expressed as %RSD were lower than 4.35%. We would like to underline, thymol sulfate and thymol glucuronide were detected for the first time in tissues and this method was shown to be suitable and applicable for examination of thymol metabolism in chicken broilers after thyme essential oil supplementation.

INTRODUCTION

The application of essential oils in food preservation, in farm animal health, and in agriculture is growing in last two decades. The main purpose is to substitute chemical substances and reduce risk of toxicity. The main biotransformation fate of essential oils in organism is through conjugation reactions, mainly sulfation, and glucuronidation. *Thymus vulgaris* essential oil is known for its antioxidant component thymol and its application as a feed additive in broiler nutrition was shown to have beneficial effect on animal health (Khaksar et al., 2012; Haselmeyer et al., 2014). UHPLC-QTOF-MS is highly sensitive and selective for metabolite profiling and allows us identifying metabolites on the basis of parent mass ions, mass fragment patterns and isotopic patterns (Vanzo et al., 2013).

MATERIAL AND METHODS

Approximately 500 mg of liver and duodenal wall were sliced immediately after removal from freezer and were placed to homogenization tubes. Tissues were extracted with 2 mL of acidified methanol and 10 µL of 15% ascorbic acid was added to each tube. Samples were homogenized for 1 min at 20 000 rpm using Polytron tissue homogenizer (Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) to release thymol metabolites and consequently processed in the vortex for 1 min. The supernatant was collected by centrifugation at 13 000 ×g for 20 min at 4°C. Consequently, samples were cleaned-up using solid-phase extraction and Oasis PRIME HLB cartridge (60 mg, 30 µm) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) was used. Supernatant (500 µL) was loaded onto SPE cartridge and rinsed two times with 500 µL of acetonitrile/methanol (80/20). Eluent containing thymol metabolites was collected in tubes and was pre-concentrated by evaporation to dryness under nitrogen stream at 30 °C. Finally, sample was reconstituted in 100 µl of methanol and centrifuged at 13 000 ×g for 15 min at

4°C. Liquid chromatography was performed using an Agilent Technologies 1200 Series LC rapid resolution system. Chromatographic separation was accomplished on Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), maintained at 30°C. The mobile phase consisted of solvents: (A) water with 0.2% acetic acid and (B) acetonitrile. Gradient was set as follows: t (min), B (%): 0.15; 1.60; 4.100; 6.15 with constant flow 0.4 mL/min and 1 μL of sample was directly injected into LC-MS system. Mass spectrometry detection was carried out using 6520 Accurate-Mass Q-TOF spectrometer (Agilent Technologies, Little Falls, DE, USA) equipped with electrospray ion source (ESI) in negative mode. Parameters of ion source were optimized to achieve the best sensitivity and optimum conditions were determined as follows: drying gas temperature 350°C, gas flow 10 L/min and nebulizer pressure 25 *psi*. Capillary and fragmentor voltage were 3200 V and 175 V, respectively. Software Agilent Mass Hunter Qualitative analysis, version B.06.00 was used for identification and quantitation of thymol metabolites.

RESULTS AND DISCUSSION

A novel Waters Oasis Prime HLB SPE cartridge was applied to sample clean up. Due to the high content of organic solvent present in sample, a fast pass-through cleanup protocol was applied to purificate liver and duodenal wall samples. A higher mass sorbent of 60 mg (2 cc size) was used in method development. Supernatant (500 μL) after tissue homogenization was taken and loaded on cartridge followed by rinsing two times with 500 μL of acetonitrile/methanol (80/20) to ensure complete removal of thymol sulfate analyte. Eluate consisting of thymol metabolites was collected for LC-MS analysis. Full-scan data were acquired by scanning from 100-1000 *m/z*. Accurate mass of 229.0538 *m/z* for thymol sulfate (C₁₀H₁₄O₄S) in negative mode [M-H]⁻ was found. Electrospray ion source parameters were optimized for the best sensitivity and the lowest noise of background. Accurate mass of 109.0295 *m/z* for catechol internal standard was found in negative mode [M-H]⁻ at the retention time 1.54 min. Unexpectedly, during the method development, catechol was shown as not stable and its peak was not observed in chromatogram and MS spectra. The possible explanation could be the fact, that catechol can be oxidized to 1,2-benzoquinone upon exposure to light and air (Schweigert et al., 2001). For this reason, we considered, that catechol does not meet criteria to be used as internal standard in our experiment. QTOF mass analyzer was calibrated for reference mass ions in negative mode of purine at 119.0363 *m/z* and of HP-0921 which gives mass 966.0007 *m/z* (formate adduct) in presence of formic acid. Appropriate data acquisition rate for the narrowest chromatographic peak was found. The default value of 1.41 spectra/s was increased to a 3 spectra/s and 18-20 points across the peak were acquired. The presence of thymol sulfate in plasma and tissue samples was confirmed based on comparison of retention time with standard in 2.01 min. Secondly, MS/MS experiment was carried out and product ion of thymol sulfate belonging to thymol of 149.0973 *m/z* was observed. Extracted ion chromatograms (EIC) of the deprotonated molecule were used for quantification of thymol sulfate. Due to lack of standard, we were not able to quantify thymol glucuronide. The presence of the metabolites, thymol sulfate, and thymol glucuronide was proved by molecular feature using MS software according to specific parameters: molecular formula, double bond equivalent, mass error, and score. Accurate mass [M] 326.1366 *m/z* of neutral molecule of thymol glucuronide (C₁₆H₂₂O₇) was calculated by software and intensive deprotonated molecule [M-H]⁻ 325.1299 *m/z* in negative mode was recorded in our samples. Retention time for thymol glucuronide was found in 1.86 min. The parameters for validation were fully determined for liver and duodenal wall as follows: selectivity, linearity, accuracy and precision, matrix effect, recovery, limit of detection and limit of quantification. For selectivity parameter, blank samples were compared with corresponding spiked blank samples. No interfering peak from matrix in retention time of

thymol sulfate was observed comparing with standard dissolved in methanol and thymol sulfate was well resolved under LC-MS conditions. For linearity studies and calibration curves construction pooled blank samples of liver and duodenal wall from control group of broiler chickens were spiked with thymol sulfate standard. External calibration curves were constructed in range from 3.906 to 250 ng/mL. Calibration curves were built using linear regression and blank offset was applied to subtract background generated by biological matrix. Regression coefficients (R^2) were 0.9979 and 0.9991 for liver and duodenal wall, respectively. Accuracy and precision were determined by analyzing spiked samples at three concentrations and were measured in triplicates for each matrix. Accuracy was evaluated for liver (95%) and duodenal wall (96.9%). Intra-day and inter-day precision expressed as %RSD were lower than 4.35%. The results indicate, that precision and accuracy met acceptance criteria at all concentrations and matrix. Extraction recoveries were established as follows: 89% for liver and 85% for duodenal wall. Matrix effect was evaluated by comparing the peak abundances of the analytes spiked in blank samples with the peak abundances of the analytes in the methanol. Matrix effect of 17% for duodenal wall and 22% for liver were determined. Sensitivity expressed as the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) was calculated using the signal-to-noise criterion of 3 or 10. LODs were 0.290 and 0.626 ng/mL and limits of quantification LOQs were 0.969 and 2.089 ng/mL for liver and duodenal wall, respectively. Developed method is validated in a direct way without previous enzymatic hydrolysis of conjugates and quantification of thymol sulfate was accomplished using corresponding regular standard of high purity.

This study was supported by the National Scholarship Programme of the Slovak Republic and by funds from Grant Agency of the Ministry of Education of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (VEGA 2/0078/16) and Slovak Research and Development Agency (APVV-14-0169).

REFERENCES

1. 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.* 2014; 95(3): 504-508.
2. Khaksar V, Van Krimpen M, Hashemipour H, Pilevar M. Effects of thyme essential oil on performance, some blood parameters and ileal microflora of japanese quail. *Int. J. Poult. Sci.* 2012; 49: 106-110.
3. Schweigert N, Zehnder AJB, Eggen RIL. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* 2001; 3(2): 81-91.
4. Vanzo A, Scholz M, Gasperotti M, Tramer F, Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. Metabonomic investigation of rat tissues following intravenous administration of cyanidin 3-glucoside at a physiologically relevant dose. *Metabolomics.* 2013; 9: 88-100.

HISTOPATOLOGICKÉ HODNOTENIE ZMIEN V SEMENNÍKOCH PUBERTÁLNYCH POTKANOV ZAPRÍČINENÝCH NEIONIZUJÚCIM ELEKTROMAGNETICKÝM ŽIARENÍM

Šimaiová, V.¹, Almášiová, V.¹, Holovská, K.¹, Cigánková, V.¹, Račeková, E.²

¹Ústav histológie a embryológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

²Neurobiologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo vyhodnotiť možné účinky celotelového pôsobenia elektromagnetickej rádiácie (EMR) na pohlavné dospievanie samcov potkanov. Samce potkana Wistar albino (14 a 21dňové) boli vystavené pulznému EMŽ o frekvencii 2,45 GHz a priemernej silovej hustote 2.8 mW/cm² po dobu 1 hodiny (14dňové) a 3 hodín (21dňové) denne počas 3 týždňov. Po poslednom ožiarení boli vzorky tkaniva semenníkov histologicky spracované. U 21dňových potkanov boli svetelnou mikroskopiou preukázané difúzne degeneratívne zmeny v semenníkoch, ako nepravidelný tvar semenotvorných kanálikov a tiež rozšírené interstícium. Zárodočný epitel vykazoval prítomnosť viacerých prázdnych miest, deskvamáciu nezrelých zárodočných buniek v lumene kanáliku, vakuolizáciu cytoplazmy pohlavných buniek, bunkovú nekrotizáciu a výskyt gigantických multijadrových buniek v adluminálnom priestore kanáliku. U 14dňových potkanov okrem výskytu prázdnych miest a odlupujúcich sa okrúhlych nezrelých zárodočných buniek v lumene kanáliku, bola pozorovaná dilatácia a kongescia ciev v *tunica albuginea* a interstíciu semenotvorných kanálikov.

ÚVOD

V súčasnej dobe je ľudská populácia čoraz intenzívnejšie vystavovaná pôsobeniu elektromagnetického žiarenia z rôznych zdrojov. Za posledné desaťročia bol zaznamenaný prudký nárast vysokofrekvenčného neionizujúceho žiarenia, ktoré môže mať škodlivý účinok na organizmus. Vzhľadom k vysokej citlivosti semenníkov voči rôznym noxám životného prostredia je veľmi dôležité študovanie vplyvu neionizujúceho elektromagnetického žiarenia na tento orgán (Kumar, 2004). Elektrické zariadenia ako mobilné telefóny či mikrovlnné rúry sú zdrojom neionizujúceho žiarenia s frekvenciou medzi 30 kHz a 300 GHz. Mikrovlnné rúry pracujú pri vlnových dĺžkach medzi 1 mm a 1 m, ktoré zodpovedajú frekvenciám v rozsahu od 300 MHz do 300 GHz. Na týchto frekvenciách molekuly v pevnom skupenstve a kvapaliny začnú kmitať a následne dochádza k tvorbe tepelných účinkov žiarenia (Hyland, 2000). Expozíciu EMR je možné rozdeliť do dvoch kategórií: kontinuálne a pulzné žiarenie. Biologické účinky pulzných vln sú ešte škodlivejšie ako žiarenie kontinuálne (Hamada a kol, 2011). Vysokofrekvenčné žiarenie - rádiofrekvenčné a žiarenie z mikrovlnnej rúry môže preniknúť do tkanív, kde sú exponované molekuly následne nútené pohybovať sa rýchlejšie a vzájomne sa zraziť, čo spôsobuje zvýšené trenie a tvorbu tepla, a to sa považuje za tepelný efekt žiarenia. Netepelný priamy účinok zahŕňajúci široké spektrum rôznych metabolických dráh je stále predmetom štúdií (Sadafi, 2006).

MATERIÁL A METODIKA

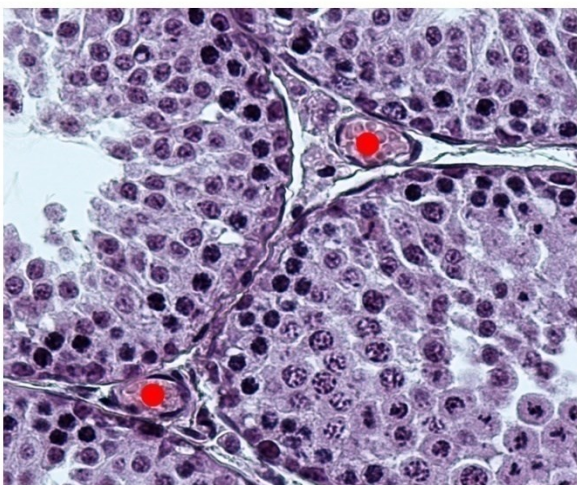
V práci boli použité samce potkanov plemena Wistar albino vo veku 14 dní (n=12) a 21 dní (n=12). 14 dňové pokusné zvieratá (n=6) boli celotelovo ožarované 1 hodinu denne a 21 dňové pokusné zvieratá (n=6) 3 hodiny denne pulzným elektromagnetickým žiarením o frekvencii 2,45 GHz a priemernej silovej hustote 2.8 mW/cm² počas 3 týždňov. Po poslednom ožiarení boli všetky zvieratá usmrtené a následne sme odobrali vzorky tkaniva. Z každého potkana boli odobrané 4 bločky (2mm³) z povrchových aj hlbších častí semenníka. Tkanivo bolo následne spracované metódou podľa Reynoldsa na účely transmisnej elektrónovej

mikroskopie. Poloténké rezy zhotovené na ultramikrotóme boli ofarbené toluidínovou modrou. Pre účely svetelnej mikroskopie boli rezy ofarbené hematoxilín-eozínom. Na histopatologické vyhodnotenie sme použili svetelný mikroskop ZeissAxioLab. A1 a na fotodokumentáciu zariadenie AxioCam ICc 5.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

U 14 dňových kontrolných aj pokusných potkanov bol zaznamenaný nástup spermatogenézy, keďže semenotvorný epitel obsahoval takmer všetky vývojové štádiá zárodočných buniek s výnimkou neskorých spermatíd. V lumene semenotvorných kanálikov sa nachádzali odlúpnuté nezrelé zárodočné bunky (Obr.1) a vo väzivovom obale *tunica albuginea*, ako aj v interstíciu sa vyskytovali rozšírené a nastrieknuté krvné cievy (Obr. 2). Zmeny zistené na krvných cievach interstícia a väzivového puzdra jasne potvrdili tepelný efekt mikrovlnného žiarenia na tkanivo. Naše pozorovania sú v súlade s ďalšími autormi, ktorí použili vo svojich štúdiách podobné dávky MW EMR a zaznamenali výskyt nezrelých zárodočných buniek v lumene semenotvorných kanálikov a edém v interstíciu (Hanci a kol, 2013), zvýšenie počtu apoptotických zárodočných buniek (Saygin a kol, 2011), vakuolárnu degeneráciu, nekrózu a odlupovanie buniek semenotvorného epitelu (Özlem a kol, 2012). U 21 dňových potkanov boli v semenníkoch pozorované difúzne degeneratívne zmeny ako nepravidelný tvar semenotvorných kanálikov, a tiež mnoho prázdnych miest. Semenotvorný epitel obsahoval vyšší počet odumierajúcich zárodočných buniek v adluminálnom priestore (Obr.1) a v okolí lumenu boli ojedinele prítomné aj gigantické multijadrové bunky, taktiež sme pozorovali vakuolizáciu cytoplazmy (Obr.2). Abnormálna morfológia bola zrejme spôsobená tepelným – nešpecifickým ako aj netepelným – špecifickým účinkom žiarenia (Nisbet a kol, 2012). Podobné výsledky pozoroval Zaaren (2009), ako prítomnosť vakuol v cytoplazme zárodočných buniek, gigantické bunky v zárodočnom epiteli, abnormálne bunky v lumene semenotvorných kanálikov u 3 týždňových myší ožarovaných mobilným telefónom. Hanci a kol. (2013) sledovali vplyv EMR na semenníky 21 dňových potkanov plemena Sprague Dawley a následne poukázali na prítomnosť nezrelých zárodočných buniek v lumene semenotvorných kanálikov ako aj na ostatné difúzne degeneratívne zmeny.

14 dňové potkany :

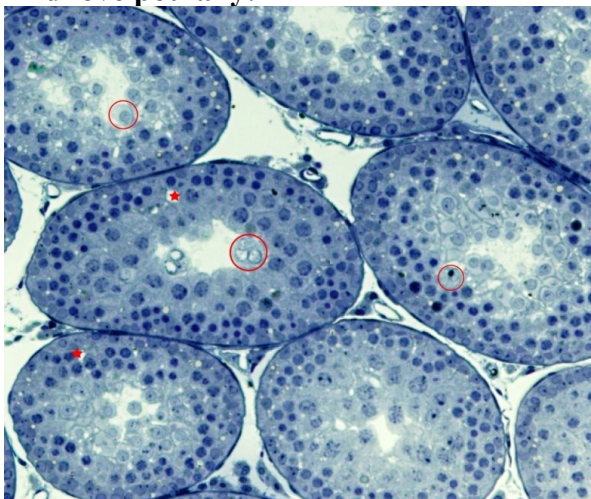


Obr.1 Zväčšenie 400x, HE. ● Dilatácia a kongescia ciev v interstíciu semenníka

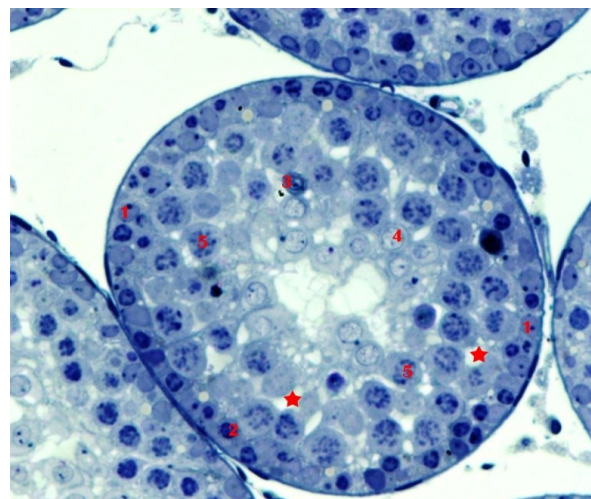


Obr.2 Zväčšenie 200x, HE. ↑ Odlúpnuté nezrelé zárodočné bunky v lumene semenotvorných kanálikov.

21 dňové potkany:



Obr.1: Zväčšenie x 100
○ Gigantické mnohojadrové bunky
★ Malé nepravidelné prázdne priestory



Obr.2: Zväčšenie x 200
1. Sertoliho bunka
2. Spermatogónium
3. Spermatocyt odumierajúciapoptózou
4. Spermatída
5. Vakuoly v cytoplazme

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0214/15

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hanci, H., Odaci E., Kaya H., Aliyazicioglu Y., Turan I., Demir S., Colakoglu S. The effect of prenatal exposure to 900-MHz electromagnetic field on the 21-old-day rat testicle. *Reproductive Toxicology*. 2013; 42: 203-209.
2. Hamada, A. J., Singh, A., Agarwal, A. Cell phones and their impact on male fertility: Fact or fiction. *Open Reproductive Science Journal*. 2011; 5, 125—137.
3. Hyland, G. J. Physics and biology of mobile telephony. *The Lancet*. 2000; 356: 1—8.
4. Kumar, S. Occupational exposure associated with reproductive dysfunction. *J. Occup. Health*. 2004; 46: 1-19.
5. Nisbet, H., Nisbet C., Akar A., Cevik M., Karayigit M. Effect of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9 GHz) on testicular function and structure in growing rats. *Research in Veterinary Science*. 2011; 93: 1001-1005.
6. Ozlem, N.H., Nisbet, C., Akar, A., Cevik, M., Karayigit, M.O. Effects of exposure to electromagnetic field (1.8/0.9 GHz) on testicular function and structure in growing rats. *Res Vet Sci*. 2012; 93:1001–5.
7. Sadafi, H. A. A review of the mechanisms of interaction between the extremely low frequency electromagnetic fields and human biology. In *Proceedings Progress in Electromagnetics Research Symposium (PIERS)*, Cambridge, USA, March 26—29, 2006; 99—103.
8. Saygin, M., Caliskan, S., Karahan, N., Koyu, A., Gumral, N., Uguz, A. Testicular apoptosis and histopathological changes induced by a 2.45 GHz electromagnetic field. *Toxicol Ind Health*. 2011; 27:455-63.
9. Zaaren, N. Testicular morphology: Effect of mobile phone induced electromagnetic fields on mice testes. *Professional Medical Journal*. 2009; 16 (2): 289-292.

NEUROPROTEKTÍVNY VPLYV KONDICIOVANÉHO MÉDIA ZÍSKANÉHO Z MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK TUKU POTKANA

Székiová E1, Slovinská L 1, Blaško J1, Čížková D1

Neurobiologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice

ABSTRAKT

V súčasnosti je dostupných mnoho štúdií potvrdzujúcich trofický a imunomodulačný efekt mezenchýmových kmeňových buniek na neurálne bunky. Cieľom tejto štúdie bolo potvrdiť, či kondiciované médium získané z mezenchýmových kmeňových buniek tukového tkaniva potkana (ATMSCs-CM) môže zabezpečiť adekvátny terapeutický efekt tak, ako vidíme pri samotných mezenchýmových bunkách. Využitím *in vitro* modelu, ktoré simuluje zápalové prostredia po SCI, sme sledovali neuroprotektívny efekt ATMSCs-CM na neurálne bunky (NCs) izolované z kortexu potkana. NCs boli vystavené pôsobeniu kondiciovaného média získaného z traumaticky poškodenej miechy potkana počas 48 hodín *in vitro*. Následne, za účelom neuroprotektie boli NCs ovplyvňované ATMSCs-CM po dobu 72 hodín. Výsledky odhalili vyššiu viabilitu NCs kultivovaných v ATMSCs-CM oproti bunkám kultivovaných iba v DMEM médiu.

ÚVOD

Traumatické poranenie miechy (SCI) je vážne poškodenie nervového systému, ktoré vedie k dočasným alebo trvalým zmenám na úrovni motorických, zmyslových alebo autonómnych funkcií. Jednou z možných stratégií pre liečbu SCI je transplantácia mezenchýmových kmeňových buniek (MSCs), ktoré sú schopné vyvolať funkčnú regeneráciu nervového tkaniva nepriamym mechanizmom, na základe ktorého zabezpečujú trofickú podporu, ovplyvňujú skorú zápalovú reakciu, zlepšujú vaskularizáciu a redukujú kavitu v mieste lézie po SCI (Sykova a kol. 2006; Wright a kol. 2011). Mnohé štúdie potvrdzujú, že MSCs sú schopné navodiť neurotrofický účinok syntézou molekúl, ktoré priamo alebo nepriamo podporujú neuroregeneráciu a zvyšujú tak prežívanie neurálnych buniek a regeneráciu nervových vlákien v mieste lézie. Hlavným cieľom využitia MSCs v terapii neurodegeneratívnych ochorení je podpora regenerácie axónov, prevencia apoptózy a náhrada mŕtvych buniek, konkrétne oligodendrocytov, s cieľom uľahčiť remyelinizáciu poškodených axónov (Dasari a kol. 2011). Cieľom tejto štúdie bolo potvrdiť, či podobný terapeutický efekt môžeme navodiť kondiciovaným médiom získaným z týchto buniek.

MATERIÁL A METODIKA

Príprava kondiciovaného média z mezenchýmových kmeňových buniek izolovaných z podkožného tuku potkana (ATMSCs-CM):

Bunková kultúra ATMSCs získaná v 3. pasáži bola kultivovaná v DMEM Low glucose (Biowest) médiu bez séra a antibiotík (DMEM) v CO₂ termostate pri 37⁰C. Po 24 hodinách inkubácie získané kondiciované médium bolo centrifugované pri 3000 rpm/5 min. a sterilizované prefiltrovaním 0,2 µm filtrom.

Príprava kondiciovaného média z miechy potkana:

Pre získanie kondiciovaného média z miechy boli použité potkany kmeňa Wistar s hmotnosťou cca 300g. U skupiny potkanov s poškodením (SCI) bola využitá modifikovaná technika balónikovej kompresie (Vanicky, I a spol., 2001) s 3-dňovým prežívaním zvierat.

Potkany s poškodením miechy (SCI, n=3) a potkany bez poškodenia (SC, n=3) boli po anestézii isofuránom následne dekapitované. Izolované miechy boli za sterilných podmienok rozdelené na cca 1cm segmenty lokalizované rostrálne, kaudálne od lézie a na segment centrálnej lézie. Každá časť bola ešte rozdelená na cca 0,5 cm segmenty, ktoré boli uložené

jednotlivo v jamkách 24 jamovej platničky a inkubované v DMEM. Po 24 hodinách inkubácie takto získané kondicionované médium bolo centrifugované pri 3000 rpm/5 min. a prefiltrované 0,2 µm filtrom. Rovnaký postup bol zvolený pre získanie CM z nepoškodenej miechy.

Izolácia a kultivácia neurálnych buniek:

Neurálne bunky boli izolované z kortexu mozgu (CX) novorodených 6-dňových potkanov kmeňa Wistar. Po anestézii na ľade boli zvieratá dekapitované. Mozgová kôra zbavená obalov bola disekovaná a následne enzymaticky spracovaná podľa Worthington Kit dissociation-protokolu. Získané bunky boli naložené v hustote 5000 buniek na jamku do 96 jamkovej platničky a kultivované v proliferačnom médiu (DMEM/F12, bFGF, EGF, N2, B27, 3% FBS, 1 % antibiotiká P/S) v CO₂ termostate pri 37⁰C. Na ôsmy deň kultivácie (DIV8) kultúra dosiahla 60-70% konfluenciu, a kultivačné médium bolo nahradené kondicionovaným médiom (CM) z rostrálnej (R), centrálnej lézie (L) a kaudálnej (C) časti kontrolnej (SC) alebo CM z traumaticky poškodenej (SCI) miechy.

Experimentálne skupiny:

Na 8.deň kultivácie (DIV 8) boli NCs rozdelené do experimentálnych skupín

1. Kontrolná skupina intaktných buniek bola kultivovaná v médiu DMEM s 1% fetálneho bovinného séra (FBS)
2. Skupina ovplyvnená kondicionovaným médiom CM v rámci tejto skupiny boli bunky kultivované po dobu 48 hod. v:
 - 2A). DMEM s 1%FBS+kondicionované médium z kontrolnej miechy (v pomere 2:1) CX-SC-CM
 - 2B). DMEM s 1%FBS+kondicionované médium z poškodenej miechy (v pomere 2:1) CX-SCI-CM

Ovplyvnenie:

Po 48 hod. expozícii bolo médium v skupinách 2A) a 2B) na dobu 72 hod. nahradené:

- i) DMEM s 1% FBS (CX-SC-CM/DMEM, CX-SCI-CM/DMEM)
- ii) DMEM s 1% FBS + ATMSCs-CM (CX-SC-CM/AT, CX-SCI-CM/AT)

Stanovenie viability :

Viabilita aktivita NCs bola stanovená využitím protokolu CyQUANT® Direct Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen). Analýza bola uskutočnená v dvoch časových periódach:

1. Meranie po 48 hod.

- i) po expozícii SC kondicionovaného média na bunkovú kultúru (CX-SC-CM)
- ii) po expozícii SCI kondicionovaného média na bunkovú kultúru (CX-SCI-CM)
- iii) skupina, ktorá nebola vystavená účinku kondicionovaného média - intaktné bunky (kontrola)

2. Meranie po 72 hod.

- i) po kultivácii iba v DMEM- skupina bez ovplyvnenia (CX-SC-CM/DMEM, CX-SCI-CM/DMEM)
- ii) po ovplyvnení ATMSCs-CM – skupina s ovplyvnením (CX-SC-CM/AT, CX-SCI-CM/AT)
- iii) skupina ktorá nebola vystavená účinku kondicionovaného média - intaktné bunky (kontrola)

Viabilita ovplyvňovaných buniek bola meraná ako intenzita fluorescencie pri vlnovej dĺžke 480/520 nm (Synergy™ Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) a následne percentuálne vyjadrená v pomere k intaktným bunkám pre každú experimentálnu skupinu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe našich výsledkov môžeme povedať, že po 48 hodinovej expozícii kondiciovaným médiami SC-CM a SCI-CM, bunky vykazujú nižšiu viabilitu oproti intaktným bunkám, pričom výraznejší pokles bol pozorovaný u SC-CM exponovaných buniek (41,1%), nižší pokles sme zaznamenali u buniek vystavených vplyvu SCI-CM (31,0%). Následným ovplyvnením týchto (exponovaných) buniek kondiciovaným médiami získaným z ATMSCs po dobu 72 hod. sme zistili u ovplyvnenej skupiny (CX-SCI-CM/AT) 63,2% a u skupiny bez ovplyvnenia (CX-SCI-CM /DMEM) 52,6% viabilitu oproti intaktným bunkám. Týmto experimentom sme mohli potvrdiť, že kondiciované médium získané z ATMSCs môže navodiť podobný pozitívny trofický efekt, ako ho vidíme u samotných ATMSCs.

Práca vznikla s podporou VEGA 2/0125/15, VEGA 2/0145/16, APVV-14-0847, APVV 0472-1

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Dasari, V. R., K. K. Veeravalli, D. H. Dinh. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World J Stem Cells*. 2011; 6 (2): 120-33
2. Sykova, E., A. Homola, R. Mazanec, H. Lachmann, S. L. Konradova, P. Kobyłka, R. Padr, J. Neuwirth, V. Komrska, V. Vavra, J. Stulik and M. Bojar. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2006; 15 (8-9): 675-87
3. Vanický I, Urdzíkova L, Saganová K, Čížková D, Gálik J. A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *J Neurotrauma*. 2001;18(12):1399-407.
4. Wright, K. T., W. El Masri, A. Osman, J. Chowdhury and W. E. Johnson. Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: mechanisms and clinical applications. *Stem Cells*. 2011; 29 (2): 169-78

KAMPYLOBAKTERY Z HYDINY A ICH CITLIVOSŤ K BIOAKTÍVNYM SUBSTANCIÁM

Ščerbová, J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

Kampylobakteriózy patria k najčastejšie hláseným zoonózam v Európskej únii a rovnako tak aj na Slovensku. Cieľom tejto štúdie bolo zistenie citlivosti/rezistencie kampylobakterov k antibiotikám ako aj testovanie ich citlivosti k bioaktívnym substanciám s antimikrobiálnym účinkom (enterocíny, fytoaditíva a lantibiotikum galidermín). Kampylobaktery boli izolované z rônych druhov hydiny. Citlivosť k antibiotikám a bioaktívnym substanciám bola testovaná diskovou a kvantitatívnou agarovou difúznou metódou. Zo 69 testovaných kmeňov kampylobakterov boli všetky rezistentné aspoň k 2 druhom testovaných antibiotík. V prípade kmeňov zo slovenskej hydiny bola najvyššia rezistencia na kyselinu nalidixovú a ciprofloxacín; u talianskych kmeňov rovnako na kyselinu nalidixovú, ale tiež na cefotaxim. Zbierkový kmeň *C. jejuni* CCM 6191 bol rezistentný až na 7 druhov antibiotík z 10, pričom jeho rast bol inhibovaný 7 enterocínmi z 8 testovaných. Celkovo bola inhibícia aspoň 1 enterocínom u kampylobakterov zo Slovenska zaznamenaná v 83 % a v prípade kmeňov z Talianska to bolo 85 %. Kampylobaktery izolované zo slovenskej hydiny boli citlivé predovšetkým k Ent 131 a kmene z talianskej hydiny prejavili najvyššiu citlivosť k Ent 9296. Účinkami šalvie bol inhibovaný rast 57 % kmeňov zo Slovenska a 44 % kmeňov z Talianska. Účinok oregana bol vyšší; inhiboval rast 67 % slovenských kmeňov a 56 % talianskych kmeňov. Ku galidermínu bolo citlivých 35 % slovenských kmeňov a 13 % talianskych. Významným výsledkom je, že väčšina kmeňov, ktoré boli rezistentné na antibiotiká, boli zároveň citlivé k enterocínom, fytoaditívam a niektoré i ku gallidermínu, čo je predpoklad pre využitie týchto substancií v chovateľskej praxi.

ÚVOD

Podľa Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín patria kampylobakteriózy k najčastejšie hláseným zoonózam u ľudí v Európskej únii. Túto tendenciu na území SR potvrdzuje tiež Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (EPIS, 2016). Z epidemiologického hľadiska sú pre človeka najdôležitejšie dva druhy *Campylobacter jejuni* a *C. coli*. Tie môžu byť zodpovedné za vznik už spomínaného zoonotického ochorenia kampylobakteriózy, ktoré je sprevádzané hnačkovými stavmi (EFSA, 2015), no v niektorých prípadoch toto ochorenie môže u ľudí spôsobiť vážne komplikácie zdravotného stavu. Keďže je cieľom chovateľov udržiavanie zdravého chovu a tým získavanie zdravých a bezpečných potravín, cieľom tejto štúdie bolo poukázať na alternatívne možnosti eliminácie kampylobakterov a tým aj zabezpečenie prevencie pred infekciami spôsobenými týmito baktériami. Jedným zo zdrojov naturálnych, bioaktívnych substancií s antimikrobiálnym účinkom môžu byť aj bakteriocín-produkujúce baktérie. Enterocíny (v rámci bakteriocínov) sú produkované niektorými zástupcami rodu *Enterococcus* (Nes a kol., 2014). K látkam s antimikrobiálnym účinkom patria aj fytoaditívne substancie a nakoľko už boli v našom laboratóriu testované oregano a šalvia, rozhodli sme sa pre porovnanie otestovať aj ich vplyv na rast kampylobakterov. V neposlednom rade nás zaujímal účinok lantibiotického bakteriocínu Galidermín, ktorý má predominantne inhibičné účinky na Gram-pozitívne baktérie a doposiaľ neboli preukázané jeho účinky na Gram-negatívne baktérie.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky trusu boli odobraté na pštrosej farmy (54 zmesných vzoriek/140 zvierat) a z domácich chovov kačíc (23 zmesných vz./40 zv.), brojlerov (6 zmesných vz./10 zv.) a nosníc (27

zmesných vz./47 zv.). Ďalšie vzorky trusu z nosníc (18. vz./18 zv.) boli odobrané v rámci aplikačného experimentu na ÚFHZ, SAV. Odber vzoriek prebehol v súlade s predpismi Štátnej veterinárnej a potravinovej správy Slovenskej republiky. Vzorky boli spracované štandardnou mikrobiologickou zried'ovacou metódou (ISO) a inokulované na selektívne kultivačné médium *Campylobacter* agar base–Karmali (Oxoid, Ltd., Veľká Británia) pre záchyt kampylobakterov. Zachytené kolónie boli indentifikované pomocou MALDI Biotyper™ identifikačného systému (BrukerDaltonics, USA) a potvrdené PCR. Na testovanie boli použité aj kmene kampylobakterov (39; *Risk Analysis and PublicHealth Department, Vialledell' Università*) izolované z trusu hydiny z Talianska (TAL kmene). Citlivosť k antibiotikám bola testovaná u všetkých 69 kmeňov (30 kmeňov zo slovenskej hydiny – SK kmene a 39 TAL kmeňov) agarovou difúznou metódou (CLSI, 2009) na Müller-Hinton agare (Bio-Rad, USA) s použitím antibiotických diskov (cefotaxim, chloramfenikol, tetracyklín, ciprofloxacín, ampicilín, azitromycín, erytromycín, streptomycín, kyselina nalidixová, gentamicín) s koncentráciou a špecifikáciou antibiotík bežne používaných vo veterinárnej praxi. Inhibičná aktivita enterocínov (izolované na ÚFHZ, SAV) na indikátorové kmene kampylobakterov bola testovaná kvantitatívnou difúznou metódou – agar spot test, podľa De Vuysta a kol. (1996) s použitím BHI (Brain Heart infusion) bujónu, 1,5 % a 0,7 % BHI agaru (Becton & Dickinson, USA). Jednotlivé druhy enterocínov (Ent EM 41, Ent M, Ent 55, Ent 412, Ent 9296, Ent EK13, Ent 4231, Ent 131) boli aplikované v objeme 10 µl. Po 48 hod. kultivácii pri 41-42 °C boli vyhodnotené zóny inhibície rastu daného indikátora príslušným enterocínom. Ako pozitívna kontrola bol použitý kmeň *C. jejuni* CCM 6191. Na ďalšie testovanie boli použité rastlinné extrakty získané zo šalvie a oregana (*Calendula a.s.*, Nová Ľubovňa). Rastlinné extrakty boli použité v dávke 5 µl (MIC 5), a ich inhibičná aktivita bola sledovaná rovnako agar spot testom. Výsledky boli štandardne vyhodnotené na základe veľkostí inhibičných zón v mm. Citlivosť ku galidermínu (Enzo-Life Sciences AG, Švajčiarsko) bola stanovená agar spot testom v dávke 2 µl (koncentrácia: 0,5 mg/ml).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Taxonomicky bolo k druhu *C. jejuni* priradených 26 kmeňov a k druhu *C. coli* 4 kmene. Vo vzorkách trusu pŕstosov nebola prítomnosť kampylobakterov potvrdená. Rodová príslušnosť kampylobakterov na úrovni génov bola potvrdená vo všetkých testovaných prípadoch. Zo 69 testovaných kmeňov kampylobakterov (30 SK kmeňov a 39 TAL kmeňov) boli všetky rezistentné aspoň k 2 druhom testovaných antibiotík. V prípade kmeňov izolovaných zo slovenskej hydiny bolo najviac rezistentných na kyselinu nalidixovú a ciprofloxacín, ktorý je často indikovaný v liečbe bakteriálnych gastroenteritíd (Scharfen, 2013). Žiaden z kmeňov izolovaných na Slovensku nebol rezistentný ku gentamicínu a tetracyklínu. TAL kmene prejavili najviac rezistenciu na cefotaxim (85 % kmeňov); na kys. nalidixovú bolo rezistentných až 77 % a na tetracyklín 79 % kmeňov. Rezistencia kampylobakterov na ciprofloxacín bola o niečo nižšia - 69 %. V prípade erytromycínu a gentamicínu bol inhibovaný iba 1 kmeň. Enterocíny zvyčajne vykazujú širokospektrálnu antimikrobiálnu aktivitu voči Gram-pozitívnym ako aj Gram-negatívnym druhom baktérií a to v *in vitro*, ale aj *in vivo* podmienkach. Vďaka svojej stabilite v prostredí tráviaceho traktu môžu chrániť chov pred rozšírením črevného ochorenia (Lauková a kol., 2012, 2015). V prípade zbierkového kmeňa *C. jejuni* CCM 6191 bola zaznamenaná rezistencia až na 7 druhov antibiotík z 10, pričom jeho rast bol inhibovaný 7 enterocínmi z 8 testovaných. Citlivosť SK kmeňov k enterocínom bola pomerne vysoká, až 25 kmeňov bolo citlivých aspoň k 1 enterocínu a citlivé boli predovšetkým k Ent 131 ako už v predchádzajúcej práci uviedli Ščerbová a kol. (2014). TAL kmene prejavili najvyššiu citlivosť k Ent 9296 a rast týchto kmeňov bol inhibovaný aspoň 1 druhom enterocínu v 33 prípadoch z 39. Celkovo bola inhibícia aspoň 1 enterocínom u kampylobakterov zo Slovenska zaznamenaná v 83 %

a v prípade kmeňov z Talianska to bolo 85 %. Šalvia inhibovala rast 57 % SK kmeňov a 44% TAL kmeňov (priemerná inhibičná zóna 9 mm). Rast 67 % SK kmeňov bol inhibovaný účinkami oregana a v prípade TAL kmeňov to bolo 56 % (priemerná inhibičná zóna 23 mm). Ku galidermínu bolo citlivých 35 % SK kmeňov a 13 % TAL kmeňov pri aktivite 100 AU/ml. Významným výsledkom je, že väčšina kmeňov, ktoré boli rezistentné k antibiotikám, boli zároveň citlivé k enterocínom, fytoaditívam a niektoré i ku gallidermínu, čo je dobrým signálom pre ich využitie predovšetkým v prevencii gastrointestinálnych ochorení. Z našej štúdie teda vyplýva, že rast kampylobakterov bol najviac inhibovaný účinkom enterocínov resp. fytoaditívami; čo je potrebné potvrdiť tiež v *in vivo* experimentoch. Významným výsledkom je aj inhibícia niektorých kampylobakterov gallidermínom. Avšak, enterocíny a fytoaditíva sa javia ako najúčinnějšíe bioaktívne/antimikrobiálne substancie v prípade kampylobakterov, čo ich predurčuje pre využitie v chovateľskej praxi.

Za pomoc pri PCR metodike ďakujem Prof. V. Kmeťovi, DrSc. Výsledky práce boli financované projektom VEGA 2/0004/14.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. De Vuyst, L., Callewaert, R., Pot, B. Characterization of antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. *Systematic and Applied Microbiology*. 1996; 19: 9-20.
2. EFSA, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*. 2015; 13(12): 4329, p. 191. Dostupné na: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329>
3. EPIS, Epidemiologický informačný systém. Aktuálny výskyt kampylobakteriôzy, 2016. Dostupné na: <http://www.epis.sk/AktualnyVyskyt.aspx>
4. Lauková, A., Kandričáková, A., Ščerbová, J. Use of bacteriocin-producing, probiotic strain *Enterococcus faecium* AL41 to control intestinal microbiota in farm ostriches. *Letters in Applied Microbiology*. 2015; 60(6): 531-535.
5. Lauková, A., Chrástínová, Ľ., Plachá, I., Stropfiová, V., Szabóová, R., Čobanová, K., Chrenková, M., Formelová, Z., Imrichová, J., Hádryová, J., Ondruška, Ľ., Jurčík, R., Žitňan, R. Beneficial effect of bacteriocin-producing strain *Enterococcus faecium* EF 55 of non rabbit origin in rabbits. In *Proceedings from 4th World Lagomorph Conference, Vienna, Austria, July 23-27, 2012*, s.77. Ed. K. Hackländer, Ch. Thurmer, ISSN-Nr.1021-3252.
6. Nes, I.F., Diep, D.B., Moss, M.O. Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. Enterococci from commensals to leading of drug resistant infection. 2014, p. 1-34.
7. Ščerbová, J., Lauková, A. Kampylobaktery z hydiny a ich potenciálna citlivosť k enterocínom. In *Abstrakty z Konferencie mladých mikrobiológov „Čo nového v mikrobiológii?“*, Štrbské Pleso, 13.3.-16.3*. 2014, *eds. Olejníková, P., Májeková, H., Bujdáková, H., s. 41. ISBN 978-80-971422-1-6.

VPLYV FRAGMENTOV ĽUDSKÉHO LYZOZÝMU NA AMYLOIDNÚ AGREGÁCIU LYZOZÝMU

Uličná K.^{1,2}, Bednáriková Z.^{2,3}, Bhunia A.⁴, Gažová Z.²

¹Ústav biologických a ekologických vied, Katedra bunkovej biológie, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Šrobárova 2, Košice, ²Ústav experimentálnej fyziky, Oddelenie biofyziky, SAV, Watsonova 47, 040 01 Košice, ³Ústav chemických vied, Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Šrobárova 2, Košice, ⁴Oddelenie biofyziky, Bose Institute, P-1/12 CIT Scheme VII (M), Kolkata 700054, India

ABSTRAKT

S amyloidnou agregáciou poly/peptidov je spojených viac ako 30 ochorení, medzi ktoré patrí aj Alzheimerova a Parkinsonova choroba, priónové ochorenia, ako aj diabetes mellitus. Tvorba amyloidných agregátov lysozýmu je sprievodným znakom systémovej lysozýmovej amyloidózy. Súčasný poznatky poukazujú na to, že inhibícia formovania amyloidných agregátov predstavuje jeden z možných prístupov terapie týchto ochorení. Zamerali sme sa na štúdium vplyvu Lz - peptidov, krátkych fragmentov ľudského lysozýmu na amyloidnú agregáciu lysozýmu. Využitím experimentálnych a výpočtových metód sme zistili, že tieto peptidy majú schopnosť ovplyvniť tvorbu lysozýmových amyloidných fibríl. Získané výsledky poukazujú na to, že tieto peptidy môžu byť použité pre vývoj nových postupov pri liečbe amyloidných ochorení.

ÚVOD

Amyloidná agregácia proteínov je charakteristickým znakom viacerých ochorení (Knowles a kol., 2014). Na molekulárnej úrovni významnú úlohu zohráva tvorba nenatívnych konformérov poly/peptidov, ktorých interakcia vedie k formovaniu amyloidných agregátov s vysokým obsahom krížovej β -štruktúry (Haass a Selkoe 2007). V súčasnej dobe sa pozornosť upriamuje ako na objasnenie mechanizmu vzniku amyloidných agregátov a ich vzťahu k amyloidným ochoreniam, tak aj na identifikáciu látok schopných ovplyvniť proces agregácie ako potenciálnych terapeutík. V posledných rokoch boli nájdené nízkomolekulové látky, peptidy a nanočastice, ktoré boli schopné inhibovať fibrilizáciu proteínov *in vitro* (Kayed a kol., 2003; Cabaleiro-Lago a kol., 2010). Napriek tomu nebola doposiaľ identifikovaná látka, ktorá by spĺňala kritériá na liečbu amyloidóz. Preto je potrebné pokračovať v štúdiu účinku rôznych látok na amyloidnú agregáciu poly/peptidov. V našej práci sme sledovali účinok krátkych fragmentov ľudského lysozýmu na amyloidnú agregáciu lysozýmu.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Ľudský lysozým (E.C 3.2.1.17), NaCl, NaH₂PO₄·2H₂O a tioflavín T boli zakúpené od firmy Sigma-Aldrich.

Lz-peptidy

Navrhnuté peptidy boli získané pomocou peptidového syntetizátora s pevnou fázou (Aapptec Endeavor 90) a čistené pomocou HPLC (Schimadzu, Japonsko) za použitia C18 kolóny. Na prečistenie peptidov bola využitá zmes vody a acetonitrilu s prídavkom 0,1% kyseliny trifluoroctovej. Na stanovenie molekulárnej hmotnosti bola využitá technika MALDI-TOF.

Amyloidná fibrilizácia ľudského lysozýmu

Roztok lysozýmu (10 μ M) získaný rozpustením proteínu v citrátovo-fosfátovom tlmivom roztoku (0,1 M kyselina citrónová, 0,2 M NaH₂PO₄ a 100 mM NaCl, pH 2,8) bol inkubovaný 2h pri 65°C a pri konštantom miešaní (1200 rpm). Vytvorenie amyloidných fibríl bolo overené pomocou ThT metódy a atómovej silovej mikroskopie.

Fluorescenčná metóda viazania Tioflavínu T(ThT)

Táto metóda bola použitá na kvantifikáciu amyloidnej fibrilizácie lyzozýmu. ThT bol pridávaný k vzorkám lyzozýmu (10 μ M) vo finálnej koncentrácii 20 μ M. Následne boli odmerané fluorescenčné spektrá pomocou Synergy MX (BioTek) spektrofluorimetra so šírkou excitačnej a emisnej štrbiny 9,0/9,0 nm pri excitačnej/emisnej vlnovej dĺžke 440/485 nm.

Atómová silová mikroskopia (AFM)

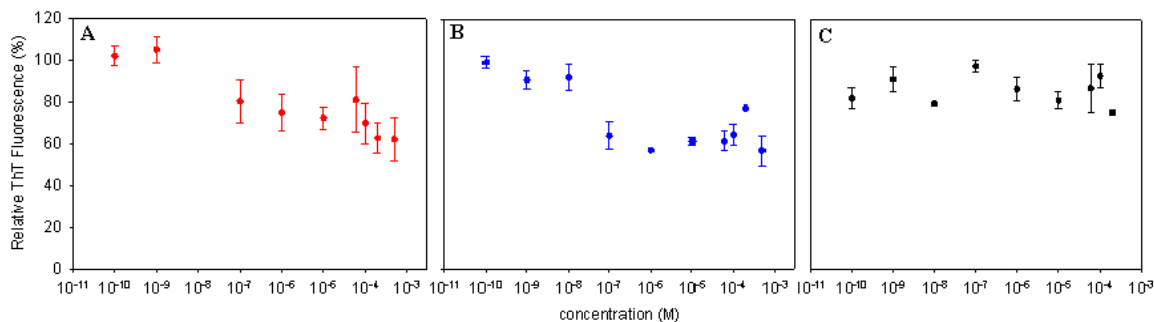
Vzorky boli nanášané na očistený povrch sľudy. Po 5 min absorpcii bol povrch sľudy očistený niekoľkokrát ultračistou vodou a vzorky boli vysušené na vzduchu. AFM snímky boli získané pomocou silového mikroskopu Veeco di Inova, Bruker AXS Inc, Madison.

Kruhový dichroizmus (CD)

CD spektrá boli merané na spektrometri Jasco J-815 pri izbovej teplote s 3 akumuláciami, s rýchlosťou 100 nm/min. Rozsah vlnovej dĺžky bol 190-260 nm. Použitá bola kremenná kveta o dĺžke 1 mm.

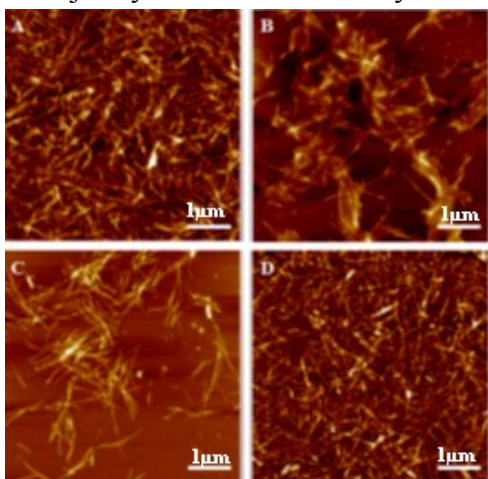
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Informácie získané v posledných rokoch poukazujú na to, že krátke peptidy odpovedajúce určitým úsekom primárnej štruktúry proteínu majú schopnosť výrazne inhibovať tvorbu amyloidných agregátov daného proteínu. V mnohých prípadoch aminokyselinová sekvencia krátkych peptidov odpovedá primárnej sekvencii aminokyselín proteínu, ktorá sa najviac podieľa na tvorbe agregátov. Zamerali sme sa preto na štúdium vplyvu troch krátkych peptidov lyzozýmu (Lz-peptidov) na amyloidnú agregáciu ľudského lyzozýmu. Aminokyselinová sekvencia Lz-peptidov odpovedala aminokyselinovej sekvencii amyloidogénneho fragmentu lyzozýmu (R¹⁰⁷-R¹¹⁵) (Lz peptid), resp. bola modifikovaná. Nahradenie Ala2Lys (LzK peptid) viedlo v porovnaní s Lz peptidom k zvýšeniu kladného náboja. Ďalšou modifikáciou Ala5Trp sme získali LzKW peptid, ktorý mal vďaka prítomnosti Trp vyššiu hydrofobicitu. Modifikácie boli urobené s cieľom zistiť, či zmena náboja a/alebo hydrofobicity aminokyselinového reťazca krátkeho peptidu má vplyv na anti-amyloidné vlastnosti Lz-peptidov. Pomocou viazania ThT sme zistili, že krátke peptidy v koncentračnom rozsahu (10 pM - 1 mM) ovplyvňujú tvorbu lyzozýmových fibril rôzne. V prípade Lz a LzK peptidu sme pozorovali postupné znižovanie hodnôt fluorescencie ThT s rastúcou koncentraciou peptidov (obr.1A, B). Pre koncentrácie vyššie ako 100 nM bol zaznamenaný pokles fluorescencie k hodnotám 60% (Lz peptid), resp. 50% (LzK peptid) voči hodnotám detegovaným pre lyzozýmové fibrily samotné (100%, kontrola). Nami získané výsledky naznačujú, že Lz a LzK peptidy interagujú s molekulami lyzozýmu, výsledkom čoho je potlačenie tvorby amyloidných agregátov približne na polovicu. Prítomnosť LzKW peptidu nespôsobila výrazné zmeny v hodnotách fluorescencie ThT v študovanom koncentračnom rozsahu. Tieto dáta poukazujú na to, že LzKW peptid neinhibuje amyloidnú fibrilizáciu lyzozýmu. Tento účinok krátkych peptidov podporili aj spektrá získané pomocou kruhového dichroizmu. Typické spektrum odpovedajúce vysokému obsahu β -listov s lokálnym minimom pri 222 nm bolo pozorované pre lyzozýmové fibrily. Zmeny v tvare spektier získané pre fibrilizáciu lyzozýmu v prítomnosti krátkych peptidov Lz a LzK poukazujú na nižšie zastúpenie β -listov a vyšší podiel α -helixov v porovnaní so zastúpením týchto sekundárnych štruktúr v lyzozýmových fibrilách. LzKW peptid spôsobil len minimálne zmeny v CD spektre v porovnaní so spektrom detegovaným pre lyzozýmové fibrily, čo naznačuje podobné zastúpenie β -listov a α -helixov. Atómová silová mikroskopia potvrdila výsledky získané metódou viazania ThT a CD spektroskopiou. Kým lyzozýmové fibrily vytvorené v neprítomnosti peptidov mali typickú morfológiu amyloidných fibril (dlhé, tenké vlákna) (obr. 2A), fibrilizácia lyzozýmu v prítomnosti Lz alebo LzK peptidov spôsobila výraznú redukciu množstva amyloidných agregátov (obr. 2 B, C). Na druhej strane, v prípade LzKW peptidu sme nepozorovali redukciu ani zmeny v morfológii vznikajúcich fibril (obr. 2D).



Obr.1 Účinok krátkych peptidov Lz (A), LzK(B), LzKW (C) na amyloidnú fibrilizáciu lyzozýmu detegovaný pomocou fluorescenčnej metódy viazania ThT. Fluorescenčné intenzity boli normalizované k fluorescenčnej intenzite lyzozýmových fibríl vytvorených v neprítomnosti krátkych peptidov (100%).

Získané výsledky poukazujú na to, že krátke peptidy Lz a LzK majú schopnosť čiastočne (~ 50%) inhibovať tvorbu amyloidných agregátov lyzozýmu. Dôležitú úlohu v tomto zohráva náboj a hydrofobicita aminokyselínového reťazca krátkeho peptidu. Ukázalo sa, že zvýšenie



náboja v LzK peptide nevedlo k výraznej zmene inhibičnej aktivity v porovnaní s rozsahom inhibície pozorovanej pre Lz peptid. Zvýšenie hydrofobicity LzKW peptidu viedlo k podstatnému poklesu inhibičnej aktivity. Na základe týchto faktov môžu byť Lz a LzK peptidy použité ako základ pre dizajn krátkych peptidov s ešte vyšším inhibičným účinkom, ktoré by mohli byť využité na liečbu amyloidných ochorení.

Obr. 2 AFM obrázky získané po amyloidnej fibrilizácii ľudského lyzozýmu samotného (A) a v prítomnosti krátkych peptidov (100 μM) Lz (B), LzK (C) a LzKW (D).

Táto práca bola podporená projektom VEGA 2/018/13.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Cabaleiro-Lago C. et al. Inhibition of amyloid beta protein fibrillation by polymeric nanoparticles. ACS Chemical Neuroscience. 2010; vol 1: 279–287.
2. Haass, C., Selkoe, D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007; 8 (2):101-12.
3. Kaye R. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. Science. 2003; vol. 300: 486–489.
4. Knowles T. P., Vendruscolo M., and Dobson, C.M. The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2014; 15 (6):384-96.

VÝZNAM NOMOGRAMOV V SÚDNOM VETERINÁRSKOM LEKÁRSTVE

Vargová G., Takáčová D.

Ústav súdneho a verejného veterinárskeho lekárstva a ekonomiky, UVLF Košice

ABSTRAKT

Poznanie času úhynu zvierat (monitorovaním krivky chladnutia, výpočtom, odčítaním hodnôt z nomogramu) môže napomôcť pri zisťovaní predpokladaného času úhynu zvierat v súvislosti s prípadmi týrania zvierat, s pytliactvom, a pod.

Cieľom našej práce bolo získanie podkladov pre vyhotovenie nomogramu, využiteľného v súdnom veterinárskom lekárstve, pri zisťovaní času úhynu zvierat.

Nomogram je grafickým vyjadrením matematických alebo fyzikálnych veličín a ich závislostí na sebe. V humánnej praxi majú nomogramy široké využitie, napr. pri stanovovaní rizík v onkológii, v oftalmológii, v neonatológii, vo výžive a dietetike pri stanovovaní BMI (*body mass index*), BSA (*body surface area*), pri kardiovaskulárnom riziku, a pod. Veterinárska prax doposiaľ nedisponuje nomogramom, ktorý by bol nápomocný pri zisťovaní času úhynu zvierat. Príprava podkladov ku konštrukcii nomogramu pozostáva zo zaznamenávania poklesu telesnej teploty kadáveru v prostredí, v ktorom sa nachádzal, až do vyrovnania sa teploty tela s teplotou prostredia. Vyhotovením nomogramu by bolo možné znížiť rozpätie možných vzniknutých chýb v čase úhynu zvierat (*TOD-time of death*), a tým poskytnúť presnejšie údaje. Tieto môžu poslúžiť pre orgány štátnej správy vo veterinárnej oblasti, pre orgány činné v trestnom konaní v súvislosti s týraním zvierat, pytliactvom, či poškodzovaním cudzej veci.

ÚVOD

Chladnutie je fyzikálny proces pozostávajúci z konvekcie, kondukcie, radiácie a evaporácie. Proces chladnutia môže byť ovplyvňovaný množstvom faktorov, ako napr. pľúcna embólia, niektoré infekcie, septikémia, infarkt, tyreotoxikóza, emočný stres, podanie niektorých neurologických liečiv, otravy, nadmerná fyzická námaha, vyčerpanosť, ktoré môžu zvýšiť telesnú teplotu o 1,5 až 2°C. Naopak, v prípadoch ako kolaps, kongestívne srdcové zlyhávanie, hypothermia, hypothyreoidizmus, podanie svalových relaxancií, môžu telesnú teplotu výrazne znížiť. [Algor Mortis/ health Drip (2012), [http:// healthdrip.com/algor – mortis/](http://healthdrip.com/algor-mortis/)].

V tropických podmienkach, kde teplota prostredia (24 - 30°C) je takmer rovná telesnej teplote, je metóda na zisťovanie poklesu telesnej teploty nevyhovujúca a v praxi nevyužiteľná (Abdulazeez a Noordin, 2010).

Prvý nomogram zaviedol do praxe Dr. Clause Henssge (Henssge, 1988). Nomogram slúži ako pomôcka pre obhliadajúcich súdnych lekárov pre stanovenie predpokladaného času smrti.

MATERIÁL A METODIKA

Doposiaľ využívané pravidlo chladnutia kadáveru využíva poznatok, že pokles telesnej teploty o 0,6 – 0,8 °C za hodinu síce poskytuje uspokojivé výsledky, avšak vykazuje veľkú chybovosť, najmä v rôznych podmienkach prostredia a vyžaduje korekcie pre hmotnosť a prostredie. V humánnej praxi sa využívajú vzorce odvodené z Newtonovho termodynamického zákona (Creig, 2010):

$$1. TOD = T_0 - T_{\text{rekt.}} \cdot 3 \text{ hod.}$$

$$2. TOD = T_0 - T_{\text{rekt.}} / 0,8 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$3. T = T_E + (T_0 - T_E) \cdot e^{-kt}$$

$$4. t = -10 \ln (T - T_{\text{rekt.}} / T_0 - T_{\text{rekt.}})$$

TOD – čas smrti, T₀ – fyziologická teplota tela, T rekt. – teplota tela v čase smrti, nameraná

v rekte, R_t – izbová teplota, T_E – teplota prostredia, t – čas smrti, Z – konštanta pre výpočet hmotnosti, $1,2815 \times m^{-0,625} - 0,0284$

Výpočet času smrti, resp. úhynu zvierat je nepresný, nakoľko vzorce nezohľadňujú plató fázy, vyskytujúce sa v priebehu chladnutia v trvaní aj niekoľko hodín a kolísanie teploty prostredia (cirkadiánný rytmus dňa).

Doposiaľ sme mali možnosť uskutočniť merania na 28 zvieratách, ktoré boli rozdelené do 7 skupín (Tab.č.1) v závislosti od druhu, hmotnosti a vonkajších podmienok, v ktorých nastal úhyn zvierat.

Tab. 1 Skupiny zvierat

Skupina 1	Pes $m \leq 5$ kg, T prostredia 18 – 20 °C
Skupina 2	Mačka $m \leq 1,9$ kg, T prostredia 18 - 20°C
Skupina 3	Pes $m \leq 6,3$ kg, T prostredia 4 – 6 °C
Skupina 4	Pes $m \leq 5,1$ kg, T prostredia 18- 20°C, prúdiaci vzduch
Skupina 5	Pes $m \leq 25$ kg, T prostredia 18 – 20 °C
Skupina 6	Mačka, pes $m \leq 9,04$ kg, T prostredia 16 – 20 °C, voda
Skupina 7	Pes, $m \leq 52$ kg, T prostredia – 3,8 °C

Zvieratá (mačky a psy) boli eutanázované na Klinike malých zvierat, UVLF Košice. Dôvodom eutanázie boli najmä vysoký vek zvierat a nevyliciteľné ochorenia, ktoré by boli spájané s následnou bolesťou a utrpením. Meranie poklesu telesnej teploty bolo vykonávané špeciálnym dvojkanálovým teplomerom TESTO 175 T3, so sondou pre meranie teploty prostredia, paralelne s meraním teploty kadáveru v rekte. Interval pre ukladanie dát merania 10 minút sa ukázal ako neužitočný, preto sme zvolili 30 min interval.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nami namerané hodnoty sú zobrazené v Grafe č.1. Najrýchlejšie chladnutie sme zaznamenali v skupine 6 (kadáver vo vode, 4 °C za 0-4 hod.), ktoré bolo trojnásobne rýchlejšie ako pri meraní v stojacom vzduchu. V skupine 4 bol pokles teploty o 2,8°C za prvé 4 hod, čo je v zhode s tvrdením, že chladnutie pri prúdiacom vzduchu je dvojnásobne rýchlejšie ako za podmienok, stojaceho vzduchu. (Algor Mortis/ health Drip (2012), <http://healthdrip.com/algor-mortis/>).

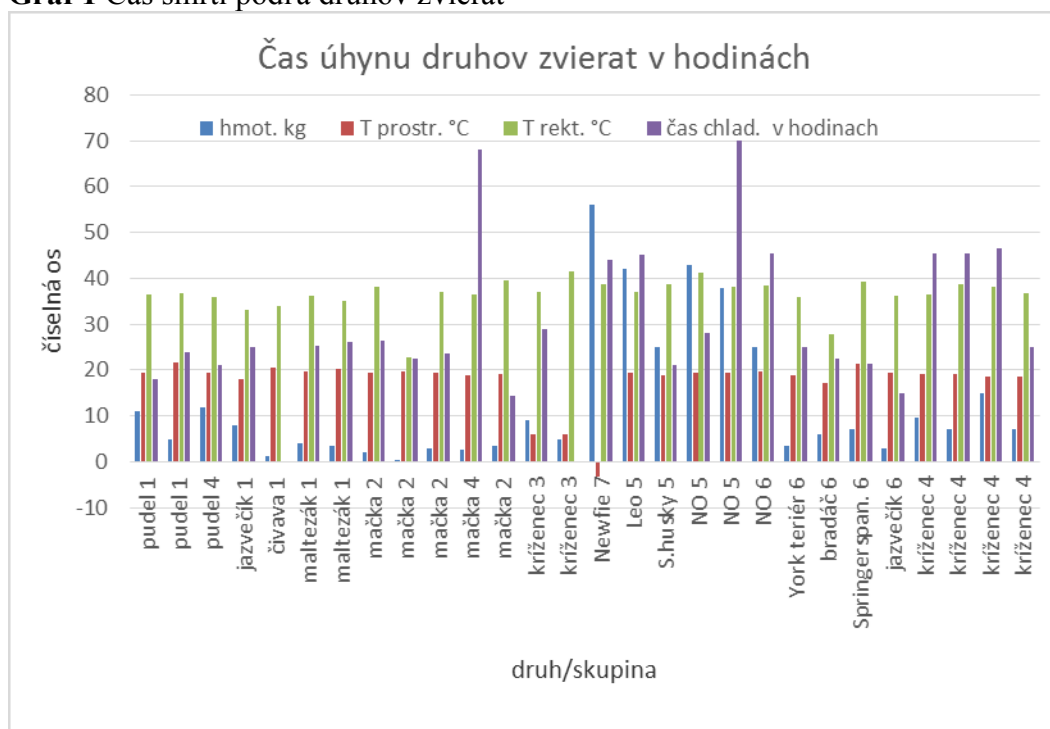
V skupine 3, v podmienkach neskorej jesene (teplota prostredia 4 - 6°C) kadáver chladol 2,4°C

za prvých 7 hodín. V skupine 1 (malí psi s hmotnosťou do 10 kg), pri izbovej teplote, sme zaznamenali pokles 2,5°C za prvé 4 hodiny a doba chladnutia bola viac ako 30 hodín. Proctor a kol., (2009) vo svojej práci, zameranej na zisťovanie času úhynu psov v domácnosti, pri objasňovaní prípadov trestnej činnosti, uvádzajú, že pes nájdený v domácnosti so stálou izbovou teplotou a pri teplote nameranej v rekte 34,5°C, môže byť 3,2 h po smrti.

V skupine 2, mačky s priemernou hmotnosťou 1,5 kg, chladli 2,2°C za prvé 4 hodiny, čo podporuje tvrdenie, že významnú úlohu zohráva hmotnosť organizmu v pomere k jeho povrchu. Ak by sme zobrali do úvahy hmotnosť tela, tak Newfoundlandský pes o hmotnosti 52 kg (skupina 7), vo vonkajších podmienkach, s teplotou prostredia v priemere –3,2°C, chladol 1,7°C za prvých 14 hodín, ale doba chladnutia trvala až 117 hodín. Počas merania sme zaznamenali kolísanie teploty v rámci 24 hodín tzv. cirkadiánný rytmus, ktorý ovplyvňoval chladnutie kadáveru a predlžoval dobu chladnutia. Tiež sme zaznamenali plató fázy (niekoľko hodín neklesajúca teplota) v čase medzi 15 – 17 hodinou chladnutia (0,3 – 0,2°C / hod) a tiež v posledných hodinách chladnutia (0,1°C / hod), v trvaní aj niekoľko hodín. Proctor a kol., (2009) vo svojej práci uvádzajú, že pohlavie, veľkosť tela, hustota

osrstenia nevlývajú na proces chladnutia, avšak hmotnosť a objem tela áno.

Graf 1 Čas smrti podľa druhov zvierat



Nájdené zvieracie kadávery sa často vyskytujú v neštandardných podmienkach, tým aj určenie času ich úhynu metódou merania poklesu telesnej teploty je náročné. Veterinárni patológovia by mali zvážiť aj vytvorenie databázy s údajmi zistenými počas pitiev a v procese ohliadania kadáverov (Merck, 2014).

Nami uvedené merania ešte vyžadujú ďalšie údaje, ktoré budú nápomocné a využité pri vypracovaní nomogramov na určovanie času smrti.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Abdulazeez, I.O., Noordin, M.M. Algor Mortis Pattern in Dogs, A Guide to Estimation of The Time of Death, *Pertanika J.Trop.Agric.Sci.* 2010; 33(1):105 – 111
2. Algor Mortis/ health Drip (2012),[http:// healthdrip.com/algor – mortis/](http://healthdrip.com/algor-mortis/)
3. Creig, A. Essential mathematics and statistics for Forensic Science, Wiley – Blackwell by John & Sons Ltd., 2010, 83 - 86
4. Henssge C. Death time estimation in case work I., The rectal temperature time of death nomogram. *Forensic Science International.* 1988; 38: 209 - 236
5. Merck, M.D. : Clinician's brief (capsule), 2014 June, [[http:// www.cliniciansbrief.com/article/veterinary-forensic-principles- not always- same-humans](http://www.cliniciansbrief.com/article/veterinary-forensic-principles-not-always-same-humans)]
6. Proctor K.W.: Estimating the early post mortem interval in domestic canines (Master thesis), Knoxville: University of Tennessee, 2009

RÖNTGENOLOGICKÉ POROVNANIE VYBRANÝCH GONIOMETRICKÝCH INDEXOV STEHNOVEJ KOSTI U PSOV S MEDIÁLNOU LUXÁCIOU PATELY

Žilinčík M., Ledecký V., Hluchý M.

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

ABSTRAKT

Predkladáme vyhodnotenie a porovnanie vybraných goniometrických indexov stehnovej kosti u skupiny psov plemena Yorkshírsky teriér bez mediálnej luxácie pately (MPL) a u skupín psov s jednotlivými stupňami (1° - 4°) mediálnej luxácie pately. Od októbra 2013 do mája 2016 bolo vyšetrených 39 psov (0° n=7, 1° n=4, II° n=20, III° n=4, IV° n=4) a pomeraných 67 stehnových kostí na vyhotovených röntgenogramoch. Z goniometrických indexov sme sa zamerali na proximálny laterálny anatomický femorálny uhol (aLPFA), distálny laterálny anatomický femorálny uhol (aLDFA) a uhol anteverzcie (AA). Na základe štatistického porovnania konštatujeme, že najvyššiu odlišnosť oproti referenčným hodnotám, vytvorených zo zdravých psov, majú indexy AA pri III stupni (MPL) a pri IV stupni mediálnej luxácie pately sú signifikantne odlišné hodnoty všetkých nami meraných indexov. Z našich meraní vyplýva, najvýraznejšie angulárne a osové deformity stehnovej kosti sa nachádzajú u psov postihnutých III a IV stupňom MPL.

ÚVOD

Luxácia pately (LP) je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcim ortopedickým ochorením postihujúcim panvové končatiny u psov (Schulz, 2012; Piermattei a kol., 2006). Mediálna luxácia pately (MLP), je najčastejšie sa vyskytujúcim typom a má najvyššiu prevalenciu u malých a miniatúrnych plemien psov ako sú Yorkshire teriér, Čivava, Nemecký trpasličí špic a Maltézsky psík (LaFond a kol., 2002; Alam a kol., 2007). MLP je najčastejšie prezentovaná ako vrodená alebo vývojová porucha, pričom sa nemusí vyskytovať po narodení jedinca. Výskum vzniku MLP poukazuje na niekoľko základných kostných abnormalít, ktoré môžu byť prítomné už po narodení alebo sa začnú vyvíjať v priebehu rastu, a ktoré predchádzajú vzniku LP (Kowaleski a kol., 2012). Za hlavné kostné abnormality sú považované coxa vara a zmenšený uhol anteverzcie, ktoré sú hlavnou príčinou ďalších kostných defektov na panvovej končatine pri MLP ako je distálny femorálny varus, plytký trochleárny zárez so slabo vyvinutým alebo chýbajúcim mediálnym hrebeňom, hypoplázia mediálneho kondylu stehnovej kosti, mediálna deviácia *tuberositas tibiae* spojená s internou rotáciou proximálnej tibiae a valgózne deformity proximálnej tibiae (Vasseur, 2003; Kowaleski a kol., 2012). Zo základných kostných deformít vznikajú abnormality na muskulárnom aparáte, z ktorých je najväčšie vyosenie extenzorového mechanizmu panvovej končatiny (Schulz, 2012; Kowaleski a kol., 2012). Pri luxácii pately dochádza k nestabilite v kolennom kĺbe zhoršením pohybu pately v trochleárnom záreze, stráca sa schopnosť stabilizácie pomocou extenzorového mechanizmu, čo vedie k angulárnym deformitám na stehnovej a holennej kosti. Sumáciou uvedených abnormalít dochádza k zvýšeniu abnormálnej záťaže na kĺbovú plochu, čo má za následok vznik osteoartrózy (Alam a kol., 2011).

Diagnostika MLP je založená na klinickom a ortopedickom vyšetrení, ktoré je doplnené röntgenologickým vyšetrením (RTG) panvových končatín pre identifikáciu a kvantifikáciu kostných deformít pri MLP a následné zvolenie vhodnej terapie. Pre zhotovenie kvalitných a presných röntgenogramov je potrebná hlboká sedácia alebo celková anestézia, pre zabránenie vzniku polohových artefaktov. Nesymetricky zhotovené röntgenogramy nám negatívne vplyvajú na meranie goniometrických indexov potrebných pre výber vhodnej chirurgickej intervencie (Dudley a kol., 2006; Kowaleski a kol., 2012).

Cieľom tejto štúdie je porovnanie jednotlivých goniometrických indexov (osových

a angulárnych) na röntgenogramoch panvových končatín zhotovených u psov bez MLP a u psov s MLP pri jednotlivých stupňoch luxácie.

MATERIÁL A METODIKA

Pre túto prospektívnu štúdiu sme vybrali psy plemena Yorkshírsky teriér s ohľadom na častú prevalenciu ochorenia a taktiež pre veľký výskyt medzi chovateľmi. Jedinca pochádzali z klinických prípadov s diagnostikovanou MLP, ktoré boli vyšetrené a ošetrené na KMZ OCHORR UVLF v Košiciach. Ďalej sme využili jedinca rovnakého plemena, ktoré sa museli podrobiť hlbokoj sedácii alebo celkovej anestézii za účelom terapie iných ochorení na rovnakom pracovisku. Všetci majitelia súhlasili s priebehom vyšetrenia.

Diagnostika MLP: Každý jedinec (n= 39) zaradený do štúdie sa musel podrobiť klinickému a ortopedickému vyšetreniu, za účelom diagnostiky MLP. Psy s MLP boli rozdelený do štyroch skupín (1^o-4^o) podľa závažnosti deformít pomocou klasifikačnej stupnice podľa Singletona (Singleton, 1969). Skupina č. 1 (n=7) obsahovala pacientov bez MLP, skupina č. 2 (n=4) obsahovala pacientov s 1^o MLP, skupina č. 3 (n=20) obsahovala pacientov s 2^o MLP, skupina č. 4 (n=4) obsahovala pacientov s 3^o MLP a skupina č. 5 (n=4) obsahovala pacientov s 4^o MLP. Pacienti s pridruženými ochoreniami pohybového aparátu (rLCC, DBK, Calve-Perthesova choroba) na panvových končatinách boli vylúčení zo štúdie.

Jednotlivé psy boli pred RTG vyšetrením uvedené do hlbokoj sedácie pomocou kombinácie anestetík diazepam (0,3mg/kg ž.hm.) a propofol (4mg/kg ž.hm.). Pri potrebe uvedenia pacienta do celkovej anestézie sme použili premedikáciu medetomidínom (10µg/kg ž.hm.) a butorfanolom (0,2mg/kg ž.hm.) a pokračovali sme s diazepamom a propofolom ako pri sedácii pacienta.

RTG vyšetrenie a meranie goniometrických indexov: Pre zhotovenie korektných röntgenogramov bol použitý prístroj GIERTH HF 200 A. Na vyhotovenie snímok bola použitá nepriama digitalizácia pomocou prístroja FireCR+ Veterinary-40 a na zhodnotenie röntgenogramov bol použitý program QuantorVet. Pre potreby merania goniometrických indexov boli zhotovené kraniokaudálne, mediolaterálne a axiálne snímky femuru. Každá panvová končatina (n=67) bola röntgenovaná samostatne. Korektné napolohované röntgenogramy boli pomerané v programe Osirix. Z goniometrických indexov sme sa zamerali na proximálny laterálny anatomický femorálny uhol (aLPFA), distálny laterálny anatomický femorálny uhol (aLDFA) a uhol anteverzie (AA).

Štatistická analýza: Namerané hodnoty goniometrických indexov jednotlivých skupín boli vyjadrené ako priemer a smerodajná odchýlka (SD). Jednocestná analýza rozptylu (ANOVA) bola použitá pre porovnanie jednotlivých skupín. Tukeyho viacnásobné porovnanie bolo použité ako post-hoc test. Ako štatisticky významné boli hodnotené výsledné hodnoty $p \leq 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Namerané priemerné hodnoty goniometrických indexov \pm SD u psov v jednotlivých skupinách sú uvedené v tabuľke č.1. Aj keď pozorujeme určité odchýlky v jednotlivých skupinách, najmarkantnejší rozdiel sa ukázal až v skupine č. 5, ktorá obsahovala súbor pacientov so IV. stupňom MLP. Nepozorovali sme štatistickú významnosť pri porovnávaní jednotlivých goniometrických indexov medzi skupinami 1.-4., až na porovnanie indexu AA pri 4. skupine, kde $p = 0,0266$ a je teda štatisticky významný. Pri porovnaní 5. skupiny s ostatnými nám vychádza markantná štatistická významnosť, ktorá má hodnotu $p \leq 0,001$. Z výsledkov teda vyplýva, že hodnoty nameraných goniometrických indexov sa významne menia pri psoch so IV. stupňom mediálnej luxácie pately a pri psoch s III. stupňom luxácie pately je výrazná zmena len pri indexe AA. Štatistická významnosť pri indexe AA nielen v skupine psov so IV. stupňom MLP, ale aj u psov s III. stupňom MLP poukazuje na fakt, že

uhol anteverzcie femorálneho krčka, ktorý predstavuje stupeň femorálnej torzie, je signifikantne spojený s priebehom zmien pri MLP. Markantné rozdiely v hodnotách pri indexoch aLDFA a aLPFA, ktoré sme namerali v skupine psov so IV. stupňom MLP, sú prejavom deformít spôsobujúcich femorálny varus.

U malých a miniatúrnych plemien je len veľmi málo štúdií, ktoré by sa venovali morfológii osových a uhlových deformít vyskytujúcich sa pri MLP (Yasukawa a kol., 2016). Nami namerané goniometrické indexy panvových končatín u Yorkshírskych teriérov bez MLP, môžu byť použité ako referenčné hodnoty pri chirurgickej intervencii angulárnych deformít spôsobených MLP.

Tab.1 Namerané hodnoty goniometrických indexov u jednotlivých skupín psov

Index	Normal	I. MLP	II. MLP	III. MLP	IV. MLP
	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD
aLPFA	118,5875 ± 3,4079	120,3633 ± 2,0585	118,0189 ± 6,8265	118,0317 ± 4,3594	95,7286 ± 8,8992
aLDFA	95,9208 ± 1,8910	97,9483 ± 1,4696	97,0981 ± 3,3224	98,9317 ± 3,7090	111,3719 ± 7,8183
AA	19,6216 ± 2,8684	19,1916 ± 2,2628	18,9375 ± 2,4186	15,9116 ± 1,8216	8,9471 ± 3,0662

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Schulz K. Diseases of the joints. In Fossum TW (ed.) Small animal Surgery, 4th edn. 2012;185-284.
- Piermattei DL., Flo GL., DeCamp CE. The stifle joint. In Piermattei DL., Flo GL., DeCamp CE (eds.). Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair, 4th edn. 2006; 562-582.
- LaFond E., Breur GJ., Austin CC. Breed susceptibility for developmental orthopedic diseases in dogs. J Am Animal Hosp Assoc. 2002; 38: 467-477.
- Alam MR., Lee JI. Kang HS. et al. Frequency and distribution of patellar luxation in dogs. Vet Comp Orthop Traumatol. 2007; 20: 59-64.
- Kowaleski MP., Boudrieau RJ., Pozzi A. Stifle joint. In Tobias KM., Johnston SA. (eds). Veterinary surgery small animal. 1st edn. 2012; 973-989.
- Vasseur PB.. Stifle joint. In Slatter D. (ed.). Textbook of small animal surgery, 3rd edn. 2003; 2122-2126.
- Alam MR., Lee HB., Kim MS., Kim NS. Surgical model of osteoarthritis secondary to medial patellar luxation in dogs. Vet Med. 2011; 3: 123-130.
- Dudley RM., Kowaleski MP., Drost WT., Dyce J. Radiographic and computed tomographic determination of femoral varus and torsion in the dog. Vet Radiol Ultrasound. 2006; 47: 546-552.
- Singleton WB.. The surgical correction of stifle deformities in the dog. J Small Anim Pract, 1969; 10: 59-69.
- Yasukawa S., Edamura K., Tanegashima K., Seki M., Teshima K., Asano K., Nakayama T., Hayashi K.. Evaluation of bone deformities of the femur, tibia and patella in Toy Poodles with medial patellar luxation using computed tomography. Vet Comp Orthop Traumatol. 2016; 29: 29-38.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2016
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XI. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Rok vydania: 2016

Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

ISBN 978-80-971428-3-4