



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2017

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

XII. ročník

Košice, 6. a 7. september 2017

**Zborník príspevkov prezentovaných na
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu
6. a 7. septembra 2017
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 978-80-971428-5-8

90. rokov od narodenia Kolomana Boďu



Profesor Boďa (4. apríla 1927 – 11. novembra 2005) patril medzi popredných slovenských vedeckých pracovníkov a na ňom je postavená bohatá tradícia základného výskumu v oblasti fyziológie hospodárskych zvierat na Slovensku. V roku 1964 kreoval oddelenie fyziológie hospodárskych zvierat Ústavu experimentálnej biológie SAV v Košiciach, z ktorého v r. 1969 vznikol Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV. Jeho cieľom bolo vybudovať moderné pracovisko reprezentujúce veterinársku fyziológiu nielen v Československu ale aj vo svete. S odstupom času môžeme právom konštatovať, že tieto zámery sa úspešne naplnili.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat mal pôvodne tri pracoviská, v Košiciach, Ivanke pri Dunaji a vo Zvolene. V roku 1990 vznikli na ich základe 2 samostatné ústavy: Ústav fyziológie

hospodárskych zvierat v Košiciach a Ústav biochémie a genetiky živočíchov v Ivanke pri Dunaji.

Vedecká činnosť ústavu pod vedením profesora Boďu bola zameraná najmä na tri základné smery:

- analýzu základných mechanizmov efektívnej transformácie rastlinných bielkovín a nebielkovinového dusíka do živočíšnych bielkovín vrátane kontroly týchto procesov,
- kvantifikáciu výmenných procesov dusíkatých látok medzi krvou a tráviacim traktom oviec,
- poznanie odpovedí organizmu na zmenené podmienky prostredia na neurohumorálnej úrovni prednostne u prežúvavcov.

Na ústave bol získaný rad prioritných poznatkov najmä v oblastiach využitia dusíka, fyziológie trávenia a využitia rôznych zdrojov energie, ktoré boli ocenené celým radom vyznamenaní a cien.

Profesor Koloman Boďa inicioval výskum na ústave aj v niektorých progresívnych oblastiach biotechnológií, ktoré sa rozvíjali naďalej a tvoria súčasť dnešného vedeckého programu ÚFHZ SAV. Ide napríklad o rozvoj poznania mikrobiológie (vrátane bachorových prvokov) tráviaceho traktu hospodárskych zvierat s využitím metód molekulárnej biológie, štúdium fyziologických procesov v bachore v *in vitro* podmienkach, mikropunkcie obličiek hospodárskych zvierat, výskum v oblasti preimplantačnej embryológie, analýza mechanizmov regulácie príjmu potravy na úrovni tráviaceho traktu a CNS. Zvlášť významné sú jeho práce zamerané na oblasť kozmickej fyziológie, ktoré boli riešené na pracovisku v Ivanke pri Dunaji v rámci medzinárodného programu Interkosmos. Tento výskum bol mu veľmi blízky a aktívne sa v ňom angažoval aj po odchode do zaslúženého dôchodku.

Profesor Boďa vchoval celú generáciu nových vedeckých pracovníkov najmä v odbore veterinárnej fyziológie a fyziológie živočíchov a položil základy dvoch úspešných ústavov SAV. Jeho meno je naozajstným pojmom nielen na Slovensku a okolitých krajinách ale aj vo svete.

Prof. MVDr. Štefan Faix, DrSc.

Obsah

PROBLEMATIKA METODOLÓGIE IZOLÁCIE LANGERHANSOVÝCH OSTROVČEKOV	
Babinčák M., Radoňák J., Fedoročko, P., Petrovič M.	7
STIMULÁCIA PRODUKCIE VYBRANÝCH SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV RODU <i>HYPERICUM</i> ENDOFYTICKÝMI HUBAMI.....	
Bálintová M., Lendacká A., Čellárová E.....	10
TESTOVANIE CITLIVOSTI <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> NA OBSAHOVÉ LÁTKY LIEČIVÝCH RASTLÍN.....	
Böhmová E., Čonková E., Sihelská Z., Harčárová M.	13
ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA EXOPOLYSACHARIDOV IZOLOVANÝCH Z <i>LACTOBACILLUS REUTERI</i>	
Brudňáková M., Fedorová M., Reiffová K., Nemcová R.	15
OXIDAČNÝ METABOLIZMUS MAKROFÁGOV MYŠÍ PO PROBIOTICKEJ TERAPII A INFEKЦИИ <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i>	
Bucková B., Dvorožňáková E., Hurníková Z., Lauková A.....	18
TVORBA BIOFILMU U POTRAVINOVÝCH A ENVIRONMENTÁLNYCH STAFYLOKOKOV.....	
Čuvalová A., Kmeť V.....	21
MicroRNA AKO POTENCIÁLNY DIAGNOSTICKÝ BIOMARKER NÁDOROVÝCH OCHORENÍ	
Ferenčáková M., Rabajdová M., Špaková I., Mareková M.....	24
VPLYV TAKRÍN-BENZOTIAZOLOVÝCH DERIVÁTOV NA AMYLODINÚ AGREGÁCIU LYZOZÝMU	
Gančár M., Bednáríková Z., Kubacková J., Gažová Z.....	27
TESTOVANIE PRODUKCIE BIOFILMU KMEŇMI <i>ENTEROCOCCUS HIRAE</i> Z RÔZNYCH ŽIVOČÍŠNYCH ZDROJOV	
Bino-Glatzová E.	30
KONTAMINÁCIA KŔMNYCH OBILNÍN MIKROMYCÉTAMI.....	
Harčárová M., Čonková E., Sihelská Z.	33
VPLYV RÔZNYCH FORIEM ZINKU A VLÁKNINY NA MINERÁLNY STATUS PRASÍAT	
Holodová M.....	36
VÝBER PROBIOTICKÝCH KANDIDÁTOV NA PREPROGRAMOVANIE MAKROFÁGMÍ RIADENEJ PRONÁDOROVEJ ODPOVEDE: <i>IN VITRO</i> PRÍSTUP S VYUŽITÍM M1 A M2 PODTYPU MAKROFÁGOV	
Hradická P., Demečková V., Kassayová M.	39
VÝVOJ POLYMORFNÝCH STR MARKEROV U PÁSOMNICE <i>DIPHYLLOBOTHRIUM LATUM</i> (CESTODA: DIPHYLLOBOTHRIIDEA)	
Koleničová A., Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Minárik G.	42

ÚLOHA GERANYLGERANYL DIFOSFÁT SYNTÁZY 11 (GGPPS11) V REGULÁCII VÝVINU <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	
Kopcsayová D., Košuth J.	45
VYUŽITIE KOMÉTOVEJ ANALÝZY PRI DETEKЦИИ GENOTOXICKÉHO A CYTOTOXICKÉHO ÚČINKU TIAKLOPRIDU V LYMFOCYTOCH PERIFÉRNEJ KRVÍ HOVÁDZIEHO DOBYTKA.....	
Kováčová S.	48
SELEKCIA ENTEROKOKOV PRE ICH PROBIOTICKÉ VYUŽITIE U PSOV.....	
Kubašová I.	51
CYTOMETRICKÉ TESTOVANIE PREŽÍVATELNOSTI BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KVASENIA IZOLOVANÝCH Z ČREVNÉHO TRAKTU PSTRUHA DÚHOVÉHO.....	
Maruščáková I., Mudroňová D., Koščová J., Fečkaninová A., Popelka P.	54
VPLYV ROZDIELNÉHO KONDIČNÉHO SKÓRE DOJNÍC VO FÁZE ZASUŠENIA NA ENERGETICKÝ PROFIL.....	
Mihajlovičová X., Mudroň P.	57
CHARAKTERIZÁCIA A IDENTIFIKÁCIA PLAZMIDU pROVR6 BAKTÉRIE <i>RAOULTELLA ORNITHINOLYTHICA/PLANTICOLA</i> Z VRABCA DOMOVÉHO.....	
Onderková A., Hamarová Ľ., Pristaš P.	60
ÚLOHA ERYTROPOETÍNOVÉHO RECEPTORA V ZVÝŠENEJ REZISTENCII BUNIEK ADENOKARCINÓMU MLIEČNEJ ŽLAZY RAMA 37-28 NA PAKLITAXEL.....	
Szentpéteriová E., Ilkovičová L., Fecková B., Kimáková P., Solár P.	63
KOMPARATÍVNA GENOMIKA PLAZMIDOV <i>ACINETOBACTER</i> SPP.....	
Šipošová N., Čoma M., Pristaš P.	66
CELKOVÉ A LOKÁLNE PRÍČINY PODMIEŇUJÚCE PATOLOGICKÉ ERUPCIE ZUBOV.....	
Štofková S., Jenča A.	69
NOVÉ SYNTETICKÉ CHALKÓNY S PROTINÁDOROVOU AKTIVITOU.....	
Takáč P.	72
NUTRIČNÁ REGULÁCIA PERIPARTÁLNEHO OBDOBIA U DOJNÍC.....	
Timkovičová Lacková P., Maskal'ová, I., Vajda V.	75
KAZUISTIKA: ADDISONOVA CHOROBA (HYPOADRENOKORTICIZMUS) U LABRADORSKÉHO RETRÍVRA.....	
Titková R., Příkryl M., Lukáč B.	78
SPRÁVANIE KLIEŠŤOV V ELEKTROMAGNETICKOM POLI.....	
Vargová B., Kostelec M., Majláth I., Kurimský J., Cimbala R., Majláthová V.....	81

PROBLEMATIKA METODOLÓGIE IZOLÁCIE LANGERHANSOVÝCH OSTROVČEKOV

Babinčák M.^{1,3}, Radoňák J.², Fedoročko, P.¹, Petrovič M.³

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita P.J. Šafárika, Košice

²I. chirurgická klinika, Lekárska fakulta, Univerzita P.J. Šafárika, Košice

³RICB s.r.o., Moskovská trieda 3, Košice

ABSTRAKT

Diabetes mellitus je ochorenie, ktorého súčasná prevalencia dosahuje 9% populácie a v budúcnosti sa očakáva jeho výrazný nárast. Z fyziologického hľadiska je kľúčovým faktorom pri vzniku a priebehu tohto ochorenia beta bunka Langerhansových ostrovčekov pankreasu. Cieľom tejto práce bolo vykonať izoláciu buniek Langerhansových ostrovčekov s ich následnou kultiváciou. Aplikovaním modifikovanej metódy izolácie Langerhansových ostrovčekov bolo možné tieto získať vo vysokej čistote. Boli prevedené viaceré kvalitatívne testy získaných buniek ako MTT test, stanovenie počtu buniek, ale aj mikroskopická verifikácia morfológie. Výsledky naznačujú, že Langerhansové ostrovčeky je možné získať len v obmedzenom merítku, čo úzko súvisí predovšetkým s ich vysokou senzitivitou pri práci *in vitro*, ako aj problematickým získavaním biologického materiálu. Napriek značnému deficitu odbornej literatúry k tejto problematike, aplikáciou modifikovanej metodiky bola dosiahnutá relatívne čistá bunková kultúra Langerhansových ostrovčekov so súčasnou schopnosťou ich kultivácie *in vivo* počas niekoľkých dní. Získané poznatky bude možné v budúcnosti využiť v oblasti regeneratívnej medicíny pri liečbe diabetes mellitus.

ÚVOD

V poslednej dekáde, z dôvodu zvýšeného výskytu diabetes mellitus v celosvetom merítku, sa viaceré vedecké tímy usilujú o izoláciu Langerhansových ostrovčekov s cieľom využiť ich potenciál pri liečbe tohto ochorenia. Diabetes mellitus je chronické ochorenie charakteristické relatívnym alebo absolútnym znížením množstva inzulínu, ktoré ma za následok hyperglykémiu. Chronická hyperglykémia môže viesť k viacerým vážnym stavom, ako napríklad neuropatia, nefropatia, retinopatia alebo zvýšeným rizikom srdcovocievnych ochorení. (King 2012). Prevalencia diabetu dosiahla v roku 2015 podľa WHO 9% populácie, pričom odhady predpokladajú dvojnásobný výskyt tohto ochorenia v ďalších 20 rokoch (Barkai a kol. 2016).

Diabetes mellitus sa vyskytuje v dvoch typoch – typ 1 a typ 2. Diabetes typu 1 je autoimunitné ochorenie vznikajúce ako následok poškodenia beta buniek pankreasu tvoriacich inzulín. Typ 2 je spojený so zníženou citlivosťou buniek organizmu na inzulín, čo je spojené s následnou kompenzáciou tvorby inzulínu beta bunkami pankreasu nasledovanou jeho zníženou produkciou (King 2012; Kopska a kol. 2008). Pod pojmom Langerhansove ostrovčeky respektíve pankreatické ostrovčeky rozumieme oblasti pankreasu s endokrinnou funkciou. Pozostávajú z viacerých typov buniek: alfa buniek, beta, delta, PP a epsilon buniek. Celkový počet Langerhansových ostrovčekov je podľa rôznych štúdií v rozmedzí 3,6 až 14,8 milióna, pričom zaberajú objem 0,5 až 1,3 cm³. (Ionescu-Tirgoviste a kol. 2015; Shapiro a kol. 2000). Najpočetnejšou skupinou buniek sú beta bunky (približne 70 %), ktoré sú najčastejšie lokalizované v centrálnej časti Langerhansových ostrovčekov (Elayat a kol. 1995). Napriek dlhoročnému úsiliu izolácie Langerhansových ostrovčekov sú výsledky v tejto oblasti však stále neuspokojivé. Dôvodom je problematické zabezpečenie čistoty primárnych línii, možnosti identifikácie a izolácie na základe povrchových markerov, neschopnosť použitia štandardných metodík ako je prietoková cytometria, ako aj problematika kultivácie Langerhansových ostrovčekov. Táto práca popisuje modifikovanú metodiku izolácie

Langerhansových ostrovčekov z pankreasu potkana, ako aj metodiku ich kultivácie s cieľom zvýšiť ich počet pri súčasnom zachovaní ich viability.

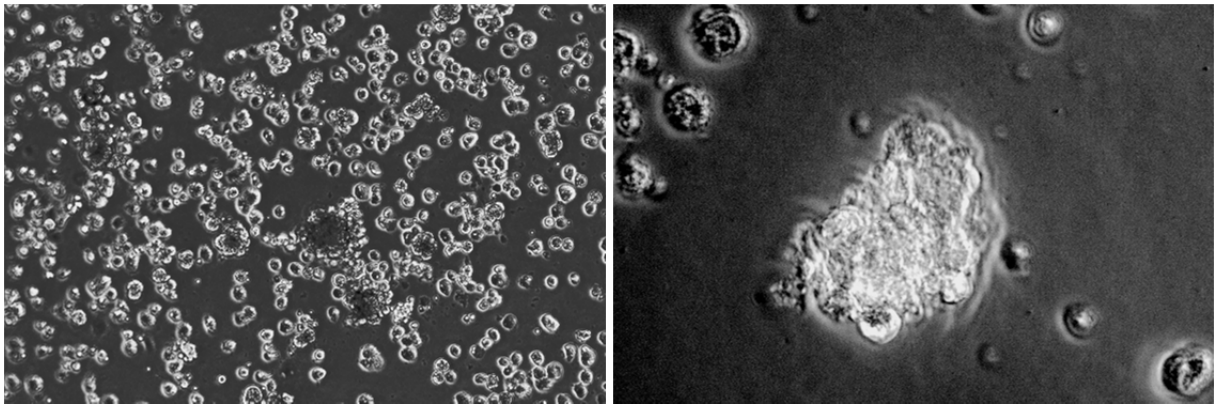
MATERIÁL A METODIKA

K izolácií buniek Langerhansových ostrovčekov bolo použité operačne získané tkanivo pankreasu potkana (samec, kmeň Sprague Dowley, štandardná diéta). Takto získané tkanivo bolo purifikované v predhriatom HBSS roztoku (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,44 mM KH_2PO_4 , 0,22 mM Na_2HPO_4 , 1,3 mM CaCl_2 , 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4,2 mM NaHCO_3 , 0,1 % glukóza, sterilizované autoklávaním). K takto pripravenému preparátu tkaniva z celého pankreasu bolo pridaných 2,5 ml roztoku kolagenázy ($1,4 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v 10 mM HEPES roztoku HBSS) vo forme jeho vpichovania pomocou injekčnej striekačky. Následne bolo toto tkanivo prenesené do skúmavky s 2,5 mL roztoku kolagenázy a inkubované 10 minút vo vodnom kúpeli pri teplote 37 °C. Následne bola takto získaná bunková suspenzia trikrát prepláchnutá 5 mL premývacieho roztoku (10 % FBS v 10 mM HEPES v HBSS roztoku) a po jemnom premiešaní centrifugovaná (300 G, 10 min, 25 °C). Následne bol pelet rozsuspendovaný v premývacom roztoku, homogenizovaný cez 100 μm bunkové sitko a opätovne centrifugovaný (400 G, 10 min, 25 °C). Vzniknutý pelet bol po opätovnom rozsuspendovaní v premývacom roztoku (3 mL) podrobený separácií pomocou gradientovej centrifugácie (ficoll, hustota $1,100 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 1000 G, 25 min, 25 °C). Medzifáza obsahujúca Langerhansové ostrovčeky bola prenesená do novej skúmavky a päťkrát premytá premývacím roztokom (rozsuspendovaná v 3 mL premývacieho roztoku, centrifugovaná - 400 G, 10 min, 25 °C). Takto pripravená bunková kultúra bola kultivovaná v 5 mL kultivačného média (90 % DMEM, 10 % FBS, penicilín/streptomycín), 5 % CO_2 , 100 % vlhkosti, 37 °C). Kultivačné médium bolo menené po 24 hodinách. Viabilita buniek bola stanovená pomocou MTT testu (Carter a kol. 2009).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto práce bolo vytvoriť metodiku efektívnej izolácie Langerhansových ostrovčekov pri súčasnom zachovaní ich viability. Bolo možné pozorovať, že výsledky jednotlivých izolácií však vykazovali určité rozdiely v závislosti na spôsobe získania tkaniva, ako aj jeho kvalitatívnych vlastností. Značnú komplikáciu predstavovala skutočnosť výskytu zvyškov okolitého tkaniva okolo pankreatického tkaniva, ktoré značne sťažovali proces izolácie. Ako jedna z kľúčových úloh predstavovala získanie čistej kultúry buniek Langerhansových ostrovčekov. Aplikáciou už popísanej izolačnej metodiky boli získané bunky vo veľmi čistej forme, čo bolo verifikované pomocou optickej mikroskopie (obrázok 2). Ďalším kvalitatívnym ukazovateľom získaných Langerhansových ostrovčekov bol ich počet a viabilita. Počet buniek bol zisťovaný pomocou Bürkerovej počítacej komôrky, ako aj pomocou počítaním na mriežke. Obe metodiky sa ale ukázali ako nepostačujúce, keďže ich opakovateľnosť nevykazovala signifikantné výsledky. Viabilita Langerhansových ostrovčekov bola stanovená pomocou MTT testu použitím štandardnej metodológie. Vzhľadom na skutočnosť, že určenie viability Langerhansových ostrovčekov bola publikovaná len v minimálnom merítku, sú tieto výsledky ťažko porovnateľné.

Touto modifikovanou metodikou izolácie Langerhansových ostrovčekov bolo ukázané, že doterajšie metódy izolácie majú značný potenciál zvýšenia ich kvality v zmysle dosiahnutia biologicky hodnotnejšieho výstupu. Tento fakt je kľúčovým predovšetkým pre aplikácie Langerhansových ostrovčekov v oblasti liečby diabetes mellitus.



Obr. 1: Stanovenie počtu buniek Langerhansových ostrovčekov pomocou mriežky (vľavo);
Obr. 2: Vizualizácia Langerhansoveho ostrovčeka pomocou optickej mikroskopie (vpravo)

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Barkai U, Rotem A, De Vos P. Survival of encapsulated islets: More than a membrane story. *World Journal of Transplantation*. 2016; 6:69.
2. Carter J, Dula S, Corbin K, Wu R, Nunemaker C. A practical guide to rodent islet isolation and assessment. *Biological Procedures Online*. 2009; 11:3-31.
3. Elayat A, El-Naggar M, Tahir M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *Journal of anatomy*. 1995; 186:629-37.
4. Ionescu-Tirgoviste C, Gagniuc P, Gubceac E, Mardare L, Popescu I, Dima S, Militaru M. A 3D map of the islet routes throughout the healthy human pancreas. *Scientific Reports*. 2015; 5:14634.
5. King A. The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*. 2012; 166:877-894.
6. Kopska T, Furstova V, Kovar J. Modified Method for Isolation of Langerhans Islets From Mice. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40:3611-3614.
7. Shapiro J, Lakey J, Ryan E, Korbitt G, Toth E, Warnock G, Kneteman N, Rajotte R. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen. *New England Journal of Medicine*. 2000; 343:230-238.

STIMULÁCIA PRODUKCIE VYBRANÝCH SEKUNDÁRNYCH METABOLITOV RODU *HYPERICUM* ENDOFYTICKÝMI HUBAMI

Bálintová M., Lendacká A., Čellárová E.

Ústav biologických a ekologických vied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice

ABSTRAKT

Zástupcovia rodu *Hypericum* produkujú mnohé biologicky zaujímavé látky. Špecifickými metabolitmi rodu sú hypericíny, ktoré sa využívajú vo fotodynamicknej terapii, čo podnietilo výskum biotechnologickej alternatívy produkcie hypericínov v podmienkach *in vitro*. V doterajších prácach sa sledoval vplyv viacerých stresorov na explantátové kultúry rodu *Hypericum*, ale doteraz nebol skúmaný vplyv endofytických húb. Cieľom tejto práce bolo stimulovať produkciu hypericínov, emodínu a floroglucinolov vo vybratých kultúrach *Hypericum spp.* Na elicitáciu sme použili sterilné hýfy endofytických húb *Trichoderma crassum* a *Fusarium oxysporum* izolované z *ex vitro* rastúcich druhov rodu *Hypericum*. Okrem toho sme sledovali aj kombinovaný vplyv týchto húb s chitosanom. Množstvá látok sme analyzovali metódou HPLC. Všetky elicítory najvýraznejšie stimulovali produkciu hypericínov a emodínu v kultúrach výhonkov *H. humifusum*, kde sme zaznamenali 2-násobný nárast obsahu týchto metabolitov po aplikácii elicítora z *F. oxysporum* a chitosanom. Kombinácia oboch húb s chitosanom najlepšie stimulovala produkciu floroglucinolov v kultúrach *H. stellatum*.

ÚVOD

Rastliny patriace do rodu *Hypericum* produkujú rôzne skupiny sekundárnych metabolitov. Vo farmakologickom priemysle sa využíva extrakt z druhu *H. perforatum*, ktorý obsahuje mnohé fenolové látky ako flavonoidy, biflavóny, xantóny alebo emodín, ale najštudovanejšie sú naftodiantróny a floroglucinoly (Nahrstedt a Butterweck, 1997). Za antidepresívne účinky extraktu zodpovedá hyperforín inhibujúci spätné vstrebávanie neurotransmiterov synaptickou membránou (Butterweck, 2003). V súčasnosti sa výskum zameriava na hypericíny, ktoré sa využívajú ako fotosenzibilizátory pri fotodynamicknej terapii a diagnóze nádorov (Jendželovská a kol., 2016). Obsah týchto látok vo voľne rastúcich rastlinách je okrem genetickej determinácie výrazne ovplyvnený aj prírodnými podmienkami. Po úspešnej introdukcii rastlín do podmienok *in vitro* sa začalo úsilie zameriavať na štúdium možností regulácie sekundárneho metabolizmu aplikáciou elicítorov s cieľom dosiahnuť zvýšenú produkciu sledovaného metabolitu. Elicitácia využíva schopnosť niektorých molekúl vyvolať obrannú odpoveď rastlín. Biotické elicítory odvodené z patogénnych húb *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus flavus*, *Phoma exigua* a *Botrytis cinerea* stimulovali produkciu hypericínov, hyperforínu a flavonoidov v kultúrach *H. perforatum* (Sirvent a Gibson, 2002; Gadzovska-Simic a kol., 2012; Gadzovska-Simic a kol., 2015). Takéto elicítory ale negatívne ovplyvňujú nárast biomasy a vyvolávajú nekrózu pletív. Alternatívu môžu predstavovať elicítory odvodené z endofytických húb, ktoré žijú v pletivách hostiteľskej rastliny bez evidentných prejavov patogenézy (Bacon a White, 2000). Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv endofytických húb na produkciu látok kultúrami rodu *Hypericum*.

MATERIÁL A METODIKA

V práci boli použité kultúry výhonkov zástupcov rodu *Hypericum* kultivované v podmienkach *in vitro* na Katedre genetiky PF UPJŠ. Zásobné kultúry boli kultivované na bazálnom MS médiu s obsahom makroelementov a mikroelementov podľa Murashige a Skoog (1962) a vitamínmi podľa Gamborg a kol. (1968), 30 g.l⁻¹ sacharózy, 7 g.l⁻¹ agaru a 2 mg.l⁻¹ glycínu. Kultúry boli umiestnené v kultivačnej miestnosti pri teplote 24 °C, fotoperióde 16/8 hod., 30% relatívnej vlhkosti a iradiácii 95 μmol.m⁻².s⁻¹. Na prípravu elicítora boli huby

kultivované v PDB (potato-dextrose broth) po dobu 4 týždňov (*T. crassum*) alebo 6 týždňov (*F. oxysporum*) pri teplote 28 °C v termostate na trepačke pri 130 ot/min. Narastené hýfy boli prefiltrované, rozdrvené v trecej miske a zriedené destilovanou vodou v pomere 1:10. Z výslednej sterilnej zmesi bol pridaný 1 ml do tekutého MS média. V experimentoch s chitosanom (10 mg.l⁻¹ a pH = 5,63) bol 1 ml pridaný ku kultúram po 14. dňoch od začatia kultivácie s elicítom z húb. Dĺžka kultivačného intervalu bola 28 dní.

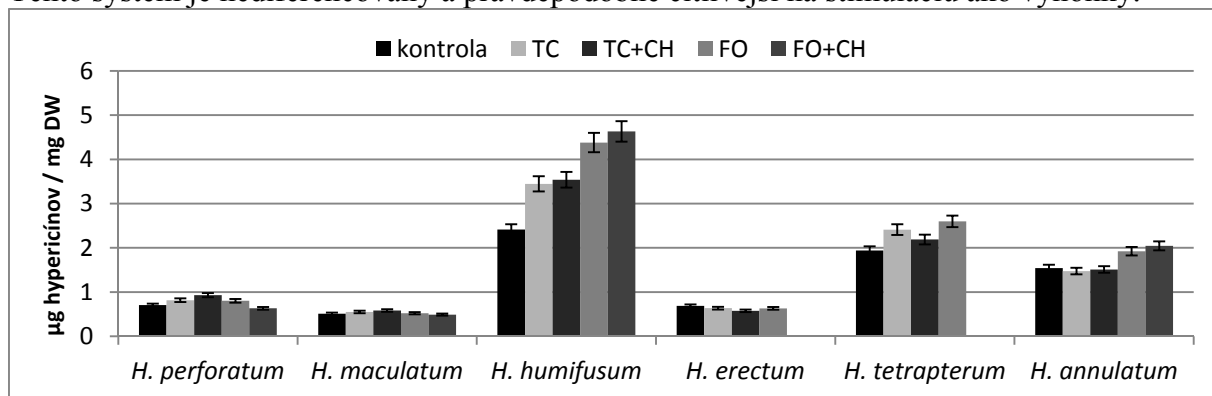
Vzorka bola pripravená z 50 mg zhomogenizovanej sušiny extrahovanej 1,5 ml zmesi metanolu: etanolu: acetónu v pomere 1:1:1. Vzorky boli inkubované 30 min. v ultrazvukovej vani pri 20°C a následne centrifugované 20 min. pri 14000 rpm. Množstvo sledovaných látok bolo stanovené gradientovou vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou na prístroji Agilent Technologies 1 200 Infinity Series s kovovou kolónou Agilent Poroshell C18 3.0x50 mm s veľkosťou častíc 2,7 µm. Mobilná fáza pozostávala z acetonitrilu (Tab. 1). Látky boli identifikované DAD lampou podľa retenčného času a obsah bol prepočítaný z kalibračných kriviek externých štandardov. Uskutočnili sa dve nezávislé opakovania experimentov.

Tab. 1: Gradient mobilnej fázy pre stanovenie hypericínov, emodínu a floroglucinolov

Roztok	0 min.	8,5 min.	9,5 min.	16,7 min.	20 min.
A (10% acetonitril)	80 %	20 %	0 %	80 %	80 %
B (100% acetonitril)	20 %	80 %	100 %	20 %	20 %

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pre stimuláciu produkcie sledovaných metabolitov sme ku kultúram výhonkov vybraných zástupcov rodu *Hypericum* exogénne pridali elicítor odvodený z *T. crassum* (TC) alebo *F. oxysporum* (FO). TC elicítor najvýraznejšie stimuloval produkciu emodínu 1,42-násobne a produkciu hypericínov 1,83-násobne v porovnaní s kontrolou v druhu *H. humifusum*. Elicitačný vplyv TC hýf sa prejavil aj v druhu *H. tetrapterum*, kde došlo ku 1,25-násobnému nárastu obsahu emodínu a hypericínov. V ďalších druhoch sa obsah týchto metabolitov nezmenil (Obr.1). TC mal negatívny vplyv na produkciu floroglucinolov výhonkami *H. humifusum*, *H. kouytchense* a *H. monogynum*, v ktorom bola akumulácia znížená 3-násobne (Obr.2). Výraznejší stimulačný efekt mal FO elicítor. V druhu *H. humifusum* došlo k 1,8- a v druhu *H. tetrapterum* k 1,35-násobnému nárastu obsahu emodínu aj hypericínov (Obr.1). Na rozdiel od TC, FO elicítor stimuloval produkciu floroglucinolov v kultúrach *H. stellatum* (Obr.2). Gadzovska-Simic a kol. (2015) zaznamenali vplyvom elicítora z *F. oxysporum* 3-násobný nárast obsahu naftodiantrónov v bunkových suspenzných kultúrach *H. perforatum*. Tento systém je nediferencovaný a pravdepodobne citlivejší na stimuláciu ako výhonky.

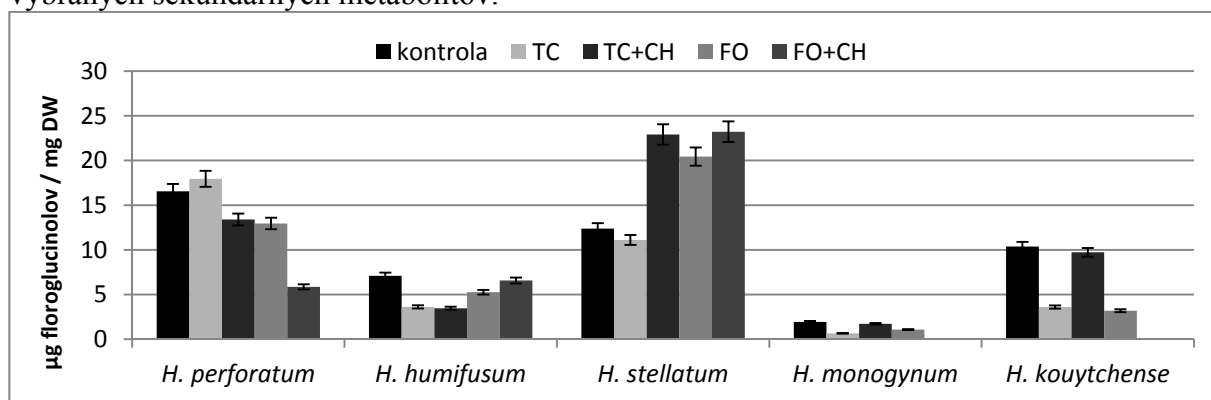


Obr. 1: Zmena obsahu hypericínu, pseudohypericínu a ich protofóriem v kultúrach elicítovaných *T. crassum* (TC), *F. oxysporum* (FO) a ich kombináciou s chitosanom (CH)

V ďalších experimentoch sme sledovali kombinovaný efekt predkultivácie rastlín s elicítom odvodeným z endofytických húb a pridaného chitosanu (CH). Chitosan je lineárny polysacharid pripravovaný deacetyláciou chitínu bunkových stien húb, ktorý svojimi

účinkami imituje vplyv patogénnych húb. Množstvo hypericínov a emodínu sa zvýšilo 1,3-násobne vo výhonkoch *H. perforatum* po použití TC+CH, ale kombinovaný vplyv FO+CH spôsobil 2-násobný pokles množstva emodínu. V *H. annulatum* sme tiež zaznamenali 1,3-násobný nárast hypericínov, ale množstvo emodínu bolo počas všetkých experimentov, vrátane kontrolných výhonkov, pod detekčným limitom metódy. Kultúry *H. humifusum* boli citlivejšie k obojm kombináciám elicitorov. Obsah naftodiantrónov vzrástol 1,5-násobne po kultivácii s TC+CH a až 2-násobne po kultivácii s FO+CH (Obr.1). Obsah floroglucinolov sa zvýšil iba v kultúrach *H. stellatum*, a to 1,85-násobne (Obr.2).

Napriek dlhodobým snahám o stimuláciu produkcie hypericínov v rôznych elicitačných systémoch, neboli doteraz zaznamenané žiadne výrazné výsledky. Toto je prvá práca skúmajúca vplyv endofytických húb, pričom sa nám čiastočne podarilo stimulovať produkciu vybraných sekundárnych metabolitov.



Obr. 2: Zmena obsahu floroglucinolov v kultúrach elicítovaných *T. crassum* (TC), *F. oxysporum* (FO) a ich kombináciou s chitosanom (CH)

Práca bola financovaná z grantov APVV-14-0154 a VEGA 1/0090/15.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bacon CW, White JF. Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. s. 3-5. ISBN 0-8247-8831-1.
- Butterweck V. Mechanism of action of St John's Wort in depression: What is known? CNS Drugs. 2003; 17 (8):539-562.
- Gadzovska-Simic S, Tusevski O, Maury S, Hano Ch, Delaunay A, Chabbert B, Lamblin F, Lainé E, Joseph C, Hagéhe D. Fungal elicitor-mediated enhancement in phenylpropanoid and naphthodianthrone contents of *Hypericum perforatum* L. cell cultures. Plant Cell Tiss Organ Cult. 2015; 122:213-226.
- Gadzovska-Simic S, Tusevski O, Antevski S, Atanasova-Pancevska N, Petreska J, Stefova M, Kungulovski D, Spasenoski M. Secondary metabolite production in *Hypericum perforatum* L. cell suspensions upon elicitation with fungal mycelia from *Aspergillus flavus*. Arch Biol Sci. 2012; 64 (1):113-121.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res. 1968; 50 (1):151-158.
- Jendželovská Z, Jendželovský R, Kuchárová B, Fedoročko P. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. Front Plant Sci. 2016; 7:560.
- Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol Plant. 1962; 15:473-497.
- Nahrstedt A, Butterweck V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. Pharmacopsychiat. 1997; 30:129-134.
- Sirvent T, Gibson D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. Physiol Mol Plant P. 2002; 60:311-320.

TESTOVANIE CITLIVOSTI *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* NA OBSAHOVÉ LÁTKY LIEČIVÝCH RASTLÍN

Böhmová E., Čonková E., Sihelská Z., Harčárová M.

Katedra farmakológie a toxikológie, Ústav farmakológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Kvasinky rodu *Malassezia* patriace medzi prirodzenú kožnú mikroflóru teplokrvných stavovcov, vo väčšine prípadov spôsobujú oportúnne infekcie. Malassezie je možné izolovať od ľudí a takmer všetkých domácich a voľne žijúcich zvierat. Medzi najrozšírenejšie prípravky používané v súčasnosti na liečbu mykotických ochorení v klinickej praxi patria azolové antimykotiká, avšak pozornosť sa začína upriamovať aj na alternatívne možnosti terapie, ako sú esenciálne oleje alebo ich obsahové látky. Cieľom našej práce bolo otestovať citlivosť kvasinky *M. pachydermatis* na vybrané obsahové látky silíc. Pre určenie citlivosti bola použitá disková difúzna metóda. Po 72 h inkubácii boli zmerané veľkosti vzniknutých inhibičných zón. Ako najúčinnejšie obsahové látky sa javili karvakrol, eugenol a mentol.

ÚVOD

Kvasinky rodu *Malassezia* sú lipofilné organizmy, ktoré sa prirodzene vyskytujú na koži teplokrvných stavovcov, avšak pri pôsobení vhodných predispozičných faktorov (zmeny prostredia povrchu kože alebo zníženie imunity hostiteľa), sa môžu stať patogénnymi a spôsobiť kožné ochorenia, systémové choroby či dermatitídy u ľudí a rôznych druhov zvierat (Ashbee a Evans, 2002; Cabañes, 2014). V súčasnosti je známych 16 druhov malassezií, ktoré je možné izolovať takmer od všetkých homoiotermných stavovcov (Galuppi a Tampieri, 2008; Cabañes, 2016). Najčastejšie izolovaným zoofilným druhom je *M. pachydermatis*, ktorá je často spojená so zápalom vonkajšieho zvukovodu a rôznymi dermatitídami domácich zvierat. Zvyčajne sa vyskytuje u psov, menej u mačiek a relatívne zriedkavo môže byť izolovaná od iných zvierat (Cabañes, 2014). Rovnako ako v humánnej, tak aj vo veterinárnej medicíne, fungálne ochorenia môžu vykazovať rezistenciu na klasické antimykotiká, čo odôvodňuje hľadanie nových alternatívnych možností terapie. Záujem sa zameriava na možnosti využitia liečivých rastlín a ich obsahových látok, ktoré majú široké spektrum antifungálnych vlastností a sú šetrné k životnému prostrediu (biologicky odbúrateľné, nezanechávajú toxické reziduá alebo vedľajšie produkty, ktoré by znečisťovali životné prostredie) (Pedersen a kol., 2007; Koul a kol., 2008; AbdelKader a kol., 2011).

MATERIÁL A METODIKA

Antifungálna aktivita vybraných obsahových látok silíc (eugenol, karvakrol, mentol a terpinén) bola testovaná diskovou difúznou metódou na 12 izolátoch *M. pachydermatis*, ktoré boli získané od psov. Pre druhovú identifikáciu izolátov bola použitá metóda podľa Kaneko a kol. (2007). Na testovanie bola použitá suspenzia kvasiniek o hustote 10^6 CFU.ml⁻¹, ktorá zodpovedá hodnote 1 McFarlanda. Suspenzia kvasiniek bola nanosená pomocou sterilného tampónu na Sabouraudov dextrózový agar s chloramfenikolom (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) v troch smeroch, dvakrát za sebou s 15 minútovým odstupom. Na povrch inokulovanej platne boli aplikované čisté disky, ktoré boli impregnované obsahovými látkami v množstve 15 µl. Obsahové látky boli použité v 50 % a 5 % koncentracii. Eugenol, karvakrol a terpinén boli nariadené na požadovanú koncentráciu parafínom, mentol bol riedený 96% etanolom. Ako kontroly boli použité disky impregnované čistým parafínom a etanolom. Platne boli následne inkubované pri 32 °C a po 72 hodinách boli zmerané zóny inhibície, na základe ktorých sa hodnotila účinnosť testovaných látok. Ako interpretačné kritérium bola zvolená 2-násobná veľkosť disku (12 mm).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvyššia účinnosť obsahových látok v 50 % koncentrácii bola zaznamenaná pri karvakrole, eugenole a mentole, na ktoré bolo citlivých všetkých 12 izolátov. Antimykotická účinnosť terpinénu bola len 67 %. V 5 % koncentrácii bola antifungálna účinnosť pozorovaná len pri karvakrole, na ktorý bolo citlivých 50 % testovaných izolátov *M. pachydermatis*. Ostatné obsahové látky v tejto koncentrácii nevykazovali žiadnu antifungálnu aktivitu.

Mnoho autorov uvádza vo svojich prácach vysokú aktivitu karvakrolu a mentolu voči mikroskopickým hubám a kvasinkám. Abbaszadeh a kol. (2014) uvádzajú signifikantnú antifungálnu aktivitu pri testovaní karvakrolu na rôzne druhy húb. Tyagi a kol. (2013) testovali pepermintový olej s obsahom mentolu (24,3 %) na rôzne druhy kvasiniek diskovou difúznou metódou a pozorovali veľké zóny inhibície.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0377.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*. 2014, 24: e51-e56.
2. Ashbee HR, Evans EGV. Immunology of diseases associated with *Malassezia* species. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15, 1, p. 21–57.
3. Abdel-Kader M, El-Mougy N, Lashin S. Essential oils and *Trichoderma harzianum* as an integrated control measure against faba bean root pathogens. *J. Plant Prot. Res.* 2011, 51 (3), 306–313.
4. Cabañes FJ. *Malassezia* Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals? *PLoS Pathog* 2014, 10(2): e1003892.
5. Cabañes FJ, Coutinho SD, Puig L, Bragulat MR, Castellá G.. New lipid-dependent *Malassezia* species from parrots. *Rev Iberoam Micol.* 2016, 33(2):92-9.
6. Galuppi R, Tampieri MP. 2008. Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. *Parassitologia* 50, 1-2: 73-76.
7. Kaneko T, Makimura K, Abe M, a kol. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. *Journal of Clinal Microbiology* 45, 2007, 11: 3737-3742.
8. Koul O., Walia S., Dhaliwal G.S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. *Biopestic. Int.*, 2008, Vol.4, pp. 63-84.
9. Pedersen K, Jensen H, Finster K, Jensen VF, Heuer OE. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60, 775–781.
10. Tyagi AK, Gottardi D, Malik A, Guerzoni ME. Anti-yeast activity of menthe oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food chemistry*. 2013, 137, 108-114.

ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA EXOPOLYSACHARIDOV IZOLOVANÝCH Z *LACTOBACILLUS REUTERI*

Brudňáková M.¹, Fedorová M.², Reiffová K.¹, Nemcová R.³

¹Katedra analytickej chémie, UPJŠ, Košice, ²Katedra lekárenstva a sociálnej farmácie, UVLF, Košice, ³Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Práca bola zameraná na sledovanie účinku exopolysacharidov izolovaných z *Lactobacillus reuteri* a komerčne dostupného exopolysacharidu – dextranu na inhibíciu tvorby biofilmov u patogénnych kmeňov *Staphylococcus aureus* a *Proteus mirabilis*. Testované exopolysacharidy vykazovali signifikantný inhibičný účinok na tvorbu biofilmu u testovaných patogénov, pričom efekt bol výraznejší u exopolysacharidov získaných z kmeňov *Lactobacillus reuteri*. Výsledky štúdie preukázali pozitívnu koreláciu medzi koncentráciou exopolysacharidov a ich antibiofilmovým účinkom.

ÚVOD

Infekcie spôsobené biofilmami sú signifikantným problémom chronických a dlhotrvajúcich infekcií. Odhaduje sa, že 80% mikrobiálnych infekcií sa spája s tvorbou biofilmov, pričom rast mikroorganizmov v biofilme môže zvyšovať ich rezistenciu resp. perzistenciu na antibiotiká. Z toho dôvodu ATB terapia biofilmových infekcií je veľmi obtiažna a mnohokrát nedostatočná, preto tieto infekcie majú dlhodobý a často rekurentný charakter (Satpathy a kol., 2016). V celosvetovom meradle prevláda snaha o hľadanie nových prístupov resp. cielených a racionálnych stratégií riešenia tejto problematiky bez rizika navodenia rezistencie. Doterajšie literárne štúdie poukazujú na možný antibiofilmový potenciál niektorých bakteriálnych produktov. Bakteriálne exopolysacharidy (EPS) sú hlavným komponentom EM biofilmov a poskytujú bunkám celý rad biologických funkcií, vrátane ochrany pred vonkajším prostredím (Pletzer a kol., 2016). Štruktúra EPS je vysoko variabilná a pozorovania naznačili, že špecifické EPS môžu zabrániť aj adhézii patogénnym druhom a vývoju biofilmov. Viaceré štúdie naznačujú, že EPS pochádzajúce z laktobacilov môžu inhibovať adhérenciu patogénnych baktérií, ovplyvňovať expresiu faktorov virulencie a *quorum sensing* (Pradeepa a kol., 2016). Cieľom práce bolo testovanie antibiofilmového účinku EPS izolovaných z kmeňov *L. reuteri* voči vybraným patogénom a porovnanie ich efektu s komerčným EPS – dextranom.

MATERIÁL A METODIKA

Použitie bakteriálne kmene – Na izoláciu exopolysacharidov sme použili kmeň *Lactobacillus reuteri* L26 izolovaný z čreva prasiat a kmeň *Lactobacillus reuteri* SL16 izolovaný z čreva hydiny. Komerčne dostupný EPS – dextran izolovaný z *Leuconostoc mesenteroides* bol získaný z firmy Sigma. Ako patogénne kmene tvoriace biofilm boli vybrané kmene *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a naše klinické izoláty, *Proteus mirabilis* a *S. aureus* 109.

Izolácia EPS – EPS boli izolované metódou extrakcie, precipitáciou etanolom. Jednotlivé koncentrácie (0,5; 2; 5; 10; 15 mg.ml⁻¹) EPS a dextranu boli pripravené rozpustením v PYG médiu a upravené na hodnotu pH 7.

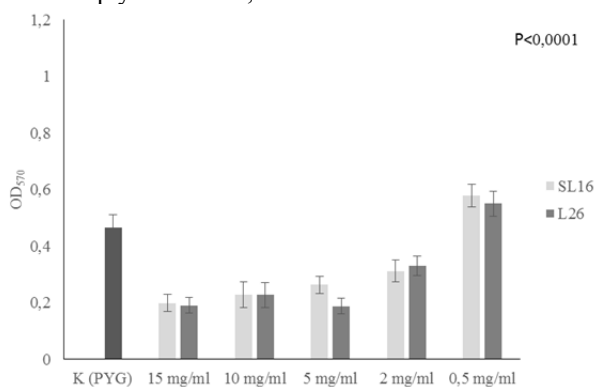
Testovanie antibiofilmovej aktivity – Na prípravu štandardizovanej suspenzie patogénnych kmeňov sme použili solitárne kolónie z BHI agaru, ktoré sme resuspendovali v 5 ml fyziologického roztoku a upravili OD na hodnotu 1 Mc Farland. Efekt EPS a dextranu na tvorbu biofilmu bol testovaný pridaním 100 µl príslušného patogénneho kmeňa k pripraveným roztokom EPS a dextranu. Pre hodnotenie tvorby biofilmu bol vybraný model statického biofilmu - *Microtitre Plate System*. Kapacita vytvoreného biofilmu bola hodnotená po 24 hodinách inkubácie pri 37 °C v polystyrénovej mikrotitračnej platničke (crystal violet

assay) podľa O'Toole a kol. (1999). Na základe získaných hodnôt absorbanie pri vlnovej dĺžke 570 nm (*Mikrobiologický mikroplatničkový multianalýzátor Synergy 4*) sme za tvorbu biofilmu považovali absorbanciu vyššiu ako 0,1. Ako pozitívna kontrola bol použitý PYG bujón bez prídavku EPS alebo dextranu. Kmene boli testované najmenej v troch nezávislých experimentoch, každý s 8 opakovaniami. Výsledky sú prezentované ako aritmetický priemer nameraných hodnôt \pm smerodajná odchýlka. Pre vyhodnotenie výsledkov sme použili jednorozmernú analýzu rozptylu (ANOVA) s doplnkovým Tukeyho testom v štatistickom programe GraphPad Prism verzia 3.00.

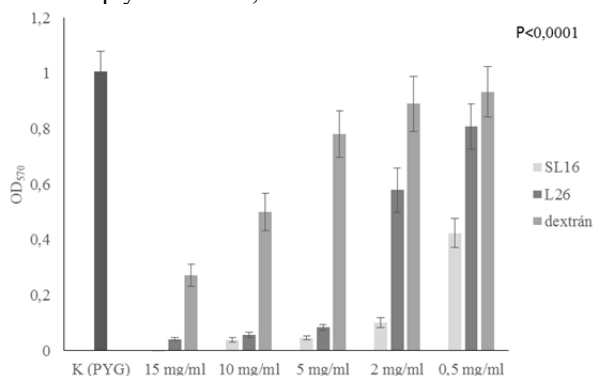
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky našej štúdie preukázali, že laktobacilové EPS môžu inhibovať tvorbu biofilmu u *S. aureus* a *P. mirabilis* (Grafy č. 1 – 3). Rast biofilmov u *S. aureus* CCM 3953 v prítomnosti obidvoch laktobacilových EPS (2 až 15 mg.ml⁻¹) bol signifikantne nižší ($p < 0,001$) oproti kontrole. Pri koncentrácii 0,5 mg.ml⁻¹ nebol zaznamenaný inhibičný efekt. Rast biofilmov u *S. aureus* 109 bol signifikantne nižší ($p < 0,001$) oproti kontrole pri všetkých testovaných koncentráciách laktobacilových EPS. Podobný účinok mal aj dextran s výnimkou najnižšej testovanej koncentrácie kde nebol zaznamenaný signifikantný inhibičný efekt. Výraznejší antibiofilmový efekt preukazoval EPS získaný z kmeňa *L. reuteri* SL16 ($p < 0,001$) v prípade nižších koncentrácií (2 a 0,5 mg.ml⁻¹) v porovnaní s EPS z kmeňa *L. reuteri* L26. Laktobacilové EPS preukazovali signifikantne vyšší ($p < 0,001$) antibiofilmový účinok v porovnaní s dextranom. V prípade *P. mirabilis*, rast biofilmov bol signifikantne nižší ($p < 0,001$) oproti kontrole pri všetkých testovaných koncentráciách laktobacilových EPS, pričom oba EPS vykazovali rovnaký inhibičný efekt. V prípade dextranu, inhibičný efekt na tvorbu biofilmu bol zaznamenaný pri koncentrácii 15 mg.ml⁻¹ ($p < 0,01$) a 0,5 mg.ml⁻¹ ($p < 0,001$). Laktobacilové EPS preukazovali signifikantne vyšší ($p < 0,001$) antibiofilmový účinok v porovnaní s dextranom.

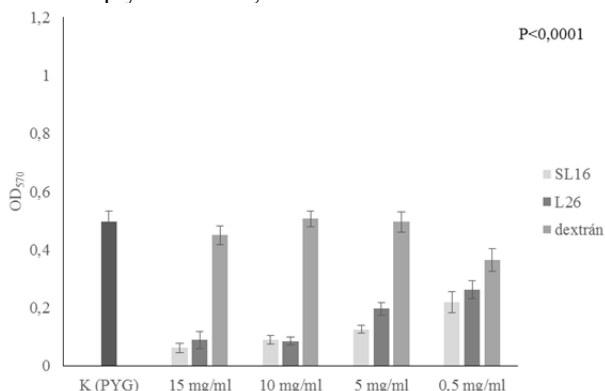
Graf 3 Vplyv EPS L26, SL16 na tvorbu biofilmu u *S. aureus* CCM 3953



Graf 2 Vplyv EPS L26, SL16 a dextranu na tvorbu biofilmu u *S. aureus* 109



Graf 3 Vplyv EPS L26, SL16 a dextranu na tvorbu biofilmu u *P. mirabilis*



Hoci spôsob účinku antibiofilmových EPS zatiaľ nie je úplne známy, žiaden z doteraz identifikovaných komponentov nevykazoval bakteriostatickú alebo bakteriocídnu aktivitu. Tento údaj potvrdzujú aj naše pozorovania, nakoľko sme nezaznamenali po kultivácii patogénov v mikrotitračných platničkách inhibíciu ich rastu. Jedným z hypotetických mechanizmov antibiofilmového účinku EPS je, že pôsobia ako surfaktanty a modifikujú fyzikálne vlastnosti bakteriálnych buniek a abiotických povrchov. Napríklad EPS *E. coli* K2 zvyšujú hydrofilnosť skleneného povrchu a znížením hydrofobicity povrchu baktérií inhibujú autoagregáciu *E. coli* sprostredkovanú intercelulárnymi adhezínmi. Podobný účinok bol zaznamenaný aj u *L. acidophilus* rEPS (Kim a kol., 2009) a *Streptococcus phocae* P180 EPS (Kanmani a kol., 2011). Predpokladáme, že možným mechanizmom antibiofilmového účinku nami testovaných EPS by mohla byť produkcia antiadhezívnych látok laktobacilmi, ktoré modifikujú fyzikálne vlastnosti bakteriálnych buniek a abiotických povrchov alebo modulujú expresiu génov zodpovedných za adhérenciu a tvorbu biofilmu u testovaných patogénov. Štúdia Chen a kol. (2014) popisuje produkciu EPS reuteranu u kmeňov *Lb. reuteri* TMW1.656 a *Lb. reuteri* LTH5794, ktorý bránil adhézií enterotoxigénneho kmeňa *E. coli* K88 na povrch intestinálneho *in vivo* modelu. Tento náš predpoklad môže byť podnetom pre ďalšie skúmanie mechanizmu ich antibiofilmového účinku ako potenciálnej therapeutickej stratégie voči biofilm tvoriacim infekciám.

Práca bola podporená projektom VVGS-PF-2016-72630 a projektom VEGA 1/0081/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Chen, X. Y., Woodward, A., Zijlstra, R. T., & Gänzle, M. G. Exopolysaccharides synthesized by *Lactobacillus reuteri* protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* in piglets. *App Environ Microbiol.* 2014; 80:5752–5760
2. Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. Production and purification of a novel exopolysaccharide from lactic acid bacterium *Streptococcus phocae* P180 and its functional characteristics activity in vitro. *Bioresour Technol.* 2011; 102:4827–4833.
3. Kim, S. W., Chang, I. M., & Oh, K. B. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by medicinal plants. *Biosci Biotech Bioch.* 2002; 66:2751-2754.
4. O'Toole, G. A., Pratt, L. A., Watnick, P. I., Newman, D. K., Weaver, V. B., Kolter, R. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology.* 1999; 310:91-109.
5. Pletzer, D., Coleman S. R., Hancock, R. E. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 33:35-40.
6. Pradeepa Shetty, A. D., Matthews, K., Hegde, A. R., Akshatha, B., Mathias, A. B., Mutalik, S., Vidya, S. M. Multidrug resistant pathogenic bacterial biofilm inhibition by *Lactobacillus plantarum* exopolysaccharide. *Bioact Carbohydr Diet Fibre.* 2016; 8:7-14.
7. Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., Raut, S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2016; 7:56-66.

OXIDAČNÝ METABOLIZMUS MAKROFÁGOV MYŠÍ PO PROBIOTICKEJ TERAPII A INFEKCIÍ *TRICHINELLA SPIRALIS*

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

¹Parazitologický ústav, SAV, Košice,

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo sledovať metabolickú aktivitu peritoneálnych makrofágov myši po probiotickej terapii a infekcii *Trichinella spiralis*. Kmene (*Enterococcus faecium* EF55, *Enterococcus faecium* 2019 = CCM 7420, *Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558, *Enterococcus durans* ED26E/7, *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7421, *Lactobacillus plantarum* 17L/1) boli podávané myšiam denne v dávke 100 μ l (10^9 KTJ.ml⁻¹) a myši boli infikované 400 larvami *T. spiralis* na 7. deň probiotickej terapie. Koncentrácia O₂⁻ v peritoneálnych makrofágoch bola stanovená spektrofotometricky. Kmene *E. faecium* EF55 a *E. faecium* AL41 zvýšili produkciu O₂⁻ na 7. deň aplikácie, pred parazitárnou infekciou. Podávanie laktobacilov a enterokokov myšiam signifikantne stimulovalo metabolickú aktivitu makrofágov počas celého experimentu, s výnimkou 18. dňa po infekcii (p.i.), kedy u myši s aplikáciou *E. durans* ED26E/7 došlo k výraznému potlačeniu tvorby superoxidového aniónu. Najvýraznejší imunomodulačný účinok na metabolickú aktivitu peritoneálnych makrofágov počas črevnej fázy infekcie *T. spiralis* vykazovali kmene *E. faecium* 2019 a *E. faecium* AL41, počas svalovej fázy infekcie stimulovali metabolickú aktivitu makrofágov aj kmene *L. fermentum* AD1 a *L. plantarum* 17L/1.

ÚVOD

Makrofágy sú heterogénnou skupinou buniek stojacou na rozhraní špecifickej a nešpecifickej imunity. Patria k profesionálnym antigén prezentujúcim bunkám, sú nevyhnutné v procese fagocytózy, uvoľňujú cytokíny a regulujú zápal (Hořejší a kol., 2013). Polarizujú do dvoch odlišných fenotypov: M1 – klasicky aktivované makrofágy indukované Th1 cytokínmi (prozápalový účinok) a M2 – alternatívne aktivované makrofágy indukované Th2 cytokínmi (protizápalový účinok) (Zawistowska-Deniziak a kol., 2017). Po kontakte s antigénom dochádza k ich stimulácii a produkcii vysokoreaktívnych voľných radikálov: oxidu dusíka a kyslíkových metabolitov, ktoré sú vysoko toxické pre väčšinu patogénov, vrátane parazitov (Kołodziej-Sobocińska a kol., 2006). Superoxidový anión O₂⁻ je základnou zložkou aktivity makrofágov. V makrofágoch vzniká redukciou molekulárneho kyslíka pomocou enzýmu respiračného vzplanutia, NADPH oxidázy. Po aktivácii tohto enzýmu sú produkované veľké množstvá superoxidového aniónu, ktoré rýchlo konvertujú na peroxid vodíka a reaktívne formy kyslíka vykazujúce antimikrobiálny (Wientjes a Segal, 1995) a antiparazitárny účinok (Hughes, 1988). Kyslíkové radikály pôsobia oxidačne na cieľové membrány, proteíny a DNA (Wientjes a Segal, 1995).

Rôzne probiotické baktérie (napr. laktobacily, bifidobaktérie, enterokoky) sa vyznačujú širokou škálou zdraviu prospešných vlastností. Avšak, z týchto benefitov spojených s ich podávaním si najväčšiu pozornosť vedcov získala modulácia imunitného systému (Dongarrá a kol., 2013). Probiotické baktérie sú schopné trvale modulovať ako vrodenuú, tak aj získanú imunitnú odpoveď, a to na lokálnej aj systémovej úrovni. V rámci nešpecifickej imunity je ich imunomodulačná aktivita vyjadrená cez inhibíciu zápalovej odpovede, stimuláciu fagocytárnej aktivity a aktiváciu antigén prezentujúcich buniek (Tsai a kol., 2012).

V tejto práci sme sa zamerali na vyhodnotenie vplyvu probiotických a bakteriocín-produkujúcich bakteriálnych kmeňov na produkciu superoxidového aniónu O₂⁻ v peritoneálnych makrofágoch myši infikovaných *T. spiralis*.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 126 myší BALB/c. Samce s hmotnosťou 18-20 g boli rozdelené do siedmich skupín: Kontrola (n = 18) – infekcia *T. spiralis* bez podávania bakteriálnych kmeňov. 1. skupina (n = 18) – *Enterococcus faecium* EF55 a infekcia *T. spiralis*. 2. skupina (n = 18) – *E. faecium* 2019 = CCM7420 a infekcia *T. spiralis*. 3. skupina (n = 18) – *E. faecium* AL41 a infekcia *T. spiralis*. 4. skupina (n = 18) – *E. durans* ED26/7 a infekcia *T. spiralis*. 5. skupina (n = 18) – *Lactobacillus fermentum* AD1 = CCM7421 a infekcia *T. spiralis*. 6. skupina (n = 18) – *L. plantarum* 17L/1 a infekcia *T. spiralis*.

Bakteriálne kmene boli podávané *per os* denne v dávke 100 μ l (10^9 KTJ.ml⁻¹ v Ringerovom roztoku) počas celého experimentu. Bakteriocín-produkujúce kmene s probiotickým účinkom: *Enterococcus faecium* EF55, izolát z kurčťa, produkujúci enterocín (Ent) 55; environmentálny izolát *E. faecium* AL41, produkujúci Ent M; *E. faecium* 2019 = CCM7420, izolát z trusu králikov produkujúci Ent 2019; *E. durans* ED26E/7, izolát z ovčieho mlieka, produkujúci bakteriocín durancín a probiotický kmeň *Lactobacillus 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.

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

In vitro produkcia O₂⁻ v peritoneálnych makrofágoch bola stanovená spektrofotometrickou metódou podľa Hrčkovej a Velebného (1997), ktorá je založená na redukcii fericytochromu C superoxidodismutázou. Výsledky boli spracované one-way ANOVA a post hoc Tukey testom.

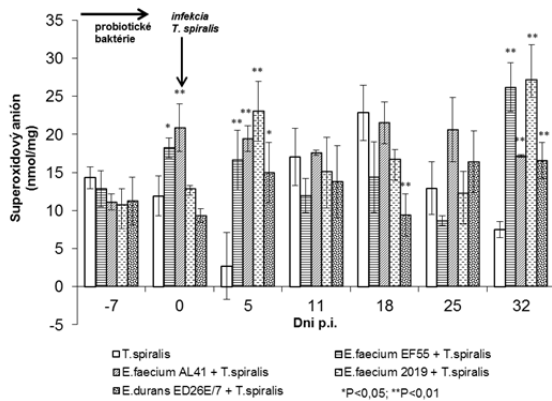
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmene *E. faecium* EF55 a *E. faecium* AL41 výrazne (P<0,05; P<0,01) zvýšili produkciu superoxidového aniónu O₂⁻ v peritoneálnych makrofágoch myši už po 7 dňoch aplikácie, ešte pred infekciou. Enterokoky a laktobacily signifikantne (P<0,05; P<0,01) stimulovali metabolickú aktivitu makrofágov na 5. resp. 11. deň p.i., teda počas črevnej fázy trichinelózy. V našom experimente aplikácia kmeňov *E. faecium* AL41 a *E. faecium* 2019 viedla k 50 % redukcii počtu dospelých trichinel na 11. deň p.i., čo pripisujeme vysokému počtu prozápalových makrofágov M1, ktoré sa spolupodieľajú na hyperkontraktilite a zvýšenej produkcii mucínu, čím prispievajú k odstráneniu parazita z čreva. Navyše v porovnaní s laktobacilmi, enterokoky lepšie adherujú na črevnú sliznicu (Lauková a kol., 2004), a tak bránia uchyteniu parazita medzi črevnými klkami. Na 18. deň p.i. probiotická terapia nemala výrazný vplyv na peritoneálne makrofágy, s výnimkou kmeňa *E. durans* ED26E/7, ktorý spôsobil signifikantnú (P<0,01) supresiu v tvorbe tohto kyslíkového radikálu. Predpokladáme, že myši modulované týmto probiotickým kmeňom vykazovali nízke počty svalových lariev na 18. deň p.i. v dôsledku signifikantne (P<0,01) zvýšenej fagocytárnej aktivity krvných leukocytov (Dvorožňáková a kol., 2016), čo mohlo prispieť k eliminácii novonarodených lariev a zabrániť ich migrácii do svalov. Počas svalovej fázy infekcie došlo opätovne k výraznej (P<0,05; P<0,01) stimulácii tvorby O₂⁻ s maximom na 25. deň p.i. u myši s aplikáciou *L. fermentum* AD1 a *L. plantarum* 17L/1, pri enterokokoch boli maximálne hodnoty zaznamenané na 32. deň p.i. Na základe toho, že vysoká produkcia superoxidového aniónu O₂⁻ pretrvala vo všetkých experimentálnych skupinách až do konca experimentálneho obdobia usudzujeme, že u myši s probiotickou terapiou došlo k zvýšeniu počtu pamäťových buniek.

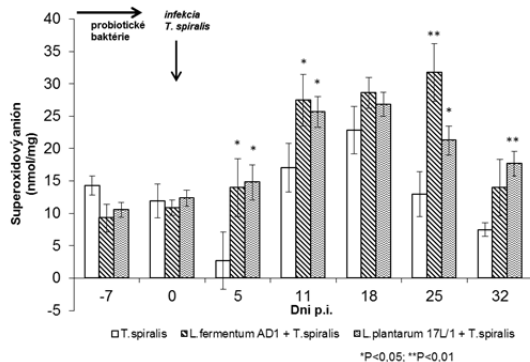
Zvýšenie metabolickej aktivity peritoneálnych makrofágov indukované probiotickou terapiou naznačuje pozitívnu moduláciu imunitnej odpovede hostiteľa pri infekcii *T. spiralis* a perspektívne uplatnenie testovaných kmeňov v terapii trichinelózy.

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

Graf 1. Produkcia superoxidového aniónu v peritoneálnych makrofágoch myší po aplikácii enterokokov a infekcii *T. spiralis*



Graf 2. Produkcia superoxidového aniónu v peritoneálnych makrofágoch myší po aplikácii laktobacilov a infekcii *T. spiralis*



POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Dongarrà ML., Rizzello V., Muccio L., Fries W., Cascio A., Bonaccorsi I., Ferlazzo G. Mucosal immunology and probiotics. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2013; 13: 19-26.
2. Dvorožňáková E., Bucková B., Hurníková Z., Revajová V., Lauková A. Effect of probiotic bacteria on phagocytosis and respiratory burst activity of blood polymorphonuclear leukocytes (PMNL) in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Vet. Parasitol.* 2016; 231: 69-76.
3. Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Spíšek R. *Základy imunologie*. 5. vyd., 2013, 336.
4. Hřčková G., Velebný S. Effect of praziquantel and liposome-incorporated praziquantel on peritoneal macrophage activation in mice infected with *Mesocostoides corti* tetrathyridia (Cestoda). *Parasitology* 1997, 114: 475-482.
5. Hughes HPA. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. *Parasitol. Today* 1988, 4: 340-347.
6. Kołodziej-Sobocińska M., Dvorožňáková E., Dziemian E. *Trichinella spiralis*: Macrophage activity and antibody response in chronic murine infection. *Exp. Parasitol.* 2006, 112: 52-62.
7. Lauková A., Stropfová V., Ouwehand A. Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. *Vet. Res. Commun.* 2004, 28: 647-655.
8. Tsai YT., Cheng PCH., Pan TM. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012, 96: 853-862.
9. Wientjes FB., Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin. Cell Dev. Biol.* 1995, 6: 357-365.
10. Zawistowska-Deniziak A., Basała K., Strojny B., Młocicki D. New data on human macrophages polarization by *Hymenolepis diminuta* tapeworm-An *in vitro* study. *Front. Immunol.* 2017, 8: 148.

TVORBA BIOFILMU U POTRAVINOVÝCH A ENVIRONMENTÁLNYCH STAFYLOKOKOV

Čuvalová A., Kmeť V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Štúdiá sa zamerala na účinky troch vodných extraktov z rastlín a ramnolipidov na tvorbu biofilmu u šiestich kmeňov *Staphylococcus aureus*. Tvorba biofilmu a antibiofilmová aktivita bola stanovená použitím Maxisorp mikrotitračných platničiek. Všetky tri rastlinné extrakty aj ramnolipidy mali inhibičný účinok na tvorbu biofilmu. Najsilnejší antibiofilmový účinok na kmene *S. aureus* mal extrakt z cibule.

Ďalším cieľom bola detekcia génov virulencie vo vzťahu k tvorbe biofilmu. Gén *hla* bol detegovaný u všetkých testovaných kmeňov, gény *sirB*, *agrII* a *clfA* len u 1 izolátu *S. aureus*, rovnako aj gén *icaAD*. Gény *isdA*, *isdB* a *sdrE* boli zistené u troch izolátov stafylokokokov.

ÚVOD

Vytvorenie a pretrvanie mikrobiálneho spoločenstva buniek uchytených na tuhom povrchu je známe ako biofilm. Infekcie spojené s biofilmom odolávajú antimikrobiálnej terapii a útoku hostiteľského imunitného systému čo spôsobuje, že tieto infekcie je ťažké liečiť (Payne a kol., 2013).

Rastliny, ako cesnak, cibuľa, alebo Pestrec mariánsky sa už pred mnohými rokmi využívali pre ich liečivé účinky. V poslednej dobe, pri stále sa zvyšujúcom výskyte rezistentných baktérií na antibiotiká, môže byť použitie rastlín a ich extraktov alternatívou pri účinnom narušení tvorby biofilmu.

Biosurfaktanty sú povrchovo aktívne látky biologického pôvodu, ktoré znižujú povrchové a medzifázové napätie. Najčastejšie využívané modely pri štúdiu účinku biosurfaktantov na adhéziu baktérií a biofilm sú ramnolipidy. Ich nízka toxicita, biologická odbúrateľnosť a účinnosť v porovnaní so syntetickými biosurfaktantami indikuje ich čoraz častejšie využívanie. Ramnolipidy vykazujú významný potenciál pri tvorbe biofilmu aj na už vytvorený bakteriálny biofilm (Nickzad a kol., 2013).

Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv extraktov z rastlín a ramnolipidov na tvorbu biofilmu a detekcia génov virulencie vo vzťahu k tvorbe biofilmu u šiestich kmeňov *Staphylococcus aureus*.

MATERIÁL A METODIKA

V práci bolo použitých 6 stafylokokokov, ktoré boli izolované z drobných cicavcov (*Staphylococcus aureus* 2), kliešťov (*Staphylococcus aureus* 51, 2111) a mlieka (*Staphylococcus aureus* 11, 12 a 14). Bakteriálne kmene sa kultivovali na krvnom agare (Oxoid, Veľká Británia) s 5 %-ným prídavkom defibrinovanej baranej krvi počas 24 hodín pri teplote 37°C.

Vybrané faktory virulencie sme detegovali pomocou metódy PCR. Teplota annealingu bola u jednotlivých génov nasledovná: gén *hla* (alfa-hemolysin) – 58°C (Jarraud a kol. 2002), gén *sirB* (staphylococcal iron-regulated protein) – 61°C (Dale a kol., 2004), gén *sdrE* (serine-aspartate repeat protein E) – 50°C (Sabat a kol., 2006), gén *isdA* (iron regulated surface determinant A) – 52°C (Verkaik a kol., 2010) a gén *isdB* (iron regulated surface determinant B) – 55°C (Waryah a kol., 2016), gén *clfA* (clumping factor A) – 55°C (Tristan a kol., 2003), gén *icaAD* (intercellular adhesion) – 49°C (Rumi a kol., 2013) a gén *agrII* (accessory gene regulator) – 55°C (Shopsin, 2003).

Kvantifikácia tvorby biofilmu bola vykonaná za použitia Nunc Maxisorp mikrotitračných platničiek (O'Toole, 2011). Následne sa testovala antibiofilmová aktivita komerčne

dostupných vodných extraktov rastlín a ramnolipidov (AGAE Technologies, Oregon USA). Efekt extraktov (200Uml^{-1}) z cibule (*Allium cepa*), cesnaku (*Allium sativum*), Pestreca mariánskeho (*Silybum marianum*) a ramnolipidov (1%) na tvorbu biofilmu bol testovaný pridaním $10\ \mu\text{L}$. Ako kontrola sa použila bakteriálna suspenzia v brain heart bujónu (Oxoid, Veľká Británia) bez účinných látok.

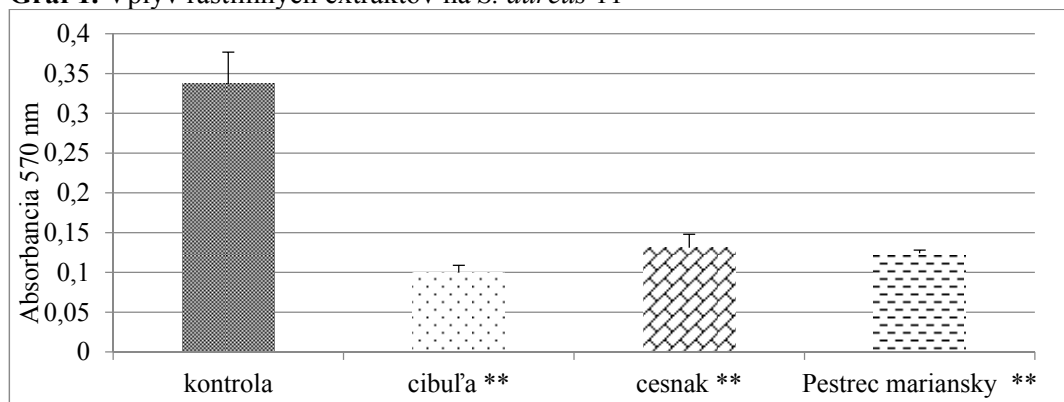
Výsledky boli štatisticky spracované v programe STATISTICA 9.0 s použitím One Way ANOVA testu a Tukey- testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V štúdií sme sa zamerali na efekt vodných extraktov a ramnolipidov na tvorbu biofilmu a prítomnosť génov virulencie vo vzťahu k tvorbe biofilmu u 6 izolátov *S. aureus*. Vyšetrovanie testovaných kmeňov preukázalo najvyšší výskyt v prípade alfa hemolyzínu, všetkých 6 kmeňov *S. aureus* bolo pozitívnych na výskyt génu *hla*. Gény *sirB*, *agrII* a *clfA* boli detegované u 1 kmeňa *S. aureus* 51, gén *icaAD* bol detegovaný len u kmeňa *S. aureus* 2. Výskyt génov *isdA*, *isdB* a *sdrE* bol potvrdený u 3 kmeňov izolovaných z mlieka.

Následne sme inhibovali tvorbu biofilmu u vybraných 6 izolátov *S. aureus*. Všetky tri použité vodné extrakty z rastlín mali inhibičný účinok na tvorbu biofilmu u testovaných stafylokokov. Inhibíciu rastu testovaných kmeňov sme nezaznamenali. Výsledky znázornené v grafe č.1 ukazujú signifikantne inhibičný účinok extraktov na *S. aureus* 11. Zo všetkých použitých extraktov mal najväčší antibiofilmový účinok extrakt z cibule. Naopak najmenší účinok mal Pestrec mariánsky, ktorý mal signifikantne inhibičný účinok len na dve tretiny testovaných stafylokokov. Podobný účinok mali na stafylokoky aj ramnolipidy. Signifikantne inhibičný účinok na biofilm sme zaznamenali pri dvoch tretinách testovaných kmeňov.

Graf 1. Vplyv rastlinných extraktov na *S. aureus* 11



Schopnosti alkoholových extraktov *A. sativum* L. pri inhibícii tvorby biofilmu baktérií *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* a *K. pneumoniae* zaznamenali Mohsenipour a kol. (2015). Wu a kol. (2015) preukázali, že pokles tvorby biofilmu bol sprevádzaný silným baktericídnym účinkom baktérií v biofilme pozorovanom už pri koncentrácií $3.13\ \mu\text{g.ml}^{-1}$ alicínu. Tvorbu biofilmu rôznych Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych baktérií, bežne sa vyskytujúcich v infikovaných ranách preukázateľne inhibovala aj masť z cesnaku. Cesnaková masť sa môže použiť ako profylaktická liečba, rovnako ako aj terapia už vytvoreného biofilmu stafylokokov (Nidadavolu a kol., 2012). Evren a kol. (2015) dokázali antibiofilmové účinky silymarinového extraktu z Pestreca mariánskeho na *S. epidermidis*, *S. aureus* a meticilín rezistentný *S. aureus*. Tvorba biofilmu sa znížila už pri koncentrácií silymarinu $15\ \mu\text{g.ml}^{-1}$. Doteraz nebola uvedená štúdia, ktorá preukazuje inhibičný vplyv extraktu z cibule (*Allium cepa*) na tvorbu biofilmu baktérie *S. aureus*.

Použitie ramnolipidov s inými biosurfaktantami môže mať silnú schopnosť narušiť štruktúru biofilmu, a to rovnakým spôsobom, ako sa preukázalo v kombinácii s antibiotickou liečbou u meticilín-rezistentného *S. aurea* (Samadi a kol., 2012). Rienzo a kol. (2016) vo svojej štúdií preukázali, že už pri koncentrácii 0.04% ramnolipidov v kombinácii s 0.01 % soforolipidmi je viac citlivejšia baktéria *S. aureus* v porovnaní s *P. aeruginosa*, z hľadiska životaschopnosti a narušenia biofilmu.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 2/0069/17 a APVV 14-0274.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Dale SE, Sebulsky MT, Heinrichs DS. Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. 2004; J Bacteriol. 186, 8356-8362.
2. Evren E, Yurtcu E. In vitro effects on biofilm viability and antibacterial and antiadherent activities of silymarin. 2015; Folia Microbiol. 60, 351-356.
3. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. 2002; Infect Immun. 70, 631-641.
4. Mohsenipour Z, Hassanshahian M. The Effects of *Allium sativum* Extracts on Biofilm Formation and Activities of Six Pathogenic Bacteria. 2015; Jundishapur J Microbiol. 8, 1-7.
5. Nickzad A, Déziel E. The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development-an approach for control? 2013; Lett Appl Microbiol. 58: 447-453.
6. Nidadavolu P, Amor W, Tran PL, Dertien J, Colmer-Hamood JA, Hamood AN. Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. 2012; J Med Microbiol. 61, 662-671.
7. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. 2011; J Vis Exp. 47, 1-2.
8. Payne DE, Martin NR, Parzych KR. Tannic Acid Inhibits *Staphylococcus aureus* Surface Colonization in an IsaA-Dependent Manner. 2013; Infect Immun. 81, 496-504.
9. Rienzo MAD, Stevenson PS, Marchant R, Banat IM. Effect of biosurfactants on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms in a BioFlux channel. 2016; Appl Microbiol Biotechnol. 100, 5773-5779.
10. Rumi MV, Huguet MJ, Bentancor AB, Gentilini ER. The *icaA* gene in staphylococci from bovine mastitis. 2013; J Infect Dev Ctries. 7, 556-560.
11. Sabat A, Melles DC, Martirosian G, Grundmann H, Belkum A, Hryniewicz W. Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding *sdr* genes among nasal-carriage and invasive *Staphylococcus aureus* strains. 2006; J Clin Microbiol. 44, 1135-1138.
12. Samadi N, Abadian N, Ahmadkhaniha R, Amini F, Dalili D, Rastkari N, Safaripour E, Mohseni FA. Structural characterization and surface activities of biogenic rhamnolipid surfactants from *Pseudomonas aeruginosa* isolate MN1 and synergistic effects against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2012; Folia Microbiol. 57, 501-508.
13. Shopsin B, Mathema B, Alcabes P, Said-Salim B, Lina G, Matsuka A, Martinez J, Kreiswirth BN. Prevalence of *agr* specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. 2003; J Clin Microbiol. 41, 456-459.
14. Tristan A, Ying L, Bes M, Etienne J, Vandenesch F, Lina G. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins involved in human hematogenous infections. 2003; J Clin Microbiol. 41, 4465-4467.
15. Verkaik NJ, Boelens HA, Vogel CP, Tavakol M, Bode LGM, Verbrugh HA, Belkum A, Wamel JB. Heterogeneity of the humoral immune response following *Staphylococcus aureus* bacteremia. 2010; Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 29, 509-518.
16. Waryah CB, Gogoi-Tiwari J, Wells K, Eto KY, Masoumi E, Costantino P, Kotiw M, Mukkur T. Diversity of virulence factors associated with west Australian methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* isolates of human origin. 2016; Biomed Res Int. 2016: 8651918.
17. Wu X, Santos RR, Fink-Gremmels J. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. 2015; Food Sci Nutr. 3, 158-168.

MicroRNA AKO POTENCIÁLNY DIAGNOSTICKÝ BIOMARKER NÁDOROVÝCH OCHORENÍ

Ferenčáková M., Rabajdová M., Špaková I., Mareková M.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta

ABSTRAKT

Onkologické ochorenia patria v súčasnosti medzi najčastejšie sa vyskytujúce ochorenia, postihujúce všetky vekové kategórie a sú celosvetovo hlavnou príčinou mortality. Počas vzniku a rozvoja nádorového ochorenia vznikajú genetické malformácie buniek. Existuje súbor genetických polymorfizmov spojených s microRNA (miRNA), ktoré predstavujú nový rozmer molekulárnej epidemiológie nádorových, ale aj nenádorových ochorení. miRNA sú malé jednovláknové endogénne molekuly RNA, ktoré patria do skupiny nekódujúcich malých jadrových RNA a predstavujú významné regulátory génovej expresie na posttranskripčnej úrovni. Zvýšená alebo znížená expresia miRNA má vplyv aj na expresiu onkogénov a tumor-supresorových génov, a preto tieto molekuly zohrávajú dôležitú úlohu v procesoch karcinogenézy. Hlavným cieľom predkladanej práce bolo štúdium molekulových zmien expresie miR-17-5p pri vybraných ochoreniach napr. prekancerózy – endometrióza, tumor prsníka a uroteliálny karcinóm. Expresia miR-17-5p bola analyzovaná v moči pacientov s histologicky potvrdeným typom endometriózy, respektíve nádoru v porovnaní s osobami v kontrolnej skupine. Kvantifikácia zmien expresie vybraných miRNA bola detegovaná metódou qRT-PCR. Následne boli získané hodnoty expresie miR-17-5p štatisticky spracované a vyhodnotené pomocou One-Way ANOVA testu, GraphPad InSTAT testu a Student-Newman-Keuls testu. Signifikantne zvýšené hladiny expresie miR-17-5p boli detegované predovšetkým v moči pacientov s uroteliálnym karcinómom a endometriózou v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naopak, v moči pacientiek s karcinómom prsníka bol zaznamenaný mierny pokles hladiny expresie miR-17-5p v porovnaní s kontrolnou skupinou, čo je pravdepodobne spôsobené tým, že miR-17-5p zohráva významnú úlohu v procese inhibície proliferácie buniek.

ÚVOD

Klinická diagnostika mnohých nádorových ochorení je často úspešná až v pokročilých štádiách tumoru, preto súčasný výskum neustále smeruje k identifikácii a charakterizácii nových biochemických a molekulových markerov potrebných ako prediktívnych ukazovateľov pri diagnostike nielen nádorových, ale aj nenádorových ochorení. Endometrióza predstavuje estrogén dependentné gynekologické ochorenie, ktoré je charakterizované ektopickým výskytom endometriálneho tkaniva. Prevalencia tohto ochorenia sa u žien v reprodukčnom veku odhaduje na 10 %. Rakovina prsníka (BC) je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich onkologických ochorení v ženskej populácii a v posledných rokoch sa stala hlavnou príčinou onkologickej morbidita a mortality žien na celom svete (Serpico a kol., 2014). Uroteliálny karcinóm močového mechúra (UBC) sa zaraďuje medzi piate najčastejšie sa vyskytujúce nádorové ochorenie a je zároveň druhým najčastejším zhubným karcinómom močových ciest. V posledných rokoch sa výskum nových biomarkerov sústreďuje aj na štúdium malých jednovláknových endogénnych molekúl RNA – miRNA, ktoré patria do skupiny nekódujúcich malých jadrových RNA a predstavujú významné regulátory génovej expresie na posttranskripčnej úrovni. Veľkosť aktívnych molekúl miRNA je 21-23 nukleotidov (Jansson a Lund, 2012; Shaker a kol., 2015). Pôsobenie miRNA reguluje proliferáciu buniek, ich diferenciáciu a apoptózu a zároveň ovplyvňuje mnoho dôležitých biologických procesov (Serpico a kol., 2014). Podstata spočíva v posttranskripčnom potláčaní expresie určitých génov prostredníctvom mediátorovej RNA (mRNA). Prepisom génov pre miRNA najprv vznikajú dlhé prekursor, ktorých úpravou vzniká jednoreťazcová, zrelá

miRNA. Na základe komplementarity sa miRNA viaže na cieľovú mRNA a tým spôsobuje zastavenie procesu translácie, poprípade aj degradáciu molekuly mRNA. V konečnom dôsledku tak nedochádza k vzniku cieľového proteínu (Lim a kol., 2005). Doposiaľ je známych viac ako 1000 génov kódujúcich miRNA, ktoré riadia expresiu približne jednej tretiny všetkých génov. Jedna miRNA môže regulovať niekoľko desiatok génov. miRNA sa okrem špecifických expresných profilov v nádorovom tkanive vyznačuje aj ďalšími vlastnosťami, napr. jednoduchou detekciou, vysokou stabilitou, širokým dynamickým rozsahom a koreláciou s už známymi klinicko-patologickými charakteristikami. V súčasnosti je výskumu miRNA venovaná veľká pozornosť a to hlavne z dôvodu ich vplyvu na malígnu transformáciu buniek. Približne polovica génov kódujúcich miRNA sa nachádza na fragilných častiach chromozómov, ktoré bývajú pozmenené buď deléciou alebo amplifikáciou v priebehu karcinogenézy. miRNA môžu vystupovať ako v pozícii onkogénu, tak aj v pozícii tumor-supresorového génu (Hansen a kol., 2011). Z tohto pohľadu je jasné, že vďaka svojim vlastnostiam by miRNA mohli slúžiť ako vhodný diagnostický marker, napr. pre zistenie pravdepodobnosti ochorenia, recidívy, odpovedi na liečbu, či pravdepodobnosti vzniku metastáz (Cho, 2009; Jansson a Lund, 2012).

MATERIÁL A METODIKA

Analyzovaný súbor tvorili experimentálna a kontrolná skupina. Experimentálne skupiny predstavovalo 10 pacientiek (n = 10) s histologicky diagnostikovanou endometriózou v rôznych klinických štádiách, 5 pacientiek (n = 5) s histologicky potvrdeným invazívnym duktálnym karcinómom prsníka (IDC) (stage 1, grade 0) a 5 pacientov (n = 5) s diagnostikovaným UBC v rôznych klinických štádiách. Kontrolnú skupinu tvorilo 5 subjektov (n = 5), ktorých preventívna prehliadka u lekára bola negatívna, a ktorí boli bez predošlej pozitívnej rodinnej anamnézy na akékoľvek onkologické ochorenie. Odber biologického materiálu – moču probandov bol uskutočňovaný na Gynekologicko-pôrodníckej klinike UPJŠ LF a UNLP v Košiciach a na Urologickej klinike UPJŠ LF a UNLP v Košiciach. Takto získaný materiál bol využitý na izoláciu miRNA, jej prepis do cDNA a na stanovenie hladín expresie miR-17-5p u pacientov s endometriózou, IDC a UBC. Na izoláciu miRNA bol použitý komerčný kit Urine microRNA Purification kit (Norgen). Pomocou prístroja NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific) bola zmeraná koncentrácia a čistota vyizolovanej miRNA. Keďže RNA nemôže byť použitá ako templát pre Real-Time PCR (RT-PCR), musela byť najskôr prepísaná do komplementárnej DNA (cDNA) reverznou transkripciou pomocou kitu TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit. Keďže miRNA má krátku dĺžku, nemohli byť na jej kvantifikáciu použité bežné RT priméry. Preto boli použité špecifické priméry s vlásenkovou štruktúrou (tzv. „stemloop RT primer“), ktoré sú schopné odlíšiť miRNA líšiace sa jedným nukleotidom. Vlásoková štruktúra bráni nešpecifickej hybridizácii s inou RNA. cDNA získaná reverznou transkripciou bola hybridizovaná so špecifickou TaqMan™ sondou, ktorá má na 5'konci fluorescenčnú značku (6-karboxyfluorescein; FAM; reportér R) a na 3'konci zhášač (6-karboxytetrametyl-rodamin; TAMRO). Metóda je založená na 5'-3' exonukleázovej aktivite Taq DNA polymerázy, čím dochádza k štiepeniu sondy. Uvoľnením zhášača dochádza k emisii fluorescenčného žiarenia. Detektorom je emisia žiarenia zaznamenávaná v reálnom čase, čiže počas každého cyklu. Intenzita zodpovedá množstvu amplifikovaného produktu. Na štatistické vyhodnotenie hladín expresie miR-17-5p v biologických vzorkách moču pacientov a kontrolných subjektov bol použitý One-Way ANOVA test, GraphPad InSTAT test a Student-Newman-Keuls test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Predpokladané zmeny expresie miR-17-5p boli zisťované v moči pacientov s histologicky potvrdenou endometriózou, typom IDC a UBC v porovnaní s osobami v kontrolnej skupine.

Relatívna hladina expresie miR-17-5p bola stanovená normalizáciou na základe vzťahu $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_a - Ct_{40})}$. V prípade experimentálnej skupiny, ktorú tvorili pacientky (n = 5) s endometrióznymi ložiskami na sarkouterinných ligamentách, sme pozorovali tendenciu zvyšovania hladiny miR-17-5p o 93 %, keďže relatívna hladina expresie miR-17-5p v experimentálnej skupine predstavovala 2 063 oproti kontrole, ktorá predstavovala 1 071. Pri molekulovej detekcii relatívnej hladiny miR-17-5p u pacientiek s pelvis frozen sme pozorovali rapídny nárast expresie miR-17-5p u všetkých pacientiek (n = 5) a to až o 712 %, pričom hladina miR-17-5p génu u experimentálnej skupiny dosahovala hodnoty 6 553, v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde relatívna hladina expresie bola 1 071. Tieto zistenia korešponujú s výsledkami opísanými Toloubeydokhtim a kol. (2014), ktorí rovnako poukázali na zvýšenú hladinu miR-17-5p v súvislosti s týmto ochorením. Pri molekulovej detekcii relatívnej hladiny miR-17-5p u pacientiek s IDC sme pozorovali len mierne zníženie hladiny expresie miR-17-5p u všetkých pacientiek (n = 5). Hladina miR-17-5p génu u experimentálnej skupiny dosahovala hodnoty 992, teda o 7 % nižšie, v porovnaní s kontrolnou skupinou, kde relatívna hladina expresie bola 1 071. Zistilo sa, že miR-17-5p sa u pacientiek s primárnym BC vyskytuje vo veľmi malých koncentráciách. Experimentálne je dokázané, že sa miR-17-5p podieľa na regulácii onkogénu AIB1 a génu CCND1 (cyklín D1), pričom reguláciou CCND1 sa zúčastňuje na inhibícii proliferácie (Hossain a kol., 2006). V moči pacientov (n = 5) s UBC v porovnaní s osobami v kontrolnej skupine bola detegovaná signifikantne zvýšená relatívna hladina expresie miR-17-5p. V experimentálnej skupine predstavovala 1 735 oproti kontrole, kde hodnota dosahovala 1 071, čo predstavuje zvýšenie o 62 %. Tieto výsledky korelujú s výsledkami práce Rena a kol. (2011), ktorí taktiež pozorovali zvýšenú hladinu expresie miR-17-5p u 50 pacientov s UBC. Získané výsledky rozdielných hladín relatívnej expresie miR-17-5p v pilotnej štúdií naznačujú možné využitie miR-17-5p pri diferenciálnej diagnostike prekancerózných stavov a stavov karcinómov vo včasných štádiách.

Práca bola podporená grantom 1/0372/17 a 1/0873/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Hansen TB, Kjems J, Bramsen JB. Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis. *RNA Biology* 2011; 8: 378–383.
2. Hossain A, Kuo MT, Saunders GF. *Mir-17-5p* Regulates Breast Cancer Cell Proliferation by Inhibiting Translation of *AIB1* mRNA. *Molecular and cellular biology* 2006; 26: 8191–8201.
3. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 42: 1273–1281.
4. Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Molecular oncology* 2012; 6: 590–610.
5. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769–773.
6. Ren H, Sun Y, Li X, Hu H, Li S, Liang E, Han R. Expression of E2F3, miR-17-5p, miR-20a and their interplay in bladder cancer. *African Journal of Biotechnology* 2011; 10: 11028-11032.
7. Serpico D, Molino L, Cosimo SD. microRNAs in breast cancer development and treatment. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40: 595–604.
8. Shaker O, Maher M, Nassar Y, Morcos G, Gad Z. Role of microRNAs -29b-2, -155, -197 and -205 as diagnostic biomarkers in serum of breast cancer females. *Gene* 2015; 560: 77–82.
9. Toloubeydokhti T, Pan Q, Chegini N. The Expression and Ovarian Steroid Regulation of Endometrial Micro-RNAs. *Reproductive Sciences* 2014; 10: 1321 – 1326.

VPLYV TAKRÍN-BENZOTIAZOLOVÝCH DERIVÁTOV NA AMYLODINÚ AGREGÁCIU LYZOZÝMU

Gančár M., Bednáriková Z., Kubacková J., Gažová Z.
Oddelenie Biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

ABSTRAKT

Tvorba a hromadenie amyloidných agregátov je jedným zo sprievodných javov amyloidózy, medzi ktoré patrí Alzheimerova a Parkinsonova choroba, či non-neuropatická lyzozýmová amyloidóza. V dnešnej dobe je prístup k liečbe týchto ochorení prevažne symptomatický a zameraný na dočasné zlepšenie kvality života. Jednou z terapeutických stratégií umožňujúcich liečbu amyloidózy je inhibícia amyloidnej agregácie poly/peptidov alebo odstránenie nerozpustných amyloidných fibril z postihnutých tkanív. Malé molekuly majú veľký potenciál interferovať s amyloidnou fibrilizáciou poly/peptidov. V našej štúdií sme sa zamerali na malé organické molekuly, konkrétne na takrín-benzotiazolové deriváty. Ide o heterodiméry pozostávajúce z derivátov takrínu a benzotiazolu prepojených pomocou uhl'ovodíkového linkera. Našou úlohou bolo zistiť, či majú niektoré z nami študovaných látok významný inhibičný účinok na agregáciu lyzozýmu z vaječného bielka či deštruktívny efekt na jeho amyloidné fibrily. Vplyv látok v sledovanom koncentračnom rozsahu bol kvantifikovaný pomocou viazania tioflavínu T a boli stanovené hodnoty IC_{50} a DC_{50} . Inhibičný i deštruktívny účinok bol pozorovaný u väčšiny látok. Najefektívnejšie boli látky s najdlhším, osem uhlíkov dlhým linkerom, ktoré mali mikromolárne IC_{50} , resp. DC_{50} hodnoty. Naše výsledky boli následne podporené snímkami z atómovej silovej mikroskopie.

ÚVOD

Amyloidózy sú v súčasnosti neliečiteľné a incidencia Alzheimerovej choroby, najčastejšej formy amyloidnej demencie, dosiahla v roku 2016 úroveň 45 miliónov postihnutých. Odhaduje sa, že počet pacientov má narastať až o takmer 10 miliónov ročne. Preto je kladený veľký dôraz na štúdium týchto ochorení a vývoj stratégií na ich úspešnú liečbu.

Niektoré malé molekuly sú schopné *in vitro* nielen inhibovať tvorbu amyloidných fibril, ale taktiež fibrily destabilizovať. Väčšina z nich nesie štruktúrne znaky látok, o ktorých vieme, že s amyloidnými fibrilami interagujú – tioflavín T (ThT), či konzská červeň. Sú teda aromatické a planárne. Jedným z možných spôsobov interakcie takýchto malých molekúl je ich interkalácia do zliabkov tvorených vrstvami β -listov, či už v rozpustných oligomérnych formách, ako aj veľkých fibrilách (Re a kol., 2010). V našej štúdií bolo identifikovaných niekoľko molekúl, ktoré aktívne inhibujú agregáciu lyzozýmu z vaječného bielka (HEWL), a taktiež majú depolymerizačný účinok na agregáty.

HEWL je malý globulárny proteín pozostávajúci zo 129 aminokyselín, ktorého trojrozmerná štruktúra, mechanizmus zbaľovania a rozbaľovania ako aj stabilita je veľmi dobre preskúmaná. Okrem toho je HEWL štruktúrnym homológom ľudského sérového lyzozýmu (približne 60% sekvenčná homológia), ktorého amyloidná agregácia je pozorovaná pri dedičnej non-neuropatickej amyloidóze. Z tohto dôvodu sa HEWL stal vynikajúcim modelom na štúdium amyloidnej agregácie globulárnych proteínov (Zeng a kol., 2016).

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie: HEWL (molekulová hmotnosť 14307 Da) bol zakúpený od spoločnosti Sigma Aldrich (E.C. number: 3.2.1.17), vo forme lyofilizovaného prášku. Študované takrín-benzotiazolové deriváty boli syntetizované v Centre biomedicínskeho výskumu, Univerzitná nemocnica Hradec Králové. 23 heterodimérov bolo rozpustených v dimetylsulfoxide (DMSO), 7-metoxytakrín (7-MEOTA) a 6-chlórtakrín (6-Cl-THA) bol rozpustený v ultrafiltrovanej vode.

Tvorba amyloidných agregátov: HEWL bol rozpustený na finálnu koncentráciu 10 μM v tlmivom roztoku 70 mM glycínu, obsahujúceho 80 mM NaCl, ktorého pH bolo upravené na hodnotu 2.7 pomocou 37% kyseliny chlorovodíkovej. Roztok proteínu sa inkuboval po dobu 2 hodín pri 65°C a za konštantného miešania (1200 rpm). Prítomnosť lyzozýmových agregátov bola overená ThT meraním a atómovou silovou mikroskopiou (AFM).

Meranie fluorescence ThT: Tvorba lyzozýmových fibríl bola monitorovaná charakteristickým nárastom fluorescenčnej intenzity ThT. ThT bolo pridané k lyzozýmovým vzorkám (10 μM) tak, aby finálna koncentrácia ThT vo vzorkách bola 20 μM . Vzorky sa inkubovali po dobu 60 min pri 37°C. Fluorescenčná intenzita ThT bola odmeraná pomocou fluorimetra SYNERGY Mx pri excitačnej vlnovej dĺžke $\lambda_{\text{ex}} = 440 \text{ nm}$ a emisnej vlnovej dĺžke $\lambda_{\text{em}} = 465\text{-}550 \text{ nm}$.

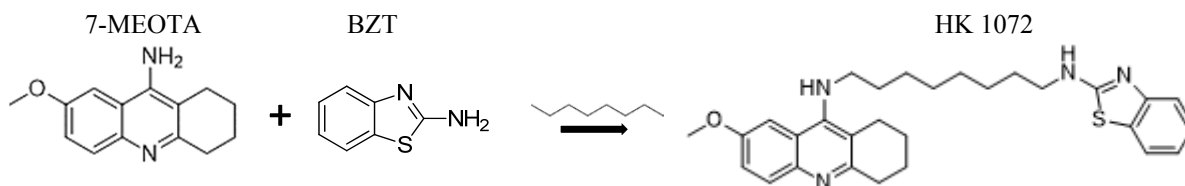
Stanovenie IC_{50} hodnôt: THA-BTZ deriváty v koncentračnom rozsahu od 1 pM do 1 mM boli pridané k roztoku proteínu s fixnou koncentráciou 10 μM . Roztoky boli vystavené podmienkam vyvolávajúcim amyloidnú agregáciu opísaným vyššie. Rozsah agregácie bol pozorovaný pomocou merania fluorescence ThT. Intenzita fluorescence bola normalizovaná na hodnotu fluorescenčného signálu čistých amyloidných agregátov lyzozýmu. Každý experiment sa uskutočnil trojmo a výsledná hodnota je priemer nameraných hodnôt. Hodnoty IC_{50} boli stanovené z kriviek, ktoré sú závislosťou priemerných hodnôt intenzity fluorescence ThT a koncentrácie testovaného derivátu vo vzorke. Obsah DMSO v meraných vzorkách bol nižší ako 2% a nemal efekt na formáciu či stabilitu lyzozýmových fibríl.

Meranie depolymerizačného efektu: K 10 μM roztoku fibríl boli pridané testované látky v koncentračnom rozsahu od 1 pM do 1 mM a vzorky boli inkubované po dobu 24 hodín. Deštruktívny účinok bol kvantifikovaný pomocou viazania tioflavínu T a hodnoty DC_{50} boli stanovené podľa postupu spomenutého vyššie.

Atómová silová mikroskopia: Vzorky boli pripravené adsorpciou 15 μl vzorky na sľude po dobu 6 min. Prebytok vzorky bol omytý 4 ml destilovanej vody. Vzorky schli pri laboratórnej teplote po dobu 30 minút a následne boli osušené stlačeným dusíkom. Koncentrácia proteínu bola stále 10 μM a koncentrácia testovanej látky 100 μM . AFM obrázky boli získané pomocou prístroja od spoločnosti Veeco di Innova (Bruker AXS Inc., Madison, U.S.A.) v „tapping“ móde a pri rezonančnej frekvencii NCHV hrotu 320 kHz.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

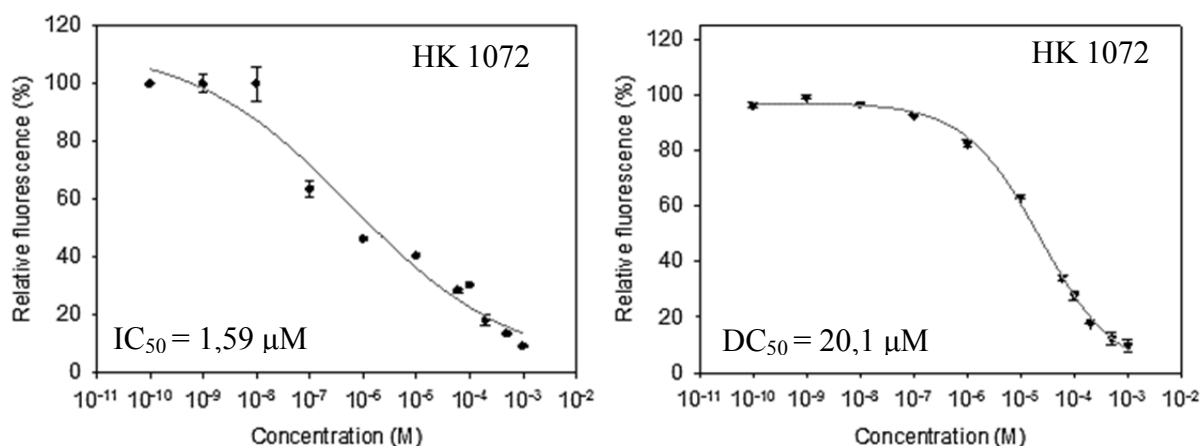
Testovali sme vplyv malých molekúl, derivátov takrínu a benzotiazolu (BTZ) na amyloidnú agregáciu lyzozýmu. Heterodiméry boli rozdelené do 3 skupín na základe použitej takrínovej časti molekuly, ktorú reprezentuje 7-MEOTA, 6-Cl-THA alebo nesubstituovaný takrín (THA). Každá zo skupín pozostávala zo 7 látok líšiacich sa v dĺžke linkera od 2 po 8 uhlíkov.



Obr. 1. Demonštrácia vzniku heterodiméru HK 1072 spojením 7-MEOTA a BTZ pomocou 8 uhlíkov dlhého linkera.

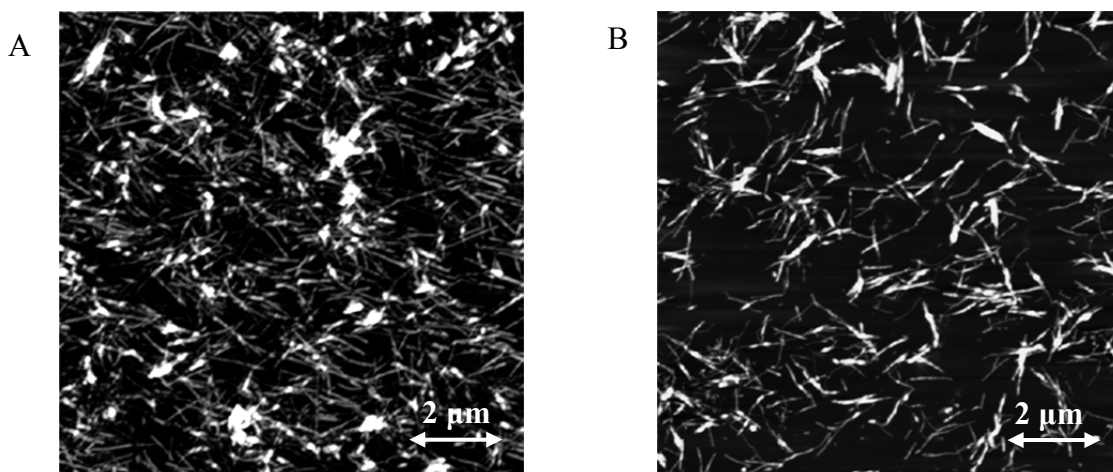
V prípade samotného THA, 6-Cl-THA ani BTZ sme nepozorovali signifikantný inhibičný alebo depolymerizačný efekt, resp. bol pozorovaný pri vyšších koncentráciách. Prepojením takrínového a benzotiazolového jadra pomocou linkera sme dosiahli výrazné zlepšenie inhibičných aj depolymerizačných vlastností látok, pričom dĺžka linkera významne ovplyvňuje účinnosť sledovaných látok. Látky s najkratším linkerom vykazovali najslabšie inhibičné, resp. depolymerizačné vlastnosti. Naopak, látky s najdlhším, 8 uhlíkov dlhým

linkerom, dosiahli najlepšiu inhibičnú a depolymerizačnú aktivitu. V prípade látky HK 1072 boli hodnoty $IC_{50} = 1,59 \mu M$, resp. $DC_{50} = 20,1 \mu M$ (Obr. 1. a 2.).



Obr. 2. Závislosť priemerných hodnôt relatívnej fluorescence ThT od koncentrácie derivátu HK 1072.

Atómová silová mikroskopia kvalitatívne podporila výsledky získané pomocou metódy viazania ThT. V prípade látky HK 1072 sme pozorovali značný úbytok amyloidných agregátov, čo demonštruje jej depolymerizačný efekt (Obr. 3.).



Obr. 3. Snímky z atómovej silovej mikroskopie; A) Lyzozýmové amyloidné fibrily (LAF) ($10 \mu M$); B) LAF ($10 \mu M$) po 24h inkubácii s látkou HK 1072 ($100 \mu M$).

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0145/17, APVV SK-CN-2015-0023

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Re F, Airoidi C, Zona C, Masserini M, La Ferla B, Quattrocchi N, Nicotra F. Beta Amyloid Aggregation Inhibitors: Small Molecules as Candidate Drugs for Therapy of Alzheimer's Disease. *Curr Med Chem.* 2010; 17:2990-3006.
2. Zeng H-j, Miao M, Yang R, Qu L-b. Effect of silybin on the fibrillation of hen egg-white lysozyme. *J Mol Recognit.* 2017; 30:1-7.

TESTOVANIE PRODUKCIE BIOFILMU KMEŇMI *ENTEROCOCCUS HIRAE* Z RÔZNYCH ŽIVOČÍŠNYCH ZDROJOV

Bino-Glatzová E.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

Mnoho mikroorganizmov sa vyskytuje v prostredí vo forme biofilmu, čo je pre ne priaznivejšie ako existencia v planktonickej forme. Mikrobiálne spoločenstvo buniek obsiahnutých v biofilme môže adherovať tak k povrchom organickým ako anorganickým a inaktivácia takýchto buniek je veľmi komplikovaná. V tejto práci bola testovaná tvorba biofilmu u kmeňov *Enterococcus hirae* z rozličných druhov zvierat, keďže tento druh je často detegovaný v tráviacom trakte zvierat a za niektorých podmienok je ochorenia vyvolávajúcim činiteľom. Testovaných bolo 70 kmeňov zo 411 zvierat. Dvadsať kmeňov *E. hirae* vykazovalo pri mikrotitračnej platničkovej metóde strednú produkciu biofilmu (0,141 až 0,697). Pri skúmavkovej metóde sa kmeň SLJ1/a z trusu sliepky prejavil ako silný producent biofilmu, čo sa potvrdilo aj metódou na Kongo agare a mikrotitračnou platničkovou metódou. Kultiváciou na Kongo agare (24h,48h,72h) bolo 36 kmeňov biofilm produkujúcich a 34 kmeňov neprodukovalo biofilm. V nadväznosti na tieto preliminárne výsledky, v testovaní produkcie biofilmu ďalej pokračujeme.

ÚVOD

Prvý prírodovedec zaoberajúci sa myšlienkou adhézie baktérií k rôznym povrchom bol holandský vedec Anton van Leeuwenhoek, ktorý mikroskopom pozoroval bunky zubného plaku (Votava, 2001). Ešte dvestopäťdesiat rokov potom nikto neakceptoval fakt, že pre baktérie je prirodzené rásť vo forme biofilmu. Až v roku 1935 mikrobiológ Zobel ako prvý použil priamu mikroskopiu k pozorovaniu tvorby biofilmu u morských baktérií (Votava, 2001).

V súčasnosti je známe, že baktérie môžu existovať v dvoch formách, a to v tzv. planktonickej alebo ako súčasť spoločenstiev, kde vytvárajú tenkú vrstvu na pevných telesách tzv. biofilm (Davey a O'Toole, 2000). Baktérie, ktoré rastú vo forme biofilmu sa vyznačujú zvýšenou odolnosťou voči obranným reakciám hostiteľa a tiež prirodzenou rezistenciou voči pôsobeniu antibiotík (ATB). Takéto kmene sú virulentnejšie a nimi spôsobené infekcie sú pretrvávajúce a ťažko liečiteľné (Arciola a kol., 2002; Ružička a kol., 2004). Prilnavosť a veľkosť baktérií je závislá na mnohých faktoroch ako sú napr. čas, teplota, pH, množstvo kyslíka, osmolarita, prítomnosť živín, ich pôsobením môžu baktérie v biofilme spomaľovať svoj rast, alebo biofilm opustiť (Goller and Romeo, 2008). Tvorba biofilmu sa rozdeľuje do troch fáz: adhézia buniek na povrch materiálu, akumulácia a maturácia a fáza disperzie (Costerton et al., 1999). Koordinované chovanie skupiny baktérií sprostredkováva proces nazvaný *quorum sensing*; tento proces umožňuje mikroorganizmom vzájomnú komunikáciu a napomáha prispôbaniu sa životným podmienkam v prostredí (Coenye a Nelis, 2010).

Druh *Enterococcus hirae* patrí do rodu *Enterococcus*; je zaradený do skupiny *E. faecium* na základe 16S rRNA analýzy podobnosti génov (Franz a kol. 2011). Keďže tento druh je často detegovaný v tráviacom trakte zvierat, a za niektorých podmienok je ochorenia vyvolávajúcim činiteľom, rozhodli sme sa v tejto štúdii sledovať tvorbu biofilmu u kmeňov *E. hirae* izolovaných z rôznych druhov zvierat, keďže tvorba biofilmu je chápaná aj ako jeden z faktorov virulencie.

MATERIÁL A METODIKA

Kmene (71) boli izolované zo 411 zvierat (kačky-7, serval-1, liška-1, sliepky-8, králiky-150, kone-39, bažanty-60, pštrosy-140, bobor-2, pes-2, koza-1), identifikované boli systémom

MALDI Biotyper™ (BrukerDaltonics, USA), potvrdené genotypizáciou-PCR a fenotypicky. Tvorba biofilmu bola testovaná tromi rozličnými metodikami: kultiváciou na agare s kongo červeňou -24h,48h,72h (Freeman a kol., 1989), skúmavkovou metódou-24h (Christensen a kol., 1982) a „double“ metódou v mikrotitračných platničkách-24h-570nm tzv. biofilm plate assay po odčítaní pomocou readra Synergy™4 a vyhodnotení podľa Chaieb K. (2007). Ako kultivačné médiá boli použité Brain-Heart infusion-BHI bujón (Difco, USA) a Trypticase soy infusion-TSY bujón (Difco, USA). Pozitívna kontrola tvorby biofilmu bola kmeň *Streptococcus zooepidemicus* CCM 7316 (poskytnutý Dr. Stykovou z UVLF, Košice).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Druh *E. hirae* zaradujeme do rodu *Enterococcus*. Prvý krát bol izolovaný v roku 1985 (Farrow a Collins) z tráviaceho traktu prasiat a kurčiat. Kultiváciou na Kongo agare (24h,48h,72h) bolo 36 kmeňov *E. hirae* biofilm produkujúcich a 34 kmeňov neprodukovalo biofilm. Na základe našich preliminárnych výsledkov môžeme zhodnotiť, že nami testované kmene zo pštrosov (16) tvorili biofilm na agare s kongo červeňou; u kmeňov *E. hirae* z bažantov bolo pozitívnych 8 kmeňov. U kmeňov, ktoré boli negatívne na tvorbu biofilmu na Kongo agare po 24 hodinách sa neprejavila žiadna zmena ani po 48 a 72 hodinách kultivácie a výsledky zostali negatívne. Výsledky skúmavkovej metódy u väčšiny kmeňov korelovali s výsledkami z testovania na Kongo agare. Iba dva kmene (Kč2/b, EHS), ktoré na Kongo agare nepreukázali tvorbu biofilmu boli pri skúmavkovej metóde ohodnotené ako slabí producenti biofilmu (Tabuľka 1) a naopak dva kmene (Kr2/b, Kr 7/a), u ktorých na Kongo agare bola zaznamenaná tvorba biofilmu, pri skúmavkovej metóde netvorili biofilm (Tabuľka 1). Mikrotitračnou platničkovou metódou testované kmene *E.hirae* (20) boli vyhodnotené ako stredne produkujúce biofilm (hodnoty 0,141 až 0,697). Podľa Mahet a O'Toola (2001) sú baktérie tvoriace biofilm podstatne rezistentnejšie voči ATB ako baktérie žijúce v planktonickej forme. Niekedy je vhodné zvýšenie koncentrácie, alebo zmena druhu ATB, aby bol pozorovaný inhibičný účinok antibiotika na biofilm. Veľký význam budú mať pre nás výsledky z testovania našich kmeňov pre prítomnosť či absenciu génov faktorov virulencie (PCR), čo úzko súvisí so schopnosťou biofilm-pozitívnych mikroorganizmov odolávať vplyvom prostredia. V ďalšom kroku by sme biofilm pozitívne kmene (prípadne aj s génmi faktorov virulencie) chceli testovať na citlivosť ku enterocínom charakterizovaným v našom Laboratóriu živočíšnej mikrobiológie.

Tabuľka 1: Porovnanie výsledkov tvorby biofilmu u kmeňov *E.hirae* tromi rozdielnymi metódami

vzorka	kongo 24h	kongo 48h	kongo 72h	Ch.skúmavková	Ch.platničková
Kč1/b	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,586
Kč2/b	negatívne	negatívne	negatívne	1	0,210
Kč4	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,189
Kč5	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,157
Kč5/a	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,141
Kč6	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,460
Kč7	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,350
EHS	negatívne	negatívne	negatívne	1	0,349
LDRG/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	2	0,278
SLJ2/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	2	0,164
SLH1/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	1	0,298
SLH3/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	2	0,5
SLJ1/a	pozitívne	pozitívne	pozitívne	3	0,697
Kr2/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	0	0,240

vzorka	kongo 24h	kongo 48h	kongo 72h	Ch.skúmavková	Ch.platničková
Kr7/a	pozitívne	pozitívne	pozitívne	0	0,344
Kr8/a	pozitívne	pozitívne	pozitívne	1	0,388
Kr9/b	pozitívne	pozitívne	pozitívne	0	0,273
K5od/1	negatívne	negatívne	negatívne	0	0,352
K7/1	pozitívne	pozitívne	pozitívne	2	0,303
K.Ap.b-2017	pozitívne	pozitívne	pozitívne	1	0,334

Práca bola podporená projektom VEGA 2/0006/17. Ďakujem za pomoc pri zabehnutí a optimalizácii mikrotitračnej platničkovej metodiky pani Doc. MVDr. Radomíre Nemcovej, PhD z UVLF v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Růžička, F., Holá, V., Votava, M., Tejkalová, R., Horvath, R., Heroldová, M., Woznicová, V., 2004: Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates;
2. *Folia Microbiol. (Praha)*; 49; 5: p. 596-600.
3. Votava M., *Lékařská mikrobiologie I: mikrobiální biofilm*. Brno: Neptun, 2001., 247s. ISBN 80-902896-2-2. Arciola, C. R., Baldassarri, L., Montanaro, L., 2002: In catheter infections by *Staphylococcus epidermidis* their tercellular adhesion (ica) locus a molecular marker of the virulent slime-producing strains; *J. Biomed. Mater. Res.*; 59; 3: p. 557-562.
4. Coenye T., Nelis H. J., In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2010, roč. 83, s. 89-105.
5. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
6. Christensen, G. D., Simpson, W. A. , Bisno, A. L., Beachey, E. H., 1982: Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces; *Infection and Immunity*; 37; 1: p. 318-326.
7. Davey, M.E., O'Toole, G.A., Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol.* 2000, roč. 64,č. 4, s. 847-867.
8. Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel H., Holzapfel, W., Gálvez, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. In *Int. J. Food Microbiol.* 151 (2011), s. 125-140.
9. Freeman, D. J., Falkiner, F. R., Keane, C. T., 1989: New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci; *J. Clin. Pathol.*; 42; 8: p. 872-874.
10. Goller, C. C., Romeo, T.: Environmental influences on biofilm development. *Bacterial biofilms*. Romeo, T. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2008, 37-66
11. Chaieb, K., Chehab, O., Zmantar, T., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A., 2007, In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical ica- positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Ann. Microbiol.* 57:431-437.
12. Mah, T.-F. C., O'Toole, G. A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 2001, 9, 34-39

KONTAMINÁCIA KŔMNYCH OBILNÍN MIKROMYCÉTAMI

Harčárová M., Čonková E., Sihelská Z.

Katedra farmakológie a toxikológie, Ústav farmakológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Mikroskopické vláknité huby predstavujú kontaminanty poľnohospodárskych plodín, potravín a krmív. Potenciálne toxinogénne druhy mikroskopických vláknitých húb sú schopné za určitých podmienok produkovať sekundárne metabolity, mykotoxíny. Cieľom našej práce bolo zistiť výskyt mikroskopických vláknitých húb v krmných obilninách. Pre stanovenie endogénnej kontaminácie zŕn bola použitá priama metóda ukladania zŕn na kultivačné pôdy. Po 7 dňovej kultivácii bola vykonaná determinácia jednotlivých druhov mikroskopických vláknitých húb. Kŕmne obilie bolo kontaminované mikromycétami z rodu *Fusarium* (43,7 %), *Penicillium* (34,3 %), *Alternaria* (34,3 %), *Cladosporium* (28,1), *Mucor* (28,1 %), *Rhizopus* (15,6 %), *Scopulariopsis* (15,6 %) a *Aspergillus* (3,1 %).

ÚVOD

Chov hospodárskych zvierat predstavuje v poľnohospodárstve základné odvetvie, prostredníctvom ktorého sa zabezpečuje výživa obyvateľstva. Pestovanie plodín a ich následné spracovanie na výrobu krmív pre zvieratá alebo na výrobu potravín pre ľudí prináša so sebou riziko výskytu mikroskopických vláknitých húb. Tie môžu znehodnotiť plodiny už počas rastu na poli alebo počas ich zberu, skladovania a spracovania. Poľné huby sú patogény spôsobujúce ochorenia rastlín počas ich rastu a skladové huby sa vyskytujú ako saprofyty na mŕtvom organickom materiáli pri skladovaní (Glenn, 2007). Zástupcovia rodov *Aspergillus* a *Penicillium* sa zaraďujú medzi skladové mikroskopické vláknité huby. Typické poľné huby reprezentujú druhy rodov *Fusarium* a *Alternaria*. Za vhodných environmentálnych podmienok (relatívna vlhkosť, teplota, prítomnosť kyslíka) sú poľné a skladové huby schopné produkovať mykotoxíny (Desjardin, 2006). Mykotoxíny predstavujú celosvetový problém a odhaduje sa, že 25 % z celkovej produkcie plodín na svete je kontaminovaných (Lawrol a Lynch, 2005). Vysoká prevalencia mykotoxínov v krmivách najmä v pestovateľských oblastiach s miernou klímou (Európa, Severná Amerika) vedie k značným ekonomickým stratám (Mézes a kol., 2010). Steyn (1998) uvádza, že existuje viac ako 300 chemicky odlišných mykotoxínov, ktoré sú príčinou chorôb tzv. mykotoxikóz. Mykotoxikózy sa môžu prejavovať širokou škálou klinických príznakov, v závislosti od typu a koncentrácie mykotoxínu, trvania expozície, od druhu, rodu, veku a zdravotného stavu zvierat. Dlhodobá expozícia zvierat mykotoxínmi vyúsťuje do stavu zvýšenej vnímavosti k sekundárnym ochoreniam vírusového, bakteriálneho a hubového pôvodu (Morgavi a Riley, 2007).

MATERIÁL A METODIKA

V 32 vzorkách skladovaných krmných obilnín (pšenica - 19, jačmeň - 6, kukurica - 4, ovos - 2, raž - 1) sa stanovila endogénna kontaminácia priamou kultiváciou povrchovo sterilizovaných zŕn, na agare s obsahom dichlóranu, chloramfenikolu a bengálskej červene - DRBC (Hocking a Pitt, 1980). Na povrchovú sterilizáciu zŕn bol použitý 0,4 % NaOCl s dobou expozície 2 minúty. Vzorky sa následne dvakrát prepláchli destilovanou vodou. Zrná sa ukladali priamo na povrch živného média sterilnou pinzetou tak, aby sa vzájomne nedotýkali. Kultivácia prebiehala 7 – 10 dní, pri laboratórnej teplote 25±2 °C (Samson a kol., 2002). Determinácia jednotlivých druhov sa uskutočnila na základe makro- a mikroskopických znakov podľa nasledovných kľúčov: Samson a kol., (2002), Leslie a Summerell, (2006).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V analyzovaných vzorkách obilnín bol zaznamenaný výskyt: *Fusarium* spp. (43,7 %), *Penicillium* spp. (34,3 %), *Alternaria* spp. (34, 3 %), *Cladosporium* spp. (28,1), *Mucor* spp. (28,1 %), *Rhizopus* spp. (15,6 %), *Scopulariopsis* spp. (15,6 %) a *Aspergillus* spp. (3,1 %). Zastúpenie jednotlivých druhov je uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka č. 1: Druhovú zastúpenie jednotlivých rodov mikroskopických vláknitých húb v obilninách

Obilnina	Druhy mikroskopických vláknitých húb
Pšenica	<i>Absidia ramosa</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium nivale</i> , <i>Helminthosporium</i> sp., <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Paecilomyces variotii</i> , <i>Penicillium viridicatum</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
Jačmeň	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Mucor circinelloides</i>
Kukurica	<i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Penicillium</i> sp.
Ovos	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Cladosporium herbarum</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus nigricans</i>
Raž	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Penicillium</i> sp.

Lacmanová a kol. (2009) uvádzajú, že približne 20 – 45 % svetovej produkcie obilnín je kontaminovaných skladovými hubami. Poľné huby rodu *Fusarium* sa vyskytujú vo viac ako 50-tich % kukurice pred zberom (Nicholson a kol., 1998). Podľa Veldmana (2003) môžu byť poľné huby detekovateľné aj v skladovaných krmných obilninách, čo sa potvrdilo aj v našej práci, nakoľko rod *Fusarium* a *Alternaria* boli identifikované vo vyšetrených vzorkách skladovaného obilia.

Táto práca bola podporená Ministerstvom školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky prostredníctvom grantu VEGA č. 1/0408/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Desjardin AE. *Fusarium* Mycotoxins Chemistry, Genetics and Biology. APS PRESS. 2006; 7-108.
2. Glenn AE. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. Anim. Feed Sci. Technol. 2007; 137: 213-240.
3. Hocking AD, Pitt J I. Fungi and Food Spoilage. Springer. 2009; 519.
4. Lacmanová I, Pazlarová J, Kostelanská M, Hajšlová J. PCR-Based Identification of Toxinogenic *Fusarium* Species. Czech J. Food Sci. 2009; 27 (2): 90-94.
5. Lawlor PG, Lynch PB. Mycotoxin management. Afr. Farming Food Process. 2005; 46: 12-13.
6. Leslie JF, Summerell, BA. The *Fusarium* Laboratory Manual. Iowa, Blackwell Publishing. 2006; 388 s.
7. Mézes M, Balogh K, Tóth K. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins – a review. Acta Veterinaria Hungarica. 2010; 58 (1): 1-17.
8. Morgavi DP, Riley RT. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feed contaminated with *Fusarium* toxins. Anim. Feed Sci. Technol. 2007; 137: 201-212.
9. Nicholson P, Simpson D R, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiol. Mol. Plant Pathol. 1998; 53: 17-37.

10. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food- and Airborne fungi. 6th ed. Utrecht: Centraalbureau voor schimmelcultures. 2002; 389.
11. Steyn P S. The biosynthesis of mycotoxins. *Revue de médecine Veterinaire* 1998; 149: 469-478.
12. Veldman B. Deskstudie naar de aanwezigheid en detectie van mycotoxinen in diervoedergrondstoffen. Rapport van De Schothorst. Stichting Instituut voor de Veevoeding. 2003; V&K-03-04.

VPLYV RÔZNYCH FORIEM ZINKU A VLÁKNINY NA MINERÁLNY STATUS PRASIAK

Holodová M.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice, Slovenská republika

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo porovnať účinok dvoch typov vlákniny a zdrojov zinku na úžitkové parametre, koncentráciu Zn, Cu, Mn a Fe v plazme, obsah albumínu a Zn-metalotioneínu (Zn-MT1) v plazme prasiatok. Experiment bol uskutočnený na 24 kastrováných samcoch prasiat Danbred x Duroc s počiatočnou telesnou hmotnosťou približne 11 kg vo veku 35 dní. Prasiatka boli rozdelené podľa hmotnosti do štyroch skupín a kŕmené bazálnou diétou (BD) obsahujúcou 1% hrubej vlákniny vo forme 1,7% celulózy alebo 5% zemiakovej vlákniny, a 150 mg Zn.kg⁻¹ v anorganickej alebo organickej forme. Počas 4-týždňového kŕmenia bola každá skupina prasiatok kŕmená BD obsahujúcou celulózu a zinok vo forme ZnSO₄ (C) alebo Zn chelátu glycinového hydrátu (C+ZnGly), a BD obohatenou o zemiakovú vlákninu a ZnSO₄ (PF) alebo Zn chelát glycinového hydrátu (PF+ZnGly). Príjem oboch diét doplnených o organický zdroj zinku (C+ZnGly, PF+ZnGly) zvýšil príjem krmiva a denné prírastky, ako aj konečnú živú hmotnosť prasiatok. Zvýšené hladiny Zn v plazme boli zistené iba v skupine prijímajúcej PF+ZnGly diétu (P<0,05), zatiaľ čo plazmatické hladiny Cu boli významne znížené v tejto skupine v porovnaní so všetkými skupinami (P<0,01). Koncentrácie Fe a Mn v plazme neboli príjmom experimentálnych diét nijako zmenené. Celkový obsah sulfhydriových skupín (TSH) bol zvýšený v plazme prasiatok kŕmených diétou PF+ZnGly v porovnaní so zvieratami prijímajúcimi diétu obohatenú síranom zinočnatým (PF). Zlepšené úžitkové parametre a zvýšený obsah Zn, albumínu a tiež TSH v plazme prasiat prijímajúcich diétu suplementovanú Zn chelátom poukazujú na vyššiu biologickú dostupnosť Zn z jeho organického zdroja, ktorý bol v plazme viazaný prevažne na albumín, zatiaľ čo plazmatické hladiny Zn-MT1 neboli ovplyvnené formou prijímaného zinku. Druh vlákniny nemal žiaden vplyv na skúmané parametre.

ÚVOD

Zinok patrí medzi stopové prvky, ktoré sú nevyhnutné na správny vývoj živých organizmov. V súčasnosti je v EÚ chválených sedem zlúčenín zinku ako aditív používaných vo výžive zvierat. Tri z nich sú cheláty- hydrát zinočnatého chelátu s aminokyselinami, zinočnatý chelát s bielkovinovými hydrolyzátmi, hydrát zinočnatého chelátu s glycinom (Community Register of Feed Additives). Využitie a absorpcia zinku v tráviacom trakte monogastričných zvierat prebieha v tenkom čreve a môže byť ovplyvnená viacerými faktormi. Delíme ich na aktivátory a inhibítory. Medzi inhibítory absorpcie zinku patria fytyáty, kyselina šťaveľová, triesloviny, selén, železo, vápnik a iné. Vlákna môže tiež negatívne ovplyvňovať absorpciu a biologickú dostupnosť stopových prvkov, ale ich vzájomné interakcie závisia od mnohých faktorov, vrátane typu vlákniny (Spears, 2003). Vlákna ovplyvňuje črevnú štruktúru, najmä morfológiu črevnej steny (Pastuszewska, 2009).

Hlavným zdrojom zemiakovej vlákniny je zemiaková drť, ktorá vzniká ako nepotrebný produkt v škrobovom priemysle. Nedávne štúdie ukázali, že zemiaková vlákna pozitívne vplyva na pasáž tráveniny, morfológiu a morfometriu čрева a funkciu pankreasu (Tušnio, 2011). Cieľom nášho experimentu bolo porovnať vplyv dvoch typov vláknin a zdrojov zinku na úžitkové parametre prasiatok po odstavbe, na koncentráciu stopových prvkov a transportérov zinku- albumínu a Zn-metalotioneínu v plazme prasiat.

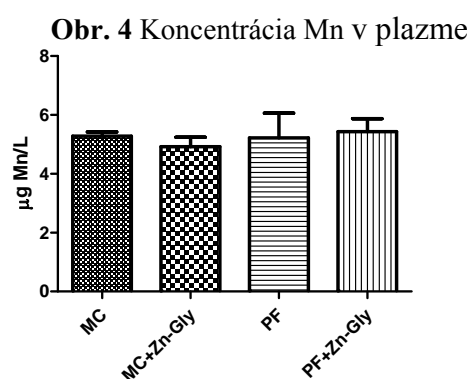
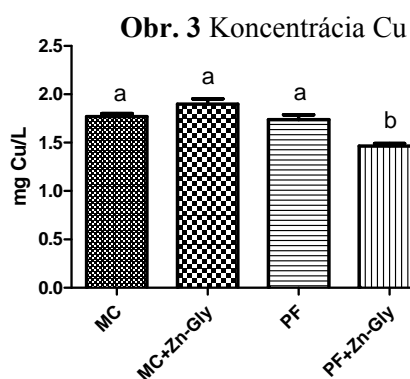
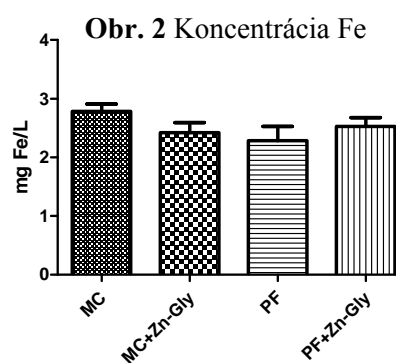
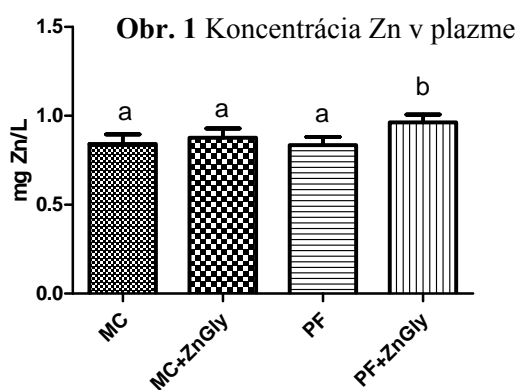
MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol prevedený na 24 kastrovanej odstavčatých plemena Danbred x Duroc, ktorých počiatočná hmotnosť bola 11 kg. Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín po 6 kusov. Odstavčatá boli 4 týždne kŕmené bazálnou diétou (BD) s obsahom 1,7 % celulózy alebo 5 % zemiakovej vlákniny s prídavkom 120 mg/kg zinku. Množstvo celulózy a zemiakovej vlákniny v BD predstavovalo 1 % obsahu hrubej vlákniny. Zinok v BD bol vo forme $ZnSO_4 \cdot H_2O$ alebo Zn chelátu glycinového hydrátu (ZnGly). Prvá skupina zvierat (C) bola kŕmená BD, ktorá obsahovala 1,5 % celulózy (Lonocel) + $ZnSO_4$. Druhej skupine (C+ZnGly) bola podávaná BD s 1,5 % celulózy + ZnGly. BD tretej (PF) a štvrtej skupiny (PF+ZnGly) obsahovala 5% zemiakovej vlákniny (Potex), pričom Zn v 3. skupine bol vo forme $ZnSO_4$, a v 4. skupine vo forme ZnGly.

Počas celého pokusu mali zvieratá voľný prístup ku krmivu a vode. Po 4 týždňoch boli zvieratá usmrtené a odoberané vzorky krvi a tkanív boli uskladnené pri teplote $-80^\circ C$. Vzorky heparinizovanej krvi boli centrifugované 20 minút pri otáčkach $10\,000\ g \cdot min^{-1}$ pri teplote $4^\circ C$. Obsah Zn, Fe a Cu v plazme bol stanovený pomocou atómového absorpčného spektrometra (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko) metódou na plameni (FAAS) za použitia acetylénu ako spaľovacieho plynu. Obsah mangánu v plazme bol stanovený na AAS s grafitovou pecou (Shimadzu, GFA-7000) a pre korekciu pozadia bola použitá deutériová lampa. Na meranie sa použili grafitové kvety s pyrolytickou vrstvou.

Koncentrácie metalotionéínu (Zn-MT1) v plazme boli merané spektrofotometricky ELISA kitom (Neo Scientific), albumín kitom ALBU L500 (Erba Lachema) a sulfhydrylové skupiny modifikovanou metódou podľa Ellmana (Ellman, Arch.Biochem.Biophys., 82:70-77, 1959).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

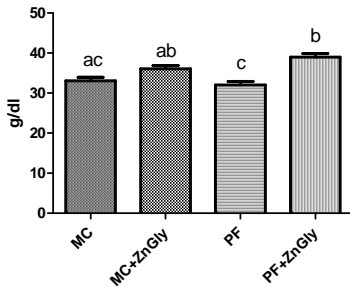


a,b: rozdielne písmenka nad stĺpcami znamenajú signifikantný rozdiel ($P < 0,05$)

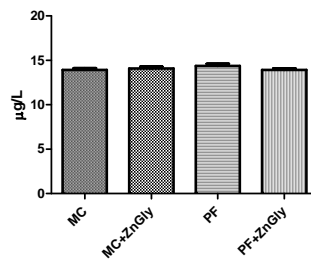
Zvýšené hladiny Zn v plazme boli zistené iba v skupine prijímajúcej PF+ZnGly diétu ($P<0,05$). Koncentrácia Cu v plazme bola významne znížená v tejto skupine ($P<0,01$) v porovnaní so všetkými skupinami.

Zvýšený obsah albumínu a TSH bol zistený u prasíat prijímajúcich diétu PF+ZnGly v porovnaní so skupinou PF ($P<0,05$). Hladina Zn-MT1 nebola ovplyvnená zdrojom prijímaného zinku.

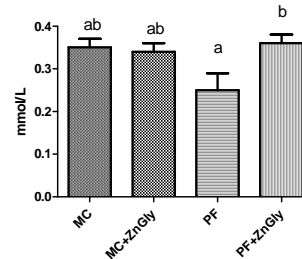
Obr. 5 Obsah albumínu v plazme



Obr. 6 Obsah Zn-MT1 v plazme



Obr. 7 Obsah TSH v plazme



a,b,c: rozdielne písmenka nad stĺpcami znamenajú signifikantný rozdiel ($P<0,05$)

Zlepšené úžitkové parametre a zvýšený obsah Zn, albumínu a tiež TSH v plazme prasíat prijímajúcich diétu suplementované organickým Zn chelátom poukazujú na vyššiu biologickú dostupnosť Zn z jeho organického zdroja, ktorý bol viazaný prevažne na albumín v plazme, zatiaľ čo plazmatické hladiny Zn-MT1 neboli ovplyvnené formou prijímaného zinku. Druh vlákniny nemal žiaden vplyv na skúmané parametre.

Práca bola podporená grantom APVV-0667-12 a COST Action FA1401 (PiGutNet).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Ellman. 1959. Tissue sulphhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 82:70-77.
2. Pastuszewska B, Antushevich H, Tuśnio A, Taciak M. 2009. Potato dietary fibre - Preliminary characterization of the properties and nutritional effects - A Review, Pol. J. Food Nutr. Sci., 59 (3): 205-210.
3. Spears, J.W. 2003. Comparative Trace Element Nutrition. Trace Mineral Bioavailability in Ruminants, 1:1506–1509.
4. Tuśnio A, Pastuszewska E, Świąch E, Taciak M. 2011. Response of young to feeding potato protein and potato fibre - nutritional, physiological and biochemical parameters. J. Anim. Feed Sci., 20:361-378.

VÝBER PROBIOTICKÝCH KANDIDÁTOV NA PREPROGRAMOVANIE MAKROFÁGMI RIADENEJ PRONÁDOROVEJ ODPOVEDE: *IN VITRO* PRÍSTUP S VYUŽITÍM M1 A M2 PODTYPU MAKROFÁGOV

Hradická P., Demečková V., Kassayová M.

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

ABSTRAKT

Makrofágy sú neoddeliteľnou súčasťou slizničného imunitného systému v gastrointestinálnom trakte. V zdravom, homeostatickom prostredí vyvolávajú tolerogénne/regulačné odpovede, pri ktorých dominuje M2 fenotyp makrofágov. Počas imunitného/zápalového stimulu, slizničné makrofágy naopak preukazujú M1pro-zápalový fenotyp. Komplexné vzťahy medzi homeostázou, zápalom a vznikom nádorov v kolorektálnom karcinóme (CRC) sú pravdepodobne do veľkej miery ovplyvňované práve touto polarizácia slizničných makrofágov z jedného podtypu na druhý. Všeobecne je akceptovaná skutočnosť, že tento typ rakovinového ochorenia často vzniká z chronického zápalu v hrubom čreve. Zároveň tu má do veľkej miery vplyv genetické pozadie, pričom ak sa u rodinného príslušníka prvého stupňa vyskytol tento druh rakoviny, riziko vzniku vzrastá 2-násobne, v prípade výskytu u 2 a viac príbuzných, riziko vzrastá až 4-násobne. I keď ide o genetický podklad, viaceré štúdie potvrdili, že aj v tomto prípade dochádza k zápalovému procesu, keďže nesteroidné antiflogistiká znížili mortalitu pri experimentálnom použití a spôsobili regresiu adenómov u pacientov s familiárnou adenomatóznou polypózou. Novodobé štúdie poukazujú na fakt, že polarizácia makrofágov môže byť modulovaná použitím probiotických baktérií. V tomto krátkom príspevku zhrnieme úlohu cytokínov v CRC a takisto vplyv použitia probiotických baktérií pri tomto druhu nádorového ochorenia.

ÚVOD

Rakovina hrubého čreva predstavuje tretí najčastejší typ rakovinových ochorení celosvetovo (GLOBOCAN, 2012). Proces transformácie zo zdravého epitelu na malígnu nádor podlieha zmenám v tumor-supresorových génoch. Následne je vzniknutý nádor závislý od proliferčných signálov, ktoré poskytuje samotné nádorové mikroprostredie. Progresiu nádoru ovplyvňuje vzájomná komunikácia medzi nádorovými bunkami, bunkami nádorového mikroprostredia (makrofágy, B a T lymfocyty, mastocyty a iné) a extracelulárnou matrix. Bunky nádorového mikroprostredia produkujú rôzne solubilné faktory (cytokíny, chemokíny, rastové faktory), ktoré regulujú rast, diferenciáciu, prežívanie nádorov, a zároveň produkujú reaktívne formy kyslíka a dusíka vedúce k ďalším genetickým zmenám v epiteli. Práve chronický zápal hrá dôležitú úlohu v prvých štádiách vzniku nádorov, iniciácii a progresii (Klampfer, 2011). Cytokíny môžeme vo všeobecnosti rozdeliť na pro- a protizápalové, pričom ak hovoríme o pro- a protinádorových vlastnostiach, ich delenie na Th1 a Th2 skupinu je dôležité. Th1 cytokíny (IL-12, IL-15, IFN- γ) prispievajú v bunkovej imunitnej odpovedi, teda sú dôležité pre priamu odpoveď voči nádorovým bunkám. Naopak Th2 typ predstavujú cytokíny IL-4, IL-5, IL-10 a IL-13, ktoré môžu znižovať tumor-špecifickú imunitnú odpoveď (Kantola a kol., 2012). Probiotické baktérie sú definované ako živé organizmy, ktoré ak sú podávané v adekvátnom množstve, majú pozitívne účinky na hostiteľa (FAO/WHO, 2002). I keď je všeobecne známe, že probiotiká sú prospešné pre človeka, ich testovanie sa z veľkej miery zaoberá len procesmi ako rezistencia na antibiotiká a žalúdočné a žlčové kyseliny, antimikrobiálne a metabolické aktivity a pod. Avšak tieto baktérie majú vplyv aj na imunitný systém, pričom rôzne kmene vykazujú rôzne imunomodulačné účinky. Viaceré kmene rodu *Lactobacillus* preukázali pozitívne účinky pri orálnom požívaní, pozitívne sa zapájali do procesov ako rast črevných mikroklkov, fermentácia nestráviteľných zložiek potravy, anaeróbny metabolizmus peptidov a proteínov a produkcia vitamínov (Nicholson a kol.,

2005), ale bol preukázaný aj ich pozitívny efekt v rámci modulácie imunitnej odpovede a protibakteriálnych, protinádorových a protimutagénnych procesov (Suzuki a kol., 2008).

ÚLOHA CYTOKÍNOV V NÁDOROVOM MIKROPROSTREDÍ

TNF- α ako hlavný protizápalový cytokín je v nádorovom tkanive CRC produkovaný predovšetkým makrofágmi a mastocytmi. Tento cytokín aktivuje onkogénne signalizačné dráhy v epitelových bunkách ako Wnt a NF- κ B, čím reguluje rast a prežívanie nádorov (Klampfer, 2011). Zároveň však bola dokázaná jeho schopnosť spôsobiť DNA poškodenie *in vitro* aj *in vivo* podmienkach, ktoré je spojené s produkciou reaktívnych foriem kyslíka. Priamym pôsobením TNF- α na bunky dochádza k chromozómovej instabilite, génovým mutáciám a amplifikáciám (Yan a kol., 2006). IL-1 β patrí taktiež do palety prozápalových cytokínov produkovaných makrofágmi. Jeho zvýšené koncentrácie zároveň zvyšujú produkciu ďalších cytokínov ako TNF- α , IL-6, IL-8 a IL-17. Tento cytokín sa tiež zapája do indukcie dráh Wnt a NF- κ B v rakovinových bunkách (Kaler a kol. 2009). Schopnosť makrofágov indukovať Wnt signalizáciu v kolorektálnych rakovinových bunkách bola znížená použitím vitamínu D₃. Tento vitamín je považovaný za chemopreventívny nielen u hlodavcov, ale aj u človeka (Klampfer, 2011). Dokonca bolo zistené, že jedinci s najvyššími hladinami vitamínu D₃ mali skoro o 40 % znížené riziko CRC oproti jedincom s najnižšími hladinami (Jenab a kol., 2010). IL-17 je cytokín produkovaný Th17 bunkami. Tento podtyp T helper buniek je stimulovaný koktejlom cytokínov TGF- β , IL-1 β a IL-23. Na jednej strane je tento podtyp T lymfocytov dôležitý pre stimuláciu tesných spojení v epiteli čreva a produkcie hlienu, zároveň prítomnosť týchto buniek je spojená s rôznymi autoimunitnými ochoreniami, keďže IL-17 je dôležitý chemokín a spôsobuje akumuláciu neutrofilov v tkanive (Veldhoen a kol., 2006). Z protizápalových cytokínov, hlavnú rolu v nádorovom mikroprostredí hrá TGF- β a IL-10 (Zamarron a Chen, 2011). Na jednej strane sú tieto cytokíny dôležité pre udržiavanie regulácie a homeostázy, a ak dochádza k ich inhibícii, zvyšuje sa naopak produkcia prozápalových cytokínov (Klampfer, 2011). Na druhej strane sa napríklad TGF- β zapája do progresie nádorov imunosupresiou. Znižuje produkciu IFN- γ Th1 bunkami, inhibuje aktivitu makrofágov a prispieva k diferenciacii Th17 buniek. Úloha cytokínu IL-10 je viac-menej protizápalová, inhibuje proces angiogenézy nádorov a signalizácie cez NF- κ B, ale v závislosti od stupňa zápalu, prípadne štádia CRC môže prispievať aj k rastu nádoru (Zamarron a Chen, 2011). Jednotlivé cytokíny nemôžeme jednoducho rozdeliť na pro- a protinádorové, keďže je jasné, že nádorové mikroprostredie a zápal sú tvorené zložitou sieťou interakcií medzi bunkami, či už imunitnými alebo nádorovými a ide o komplexný systém, kde do kontaktu s imunitným systémom prichádza aj mikroflóra v rámci čreva.

IMUNOMODULAČNÉ ÚČINKY PROBIOTICKÝCH BAKTÉRIÍ

Dlhú dobu sa predpokladalo, že pozitívny efekt probiotických baktérií spočíva len v zlepšovaní črevnej mikrobiálnej rovnováhy. Najnovšie štúdie sa zaoberajú testovaním imunomodulačných účinkov rôznych kmeňov probiotík. Vo všeobecnosti môžeme probiotické baktérie rozdeliť na imunostimulačné a imunoregulačné, preto pred ich použitím v prípade chorého jedinca je nutné zvážiť ich výber na základe kontrétného prípadu. Cammarota a kol. (2009) testovali *L. plantarum* kmeň DSMZ 12028 a *Echerichia coli* K4, pričom z výsledkov je zrejmé, že táto bakéria mliečneho kvasenia stimulovala produkciu prozápalových cytokínov minimálne v porovnaní s patogénom *E.coli*. V prípade *L.acidophilus* Bar13 a *L. longum* Bar33 bolo zistené, že znižujú produkciu chemokínu IL-8, ktorý atrahuje neutrofile do tkaniva, s čím súvisí nadmerná zápalová reakcia (Candela a kol., 2008). V inej štúdii bol preukázaný cytotoxický účinok *Lactococcus lactis* 44Lac na rakovinové bunky *in vitro* podmienkach, pričom na normálnu bunkovú líniu bola preukázaná len minimálna cytotoxicita (Haghshenas a kol., 2014). Chon a kol. (2009)

testovali imunomodulačné účinky *L. plantarum* KFCC11389P, pričom preukázali stimuláciu produkcie cytokínov IL-6 a IL-10. Navyše pri použití LPS stimulovaných makrofágov, tento probiotický kmeň znížil tvorbu prozápalových cytokínov, čo by mohlo pomôcť pri liečbe akútnych zápalových odpovedí pri Crohnovej chorobe a ulceratívnej kolitíde. Viaceré popredné svetové laboratória sa zaoberajú štúdiom imunomodulačných vlastností probiotických baktérií, pričom sa predpokladá ich potenciál aj v prípade prevencie ochorení ako zápalové ochorenia čriev a CRC. Zároveň sa kladie veľký dôraz na výskum týchto ochorení, keďže v modernej dobe dochádza k ich vzostupu celosvetovo.

Moja veľká vďaka patrí vedeckej skupine Dr. A. Foey z Plymouth University, UK. Táto práca bola podporná grantom VVGS 2016-291 a projektom VEGA 1/0476/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Cammorota, M, De Rosa M, Stellavato A, Lamberti M. *In vitro* evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity. *Int J Food Microbiol.* 2009; 135: p. 90-98.
2. Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitalu B, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol.* 2008; 125: 286-292.
3. FAO/WHO: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
4. GLOBOCAN: Cancer Incidence and Mortality Worldwidel in 2012. IARC CancerBase. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013, 11.
5. Haghshenas B, Abdullah N, Nami Y, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe.* 2014; 20: 51-59.
6. Chon H, Choi B, Lee E, Jeong G. Immunomodulatory effects of specific bacterial components of *Lactobacillus plantarum* KFCC11389P on the murine macrophage cell line RAW 264.7. *J Appl Microbiol.* 2009; 107: 1588-1597
7. Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, van Duijnhoven FJ, Norat T, Pischon T, Jansen EH, Slimani N, Byrnes G, Rinaldi S, Tjonneland A, Olsen A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Morois S, Kaaks R, Linseisen J, Boeing H, Bergmann MM, Trichopoulou A, Misirli G, Trichopoulos D, Berrino F, Vineis P, Panico S, Palli D, Tumino R, Ros MM, van Gils CH, Peeters PH, Brustad M, Lund E, Tormo MJ, Ardanaz E, Rodriguez L, Sanchez MJ, Dorronsoro M, Gonzalez CA, Hallmans G, Palmqvist R, Roddam A, Key TJ, Khaw KT, Autier P, Hainaut P, Riboli E. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations:a nested case-control study. *BMJ.* 2010; 340:b5500.
8. Kaler P, Godasi BN, Augenlicht L, Klampfer L. The NF-kappaB/AKT-dependent Induction of Wnt Signaling in Colon Cancer Cells by Macrophages and IL-1beta. *Cancer Microenviron.* 2009; 2(1): 69-80
9. Klampfer, L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011; 11(4): 451-464.
10. Nicholson J K, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3: 431-438
11. Suzuki C, Kimoto-Nira H, Kobayashi M, Nomura M, Sasaki K, Mizumachi, K. Immunomodulatory and cytotoxic effects of various *Lactococcus* strains on the murine macrophage cell line J774Æ1. *Int J Food Microbiol.* 2008; 123: 159–165.
12. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006; 24: 179-189.
13. Yan B, Wang H, Rabbani ZN, Zhao Y, Li W, Yuan Y, Li F, Dewhirst MW, Li CY. Tumor necrosis factor-alpha is a potent endogenous mutagen that promotes cellular transformation. *Cancer Res.* 2006; 66: 11565–11570.
14. Zamarron BF, Chen WJ. Dual Roles of Immune Cells and Their Factors in Cancer Development and Progression. *Int. J. Biol. Sci.* 2011; 7(5): 651-658.

VÝVOJ POLYMORFNÝCH STR MARKEROV U PÁSOMNICE *DIPHYLLOBOTHRIMUM LATUM* (CESTODA: DIPHYLLOBOTHRIIDAE)

Koleničová A.¹, Bazsalovicsová E.¹, Králová-Hromadová I.¹, Minárik G.²

¹Parazitologický ústav, SAV, Košice

²Katedra molekulárnej biológie, UK, Bratislava

ABSTRAKT

Pásomnica *Diphyllbothrium latum* (Cestoda: Diphyllbothriidae) je veterinárne a medicínsky významný parazit, ktorého výskyt v Európe bol najviac zaznamenaný u ostriežov zelenkavých (*Perca fluviatilis*) a šŕúk severných (*Esox lucius*) v oblasti alpských jazier vo Švajčiarsku, východnom Francúzsku a severnom Taliansku ale tiež v Estónsku, Rusku a v brakických vodách na severe Poľska. Doteraz však nie sú známe informácie o presnom geografickom rozšírení, vzájomných genetických vzťahoch, migračných trasách a pôvode európskych populácií tejto pásomnice. Mikrosatelity, alebo tzv. „short tandem repeats“ (STR) sú polymorfné, multilokusové, krátke repetitívne sekvencie distribuované v celom genóme, ktoré pre svoje unikátne vlastnosti patria medzi často využívané markery v populačnej genetike. Cieľom práce bolo pomocou technológie sekvenovania novej generácie (NGS) originálne navrhnúť a charakterizovať polymorfné STR markery, ktoré budú v budúcnosti aplikované na štúdium genetických vzťahov európskych populácií pásomnice *D. latum*.

ÚVOD

Pásomnice rodu *Diphyllbothrium*, známe aj ako škárovce alebo rybie pásomnice, sú veterinárne ale aj medicínsky významné parazity, ktoré vyvolávajú ochorenie zvané difylobotrióza. Aktuálne je známych takmer 50 druhov pásomníc tohto rodu, z ktorých 15 druhov parazituje aj u človeka (Scholz a kol., 2016). V Európe boli u rýb zaznamenané tri druhy, *Diphyllbothrium latum* (alpská oblasť), *Diphyllbothrium dendriticum* a *Diphyllbothrium ditremum* (severná Európa, Rusko). Životný cyklus škárovcov zahŕňa dvoch medzihostiteľov (vodné kôrovce a sladkovodné a morské ryby) a definitívneho hostiteľa (rybožravé vtáky alebo cicavce, vrátane človeka). V Európe patria k najčastejším druhým medzihostiteľom ostriež zelenkastý (*Perca fluviatilis*), šŕuka severná (*Esox lucius*), mieň sladkovodný (*Lota lota*) a hrebenačka frkaná (*Gymnocephalus cernua*) a lososovité ryby ako napríklad losos atlantický (*Salmo salar*), pstruh hnedý (*Salmo trutta*) a sih veľký (*Coregonus lavaretus*). Zdrojom nákazy pre definitívneho hostiteľa sú ryby infikované larválnymi štádiami *Diphyllbothrium* sp., tzv. plerocerkoidmi, ktoré sú lokalizované prevažne vo svalovine rýb (Chai a kol., 2005; Kuchta a kol., 2014). Pri zisťovaní pôvodu škárovcov je teda nevyhnutné rozlíšiť, či bola pásomnica zistená u človeka, ako jedného z možných definitívnych hostiteľov, alebo u rýb, teda druhých medzihostiteľov. Infekcia u rýb je spôsobená prírodnou cestou nákazy, získaná priamo v ich životnom prostredí. Nákaza u ľudí môže byť spôsobená konzumáciou infikovaných, tepelne neupravených rýb v krajinách s dokumentovaným výskytom parazita alebo prostredníctvom importovaných sladkovodných a morských rýb z týchto oblastí. Preto nevyhnutným krokom pri identifikácii parazita je kazuistika, ktorá pomáha určiť zdroj a miesto nákazy. Pásomnica *D. latum* je najčastejším zoonóznym druhom, ktorý bol diagnostikovaný u ľudí predovšetkým v holarktiskej oblasti (Škandinávia, Severná Amerika, západné Rusko). Napríklad vo Fínsku bola v roku 1952 zaznamenaná 20-25 % prevalencia difylobotriózy u ľudí, no v roku 1982 prevalencia poklesla na úroveň 1-3 % (Raisanen a kol., 1984). Prípady difylobotriózy v Európe zaznamenané v rokoch 1980 až 2002 indikujú, že bývalé miesta najväčšieho výskytu tejto zoonózy vykazujú celkový pokles počtu nakazených (Škandinávia) (Dupoy-Camet a kol., 2004). Naopak, v krajinách, ktoré sa donedávna nepovažovali za miesta výskytu difylobotriózy (Rakúsko, Česká republika, Belgicko, Holandsko a Španielsko) sa za posledných desať rokov sporadicky

vyskytli infekcie u ľudí, pravdepodobne zapríčinené konzumáciou surových rýb (napr. „sushi“, „carpaccio“ a pod.) (Kuchta a kol., 2013). U rýb bol výskyt larválnych štádií (plerocerkoidy) pásomnice *D. latum* zaznamenaný predovšetkým v oblasti alpských jazier vo Švajčiarsku, východnom Francúzsku a severnom Taliansku, ktoré sa na základe dlhodobých štúdií preukázali aj ako najrizikovejšie oblasti (Wicht a kol., 2010). Napríklad v talianskych jazerách Como, Maggiore, Iseo a Orta prevalencia difylobotriózy u ostriežov zelenkastých, šťúk severných a mieňov sladkovodných presahovala aj 30 % hranicu (Gustinelli a kol., 2016). Podobná situácia bola zaznamenaná aj v jazerách Biel, Murten a v Ženevskom jazere vo Švajčiarsku kde boli infikované ostrieže zelenkasté a šťuky severné. Prítomnosť pásomnic *D. latum* bola zistená aj pri kontrole filiet z ostriežov pochádzajúcich zo Švajčiarska, Poľska, Estónska a Ruska, počas ktorej bolo 10 % vyšetrených rýb pozitívnych na larvy *D. latum* (Scholz a Kuchta, 2016). Tieto parazity boli nájdené aj v ostriežoch z brakických vôd na severe Poľska (Bielat a kol., 2015).

Napriek dostupným údajom o rozšírení pásomnice *D. latum*, vzájomné genetické vzťahy, migračné trasy a pôvod európskych populácií tejto pásomnice nie sú doteraz známe. Metodologickým nástrojom pri populačno-genetických štúdiách sú molekulárne metódy využívajúce DNA oblasti s rôznou mierou variability resp. konzervatívnosti. Mikrosatelity, alebo tzv. „short tandem repeats“ (STR) sú polymorfné, multilokusové, krátke repetitívne sekvencie distribuované v celom génóme, ktoré pre svoje unikátne vlastnosti patria medzi často využívané markery v populačnej genetike, ekologických a evolučných štúdiách (Goldstein a kol., 2000). Preto cieľom práce bolo pomocou technológie sekvenovania novej generácie (NGS) originálne navrhnúť STR markery, ktoré budú následne aplikované v detailnom populačno-genetickom štúdiu európskych populácií pásomnice *D. latum*.

MATERIÁL A METODIKA

Na prípravu DNA templátu pre NGS analýzy bola genomická DNA izolovaná z 10-tich plerocerkoidov *D. latum*, získaných zo svaloviny ostrieža zelenkastého pochádzajúceho z jazera Iseo v Taliansku, pomocou komerčného kitu QIAamp® DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Koncentrácia a čistota gDNA bola meraná spektrofotometricky (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, Delaware, USA), následne koncentrovaná, ekvimolárne zmiešaná a odoslaná na NGS analýzy. Po navrhnutí primerov pre STR lokusy bolo vykonaných niekoľko validačných testov: i) test špecificity navrhnutých primerov pomocou PCR amplifikácie, ii) potvrdenie prítomnosti deklarovaného repetitívneho motívu Sangerovým sekvenovaním, iii) určenie polymorfizmu STR alel v rámci testovaných lokusov pomocou fragmentovej analýzy s fluorescenčne značenými primermi s využitím kapilárnej elektroforézy a softvéru v.3.7 GeneMapper (Applied Biosystems) na analýzu dát. Pre jednotlivé metodické kroky bola použitá genomická DNA izolovaná z celkovo 70 jedincov *D. latum* (23 proglotidov z definitívnych hostiteľov zo Švajčiarska, Rakúska, Belgicka, Fínska a USA a 48 plerocerkoidov z ostriežov, šťúk a mieňov z jazier Como, Maggiore a Iseo v Taliansku).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celogenómovým sekvenovaním bolo vybraných 518 kandidátnych STR marker obsahujúcich amplikónov zahrňujúcich di-, tri- a tetranukleotidové opakovania s variabilnou dĺžkou v rozpätí 90-312 bp. Najlepších 122 kandidátnych amplikónov obsahujúcich unikátne STR markery bolo testovaných PCR metódou, ktorou bol u 110 z nich detegovaný PCR produkt požadovanej veľkosti. Tieto boli sekvenované z oboch strán použitím BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a ABI 3130x1 Genetic Analyser (Applied Biosystems) za účelom detekcie prítomnosti deklarovaného repetitívneho motívu. Analýzou sekvencií pomocou programu Geneious v10.0.1 (Biomatters,

Auckland, New Zealand) bola potvrdená prítomnosť deklarovaných repetitívnych motívov v 78 lokusoch. Doteraz bolo fragmentovou analýzou na alelový polymorfizmus otestovaných 35 lokusov, z ktorých štyri lokusy boli polymorfne. Zvyšných 43 STR lokusov je vo fáze testovania na alelový polymorfizmus.

Úspešný návrh a charakterizácia polymorfných STR markerov je prvým a nevyhnutným krokom pre ich samotnú aplikáciu v populačných štúdiách. V našom prípade boli doposiaľ determinované štyri polymorfne lokusy vhodné na ďalšie analýzy. Keďže proces určenia polymorfizmu STR alel v rámci testovaných lokusov pomocou fragmentovej analýzy ešte nie je ukončený, predpokladáme, že počet polymorfných lokusov bude navýšený. Po dokončení validačných testov budú všetky kandidátne polymorfne lokusy testované na pozorovanú (Ho) a očakávanú (He) heterozygotitu, odchýlky od Hardy-Weinbergovej rovnováhy a prítomnosť nulových alel pomocou programov GenAlEx 6.5, Micro-Checker 2.2.3. Originálne navrhnuté STR markery, budú následne aplikované v detailnom populačno-genetickom štúdiu európskych populácií pásomnice *D. latum*.

Práca bola realizovaná s podporou projektov APVV-15-004 a VEGA 2/0134/17 a na základe podpory Operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja ITMS: 26220120022 (0,4).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Bielat M., Legierko M., Sobocka E. Species richness and diversity of the parasites of two predatory fish species – perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) and zander (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758) from the Pomeranian bay. *Ann Parasitol.* 2015; 61: 85-92.
2. Chai J. Y., Murell K. D., Lymbery A. J. Fish-borne parasitic zoonoses: status and issues. *Int J Parasitol.* 2005; 35:1233-1254.
3. Dupoy-Camet J., Peduzzi R. Current situation of human diphyllbothriasis in Europe. *Euro Surveill.* 2004, 9:31-35.
4. Goldstein D. B., Schöletterer CH. *Microsatellites: evolution and applications.* 2000; ISBN 9780198504078.
5. Gustinelli A., Menconi V., Prearo M., Caraffa M., Righetti M., Scanzio T., Raglio A., Fioravanti M. L. Prevalence of *Diphyllbothrium latum* (Cestoda: Dphyllobothriidae) plerocercoids in fish species from four Italian lakes and risk for the consumers. *Int J Food Microbiol.* 2016; 235:109-112.
6. Kuchta R., Brabec J., Kubačková P., Scholz T. Tapeworm *Diphyllbothrium dendriticum* (Cestoda) – neglected or emerging human parasite?. In *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7:12.
7. Kuchta R., Esteban J.G., Brabec J., Scholz T. Misidentification of *diphyllbothrium* species related to global fish trade. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1955-1957.
8. Raisanen S., Puska P. Fish tapeworm, a disappearing health problem in Finland. *Scan J Soc Med.* 1984; 12:3-5.
9. Scholz T, Kuchta R. Fish-borne, zoonotic cestodes (*Diphyllbothrium* and relatives) in cold climates: A never-ending story of neglected and (re)-emergent parasites. *Food waterb Parasitol.* 2016; 4:23-38.

ÚLOHA GERANYLGERANYL DIFOSFÁT SYNTÁZY 11 (GGPPS11) V REGULÁCIÍ VÝVINU *ARABIDOPSIS THALIANA*

Kopcsayová D., Košuth J.

Ústav biologických a ekologických vied UPJŠ PF, Košice

ABSTRAKT

Enzýmy z rodiny GGPP syntáz sa podieľajú na biosyntéze izoprenoidov, ku ktorým patria aj fotosyntetické pigmenty a mnohé fytohormóny. *A. thaliana* disponuje najmenej piatimi génmi kódujúcimi GGPP syntázy aktívne v rôznych kompartmentoch bunky. Z nich je pre vývin rastliny kľúčová iba plastidová GGPPS11, ktorej nulová mutácia je embryo-letálna. Zistili sme, že *ggpps11* mutáciu je možné čiastočne komplementovať overexpresiou iného *GGPPS* génu. *GGPPS1*, *GGPPS2* alebo *GGPPS3* exprimované pod kontrolou natívneho *GGPPS11* promótoru umožňujú *ggpps11* embryám klíčiť, ale nedokážu obnoviť normálny autotrofný vývin. Aby sme overili, či je príčinou rôzna intracelulárna lokalizácia GGPPS izozým, vytvorili sme konštrukty, v ktorých boli nukleotidové sekvencie tranzitných peptidov *GGPPS1*, 2 a 3 nahradené sekvenciou tranzitného peptidu *GGPPS11* fúzaného s natívnym *GGPPS11* promótorom (*pG11::G11T+G1tr*, *pG11::G11T+G2tr*, *pG11::G11T+G3tr*). Tieto konštrukty sme vniesli pomocou agrobaktérií do genómu rastlín *A. thaliana* heterozygotných pre alelu *ggpps11*. 18,75 % potomstva transformovaných T₁ rastlín segregovalo s nulovým *ggpps11* genotypom a jednou inzerciou transgénu *pG11::G11T+G1tr* alebo *pG11::G11T+G2tr* – v tejto frakcii sme sledovali účinok komplementácie *ggpps11*. *pG11::G11T+G1tr* nekomplementoval vývin *ggpps11* ani v jednej z analyzovaných línií rastlín, *pG11::G11T+G2tr* komplementoval embryonálny vývin čiastočne v 3 líniách a úplne v 2 líniách, v ktorých sa bude sledovať aj postembryonálny vývin. Pre *pG11::G11T+G3tr* sa zatiaľ nepodarilo vyselektovať T₁ transformanty. Priebežné výsledky tohto experimentu čiastočne podporujú doterajší výskum, ktorý predpokladá, že *GGPPS11* patrí k „house-keeping“ génom so širším portfóliom pôsobnosti ako je syntéza GGPP pre tvorbu konečných produktov, čo je aj dôvod, prečo ho vo funkcii nedokážu plne zastúpiť iné *GGPPS* gény.

ÚVOD

GGPP sa tvorí vo viacerých častiach bunky za účasti rôznych GGPP syntáz – v mitochondriách jeho syntézu zabezpečuje *GGPPS1*, v cytoplazme *GGPPS3* a 4, v plastidoch *GGPPS2* a 11 (Beck a kol., 2013). Je však možné, že *GGPPS11* je duálne targetovaný, pričom jeho cytozolická verzia je esenciálna hlavne pre vývin embrya (Ruiz-Sola a kol., 2016b). O *GGPPS11* je ďalej známe, že na rozdiel od svojich paralógov je gén vysoko exprimovaný takmer vo všetkých pletivách a počas celej ontogenézy rastliny (Beck a kol., 2013). *GGPPS11* je navyše schopný interagovať s enzýmami, ktoré využívajú GGPP ako substrát (Ruiz-Sola a kol. 2016a). Všetky tieto charakteristiky sú pravdepodobne zodpovedné za to, že za normálnych podmienok nie sú ostatné izozýmy schopné nahradiť stratu *GGPPS11*, čo vedie k letalite už v ranom štádiu vývinu a *GGPPS11* predurčuje ku génom s „house-keeping“ funkciou.

MATERIÁL A METODIKA

Rastlinný materiál a podmienky kultivácie

V experimente boli použité rastliny *A. thaliana* (L.) Heynh heterozygotné pre letálnu *ggpps11* mutáciu vypestované zo semien T-DNA inzerčnej línie SAIL_712_D06 (Sessions a kol., 2002) a štandardné rastliny ekotypu Col-0 ako kontrola. Klíčenie semien bolo iniciované *in vitro* na MS médiu (Murashige a Skoog, 1962) s 1% w/v sacharózou spevnenom 0,8% w/v rastlinným agarom (Duchefa). Heterozygotné *ggpps11* rastliny boli selektované na

fosfinitricíne (10 μgml^{-1}), po transformácii aj na kanamycíne (25 $\mu\text{g/ml}$). Klíčence boli ďalej pestované *ex vitro* v pôde pri 23 °C, 60 % RH a fotoperióde 16/8.

Príprava vektorov na transformáciu

Kódujúce sekvencie *GGPPS1* (At1g49530), *GGPPS2* (At2g18620) a *GGPPS3* (At2g18640) boli skrátené o dĺžku tranzitných peptidov predikovaných programom TargetP (Emanuelsson a kol., 2000; Nielsen a kol., 1997), teda o 22 aa u *GGPPS1* → *G1tr*, 39 aa u *GGPPS2* → *G2tr* a 22 aa u *GGPPS3* → *G3tr*. „tr“ sekvencie boli klonované Gateway™ technológiou (Invitrogen) do pENTR/D-TOPO vektora (Invitrogen) a ďalej rekombinačnou reakciou do binárneho vektora pK7WG2,0 (Karimi a kol. 2002). Natívny *GGPPS11* promótor a tranzitný peptid → *pG11::G11T* boli amplifikované na templáte gDNA ako súvislý úsek 1345 nukleotidov pred začiatkom ORF *GGPPS11* a nasledovných 168 nukleotidov zodpovedajúcich 56 aa chloroplastového tranzitného peptidu *GGPPS11* podľa TargetP (Emanuelsson a kol., 2000; Nielsen a kol., 1997). *pG11::G11T* bol klonovaný TOPO TA metódou (Invitrogen) do pCR2.1-TOPO (Invitrogen), odkiaľ bol vyštiepený ako XhoI/SpeI fragment. Pôvodný CaMV 35S promótor v pK7WG2,0 bol vyštiepený ako SallI/SpeI fragment zanechávajúci kohézne konce kompatibilné s ligáciou *pG11::G11T* fragmentu, ktorý sa cez obnovené restriktčné miesto pre SpeI spojil s *G1tr*, *G2tr* alebo *G3tr* tak, aby ostal zachovaný čítací rámec.

Transformácia A. thaliana

Vektory pK7WG2_ *pG11::G11T+G1tr*, pK7WG2_ *pG11::G11T+G2tr* a pK7WG2_ *pG11::G11T+G3tr* boli chemickou CaCl_2 transformáciou vnesené do *Agrobacterium tumefaciens* kmeňa C58C1 Rif^R (pMP90) (Koncz a Schell, 1986). Pozitívne klony boli selektované na LB médiu (Difco) spevnenom 1,5% w/v mikrobiologickým agarom (Sigma-Aldrich) so spektinomycínom (100 $\mu\text{g/ml}$). Z vybraných kolónií boli pripravené suspenzie podľa Logemann a kol. (2006), do ktorých sa ponorili kvety *ex vitro* rastlín *A. thaliana* s heterozygotnou *ggpps11* mutáciou. Zozbierané semená boli selektované pre T1 transformanty.

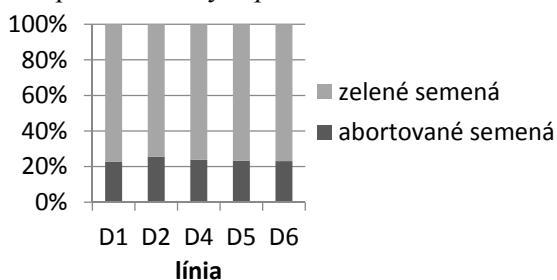
Analýza komplementácie ggpps11 letálneho fenotypu

Na štúdium účinku komplementácie bolo vybraných 5 T1 línií rastlín (samostatných transformačných udalostí) pre konštrukt *pG11::G11T+G1tr* a takisto 5 T1 línií pre konštrukt *pG11::G11T+G2tr*. Pre *pG11::G11T+G3tr* sa zatiaľ nepodarilo vyselektovať žiadneho transformanta. Z každej línie bolo pod stereolupou (Leica EZ4 D) analyzovaných najmenej 1000 semien v šesľách, a to na základe segregácie fenotypu.

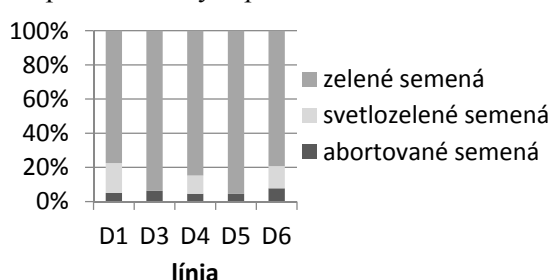
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V experimente sme skúmali, či *GGPPS1* a 2 dokážu zastúpiť funkciu *GGPPS11* u *ggpps11* mutantov, ak sú ich gény exprimované na rovnakej úrovni a enzýmy targetované rovnako ako *GGPPS11*. Tieto vlastnosti mali dosiahnuť pomocou fúzie s *pG11::G11T* po odstránení ich pôvodných tranzitných peptidov. Mieru komplementácie *ggpps11* sme pre jednotlivé transgénne línie rastlín určili na základe porovnania zisteného a očakávaného štiepenia fenotypov semien ($\chi^2_{0,05}$ test dobrej zhody). V našom prípade úplnej komplementácii zodpovedalo 93,75 % štandardných zelených a 6,25 % abortovaných semien, čiastočnej komplementácii 75 % zelených, 18,25 % svetlozelených a 6,25 % abortovaných semien, žiadnej komplementácii 75 % zelených a 25 % abortovaných semien (podľa Mendelovho zákona štiepenia). Z 5 analyzovaných línií rastlín s inzertom *pG11::G11T+G1tr* nedošlo ku komplementácii *ggpps11* ani v jednej ($p = 0,59-0,88$; Graf 1). *pG11::G11T+G2tr* komplementoval *ggpps11* v dvoch líniách ($p = 0,46$ a $0,99$) a čiastočne v 3 líniách ($p = 0,08-0,82$; Graf 2).

Graf 1 Percentuálne zastúpenie fenotypov semien v línách *GGPPS11/ggpps11* komplementovaných *pG11::G11T+G1tr*.



Graf 2 Percentuálne zastúpenie fenotypov semien v línách *GGPPS11/ggpps11* komplementovaných *pG11::G11T+G2tr*.



Zistili sme, že štandardne mitochondriálna GGPPS1 targetovaná do plastidov nedokáže nahradiť GGPPS11. Príčinou by mohla byť aj skutočnosť, že GGPPS1 syntetizuje primárne geranylferanzyl difosfát (Nagel a kol., 2016; Wang a kol., 2016). V prípade *pG11::G11T+G2tr* sme síce dosiahli aj úplnú komplementáciu *ggpps11*, tá však môže byť obmedzená iba na embryonálny vývin, preto sú na vyvodenie definitívnych záverov o funkcii GGPPS11 žiaduce ďalšie pozorovania.

Práca vznikla s podporou grantov VVGS-PF-2016-72621 a VEGA 1/0926/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Beck G, Coman D a kol. Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.* 2013; 82: 393-416
2. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S a von Heijne G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol.* 2000; 300: 1005-1016
3. Karimi M, Inzé D, Depicker A. Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 2002; 7: 193-195
4. Koncz C a Schell J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* 1986; 204: 383-396
5. Logemann E a kol. An improved method for preparing *Agrobacterium* cells that simplifies the *Arabidopsis* transformation protocol. *Plant Methods.* 2006; 2: 16
6. Murashige T a Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 1962; 15: 473-497
7. Nagel R a kol. *Arabidopsis thaliana* isoprenyl diphosphate synthases produce the C25 intermediate geranylgeranyl diphosphate. *Plant J.* 2015; 84: 847-859
8. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S a von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* 1997; 10: 1-6
9. Ruiz-Sola MÁ, Barja MV a kol. A single *Arabidopsis* gene encodes two differentially targeted geranylgeranyl diphosphate synthase isoforms. *Plant Physiol.* 2016b; 172: 1393-1402
10. Ruiz-Sola MÁ, Coman D a kol. *Arabidopsis* geranylgeranyl diphosphate synthase 11 is a hub isozyme required for the production of most photosynthesis-related isoprenoids. *New Phytol.* 2016a; 209: 252-264
11. Sessions A a kol. A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell.* 2002; 14: 2985-2994
12. Wang C, Chen Q a kol. Structural analyses of short-chain prenyltransferases identify an evolutionarily conserved GGPPS clade in *Brassicaceae* plants. *Mol Plant.* 2016; 9: 195-204

VYUŽITIE KOMÉTOVEJ ANALÝZY PRI DETEKcii GENOTOXICKÉHO A CYTOTOXICKÉHO ÚČINKU TIAKLOPRIDU V LYMFOCYTOCH PERIFÉRNEJ KRVI HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Kováčová S.

Ústav genetiky, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Neonikotinoidy sú jednou z najzaujímavejších tried syntetických insekticídov za posledné tri desaťročia. Využívajú sa najmä na ochranu pred bodavým hmyzom u rastlín a zvierat. Spomedzi širokej rady neonikotinoidných insekticídov sme si vybrali prípravok tiakloprid. Keďže je tento prípravok rozšírený celosvetovo, je dôležité posúdiť jeho možný genotoxický a cytotoxický účinok na živé organizmy. Vhodným experimentálnym modelom sú prežúvavce, ktoré môžu byť prostredníctvom spásania a kŕmenia vystavené vyšším dávkam pesticídov. V našej práci sa potenciálne genotoxické a cytotoxické účinky pesticídu tiaklopridu na neproliferujúce bunky hovädzieho dobytká skúmali pomocou alkalickej jednobunkovej gélovej elektroforézy (kometový test - SCGE). Po 2 hodinovej expozícii tiaklopridu došlo k výraznému zvýšeniu poškodenia DNA so štatistickou významnosťou pri všetkých koncentráciách okrem najnižšej koncentrácie u donora 1 ($60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** $p < 0,01$ a $120, 240, 480 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *** $p < 0,001$) a pri troch najvyšších koncentráciách u donora 2 ($120 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** $p < 0,01$ a $240, 480 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *** $p < 0,001$, ANOVA).

ÚVOD

Využitie neonikotinoidov sa neustále zvyšuje a postupne nahrádzajú orgánofosfátové a metylkarbamátové zlúčeniny. Z dôvodu nekontrolovateľnej aplikácie insekticídov sa zvyšuje rozsah ekologickej nestability a obeťou sa stávajú mnohé necieľové organizmy. Neonikotinoidy patria medzi silné neurotoxické insekticídy (Kocaman a kol., 2014). Mechanizmus pôsobenia neonikotinoidov spočíva v agonistickom účinku na nikotínový acetylcholínový receptor (nAChR) hmyzu, nie však na nAChR cicavcov, vtákov a rýb. Neonikotínové insekticídy môžu mať silné vedľajšie účinky vďaka skutočnosti, že aktivujú a/alebo modulujú nikotínový receptor stavovcov. Najčastejšie testovanými neonikotínovými prípravkami sú imidakloprid, tiametoxam a tiakloprid (Sharma a Parihar, 2013). Riziko vedľajších účinkov daných pesticídov bolo hodnotené na čmeliakoch. Naznačili, že imidakloprid a tiametoxam sú veľmi nebezpečné, zatiaľ čo tiakloprid sa zdal byť bezpečným (Mommaerts a kol., 2010).

Prvýkrát bola detekcia a kvantifikácia zlomov molekuly DNA v jednotlivých bunkách použitá v práci Rydberga a Johansona (Rydberg a Johanson, 1978), kedy boli bunky imobilizované v agaróze na mikroskopických sklíčkach a lyzované v mierne alkalickom roztoku tak, aby DNA bola čiastočne relaxovaná. Po neutralizácii boli bunky ofarbené akridínovou oranžou. Použitím elektroforézy došlo k zvýšeniu citlivosti detekcie poškodenia DNA v nukleoidoch. Výsledný obraz vplyvom migrácie poškodenej DNA pripomínal kométu, odtiaľ vznikol názov kométová analýza (Singh a kol., 1988).

MATERIÁL A METODIKA

Pri alkalickej kométovej analýze boli lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytká izolované pomocou separačného média Histopaque 1077. Lymfocyty boli inkubované v kultivačnom médiu a boli vystavené pôsobeniu insekticídu tiaklopridu (koncentrácie $30, 60, 120, 240$ a $480 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), destilovanej vode (negatívna kontrola) a H_2O_2 (pozitívna kontrola) počas doby 2 hodín. Pred lýzou sa bunky zmiešali s agarózou s nízkou teplotou topenia (LMP) na mikroskopickom sklíčku. Pomocou Trypanovej modrej bola určená relatívna životaschopnosť buniek. Bolo analyzovaných celkovo 100 komét pomocou fluorescenčného mikroskopu

NIKON Labophot 2A, vybaveného filtrom Texas Red. Kométy boli vizuálne klasifikované do piatich kategórií podľa intenzity fluorescencie DNA v chvoste vzhľadom k hlave kométy. Hodnota 0-4 bola priradená každej kométe podľa stupňa poškodenia (Collins, 1997). Výsledky boli vyhodnotené štatistickou metódou ANOVA a Dunnettovým testom.

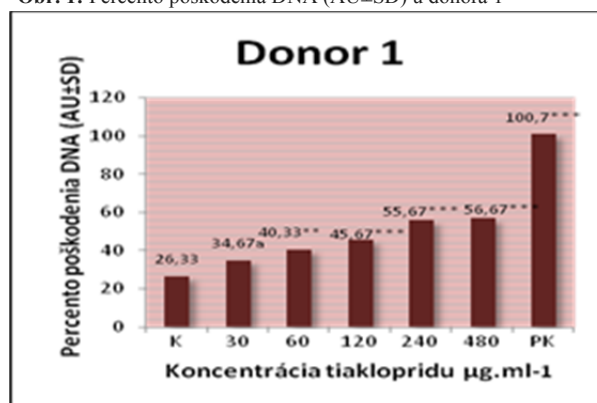
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky poškodenia DNA v neproliferujúcich lymfocytoch periférnej krvi u hovädzieho dobytká po expozícii tiaklopridom (koncentrácie 30,60,120,240 a 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) sú zhrnuté v Tab.1. a na Obr. 1 a 2. Po 2 hodinovej expozícii tiaklopridom došlo k výraznému zvýšeniu poškodenia DNA so štatistickou významnosťou pri všetkých koncentráciách okrem najnižšej koncentrácie u donora 1 (60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** p <0,01 a 120, 240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ***p <0,001) a pri troch najvyšších koncentráciách u donora 2 (120 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ** p <0,01 a 240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ***p <0,001, ANOVA). Životaschopnosť buniek bola u donora 1 vyššia ako 95,83 % a u donora 2 bola vyššia ako 95,24 %.

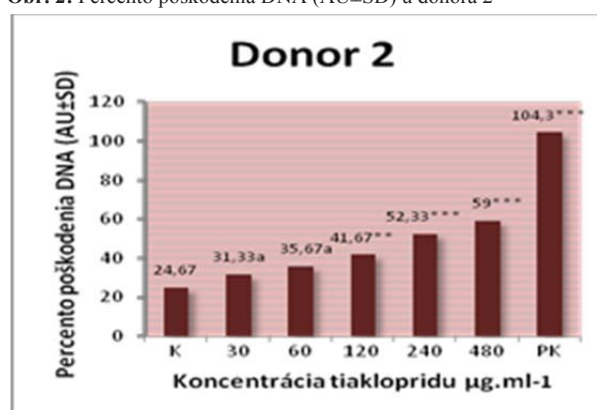
Tab.1: Rozsah poškodenia DNA (arbitrárne jednotky, AU) a životaschopnosti (%) neproliferujúcich boviných lymfocytov periférnej krvi po vystavení pôsobeniu tiaklopridu v priebehu 2 hodín

Dávka	% Životaschopnosti	DNA poškodenie (AU \pm SD)
Donor 1		
H ₂ O	98.7	26.33 \pm 4,51
Tiaklopid ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
30	98.5	34.67 \pm 2.52 ^a
60	97.5	40.33 \pm 1.53 ^{**}
120	95.8	45.67 \pm 2.52 ^{***}
240	98.0	55.67 \pm 0.58 ^{***}
480	98.1	56.67 \pm 6.81 ^{***}
H ₂ O ₂ (300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	-	100.7 \pm 5.13 ^{***}
Donor 2		
H ₂ O	95.2	24.67 \pm 3.06
Tiaklopid ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
30	97.6	31.33 \pm 4.62 ^a
60	96.8	35.67 \pm 2.52 ^a
120	95.2	41.67 \pm 1.16 ^{**}
240	95.2	52.33 \pm 3.51 ^{***}
480	97.0	59.00 \pm 4.36 ^{***}
H ₂ O ₂ (300 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	-	104.3 \pm 11.59 ^{***}

Obr. 1: Percento poškodenia DNA (AU \pm SD) u donora 1



Obr. 2: Percento poškodenia DNA (AU \pm SD) u donora 2



Pri sledovaní účinku neonikotínového insekticidu tiaklopridu na neproliferujúce boviné lymfocyty alkalickou kométovou analýzou sme po 2h expozícii detegovali zvýšené poškodenie DNA v súvislosti so zvyšujúcimi koncentraciami. Alkalická kométová analýza sa primárne používa k detekcii jednoreťazcových zlomov, ale poskytuje tiež informácie o dvojláknových zlomoch a alkalicky labilných miestach. Existuje taktiež neutrálna modifikácia, ktorou sa hodnotia dvojláknové zlomy. V alkalickom prostredí dochádza k narušeniu neväzobných interakcií medzi dusíkatými bázami DNA a teda k oddeleniu oboch vlákn dvojjávitnice. Zlomy na jednom reťazci sa prejavujú uvoľnením fragmentov

jednovláknovej DNA, detegovateľných kométovou analýzou (Collins, 2004a). Naše výsledky poukazujú na to, že pesticídny prípravok tiakloprid indukuje poškodenie DNA a tvorbu zlomov. Pozitívny účinok pri formácii komét, t.j. produkcii DNA zlomov tiež opísali v neproliferujúcich humánných lymfocytoch vplyvom insekticídov tiaklopridu, klotidinu a imidaklopridu autori Calderón-Segura a kol. (2012). Kométová analýza ponúka vhodné doplnenie informácie o priamom poškodení DNA. Jednovláknové zlomy môžu byť vyvolané rôznymi látkami (UV žiarenie, ROS), môžu byť rýchlo opravené a nemajú veľkú závažnosť pre porušenie genómovej integrity. Dvojvláknové zlomy v porovnaní s jednovláknovými predstavujú závažnejšie poškodenie spôsobené mutagénmi, pretože sú vyvolané silnými induktormi mutácií a chromozómových abnormalít (Jackson, 2002). Kométovou analýzou sa najčastejšie hodnotí genotoxicita rôznych zlúčenín. Ündeğer a Başaran (2005) *in vitro* na čerstvo izolovaných humánných lymfocytoch periférnej krvi testovali pomocou SCGE genotoxický účinok viacerých účinných látok široko používaných pesticídnych prípravkov, pričom v určitých koncentráciách zistili signifikantné zvýšenie DNA poškodenia. Nakoľko neexistuje jednoduchý vzťah medzi úrovňou poškodenia DNA spôsobeným určitou látkou a biologickým dopadom tohto poškodenia je interpretácia výsledkov neľahká, čo predstavuje hlavnú nevýhodu kométovej analýzy (Olive a kol., 2006). V našom prípade dosiahnuté výsledky detegovali výraznejšie poškodenie DNA a tvorbu zlomov prejavujúcich sa typickými obrazmi komét, čím sa potvrdil negatívny účinok insekticídu tiaklopridu.

Podakovanie: VEGA 1/076/16, VEGA 1/0043/15 a IGA 09/2017

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Calderon-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Villalobos-Pietrini R, Martínez-Valenzuela C, Carbajal-
2. López Y, Calderón-Ezquerro MC, Cortés-Eslava J, García-Martínez R, Flores-Ramírez D, Rodríguez-Romero MI, Méndez-Pérez P, Bañuelos-Ruiz E. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects in human peripheral blood lymphocytes exposed in vitro to neonicotinoid insecticides news. *J. Toxicol.* 2012; 612647, 11.
3. Collins AR, Dobson VL, Dušinská M, Kennedy G, Štětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 1997; 375,183-193.
4. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair.Principles, applications, and limitations. *Mol.Biotechnol.*26. 2004a; 249-261.
5. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks.*Carcinogenesis.* 2002; 23:687-696.
6. Kocaman AY, Rencüzoğullari E, Topaktaş M. In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Envir.Toxicology.* 2014; 29:631-641.
7. Mommaerts V, Reynders S, Boulet J, Besard L, Sterk G, Smagghe G. Risk assessment for side-effects of neonicotinoids against bumblebees with and without impairing foraging behavior.*Ecotoxicology.* 2010; 19:207-215.
8. Olive PL, Banáth JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protocols* 1. 2006; 23-29.
9. Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells.In Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF(Eds.): *DNA repair mechanisms.* Academic press. 1978; 465-468.
10. Sharma BN, Parihar NS. Dissipation and persistence of flubendiamide and thiacloprid in/on tomato and soil.*Bull. Environ. Contam. Toxicol.*2013; 90:252-255.
11. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp.Cell Res.* 175. 1988; 184-191.
12. Ündeğer Ü, Başaran N. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch.Toxicol.* 2005; 79:169-176.

SELEKCIA ENTEROKOKOV PRE ICH PROBIOTICKÉ VYUŽITIE U PSOV

Kubašová I.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Sedemnást' kmeňov baktérií rodu *Enterococcus* (vybratých do užšieho výberu zo 160 izolátov) bolo testovaných z hľadiska možnosti ich využitia ako kmeňov probiotických vo výžive spoločenských zvierat. Enterokoky boli izolované z trusu klinicky zdravých psov. Z hľadiska bezpečnosti sa vyžaduje, aby boli probiotické baktérie citlivé voči vybraným antimikrobiálnym látkam udaným Európskym úradom pre bezpečnosť potravín. Všetky enterokoky z uvedenej vyselektovanej skupiny boli citlivé ku 9 z 19 vybraných antimikrobiálnych látok. Najvyššia rezistencia bola pozorovaná v prípade cefotaximu (88,2 %) a oxacilínu (76,5 %). U všetkých kmeňov bola detegovaná γ -hemolýza, indikujúca absenciu hemolýzy. Z hľadiska enzymatickej aktivity je dôležité, aby probiotický kmeň neprodukoval nežiaduce enzýmy: negatívne reakcie 17 enterokokov boli pozorované v prípade N-acetyl- β -glukozaminidázy a β -glukuronidázy, zatiaľ čo v prípade β -glukozidázy bolo pozorovaných 13 negatívnych reakcií a v prípade α -chymotrypsínu 12 negatívnych reakcií. Na základe testov bezpečnosti bola vyselektovaná užšia skupina 9 enterokokov, u ktorej boli skúmané probiotické vlastnosti. Skúmané kmene produkovali kyselinu L-mliečnu v koncentráciách v rozmedzí od 76,2 mmol.l⁻¹ do 119,3 mmol.l⁻¹ po 24 hodinách. D-izomér kyseliny mliečnej bol produkovaný v podstatne nižších koncentráciách u všetkých enterokokov. Prežiteľnosť dosahovali vyššiu v podmienkach simulujúcich žľčovú šťavu, zatiaľ čo v podmienkach simulujúcich žalúdočné prostredie (teda nižšieho pH) dosahoval najlepšiu prežiteľnosť kmeň *E. faecium* D7, a to 27,8 % po 45 min a 4,7 % po 90 min. Výsledkom štúdie sú vyselektované 2 kmene druhu *Enterococcus faecium* (EF/D7 a EF/IK25) psieho pôvodu, ktoré spĺňajú podmienky pre ich využitie vo výžive zvierat a budú predmetom ďalšieho skúmania *in vitro* a taktiež *in vivo*.

ÚVOD

Probiotiká sa stávajú čoraz populárnejšími ako náhrada za antibiotické stimulatory rastu (AGP - Antibiotic Growth Promoters). Sú definované ako živé mikroorganizmy, ktoré ak sú podávané v adekvátnom množstve, prispievajú k zlepšeniu zdravotného stavu hostiteľa (FAO/WHO, 2001). U hospodárskych zvierat sa používajú najmä pre udržiavanie a zlepšenie úžitkovosti (produktivita a rast zvierat) a taktiež ako prevencia premnoženia črevných patogénov (FAO, 2016). Avšak v posledných rokoch narastá záujem o užívanie probiotických baktérií aj u chovateľov spoločenských zvierat, najmä mačiek a psov. Ako probiotiká vo výžive zvierat sa najčastejšie používajú kmene rodov: *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Yirga, 2015). Aby bolo využitie probiotík prospešné, bakteriálne druhy by mali byť intestinálneho pôvodu hostiteľa, nakoľko probiotické vlastnosti mikroorganizmov sú spájané s hostiteľskou špecificitou (Christensen a kol., 2002; Grzeskowiak a kol., 2015). Avšak, väčšina probiotík určených spoločenským zvieratám nie je pôvodom izolovaná z gastrointestinálneho traktu mačiek alebo psov. Čo sa týka psov, iba dva kmene *E. faecium* (nie psieho pôvodu) boli doposiaľ v rámci Európy preskúmané a schválené Európskym úradom pre bezpečnosť potravín pre ich bezpečnosť a účinnosť ako probiotiká alebo krmné aditíva u psov (Schmitz a Suchodolski, 2016).

MATERIÁL A METODIKA

Zo 160 kmeňov enterokokov izolovaných z trusu psov bola na základe výsledkov z predchádzajúcej štúdie vyselektovaná užšia skupina 17 kmeňov. Táto skupina pozostávala z 15 kmeňov *E. faecium*, 1 kmeňa *E. casseliflavus* a 1 kmeňa *E. mundtii*. Enterokoky boli

testované z hľadiska bezpečnosti podľa kritérií EFSA (detekcia génov virulentných faktorov, rezistencia voči antimikrobiálnym látkam, enzymatická aktivita, hemolytická aktivita) a taktiež boli u nich testované probiotické vlastnosti (prežívateľnosť v podmienkach GIT, produkcia kyseliny mliečnej). U všetkých enterokokov bola testovaná minimálna inhibičná koncentrácia voči 19 vybraným antimikrobiálnym látkam za použitia Mueller-Hinton agaru (Oxoid, UK). Boli použité MIC stripy s nasledovnými koncentráciami – 0,016-256 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (BioMérieux, Francúzsko): ampicilín, kyselina klavulánová+amoxicilín, linezolid, teicoplanin, chloramfenikol, kanamycín, klindamycín; 0,015-256 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Oxoid): cefotaxim, oxacilín, erytromycín, tetracyklín, vankomycín; 0,002-32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$: imipenem, penicilín (Oxoid), meropenem, ciprofloxacín, trimetoprim sulfametoxazol (BioMérieux, Francúzsko); 0,064-1024 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (BioMérieux): streptomycín; 0,06-1024 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (Oxoid): gentamycín. Po naočkovaní enterokokov a uložení MIC stripov, boli platne inkubované pri 36 °C 18 hod (vankomycín 24 hod). Po inkubácii boli kmene charakterizované ako senzitivne alebo rezistentné podľa referencie EFSA (FEEDAP, 2012) a zostávajúce kmene podľa tabuliek EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2017). Ako pozitívne kontroly boli použité kmene *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Hemolytická aktivita bola testovaná za použitia Columbia agaru (Becton a Dickinson), ktorý bol suplementovaný 5 % (v/v) čerstvej konskej krvi. Platne boli inkubované 24 hod. pri 37°C a po inkubácii bola u kmeňov diferencovaná α -, β - a γ -hemolýza. Enzymatická aktivita bola testovaná semikvantitatívnou mikrometódou za použitia kitu API ZYM (BioMérieux). Enzymatické aktivity boli odčítavané na základe intenzity farebnej reakcie v rozsahu 1 až 5, čo zodpovedalo aktivite od 0 do 40 nmol / 4 hod. Po vyššie uvedených testoch bola vyselektovaná skupinka 9 kmeňov enterokokov, u ktorej bola skúmaná prežívateľnosť v podmienkach simulujúcich gastrointestinálny trakt metódou podľa Arboleya a kol. (2011), (žalúdočná šťava – pH=2,5, 45 a 90 min; žľčová šťava – pH=8, 180 min). Výsledky boli prezentované v percentách počtov prežívajúcich buniek. Deväť probiotických kandidátov enterokokov bolo testovaných taktiež na produkciu kyseliny mliečnej, a to enzymatickou UV metódou za použitia D- and L-lactic acid kitu (NZYTech, Lisabon, Portugalsko). Počty enterokokov boli vyjadrené v KTJ.ml⁻¹ po 48 h kultivácii pri 37°C (MRS agar, Merck, Nemecko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Všetkých 17 kmeňov enterokokov bolo citlivých k 9 antimikrobiálnym látkam: ampicilín, kyselina klavulánová+amoxicilín, chloramfenikol, erytromycín, gentamicín, streptomycín, teicoplanin, trimetoprim/sulfametoxazol a vankomycín. Na druhej strane, najvyššia rezistencia bola pozorovaná v prípade cefotaximu (88,2 % kmeňov) a oxacilínu (76,5 % kmeňov). EFSA určuje hraničné hodnoty rezistencie enterokokov k 10 antimikrobiálnym látkam (FEEDAP, 2012), na základe ktorých boli psie enterokoky selektované. Čo sa týka hemolytickej aktivity, u všetkých testovaných enterokokov bola detegovaná γ - hemolýza, indikujúca absenciu hemolýzy. V prípade enzymatickej aktivity bola u všetkých enterokokov pozorovaná negatívna reakcia – 0 nmol/4 hod v prípade 10 enzýmov, vrátane dvoch nežiaducich: N-acetyl- β -glukozaminidázy a β -glukuronidázy. U zvyšných dvoch nežiaducich enzýmov boli pozorované reakcie v rozmedzí 5 - 10 nmol/ 4 hod v prípade β -glukozidázy u štyroch kmeňov a 5 – 20 nmol/ 4 hod v prípade α -chymotrypsínu u piatich kmeňov. U žiadneho testovaného kmeňa nebola pozorovaná maximálna intenzita zafarbenia zodpovedajúca koncentrácii 40 nmol / 4 hod. Miera prežitia enterokokov bola oveľa vyššia v podmienkach simulujúcich žľčovú šťavu ako v podmienkach žalúdočnej šťavy. Dokonca u 3 kmeňov došlo pri pH 8 k ich pomnoženiu (176.2 %, 254.0 % a 181.4 %). Najvyššia prežívateľnosť pri pH 2,5 bola pozorovaná u *E. faecium* IK25 (19,3 % po 45 min, 1,56 % po 90 min) a u *E. faecium* D7 (27,8 % po 45 min, 4,7 % po 90 min) v porovnaní s ostatnými kmeňmi. Koncentrácia produkovanej

kyseliny L-mliečnej po 48 hod bola v rozmedzí od 76,2 mmol.l⁻¹ do 119,3 mmol.l⁻¹. Produkcia menej žiaduceho D - izoméru kyseliny mliečnej bola podstatne nižšia, v rozmedzí <0,3 – 3,2 mmol.l⁻¹. Na základe tejto štúdie boli vyselektované dva kmene druhu *E. faecium*, kmeň D7 a IK25, ktoré majú probiotické vlastnosti a taktiež spĺňajú kritéria bezpečnosti. Tieto kmene budú predmetom ďalšieho skúmania a testovania *in vivo*.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0012/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Arboleya S, Ruas-Madiedo P, Margolles A, Solís G, Salminen S, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. *Int J Food Microbiol.* 2011; 149:28-36.
2. Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol.* 2002; 168:171-8.
3. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 2012; 10:2740 (10pp)
4. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2017.
5. FAO. Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation by Yadav S. Bajagai, Athol V. Klieve, Peter J. Dart and Wayne L. Bryden. Editor Harinder P.S. Makkar. *FAO Animal Production and Health Paper.* Rome. 2016; 179: 1-89.
6. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* 2001.
7. Grzeškowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe.* 2015; 34:14-23.
8. Schmitz S, Suchodolski J. Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Vet Med Sci.* 2016; 2:71-94.
9. Yirga, H. The use of probiotics in animal nutrition. *J Prob Health.* 2015; 3:132.

CYTOMETRICKÉ TESTOVANIE PREŽÍVATELNOSTI BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KVASENIA IZOLOVANÝCH Z ČREVNÉHO TRAKTU PSTRUHA DÚHOVÉHO

Maruščáková I.¹, Mudroňová D.¹, Koščová J.¹, Fečkaninová A.², Popelka P.²

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, Slovensko

²Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF, Košice, Slovensko

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bola selekcia probiotických laktobacilov izolovaných priamo z tráviaceho traktu pstruhov na základe testovania ich prežívateľnosti v podmienkach gastrointestinálneho traktu a vo vodnom prostredí rýb pomocou prietokovej cytometrie. Bakteriálne izoláty sme testovali v umelej žalúdočnej šťave pri pH 2, 2,5 a 3 pred inkubáciou a po 30, 60, 90 a 120 minútach pri každej hodnote pH; v prítomnosti 10 % rybej žlče pred inkubáciou a po 1, 2, 3 a 4 hodinách; vo vode odobratej priamo z chovných nádrží na začiatku inkubácie a po 4 hodinách; rast laktobacilov pri 12 °C. Najlepšie výsledky vo všetkých testovaných selekčných kritériách dosiahli izoláty *L. plantarum* R2 a *L. fermentum*.

ÚVOD

Probiotiká využívané v akvakultúre sa zásadne líšia od probiotík používaných u suchozemských živočíchov. Vodné živočíchov majú oveľa užší vzťah s ich vonkajším prostredím. Pri výbere probiotík je dôležitých niekoľko faktorov: pôvod (vhodnejšie sú druhovo-špecifické kmene); patogénnosť; schopnosť odolávať podmienkam GIT hostiteľa. Pri selekcii probiotík je hlavné kritérium schopnosť prospešných baktérií kolonizovať epitel čriev, kvôli zníženiu adhérence patogénov (Vine a kol., 2004). Medzi ďalšie kritéria patrí čo najdlhšia životaschopnosť pri technologickom spracovaní a skladovaní, a samozrejmosťou je pozitívne pôsobenie na organizmus hostiteľa. Spôsob aplikácie probiotík zahŕňa dva spôsoby, a to podávaním hostiteľovi prostredníctvom živej potravy (Gomes-Gil a kol., 1998) alebo ako doplnok k umelej strave (Rengpipat a kol., 2000) a aplikácia probiotík ako prídavok do vody (Spanggaard a kol., 2001) alebo vo forme kúpeľov (Gram a kol., 1999).

MATERIÁL A METÓDY

Živé pstruhy dúhové boli dovezené vo vode saturovanej kyslíkom. Po príchode boli okamžite usmrtené a následne bol sterilne odobratý obsah tráviaceho traktu, z ktorého bolo izolovaných 6 izolátov, ktoré boli identifikované pomocou mikrobiologických metód a metódou MALDI-TOF MS ako *Lactobacillus paraplantarum*, *L. plantarum* R2, *L. fermentum*, *L. plantarum* R4, *L. plantarum* R5 a *L. brevis*. U všetkých izolátov boli najprv testované rastové vlastnosti v laboratórnych podmienkach pri 12 °C a pri 37 °C. Prežívateľnosť v simulovaných podmienkach umelej žalúdočnej šťavy, ktorá bola upravená pomocou HCl na hodnotu pH 2, 2,5 a 3 bola meraná pred začiatkom inkubácie a po 30, 60, 90 a 120 minútach. Prežívateľnosť v roztoku 10 % rybej žlče bola stanovovaná tiež pred inkubáciou a po 1, 2, 3 a 4 hodinách. Do sterilných fliaš bola odobratá z nádrží voda a po inokulácii izolátmi bola prežívateľnosť stanovovaná pred inkubáciou (0 h) a po 4 hodinách pri 12 °C. V celom experimente bolo na stanovenie životnosti použité farbivo cFDA, ktoré sa enzymatickou aktivitou v živých bunkách mení na fluoreskujúci karboxyfluoresceín. Živé baktérie boli identifikované pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto. Na excitáciu bol použitý modrý laser s vlnovou dĺžkou 488 nm a emisiu sme merali pri vlnovej dĺžke 530/30 nm (FL1), pričom bolo percento živých baktérií vyhodnotené pomocou histogramu pri nastavení fluorescencie FL1 oproti počtu udalostí.

Štatistická analýza: Pre štatistickú analýzu sme použili najprv dvojrozmernú analýzu rozptylu (two-way ANOVA), následne jednorozmernú (one-way ANOVA) s doplnkovým Tukey testom v štatistickom programe GraphPad Prism Version 3.00.

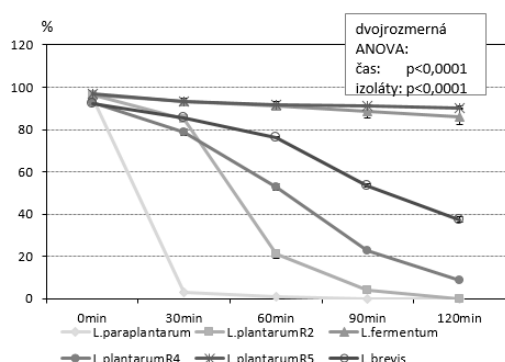
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri testovaní rastových vlastností vybratých izolátov v laboratórnych podmienkach pri 12 °C a pri 37 °C boli zistené počty (Tabuľka č.1), z ktorých bolo zrejmé, že pri 12 °C, čo zodpovedalo fyziológii pstruhov, najlepší rast vykazoval *L. plantarum* R2 a *L. plantarum* R4. Pri 37 °C dobre rástli všetky izoláty, pričom dosahovali počty až 10^{10} baktérií/ml.

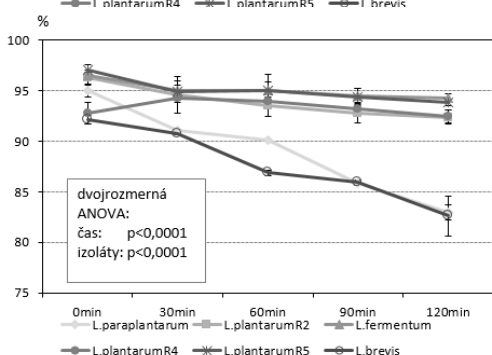
	12°C	37°C
<i>L.paraplantarum</i>	6.10^7	$5,7.10^9$
<i>L.plantarum</i> R2	$2,7.10^8$	$5,9.10^9$
<i>L.fermentum</i>	$7,6.10^7$	$8,3.10^9$
<i>L.plantarum</i> R4	1.10^8	$7,1.10^9$
<i>L.plantarum</i> R5	8.10^7	$1,1.10^{10}$
<i>L.brevis</i>	$8,1.10^7$	$2,3.10^9$

Tabuľka č.1, Rast rybných laktobacilov v laboratórnych podmienkach (vyjadrené ako počet baktérií/ml)

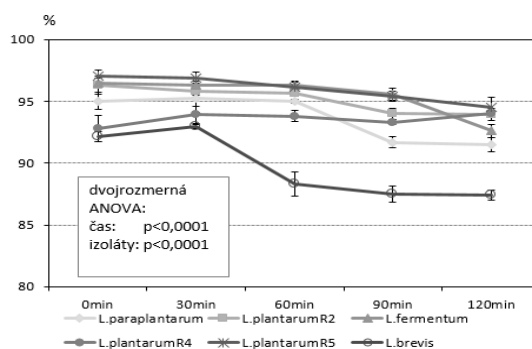
Keďže v žalúdku rýb sa hodnota pH pohybuje v rozmedzí 2 – 4, zisťovali sme prežívanie izolátov pri hodnote pH 2, 2,5 a 3. Ako prvú sme použili žalúdočnú šťavu s pH 2 (Graf č. 1). Najlepšiu životnosť vykazovali *L. fermentum* a *L. plantarum* R5, aj po 120 minútach bolo živých vyše 80 % baktérií ($p < 0,0001$). Naopak najcitlivejší bol *L. paraplantarum*, kde po 30 minútach boli takmer všetky laktobacily mŕtve. Aj v prítomnosti žalúdočnej šťavy s pH 2,5 postupne odumierali jednotlivé izoláty laktobacilov, avšak pomalšie ako pri pH 2. *L.plantarum* R2, *L. fermentum*, *L.plantarum* R4 a *L.plantarum* R5 vykazovali signifikantne vyššiu životaschopnosť v porovnaní s ostatnými laktobacilmi (vo všetkých prípadoch $p < 0,0001$; Graf č.2). Po inkubácii izolátov so žalúdočnou šťavou s pH 3 (Graf č.3) boli všetky izoláty odolné voči tejto hodnote pH, pričom len v prípade *L. brevis* životnosť klesla pod 90 %. Hodnoty pH namerané v žalúdku pstruhov dúhových, ktoré pochádzali z toho istého chovu ako pstruhy využité v našom experimente boli priemerne 3,5 (Drdolová, 2013). Z toho vyplýva, že izoláty ktoré prežili pH 2 sú extrémne odolné, a keďže pri pH 3 prežili všetky izoláty, dá sa predpokladať, že aj v *in vivo* podmienkach by vykazovali dobrú rezistenciu.



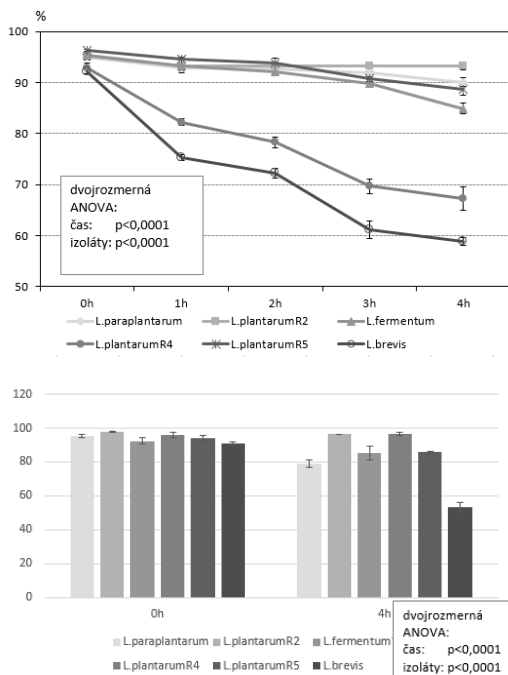
Graf č.1, Prežívanie izolátov laktobacilov v umelej žalúdočnej šťave pri hodnote pH 2



Graf č.2, Prežívanie izolátov laktobacilov v umelej žalúdočnej šťave pri hodnote pH 2,5



Graf č.3, Prežívanie izolátov laktobacilov v umelej žalúdočnej šťave pri hodnote pH 3



Pri testovaní prežívateľnosti v prítomnosti 10% rybej žlče po 4 hodinách inkubácie výraznejšie zníženie nastalo len u *L. brevis* na 69 % a *L. plantarum* R4 na 67 %. Ďalšie 4 izoláty po štyroch hodinách boli v žlči stabilné a nedošlo k ich väčšiemu odumieraniu (Graf č.4).

Graf č.4, Prežívateľnosť izolátov laktobacilov v 10% rybej žlči

Pri testovaní prežívateľnosti vo vode, životnosť *L. paraplantarum* klesla po 4 hodinách cca o 17 %, v prípade *L. brevis* to bolo až o 38 %. *L. plantarum* R2 a *L. plantarum* R4 vykazovali len mierny úbytok živých baktérií, a to približne len o 1 %, čo bola signifikantne vyššia prežívateľnosť ako v prípade *L. paraplantarum* a *L. brevis* ($p < 0,001$) (Graf č.5).

Graf č.5, Prežívateľnosť laktobacilov vo vode

Z výsledkov selekčných kritérií môžeme konštatovať, že najlepšie výsledky vo všetkých testovaných selekčných kritériách dosiahli izoláty *L. plantarum* R2 a *L. fermentum*. *L. plantarum* R2 mal najlepšie rastové vlastnosti, zatiaľ čo *L. fermentum* najlepšie prežival v simulovaných podmienkach tráviaceho traktu rýb. Paralelne s našim experimentom boli v inej práci v *in vitro* podmienkach potvrdené silné inhibičné vlastnosti *L. plantarum* R2 voči závažným rybím patogénom – *Y. ruckeri* a *A. salmonicida*. Na základe týchto všetkých výsledkov sa stáva najperspektívnejším z testovaných izolátov na ďalšie využitie v akvakultúre, kde bude následne vyvíjaná vhodná aplikačná forma a budú realizované *in vivo* experimenty.

Uvedená práca bola realizovaná aj s podporou projektu SK0021 spolufinancovaného z finančného mechanizmu EHP, nórskeho finančného mechanizmu a štátneho rozpočtu SR.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Drdlová J, Probiotické baktérie v Gastrointestinálnom trakte pstruha dúhového: diplomová práca. Košice: UVLF, 2013; 58 s.
2. Gomes-Gil B, Herrera-Vega M, Abreu-Grobois F, Roque A. Bioencapsulation of two different *Vibrio* species in nauplii of the brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Appl. Environ. Microbiol.* 1998; 64: 2318-2322.
3. Gram L, Melchiosen J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen T. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* strain AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65: 969-973.
4. Rengpipat S, Rukpratanporn S, Piyitivorakul S, Menasaveta P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture.* 2000; 191: 271-288.
5. Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Sick E, Pipper C, Martinussen T, Slierendrecht W, Gram L. The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. *Environ. Microbiol.* 2001; 27: 319-329.
6. Vine N, Leukes W.D, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish. Dis.* 2004; 27: 319-326.

VPLYV ROZDIELNÉHO KONDIČNÉHO SKÓRE DOJNÍC VO FÁZE ZASUŠENIA NA ENERGETICKÝ PROFIL

Mihajlovičová X., Mudroň P.
Klinika prežívavcov UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo analyzovať vplyv rozdielneho kondičného stavu na energetický profil dojníc vo fáze zasušenia. Sledovanie bolo uskutočnené na mliečnej farme. Dojnice boli pred otelením rozdelené do dvoch skupín na základe kondičného stavu: normálna kondícia (3,00-3,75) a pretučnené dojnice (>4,00). V dojníc krvi boli analyzované nasledovné energetické ukazovatele: glukóza, beta-hydroxybutyrát (BHB), triacylglyceridy, cholesterol a neesterifikované mastné kyseliny (NEFA). Signifikantný rozdiel bol zaznamenaný len pri koncentráciách triacylglyceridov ($p < 0,01$). Záverom možno konštatovať, že kondícia dojníc pred pôrodom nemá vplyv na energetický metabolizmus v tomto 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 na úrovni 3,25 až 3,5 pre zasušené dojnice, je dôležité aby tieto dojnice počas státia na sucho neschudli ani nepribrali. 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 a Raphaellet, 2013).

Tranzitné obdobie je charakterizované ako obdobie 3 týždne pred a 3 týždne po pôrode. Pre toto obdobie je typický vysoký energetický nárok dojníc z dôvodu fetálneho rastu a začiatku laktácie, negatívna energetická bilancia (NEB) a znížený príjem krmiva. Vyrovnaný energetický metabolizmus v tomto období je kľúčovým faktorom na zvládnutie postpartálneho obdobia. Metabolity ako NEFA a BHB sa bežne používajú ako indikátory negatívnej energetickej bilancie a ketózy u tranzitných dojníc. Hoci mierne zvýšenie sérových hladín týchto metabolitov je normálne pretože dojnice vyrovnávajú príjem a výdaj energie počas skorej laktácie, ale nadmerné zvýšenie NEFA a BHB indikuje nedostatočnú metabolickú adaptáciu na NEB (Herdt, 2000). V prípade keď dojnice nedokážu dostatočne rýchlo alterovať svoj energetický metabolizmus pre potreby laktácie, mliečna produkcia rapidne klesá a zároveň sú tieto dojnice viac náchylné na metabolické ochorenie (Herdt, 2000; LeBlanc, 2010). Sérová koncentrácia NEFA reflektuje úroveň mobilizácie tukov, zatiaľ čo koncentrácia BHB poukazuje na úplnosť oxidácie tukov v pečeni (LeBlanc, 2010). Mnoho štúdií sa zaoberalo stanovením prahových hodnôt NEFA, BHB a sérového vápnika pre predpovedanie produkčných ochorení u tranzitných dojníc (Roberts a kol., 2012; Ospina, 2010). Zvýšené hladiny NEFA, BHB a znížené hladiny sérového vápnika pred pôrodom sú spájané s vyšším rizikom výskytu klinických ochorení (LeBlanc a kol., 2005; Seifi a kol., 2011), zníženou mliečnou produkciou (Ospina a kol., 2010) a nedostatočnou reprodukčnou aktivitou v popôrodnom období.

MATERIÁL A METODIKA

Do výskumu bolo zahrnutých 50 dojníc, ktoré boli rozdelené do dvoch skupín na základe kondičného skóre. Dojnice s normálnym kondičným stavom 3,00 – 3,75 (n=23) a dojnice s vyšším kondičným skóre 4,00 - 5,00 (n=27). Kondičný stav sa posudzoval v období státia na sucho, vizuálnym posúdením. Dojnice boli ustajnené na voľno, mali dostatočný prístup ku kŕmnej dávke (TMR) a na farme bola priemerná ročná úžitkovosť okolo 8000 litrov mlieka. Odber krvi sa uskutočnil u dojníc vo fáza zasušenia, približne 2 týždne pred pôrodom. Odber krvi sa vykonával z *v.coccygea* do jednorázových hemosiek (Hemos H-02, Gama Group a.s, ČR). Následne sa krv centrifugovala pri rýchlosti 3000 rpm po dobu 30 minút (HettichUniversal 300, Germany). V krvnom sére sa spektrofotometricky (Alizé, Lisanbio) stanovovali jednotlivé energetické metabolity: glukóza (Glu), beta-hydroxybutyrát (BHB), triacylglyceridy (TAG) a cholesterol (Chol). Neesterifikované masné kyseliny sa analyzovali spektrofotometricky (A Specord 210, Analytik Jena). Jednotlivé parametre sa štatisticky vyhodnocovali pomocou popisnej štatistiky a neparametrickým Mann-Whitneyho testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Naším cieľom bolo stanoviť ako sa pred pôrodom energetický profil dojníc s BCS >4,00 líši v porovnaní s dojnicami s normálnym BCS. Výsledky merania krvných ukazovateľov energetického profilu sú uvedené v tabuľke č.1. V rámci štatistického vyhodnotenia bolsignifikantný rozdiel medzi skupinami zistený len v prípade triacylglyceridov ($p < 0,01$).

Tabuľka č.1 Koncentrácie ukazovateľov energetického profilu v krvi dojníc s rozdielnym kondičným skóre ($x \pm SD$).

	BCS 3,00 – 3,75	BCS 4,00 – 5,00	
BCS	3,55 ± 0,24	4,35 ± 0,34	P<0,001
NEFA	0,37 ± 0,21	0,39 ± 0,17	ns
Glu	3,79 ± 0,89	4,08 ± 0,99	ns
Chol	2,69 ± 0,75	2,40 ± 0,66	ns
TAG	0,14 ± 0,08	0,21 ± 0,08	p<0,01
BHB	0,45 ± 0,16	0,46 ± 0,16	ns

BCS- body conditionscore, NEFA – neesterifikované masné kyseliny, Glu- glukóza, TAG- triacylglyceridy, BHB- beta-hydroxybutyrát, ns- nesignifikantné

Hlavné sérové parametre, ktoré sa posudzujú u dojníc pred pôrodom a aj v popôrodnom období sú NEFA, BHB a vápnik (Ospina a kol., 2010; Chapinal a kol., 2011; Martinez a kol., 2014). Tieto koncentrácie poukazujú na mieru adaptácie na NEB a je možné predpokladať následne výskyt postpartálnych ochorení. Ospina a kol. (2010) uvádza, že ak je koncentrácia NEFA pred pôrodom vyššia ako $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, je zvýšené riziko výskytu zadržanej placenty, metritídy, dislokácie slezu, znižuje sa mliečna produkcia a predlžuje sa servis perióda. Zvýšená koncentrácia BHB ($\geq 0,8 \text{ mmol.l}^{-1}$) v prepartálnom období je indikátorom zníženej produkcie v popôrodnom období a zvýšeného rizika vzniku dislokácie slezu (Chapinal a kol., 2012). Je všeobecne známe, že dojnice s BCS >4,00 sú náchylnejšie na metabolické poruchy v postpartálnom období. Pretože adaptácia na NEB je u nich nedostatočná, dochádza k lipomobilizácii a následne k zvýšeniu sérových koncentrácií NEFA a BHB. Nadprahové hodnoty NEFA (nad $0,5 \text{ mmol.l}^{-1}$) sa v našom sledovaní vyskytli u 13,04 % dojníc s normálnym kondičným skóre a u 18,5 % pretučnených dojníc. Na základe zistených výsledkov môžeme konštatovať, že sme nezaznamenali rozdielne koncentrácie NEFA a BHB v skupinách dojníc s rozdielnou kondíciou.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Edmonson AJ, et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 1989, 72.1: 68-78.
2. Herdt TH. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2000, 16.2: 215-230.
3. Chapinal N, et al. The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of dairy science*, 2012, 95.3: 1301-1309.
4. Chapinal N, et al. The association of serum metabolites with clinical disease during the transition period. *Journal of dairy science*, 2011, 94.10: 4897-4903.
5. Leblanc SJ, Leslie KE; Duffield TF. Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 2005, 88.1: 159-170.
6. Leblanc S. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of reproduction and Development*, 2010, 56.S: S29-S35.
7. Martinez N, et al. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *Journal of dairy science*, 2014, 97.2: 874-887.
8. Ospina PA, et al. Evaluation of nonesterified fatty acids and β -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*, 2010, 93.2: 546-554.
9. Roberts T, et al. Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *Journal of dairy science*, 2012, 95.6: 3057-3063.
10. Seifi HA, et al. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *The veterinary journal*, 2011, 188.2: 216-220.
11. Sordillo LM. Raphael W. Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2013, 29.2: 267-278.

CHARAKTERIZÁCIA A IDENTIFIKÁCIA PLAZMIDU pROVR6 BAKTÉRIE *RAOULTELLA ORNITHINOLYTHICA/PLANTICOLA* Z VRABCA DOMOVÉHO

Onderková A.¹, Hamarová L.¹, Pristaš P.^{1,2}

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

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Bakteriálny izolát ROVR6 získaný z trusu vrabca domového *Passer domesticus* bol na základe hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF a analýzy sekvencií 16S rRNA identifikovaný ako *Raoultella ornithinolythica/planticola*. Analýzou totálnej DNA bola zistená prítomnosť plazmidu pROVR6 s veľkosťou cca 4000 bp. Na jeho charakterizáciu bola použitá transpozónová mutagenéza, vďaka ktorej boli získané 4 typy mutantných plazmidov. Analýza blastx získaných génových sekvencií potvrdila vysokú podobnosť mutantných plazmidov M4 a M6 so sekvenciami hypotetických proteínov AKI40_pB004 a AKI40_pB005 plazmidov *Enterobacter* sp. FY-07. Doposiaľ bolo na genómovej úrovni charakterizovaných len niekoľko plazmidov druhov *R. ornithinolythica/planticola*, preto budeme na charakterizácii pROVR6 naďalej pracovať.

ÚVOD

Baktérie rodu *Raoultella* predstavujú gramnegatívne nepohyblivé tyčinkovité baktérie, patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*, vyskytujú sa prevažne v prírode v teplotnom rozmedzí 4-40°C (Haruki a kol., 2014; Sekowska, 2017). V súčasnosti je zaznamenaný nárast patogénnych kmeňov druhov *R. ornithinolythica* a *R. planticola* s nízkou virulenciou. Kolonizujú respiračný a gastrointestinálny trakt a spôsobujú vznik infekcií, sepsy a bakterémií predovšetkým u imunodeficientných pacientov, novorodencov či pacientov s dlhodobou nemocničnou liečbou (Skelton a kol., 2017). Hlavným problémom týchto infekcií je náročná identifikácia baktérií, a to aj v prípade použitia MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie, kde odlíšenie druhov *R. ornithinolythica* a *R. planticola* znemožňuje podobnosť ich hmotnostných spektier (de Jong a kol., 2013; Seng a kol., 2016). Klinické štúdie v minulých rokoch preukázali v týchto druhoch baktérií prítomnosť génov antibiotickej rezistencie voči β -laktamázam *bla_{KPC}* a *bla_{NDM-1}* (Castanheira a kol., 2009; Chen a kol., 2014). Rezistencia patogénov voči antibiotikám je jedným z hlavných dôvodov nárastu mortality a morbidity. Extrachromozomálny prenos génov antibiotickej rezistencie najčastejšie zabezpečujú plazmidy, pričom veľký význam majú aj transpozóny, ktoré sú schopné inkorporovať gény antibiotickej rezistencie do plazmidov a iných mobilných génových elementov, čím dopomáhajú k prenosu týchto génov do inej bunky (Bennett, 2008).

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálny izolát ROVR6 bol získaný z trusu vrabca domového *Passer domesticus* z východného Slovenska. Izolát bol identifikovaný použitím MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie (Biotyper, Bruker Daltonics, Nemecko) a následnou analýzou sekvencie 16S podjednotky ribozomálnej RNA. Testovanie antibiotickej rezistencie prebehlo difúznou metódou použitím antibiotických diskov (Liofilchem, Taliansko), a to konkrétne pre antibiotiká tetracyklín (30 μ g), chloramfenikol (30 μ g) a ampicilín (10 μ g), pričom výsledky boli vyhodnocované s použitím tabuliek CLSI (<https://clsi.org/>). Plazmidová DNA bola izolovaná pomocou kitu GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich). Transpozónová mutagenéza bola realizovaná s použitím Template Generation System II Kit (Thermo Scientific). Podľa protokolu dodaného výrobcom bol do genómu plazmidu vložený transpozón s veľkosťou 1302 bp, kódujúci rezistenciu voči chloramfenikolu (Cam^R).

Plazmidová DNA obsahujúca transpozón bola následne transformačnými mechanizmami prenesená do buniek laboratórneho kmeňa *Escherichia coli* ER2267, vykazujúceho rezistenciu voči kanamycínu (Kan^R). Kultivácia buniek s heterogénnou plazmidovou DNA prebiehala na selektívnych platniach s LB médiom (Luria-Bertani) a s obsahom chloramfenikolu a kanamycínu pri teplote 37°C. Zo získaných mutantných kmeňov baktérií bola opätovne izolovaná plazmidová DNA, ktorá bola následne podrobená restriktívnej analýze enzýmami BamHI a PstI na identifikáciu jednotlivých typov mutácií. Pre overenie vplyvu získaných mutácií na segregáciu stabilitu plazmidov boli získané mutantné kmene kultivované 33 hodín pri teplote 37°C v tekutom LB médiu bez pridaného antibiotika. Následne boli bakteriálne kultúry riedené a v koncentrácii 10⁻⁶ vysiata na platne s LB médiom. Z každého mutanta bolo 100 z narastených kolónií preočkovaných na LB platne s pridaným chloramfenikolom, pričom počet novo narastených kolónií vyjadroval segregáciu stabilitu plazmidov. Štrukturálna stabilita plazmidov bola overená opätovným štiepením plazmidovej DNA enzýmami BamHI a PstI. Na analýzu sekvencií jednotlivých mutantných plazmidov boli vzorky zaslané do spoločnosti GATC Biotech AG (Nemecko). Získané génové sekvencie boli vyhodnotené pomocou blastx analýzy (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Identifikácia izolátu ROVR6 pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie neposkytla dostatočne spoľahlivé výsledky, hodnota skóre pre *R. ornithinolytica* bola 1,996 a pre *R. planticola* 1,865. Preto sme pristúpili k analýze sekvencie 16S rRNA, zhoda sekvencie bola 99 % pre oba vyššie uvedené druhy. V dôsledku vysokej genetickej podobnosti spomínaných druhov baktérií nebolo možné jednoznačné stanovenie pôvodu ROVR6.

Výsledok testovania antibiotickej rezistencie preukázal senzitivitu baktérie voči tetracyklínu a chloramfenikolu a rezistenciu voči ampicilínu. Izolácia totálnej DNA potvrdila prítomnosť plazmidovej DNA a následne bol ďalšou izoláciou získaný plazmid s veľkosťou približne 4000 bp. Transpozónovou mutagenézou sme overili schopnosť replikácie plazmidu pROVR6 v heterogénnom hostiteľovi, pričom bolo získaných 6 mutantných kolónií M1 až M6 rezistentných voči chloramfenikolu. Restriktívnu analýzu sme identifikovali existenciu 4 typov mutácií, teda 4 rôzne možnosti začlenenia transpozónu v plazmidovej DNA, a to v mutantných plazmidoch M1, M2, M4 a M6. Z výsledku testovania segregácie a štrukturálnej stability mutantných plazmidov (Tab. 1) vyplýva, že najmenej 2 zo 4 mutácií neovplyvňujú segregáciu stabilitu plazmidu.

Doteraz získané génové sekvencie mutantných plazmidov M4 a M6 vykazovali vysokú mieru podobnosti s plazmidmi enterobaktérií (Tab. 1). Nakoľko plazmid pROVR6 je jedným z mála získaných plazmidov druhov *R. ornithinolytica/planticola* a doposiaľ je len niekoľko z nich charakterizovaných na genómovej úrovni, budeme naďalej pokračovať v kompletizácii jeho génovej sekvencie.

Tab. 1: Výsledok blastx analýzy získaných čiastočných sekvencií mutantných plazmidov a výsledok testovania segregácie a štrukturálnej stability plazmidov

mutantný plazmid	disruptovaný gén/organizmus	segregačná stabilita (%)	štrukturálna stabilita (%)
M1	hypotetický proteín/ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	100
M2	hypotetický proteín/ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	94	100
M4	hypotetický proteín AKI40, pB005/ <i>Enterobacter</i> sp. FY-07	96	100
M6	hypotetický proteín AKI40, pB004/ <i>Enterobacter</i> sp. FY-07	100	100

Táto práca bola realizovaná vďaka grantu APVV-16- 0171.

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. Castanheira M, Deshpande LM, DiPersio JR, Kang J, Weinstein MP, Jones RN. First Descriptions of *bla_{KPC}* in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(12): 4129-4130
3. Chen DQ, Song JL, Tang HX, Yang L, Wu AW, Lin YP. Extensively drug-resistant *Raoultella planticola* carrying multiple resistance genes including *bla_{NDM-1}*. *JMM Case Reports* 2014; 1: 1-3
4. de Jong E, de Jong AS, Smidts-van der Berg N, Rentenaar RJ. Differentiation of *Raoultella ornithinolytica/planticola* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013; 75: 431-433
5. Haruki Y, Hagiya H, Sakuma A, Murase T, Sugiyama T, Kondo S. Clinical characteristics of *Raoultella ornithinolytica* bacteremia: A case series and literature review. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2014; 20: 589-591
6. Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, Paganelli F, Bernit E, Le Treut YP, Thomas P, Papazian L, Raoult D, Stein A. Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases* 2016; 45: 65-71
7. Sękowska A. *Raoultella* spp. – clinical significance, infections and susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica* 2017; 62(3): 221-227
8. Skelton WP, Taylor Z, Hsu J. A rare case of *Raoultella planticola* urinary tract infection in an immunocompromised patient with multiple myeloma. *IDCases* 2017; 8: 9-11

ÚLOHA ERYTROPOETÍNOVÉHO RECEPTORA V ZVÝŠENEJ REZISTENCII BUNIEK ADENOKARCINÓMU MLIEČNEJ ŽLAZY RAMA 37-28 NA PAKLITAXEL

Szentpéteriová E., Ilkovičová L., Fecková B., Kimáková P., Solár P.
Ústav biologických a ekologických vied, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Stimulácia rastu buniek pomocou rekombinantného erythropoetínu (rHuEPO) je možná cestou funkčného erythropoetínového receptora (EPOR) exprimovaného na ich povrchu. Prítomnosť EPOR bola preukázaná aj v prípade mnohých nádorových bunkových línií. Predmetom tejto práce bolo testovanie spojitosti EPOR s rezistenciou buniek vybraných bunkových línií adenokarcinómu mliečnej žľazy na paklitaxel (PTX). Analýzou metabolickej aktivity a *in vitro* proliferácie buniek sme potvrdili zníženie citlivosti buniek na PTX cestou EPOR. Rozlúštenie a správne pochopenie procesov vyvolávajúcich rezistenciu nádorových buniek sa pritom v oblasti súčasnej onkologickej liečby stáva prioritou.

ÚVOD

Rezistencia nádorových buniek predstavuje významný problém súčasnej onkologickej liečby. Bráni úspešnej terapii a priaznivej prognóze onkologických pacientov. Želaným cieľom je eliminácia prejavov rezistencie a zlepšenie terapeutických možností. Slabá prognóza onkologických pacientov sa objavila v prípade podávania rHuEPO za účelom korekcie anémie (Leyland-Jones a kol., 2005). Súčasne sa zvyšuje počet publikácií preukazujúcich stimulačný účinok rHuEPO na bunky mimo hematopoetického prostredia vrátane nádorových buniek. Toto zistenie „dvíha“ varovný prst nad samotným využitím rHuEPO v onkologickej oblasti. Za negatívnou prognózou v prípade podávania rHuEPO môže byť expresia EPOR na povrchu nádorových buniek (Arcasoy, 2008). Podporná terapia pomocou rHuEPO má pritom svoje využitie aj v prípade taxánov. Taxány, medzi ktoré zaraďujeme aj PTX, predstavujú jedinečné mitotické inhibítory (Marupudi a kol., 2007). Ich využitie v protinádorovej terapii predstavuje prísľub antiproliferatívnych a antiangiogénnych účinkov spolu so znížením metastatických aktivít nádorových buniek. Napriek predurčeniu na vysoko potenciálnu liečbu rôznych typov rakoviny sa však nie v každom prípade ukázali byť účinné (Orr a kol., 2003). Nakoľko sa expresia EPOR preukázala už v prípade niekoľkých nádorových bunkových línií, je vysoko pravdepodobné, že by mohla mať spojitosť aj s rezistenciou nádorov vrátane ovplyvnenia ich citlivosti na PTX.

MATERIÁL A METODIKA

Bunkové línie a kultivačné podmienky. Pre účely *in vitro* experimentov bola použitá potkana bunková línia adenokarcinómu mliečnej žľazy RAMA 37 a jej klón RAMA 37-28 so zvýšenou expresiou EPOR (poskytla Doc. Dr. Nataša Debeljak, Ústav biochémie, Lekárska fakulta Univerzity v Lubľane, Slovinsko). Bunky boli kultivované v médiu RPMI 1640 (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) s prídavkom 10 % FBS (Gibco/BRL) za štandardných inkubačných podmienok (37°C, 95 % vlhkosť, 5 % CO₂, 21 % O₂, 74 % N₂).

Analýza metabolickej aktivity. Vplyv viacerých koncentrácií PTX (0,5; 5; 50; 500 a 1000 nM) (Paclitaxel, Ebewe Pharma, Unterach, Rakúsko) na metabolickú aktivitu buniek v prítomnosti alebo bez prítomnosti rHuEPO (10 IU) (Epoetin alfa, Binocrit, Sandoz, Rakúsko) bol testovaný po 72 hod. inkubácii buniek. Metabolická aktivita bola stanovená použitím MTT testu podľa všeobecne zaužívaného protokolu. Množstvo rozpusteného formazánu bolo analyzované spektrofotometricky meraním absorbancie pri vlnovej dĺžke 570 nm prístrojom FluoStar Optima (BMG Labtech, Offenburg, Nemecko).

Analýza in vitro proliferácie buniek. Proliferácia buniek *in vitro* bola analyzovaná testom klonogenicity. Bunky, ktoré prežili 72 hod. inkubáciu s PTX (200 nM) s prídavkom, resp. bez prídavku rHuEPO (10 IU) boli nasadené do 6-jamkových platničiek v počte 1000 buniek/jamku a inkubované 10 dní. Vytvorené kolónie boli z dôvodu lepšej vizualizácie ofarbené 1 % metylénovou modrou. Počet kolónií bol stanovený pomocou programu Clono-Counter (Niyazi a kol., 2007). Výsledky boli štatisticky analyzované pomocou programu GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, USA).

Okrem toho bola proliferácia buniek kontrolných a ovplyvnených skupín sledovaná v kontrolovanom prostredí štandardného bunkového inkubátora prístrojom IncuCyte ZOOM System (Essen BioScience, MI, USA). Snímky jamôk 96-jamkovej platničky zbierané každé 2 hod. poskytli reálny pohľad na zmeny tvaru a denzity buniek počas celej dĺžky trvania experimentu. Analýza bola uskutočnená aj za podmienok stíšenej expresie EPOR pomocou krátkych interferujúcich molekúl RNA (siRNA; 2 μ M) (ON-TARGETplus SMARTpool Human EPOR siRNA, Dharmacon, CO, USA). V tomto prípade slúžila ako negatívna kontrola skupina s necieľovou siRNA (nt siRNA; 2 μ M) (ON-TARGETplus Non-targeting Control siRNA, Dharmacon, CO, USA). Funkčnosť siRNA bola otestovaná metódou western blot za pomoci anti-EPOR protilátky (A82, Amgen, CA, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto štúdie bolo sledovanie vzťahu EPOR k citlivosti buniek adenokarcinómu mliečnej žľazy na PTX. Východiskom bola štúdia Solára a kol. (2008), ktorá ako prvá svojho druhu demonštrovala vyvolanie fenotypu rezistentného na PTX *in vitro* účinkom rHuEPO, a to v prípade buniek ľudského ovariálneho karcinómu A2780. Testom metabolickej aktivity sme sledovali účinok rôznych koncentrácií PTX bez prítomnosti rHuEPO, resp. s prídavkom rHuEPO na vybrané bunkové línie mamárneho adenokarcinómu. Pri nižších koncentráciách PTX (0,5 a 5 nM) sme pozorovali stimuláciu metabolickej aktivity pôsobením rHuEPO v bunkách RAMA 37 ($p < 0,01$) a rovnako aj v bunkách RAMA 37-28 so zvýšenou expresiou EPOR, kde sme navyše zaznamenali stimuláciu aj pri vyšších koncentráciách PTX (500 a 1000 nM), ktorú sme už v prípade buniek RAMA 37 nepozorovali. Na základe týchto zistení sme pre ďalšie analýzy zvolili koncentráciu PTX (200 nM), pri ktorej je ešte viditeľný stimulačný účinok rHuEPO v prípade klonu so zvýšenou expresiou EPOR, nie však už v prípade buniek divokého typu. Vplyv samotného rHuEPO, PTX a ich kombinácie na schopnosť buniek proliferovať a vytvárať klony buniek na základe rôznej hladiny expresie EPOR sme zisťovali prostredníctvom testu klonogenicity. V tomto prípade sme síce zaznamenali celkovú pomalšiu proliferáciu v prípade buniek RAMA 37-28, avšak, pri ovplyvnení pomocou PTX sme pozorovali oslabenie jeho účinku (nižší pokles v počte kolónií oproti kontrolným skupinám bez PTX) práve v spomínaných bunkách so zvýšenou hladinou EPOR. Navyše, v kombinácii PTX s 10 IU rHuEPO bola viditeľná stimulácia proliferácie oproti samotnému PTX. Vplyv rHuEPO, PTX a ich kombinácie na *in vitro* proliferáciu sme sledovali aj prostredníctvom prístroja Incucyte ZOOM system. Tromi nezávislými opakovaniami s hexaplikátmi experimentálnych skupín sme potvrdili predpokladanú stimuláciu proliferácie účinkom rHuEPO, či už samotného, alebo v kombinácii s PTX súvisiacu so zvýšením rezistencie buniek v prípade oboch testovaných bunkových línií. Zaujímavo, výraznejšia stimulácia bola opäť práve v prípade klónu so zvýšenou expresiou EPOR. Bunky RAMA 37-28 javili oproti bunkám divokého typu pri tomto type testu vyššiu rezistenciu aj voči samotnému PTX. Po týchto zisteniach sme sa zamerali na potvrdenie úlohy EPOR v potenciálnej rezistencii RAMA 37-28 buniek na PTX a to cestou stíšenia expresie EPOR pomocou siRNA. Pokles proliferácie v stíšenej skupine v prostredí PTX potvrdil pôsobenie EPOR v zvýšenej rezistencii RAMA 37-28 buniek. Ako negatívna kontrola slúžila skupina s nt siRNA, ktorá nijakým spôsobom neovplyvnila proliferáciu buniek, a mala

rovnaký charakter ako skupina ovplyvnená iba účinkom PTX. Následne sme vplyv stíšenia expresie EPOR sledovali aj v prostredí rHuEPO. Kombinácia rHuEPO a PTX mala v porovnaní so samotným PTX stimulačný účinok, ktorý sa aj v tomto prípade pomocou siRNA podarilo minimalizovať. Funkčnosť siRNA sme testovali metódou western blot za pomoci anti-EPOR protilátky. Detekciou EPOR sme dokázali zvýšenú hladinu EPOR v skupine RAMA 37-28, rovnakú s hladinou proteínu v skupine s nt siRNA a taktiež pokles tejto hladiny v stíšenej skupine, čo funkčnosť našej siRNA potvrdilo. Výsledky našej štúdie potvrdili predpokladanú stimuláciu rHuEPO v prostredí adenokarcinómu mliečnej žľazy a spojitosť EPOR s rezistenciou buniek mliečnej žľazy na PTX. Tieto výsledky korelujú aj s *in vivo* štúdiou Todara a kol. (2013), ktorá preukázala zvýšenú progresiu metastáz v prípade kombinovanej terapie myšacích modelov karcinómu mliečnej žľazy pomocou PTX a rHuEPO na rozdiel od samotnej PTX terapie. Naznačenie priameho vplyvu rHuEPO na nádorové bunky zvýraznilo dôležitosť ďalšieho testovania interakcií EPO/EPOR v nádorových bunkách a možnej modulácie ich senzitivity nielen voči PTX, ale aj rôznym ďalším chemoterapeutikám.

Práca bola podporená grantom VEGA1/0394/15 a VVGS-PF-2016-72617.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Arcasoy M.O. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Brit. J. Haematol.* 2008; 141:14–31.
2. Leyland-Jones B., Semiglazov V., Pawlicki M., a kol. Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23 (25):5960-5972.
3. Marupudi N.I., Han J.E., Li K.W., a kol. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin. Drug Saf.* 2007; 6 (5):609–621.
4. Niyazi M., Niyazi I., Belka C. Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. *Radiation Oncology.* 2007; 2 (1):4.
5. Orr G.A., Verdier-Pinard P., McDaid H., Horwitz S.B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene.* 2003; 22 (47):7280-7295.
6. Solár P., Feldman L., Jeong J.Y., a kol. Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *Int. J. Canc.* 2008; 122:281-288.
7. Todaro M., Turdo A., Bartucci M., a kol. Erythropoietin activates cell survival pathways in breast cancer stem-like cells to protect them from chemotherapy. *Cancer Res.* 2013; 73 (21):6393-6400.

KOMPARATÍVNA GENOMIKA PLAZMIDOV *ACINETOBACTER* SPP.

Šipošová N.¹, Čoma M.², Pristaš P.^{1,3}

¹Ústav biologických a ekologických vied UPJŠ, Košice, ²Ústav farmakológie UPJŠ, Košice

³Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

ABSTRAKT

Bakteriálny izolát *Acinetobacter lwoffii* K1 je gramnegatívna, metalotolerantná a alkalotolerantná baktéria, ktorá obsahuje viaceré plazmidy. V rámci našej práce sme stanovili kompletný genóm kryptického plazmidu pALK1 (3 050 bp), v ktorom sme detegovali dve vysoko konzervované oblasti, lokalizované pred a za genóm pre replikačný proteín. Cieľom tejto práce bolo identifikovať koreláciu medzi prítomnosťou týchto konzervovaných sekvencií, Rep_3 a Mob rodinou proteínov u plazmidov rodu *Acinetobacter*. Komparatívna analýza naznačuje určité súvislosti, no detailnejšia štúdia poukázala aj na výnimky a preto v týchto analýzach pokračujeme naďalej.

ÚVOD

Bakteriálny rod *Acinetobacter* je charakteristický častou prítomnosťou plazmidov, ktoré obsahujú rôzne determinanty rezistencie (Midlin a kol., 2015). Plazmid pALK1 izolátu K1 *A. lwoffii* s veľkosťou 3 050 bp je doteraz najmenším plazmidom tohto bakteriálneho druhu s kompletne osekvenovaným genómom. Izolát K1 obsahuje minimálne ďalšie tri väčšie plazmidy so zatiaľ neznámou genetickou štruktúrou. Plazmid pALK1 kóduje proteíny zaradené do Rep_3 a Mob_Pre rodiny proteínov, neobsahuje však gény umožňujúce jeho samostatný prenos do iných bakteriálnych buniek alebo gény dôležité pre metabolizmus, rezistenciu voči antibiotikám, ťažkým kovom a pod. Do iných buniek môže byť prenesený iba za účasti konjugatívnych systémov väčších plazmidov. Plazmidy sú dôležité nástroje výmeny genetického materiálu medzi rôznymi druhmi ale aj rodmi baktérií. Tento tok génov umožnil rapidnú evolúciu a adaptáciu baktérií na rôzne, mnohokrát extrémne podmienky životného prostredia (de la Cruz a Davies, 2000). Extrémotolerantné baktérie môžu byť využívané v biotechnológiách alebo pri ekologických metódach čistenia životného prostredia – bioremediácii. Plazmid pALK1 je kryptickým plazmidom kmeňa tolerujúceho vyššie koncentrácie ťažkých kovov a alkalické pH. V tejto práci sme sa zamerali na komparatívnu analýzu plazmidov rodu *Acinetobacter*. Štúdium a pochopenie genetickej štruktúry a mechanizmov prenosu plazmidov nám môže pomôcť pri začlenení extrémotolerantných bakteriálnych druhov do procesov čistenia životného prostredia.

MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálny izolát K1 *A. lwoffii* bol v roku 2010 izolovaný z hnedého kalu, ktorý vznikol po výrobe hliníka spekačou metódou pri Žiari nad Hronom. Plazmidy z tohto izolátu boli izolované modifikovanou metódou alkalického lýzy (Mangan a kol., 1997), ich množstvo a veľkosť boli stanovené elektroforeticky na 1 % agarózovom géli. Plazmidy boli štiepené enzýmom *EcoRI* (Fermentas). Vzniknutý fragment bol vyrezaný z agarózového gélu, prečistený kitom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), ligovaný do vektora pUC118 *EcoRI*/BAP (Takara) pomocou kitu InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Scientific) a klonovaný s využitím štandardných techník rekombinantných DNA (Maniatis a kol., 1982). Rekombinantné plazmidy boli zaslané na sekvenovanie (GATC Biotech, Nemecko). Neosekvenovaná časť plazmidu bola získaná amplifikáciou jeho chýbajúcej časti pomocou primérov navrhnutých podľa sekvencie *EcoRI* fragmentu: MC9outF 5'-ACACGCTTTCACAGATGCAG - 3' a MC9outR 5'-CGTCTTACCCGTGCCAAATT - 3', klonovaním vo vektore pTZ57R/T (Thermo-Scientific) a sekvenovaním PCR amplikónu. Výsledná sekvencia plazmidu pALK1 bola podrobená komparatívnej analýze so sekvenciami

plazmidov druhu *A. lwoffii* dostupnými v databáze Nucleotide, GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>, Jún, 2017) a ďalšími sekvenciami plazmidov *Acinetobacter* spp. (Tab. 1). Príslušné plazmidové sekvencie boli analyzované s využitím blastx a blastn analýzy NCBI (Altschul a kol., 1990). Štatistické analýzy boli uskutočnené pomocou programu dostupného na: http://biit.cs.ut.ee/clustvis/#pca_heatmap. Priame opakovania sekvencie boli detegované pomocou programu REPFIND (<http://zlab.bu.edu/repfind/>).

Tab.1 Prehľad analyzovaných sekvencií plazmidov a ich prístupové čísla v GenBank databáze

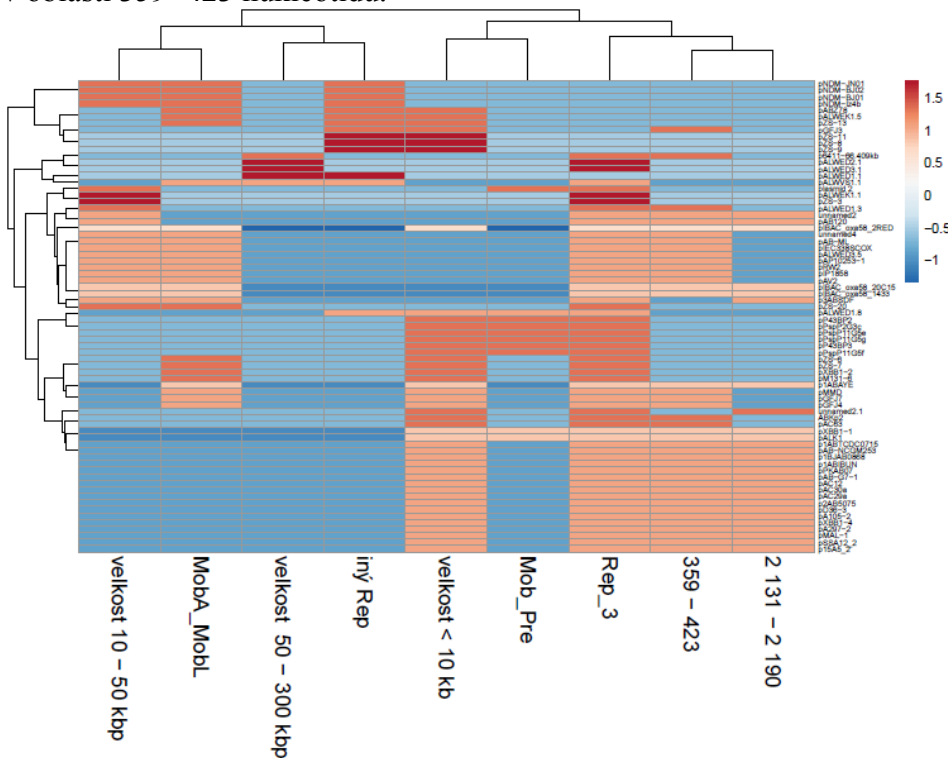
Plazmid	GenBank Acc.No.	Plazmid	GenBank Acc.No.	Plazmid	GenBank Acc.No.
pXBB1-1	CP010352.1	pD36-3	CP012955.1	pALWVS1.1	KX426232.1
p1ABAYE	CU459137.1	p2AB5075	CP008708.1	pALWEK1.1	KX528688.1
pIP1858	KP890934.1	p6411-66.409kb	CP010903.1	pZS-20	CP019152.1
pXBB1-2	CP010353.1	pAC29a	CP008850.1	pZS-3	CP019145.1
plasmid 2	CP012708.1	pAC30a	CP007578.1	pALWEK1.5	KX426231.1
pP43BP3	JQ348845.1	pAC12	CP007550.1	pZS-8	CP019148.1
pPspP11G5f	CP012539.1	pAB-G7-1	KJ586856.1	pZS-9	CP019149.1
pPspP11G5g	CP012540.1	pPKAB07	CP006964.1	pABZ78	JQ739158.1
pPspP11G5e	CP012538.1	p1ABIBUN	HG380023.1	pZS-11	CP019150.1
pPspP2G3c	CP012532.1	p1BJAB0868	CP003850.1	pALWED1.8	LN873256.1
pP43BP2	JQ245701.1	pAB-NCGM253	AB823544.1	pABZ78	JQ739158.1
pM131-6	JX101643.1	pAB120	JX069966.1	pZS-11	CP019150.1
p3ABSDF	CU468233.1	pAC63	JN982951.1	pA297-2	KU869528.1
pALWED1.3	KX426228.1	p1ABTDCDC0715	CP002523.1	unnamed4	CP014655.1
pAV2	DQ278486.1	pMMD	GQ904226.1	pXBB1-4	CP014217.1
pRW2	CP018142.1	pALWED1.1	KX426227.1	pA105-2	KR535993.1
pAP10253-1	KY499579.1	pALWED2.1	KX426229.1	pZS-13	CP019151.1
pALWED3.5	KX426230.1	pALWED3.1	KX528687.1	pMAL-1	KX230793.1
pIEC338SCOX	CP015146.1	pNDM-JN01	KM210086.1	pZS-7	CP019147.1
pGFJ7	CP016903.1	pNDM-BJ01	JQ001791.1	pZS-6	CP019146.1
pGFJ4	CP016900.1	pNDM-Iz4b	KJ547696.1	pGFJ3	CP016899.1
pIBAC_oxa58_20C15	KY202458.1	pNDM-BJ02	JQ060896.1	ABKp2	CP001923.1
pIBAC_oxa58_2RED	KY202457.1	unnamed2	CP014293.1	pSSA12_2	CP020576.1
pIBAC_oxa58_1433	KY202456.1	pAB-ML	KT022421.1	p15A5_2	CP020575.1

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kompletný genóm plazmidu pALK1 má veľkosť 3 050 bp a kóduje dva gény. Mobilizačný proteín Mob_Pre rodiny plazmidu pALK1 je lokalizovaný v oblasti 1 133 - 1660 nukleotidu a replikačný proteín Rep_3 rodiny proteínov v oblasti 2 257 – 2 910 nukleotidu. Na úrovni nukleotidovej sekvencie sme u plazmidu pALK1 detegovali vysoko konzervované oblasti a to hlavne v rozmedzí 359 - 423 nukleotidu, kde sme našli aj priame opakovania sekvencie. Tento úsek sa nachádza 499 nukleotidov za Rep_3. Druhý konzervovaný úsek sa nachádza v oblasti 2 131 – 2 190 nukleotidu, 67 nukleotidov pred Rep_3. Tieto dve konzervované sekvencie sme pozorovali predovšetkým u druhu *A. baumannii* ale aj iných druhov: *A. pittii*, *A. soli*, *A. johnsonii*, *A. haemolyticus*, *A. nosocomialis*, *A. venetianus*, *A. lwoffii*, *Providencia rettgeri*, *Klebsiella pneumoniae*.

S cieľom zistiť, či sú tieto konzervované oblasti viazané s prítomnosťou Rep_3 alebo Mob_Pre a či predstavujú počiatok replikácie plazmidu *ori*, skonštruovali sme tepelnú mapu, v ktorej sme zahrnuli sekvencie plazmidov, ktoré vykazovali zhodu v určitej časti nukleotidovej sekvencie pALK1 a plazmidy druhu *A. lwoffii* (Obr. 1). V súčasnosti sa v nr databáze nukleotidových sekvencií, GenBank nachádza 22 sekvencií plazmidov druhu *A. lwoffii*. U desiatich sme detegovali prítomnosť Rep_3 a u dvanástich MobA_MobL rodinu

proteínov. Súčasne Rep_3 a MobA_MobL obsahovalo päť plazmidov. Mob_Pre rodinu sme nedetegovali ani u jedného plazmidu. Iba u dvoch plazmidov *A. lwoffii* sa vyskytujú zhody v oblasti 359 -423 nukleotidu.



Obr. 1 Tepelná mapa znázorňujúca vzťah medzi prítomnosťou Rep_3, Mob_Pre, MobA_MobL génov, dvoch konzervovaných úsekov sekvencie a veľkosťou analyzovaných plazmidov z Tab.1

Zhluková analýza tepelnej mapy rozdelila analyzované plazmidy do niekoľkých skupín. Najmenšiu skupinu tvoria veľké plazmidy (50 – 300 kb), z ktorých niektoré obsahujú Rep_3 ale iba u jedného sa vyskytuje konzervovaná sekvencia v oblasti 359 - 423 nukleotidu. Ďalšiu skupinu tvoria plazmidy s veľkosťou 10 – 50 kb, z ktorých veľká časť obsahuje Rep_3 a niektoré aj MobA_MobL a konzervované úseky. Naše analýzy naznačujú, že prítomnosť týchto dvoch konzervovaných oblastí je spojená s prítomnosťou Rep_3 a MobA_MobL proteínov a to predovšetkým u malých plazmidov, menších ako 10 kb. Tieto sekvencie môžu byť teda dôležité pre oba proteíny. Na druhej strane existujú plazmidy (18 zo 72 analyzovaných), ktoré tieto proteíny kódujú ale neobsahujú príslušné konzervované sekvencie (Obr. 1). Pre úplné objasnenie týchto faktov budú potrebné ďalšie analýzy.

Práca vznikla za podpory grantu VVGS-PF- 2017-270 a VEGA 1/0229/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. de la Cruz , F., Davies, J. Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol.* 2000; 8: 128-133.
2. Midlin, S. a kol. Resistance of Permafrost and Modern Acinetobacter lwoffii Strains to Heavy Metals and Arsenic Revealed by Genome Analysis. *BioMed Research International.*
3. Mangan, M.W. a kol. Molecular genetic analysis of high-level gentamicin resistance in *Enterococcus hirae*. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40:377-382.
4. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (Eds.), 1982. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
5. Altschul, S. F. a kol. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research.* 1997; 25: 3389-3402.

CELKOVÉ A LOKÁLNE PRÍČINY PODMIEŇUJÚCE PATOLOGICKÉ ERUPCIE ZUBOV

Štofková S., Jenča A.

Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, UNLP, Košice

ABSTRAKT

Etiológia disgnácií bola spočiatku predmetom záujmu filozofov. Neskôr prvotné základy čelustnej ortopédie položil Edward Angle. V prvej polovici dvadsiateho storočia sa do popredia dostali Mendelovské pravidlá dedičnosti, ktoré priniesli nový pohľad na etiológiu disgnácií. Do popredia sa dostal názor dedične podmienených dentofaciálnych anomálií. V osemdesiatych rokoch minulého storočia bol silný návrat k predošlým poznatkom, keďže samotné základy dedičnosti nepriniesli vysvetlenie variability disgnácií. Boli predstavené nové teórie ako enviromentálne vplyvy a znovu uznávaná teória vývoja populácie. Vďaka klinickým štúdiám sa dospelo k záveru, že pôvodné teórie boli zjednodušené, izolované a nezahŕňali celú podstatu disgnácií. Až v 21. storočí bola presadená myšlienka zložitej multifaktoriálnej etiológie disgnácií, ako výsledok pôsobenia celkových a lokálnych faktorov. V našej práci sme sa zamerali na analýzu vzťahov medzi celkovými etiologickými faktormi a patologickou erupciou zubov. K analýze sme použili výsledky dostupných domácich a zahraničných štúdií.

ÚVOD

Erupcia zuba predstavuje jednu ucelenú etapu vo vývine zuba, ktorá začína pohybom zuba z jeho zubného lôžka, pokračuje alveolárnou erupciou, klinickou erupciou a končí dosiahnutím okluzálnej roviny (Proffit a kol., 2007; Kořová, 2006). Vývin zubov prebieha relatívne dlhú časovú periódu, počas ktorej pôsobí veľa faktorov ovplyvňujúcich samotný vývin ako aj erupciu zubov. Procesy spojené s vývojom zuba sú zložité a neobyčajne citlivé na rušivé zásahy. To platí predovšetkým pre štádium diferenciacie zubných tkanív. Sled dejov odohrávajúcich sa pri vývoji zuba je závislý na miestnych mechanizmoch, je riadený centrálné a ovládaný neurohumorálne. Akýkoľvek zásah do vzájomnej súvislosti tejto regulácie vedie k narušeniu rovnováhy a má za následok poruchu zubných tkanív (Ležovič a kol., 2008). Pri erupcii zubov sa uplatňujú celkové a lokálne príčiny, ktoré ovplyvňujú erupčný proces a tým aj samotný výsledok erupcie. Anomálie zubov vznikajú poškodením tkanív zuba v dobe ich vývoja a rastu (Komínek a kol., 1980).

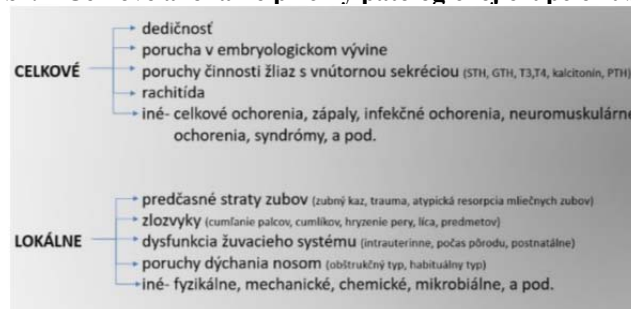
Tab. 1 Závislosť typu zubnej anomálie na dobe pôsobenia noxy (Komínek a kol., 1980)

Rast					Mineraliácia	Erupcia
vznik	proliferácia	histodiferenciácia	morfordiferenciácia	apozícia		
Anomálie hypodontia	Počtu hyperdontia zrastlice	Anomálie štruktúry Amelogenimperfecta Dentinogenimperfecta	Anomálie tvaru Čipkovité zuby Hutchinsonové zuby Anomálie veľkosti Mikrodoncia makrodoncia	Hypoplázia zubných tkanív Celkové lokálne	Hypokalcifikácia Škvritná sklovina Interglobulárny dentín	Oneskorená Urýchlená Zmena polohy

V čelustnej ortopédii používame pre odchýlku v ortognátnom systéme pojem disgnácia. Disgnácia je výsledkom odchýlného vývinu. Buď ide o morfológické, alebo funkčné nedostatky ortognátného systému, alebo sa vyskytujú súčasne. Celkovo sa môžu tieto odchýlky prejavovať odchýlnou polohou zubov, atypickým tvarom zubných oblúkov, poruchou oklúzie, anomálnymi, disgnátnymi intermaxilárnymi vzťahmi a nepravidelnosťami formy, počtu a vývinu zubov. Hranica medzi eugnáciou a disgnáciou nie je vždy ostrá, prechody medzi nimi môžu byť plynulé (Graber, 2000). Podľa autorov (Proffit a kol., 2007,

Adam, 1976) disgnácia je vývojová porucha. Vo väčšine prípadov sú disgnácia a dentofaciálne deformácie spôsobené nie patologickým procesom, ale odchýlkou vo fyziologickom vývine. Niekedy je však zrejma určitá príčina, ktorá bezprostredne spôsobí disgnáciu. Oveľa častejšie je príčina patologickej erupcie zubov výsledkom interakcie viacerých faktorov, ktoré ovplyvňujú vývin a rast, pričom nie je možné opísať jeden špecifický zodpovedný faktor. Napriek zložitej etiológii disgnácií sú vo všeobecnosti popísané možné príčiny. Tie delíme na celkové a lokálne etiologické faktory.

Obr. 1 Celkové a lokálne príčiny patologickej erupcie zubov



MATERIÁL A METODIKA

V ďalšej časti práce sme sa zamerali na analýzu vzťahov medzi celkovými etiologickými faktormi a patologickou erupciou zubov. Použili sme výsledky domácich a zahraničných štúdií z dostupných zdrojov zdravotníckej, medicínskej, odbornej a vedeckej literatúry.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Poruchy v embryologickom vývoji zvyčajne vyústia do zániku embrya. U viac ako 20 % tehotných žien sa ich gravidita končí predčasne kvôli defektom v embyologickom vývoji. Keď príčinný agens zasiahne v kritickom čase embryologického vývoja, hovoríme o teratogénnom vplyve. Teratogény spôsobujú špecifické defekty s nižšou alebo vyššou úrovňou, pri vyššej úrovni majú letálny efekt (Hunt, 2002). Väčšina vplyvov vedúcich ku kraniofaciálnym anomáliam má svoj pôvod vzniku v tretej etape embryologického vývoja, tzv. *neural crest cells* pôvodu a v migrácii týchto buniek. Migráciou a diferenciáciou týchto buniek v štvrtom týždni intrauterinného vývinu sa vyvíja väčšina mezenchýmového tkaniva orofaciálneho systému. V minulosti prinieslo neuspokojivú skúsenosť užívanie talidomidu, alebo preparátu proti akné, *Accutane- isotretín*. (Proffit, 2003). Účinok oboch týchto liekov narušil migráciu a diferenciáciu *neural crest cells*. Častejšie sú účinkom rôznych látok zasiahnuté *neural crest cells*, ktoré majú dlhšiu migračnú dráhu, teda tie, ktoré sa podieľajú na formovaní laterálnych a kaudálnejších štruktúr tváre. V zahraničnej literatúre bolo popísané zakliesnenie plodu v krčkovej časti *uteru*, ktoré narušilo normálny rast čeľustí (Hunt, 2002). Deformity orofaciálnej oblasti môžu vzniknúť aj v prípade ťažkého pôrodu, najmä ak sa musia použiť pôrodné kliešte, môže dôjsť k poškodeniu oboch temporomandibulárnych spojení u dieťaťa. Deformity čeľustí sa vyskytujú častejšie v spätosti s kongenitálnymi syndrómami (Adam, 1976). V 20. storočí sa myšlienky na dedičné faktory pre uplatnenie maloklúzie sústredili na dve hlavné možnosti. Prvá sa zaoberala dedičnosťou disproporcionality medzi veľkosťou zubov a veľkosťou čeľustí, ktorá viedla k stesnaniu alebo medzerovitosti chrupu. Druhá myšlienka sa zaoberala dedičnosťou diproporcionality medzi veľkosťou alebo tvarom čeľuste a sánky, ktorá viedla k narušeniu okluzálneho vzťahu. Je pravdepodobné, že veľkosť čeľustí a zubov je dedične nezávislá, ale dentofaciálne vlastnosti sa prepájajú, ale dedičné prepojenie je nepravdepodobné (Hillson, 2014). Primitívne ľudské populácie a skupiny, ktoré sú geneticky izolované a uniformné, vykazujú menší výskyt maloklúzie ako v modernej spoločnosti. V rozdielnych skupinách populácií sa vyvinuli

pôsobivé variácie medzi proporciami tváre a vzťahom medzi čeľusťou a sánkou (Steinberg, 2016). Charakteristickou črtou populácie bolo sústredovanie sa do väčších skupín a mobilita obyvateľstva, čím došlo k rozšíreniu možností pre kríženie génov. Silné dedičné črty sa preniesli do modernej populácie, čo prinieslo vysoký výskyt maloklúzie a veľkú variabilitu ortodontických odchýlok. Autor (Proffit, 2007) ako príklad uvádza Spojené štáty americké, v ktorých vysoký podiel rôznych populačných skupín viedol k stavu najvyššieho počtu maloklúzii, táto situácia je označovaná v zahraničnej literatúre ako *genetic melting pot*. Tento pohľad na maloklúziu ako primárne genetický problém bol potvrdený výskumami na zvieratách v tridsiatych rokoch dvadsiateho storočia. Najvýznamnejšou osobnosťou týchto výskumov bol profesor Stockard, ktorý viedol pokusy na psoch. Krížil bostonské teriéry s kóliami a jeho pokusy poukázali na výraznejšie odchýlky u potomkov vo veľkosti čeľustí ako vo veľkosti zubov. Tieto výskumy potvrdili nezávislú dedičnosť tvárových štruktúr u potomkov ako výsledok kríženia genetickej informácie (Johannsdottir a kol, 2005).

V posledných desaťročiach sa aj napriek ťažkostiam vo výskume dedičnosti človeka objasnili podrobnosti o vplyve dedičných faktorov na vznik disgnácií. Z týchto výskumov bol vyvodený záver, že dedičnosť determinuje veľkosť, formu a počet zubov. Geneticky determinovaná je aj poloha zubných zárodokov, smer erupcie, ako aj sled a čas prerezávania zubov (Lauweryns, 1993). Podľa autora (Andrik, 1981) zuby a čeľuste nie sú geneticky závislé. Sú známe gény, ktoré determinujú rozmery len niektorej skupiny zubov. Je predpoklad, že veľkosť mliečnych a trvalých zubov určujú odlišné gény. Hereditárne je ovplyvnený aj vzťah čeľustí k ostatnému lebečnému skeletu, ale je závislý aj od kongenitálnych, ale nededičných okolností, ako sú hormóny či traumy. Charakteristické vlastnosti a znaky väčšiny disgnácií bývajú determinované polygénne. To platí hlavne u intermaxilárnych podmienok. Zo zhryzových odchýlok sa ako dominantne dedičné uvádzajú pravá progénia a previsnutý zhryz. Väčšine disgnácií sa však prisudzuje recesívna dedičnosť. Autor Saller označil súhrn latentných základov ako *kryptotyp*, ktorým vysvetľuje rozdielnu manifestáciu dedičných vlastností počas vývinu chrupu a pri vzniku disgnácií. Stúpajúci výskyt disgnácií sa pripisuje aj kríženiu rôznych ľudských rás, typov a populačných skupín, pretože sa vo zvýšenej miere môžu kombinovať nevhodné genetické znaky a vlastnosti (Hillson, 2014 ; Bulík, 2001).

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adam M. Otodencie. 1976; 336.
2. Andrik P a kol. Čeľustná ortopédia (ortodoncia). 1981; 221.
3. Bulík O, Petr J. Komplexní ortodonticko-chirurgická terapie čelistních anomálií. Ortodencie. 2001; 10:14-25.
4. Graber M, Vanarsdall R. Orthodontics current principles and techniques, 3rd edition. 2000; 1094.
5. Hillson S. Tooth development in human evolution and bioarcheology. 2014; 147.
6. Hunt J, Hobar P. Common craniofacial anomalies: the facial dysostoses. Plastic and Reconstructive Surgery. 2002; 110:1714-1725.
7. Johannsdottir B a kol. Heritability of craniofacial characteristics between parents and offspring estimated from lateral cephalograms. American Journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. 2005; 127:200-7.
8. Komínek J a kol. Dětská stomatologie. 1980; 543.
9. Kořová M. Ortodontický průvodce praktického zubního lékaře. 2006; 116.
10. Lauweryns I, Carels C, Vlietinck R. The use of twins in dentofacial genetic research. American Journal of orthodontics and dentofacial orthopedics. 1993; 103:33-8.
11. Ležovič J a kol. Dětské zubné lékařstvo. 2012; 400.
12. Proffit WR a kol. Contemporary orthodontics, fourth edition. 2007; 748.
13. Proffit WR a kol. Contemporary treatment of dentofacial deformity. 2003; 751.

NOVÉ SYNTETICKÉ CHALKÓNY S PROTINÁDOROVOU AKTIVITOU

Takáč P.

Ústav farmakológie, LF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Nádorové ochorenia stále prispievajú k najvyššej úmrtnosti na celom svete. Snahou mnohých odborníkov je preto hľadať molekuly, ktoré by sa stali východiskom pre syntézu nových protinádorových liečiv. Viaceré prírodné látky sa v poslednom období stávajú predmetom záujmu pre svoje priaznivé chemopreventívne a chemoterapeutické účinky. Medzi takéto látky patria aj chalkóny, prekursori flavonoidov, ktoré vykazujú protizápalové, antioxidantné a chemopreventívne účinky. Navyše bola preukázaná ich schopnosť potláčať rast nádorových buniek. Cieľom práce bolo potvrdiť antiproliferatívnu aktivitu nových derivátov chalkónov na nádorových bunkových líniiach a študovať možný mechanizmus ich pôsobenia. Využitím MTT testu sme testovali antiproliferatívnu aktivitu novo syntetizovaných chalkónov s obsahom dusíkatého heterocyklu na nádorových bunkových líniiach. Látka 1C najúčinnšie inhibovala prežívanie buniek HCT s $IC_{50} = 4,13 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Možný mechanizmus antiproliferatívneho pôsobenia tohto derivátu sme sledovali využitím prietokovej cytometrie. Zistili sme, že derivát 1C blokuje bunkový cyklus buniek HCT v G2/M fáze a tiež indukuje ich apoptózu. Tieto výsledky poukazujú na to, že nové syntetické chalkóny predstavujú potenciálne protinádorové liečivá.

ÚVOD

Úmrtnosť na nádorové ochorenia je u nás aj vo svete naďalej vysoká, čo vedie mnohých odborníkov k hľadaniu nových protinádorových liečiv (Ferlay a kol., 2013). Hlavným zdrojom nových liečiv je príroda, hlavne rastliny, ktoré obsahujú mnoho látok s protinádorovou aktivitou. K takýmto látkam patria aj prekursori v syntéze flavonoidov – chalkóny, ktoré sa stávajú predmetom záujmu kvôli širokému spektru biologických účinkov. Viaceré štúdie tiež potvrdzujú ich priaznivé chemopreventívne a chemoterapeutické účinky v *in vitro* aj *in vivo* podmienkach (Champelovier a kol., 2013; Mahapatra a kol., 2015). Protinádorová aktivita chalkónov súvisí s ich schopnosťou zabraňovať aktivácii karcinogénov (Champelovier a kol., 2013), antiproliferatívnymi účinkami (Pilátová a kol., 2010), blokádou bunkového cyklu nádorových buniek (Drutovič a kol., 2014), indukciou apoptózy nádorových buniek (Kello a kol., 2016), inhibíciou nádorovej angiogenézy (Pilátová kol., 2010; Varinská a kol., 2012) ako aj *in vivo* protinádorovou aktivitou (Mahapatra a kol., 2015). Syntéza nových chalkónov s protinádorovými vlastnosťami aj naďalej pokračuje. Naším cieľom bolo testovať antiproliferatívnu aktivitu novosyntetizovaných chalkónov a mechanizmus ich pôsobenia na molekulárnej úrovni využitím vhodných metódik.

MATERIÁL A METODIKA

Na experimenty boli použité syntetické analógy chalkónov obsahujúce dusíkatý heterocyklus s označením ZKCH-1, 1B, 1C. Látky boli testované v koncentráciách 100, 50 a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Na experimenty boli použité nádorové bunkové línie MDA (adenokarcinóm prsníka, ER-), MCF-7 (adenokarcinóm prsníka, ER+), A549 (ľudský bronchogénny karcinóm), Jurkat (akútna T-lymfoblastová leukémia) a HCT (ľudský kolorektálny karcinóm). Bunky boli inkubované v 96-jamkových platniach v kultivačnom médiu v počte 5000-10 000 buniek na jamku, aby mohli proliferovať v priebehu celého experimentu. Po 24 hodinách boli pridané testované látky v koncentráciách 100, 50 a 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Po 72 hodinovej inkubácii pri 37 ° C v atmosfére s 5 % obsahom CO₂ bolo do každej jamky pridaných 10 μl 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl) 2,5-difenyltetrazólium bromidu (MTT) v koncentrácii 5 mg.ml^{-1} . Po 4 hodinovej inkubácii pri 37° C, počas ktorej dochádza k premene žltého rozpustného MTT aktívnymi

dehydrogenázami mitochondrií živých buniek na nerozpustný fialový formazán, bola táto reakcia zastavená pridaním 100 µl dodecylsulátu sodného (SDS), ktorý zároveň slúži ako rozpúšťadlo formazánu. Na druhý deň bola absorbancia rozpusteného formazánu meraná spektrofotometricky pri 540 nm. Namerané hodnoty boli prepočítané na percento prežívajúcich buniek v porovnaní s kontrolou (100 % prežívanie). Z minimálne troch nezávislých experimentov sa určila hodnota strednej inhibičnej koncentrácie (IC₅₀) v µmol.l⁻¹. V ďalších experimentoch sme pokračovali s najúčinnnejším derivátom. Distribúcia bunkového obsahu po inkubácii s testovanou látkou bola analyzovaná pomocou prietokového cytometra. Bunky, zozbierané v súlade s experimentálnou schémou, boli premyté s 1x PBS, zafixované v 70 % chladenom etanole a uskladnené minimálne 24 hod pri 4°C. Pred analýzou boli bunky dvakrát prepláchnuté chladeným PBS. RNA bola degradovaná RNázou (500 µg.ml⁻¹, SigmaAldrich) a bunky boli farbené 30 min. Vindelovým roztokom s obsahom propidium jodidu (PI, 25µg.ml⁻¹, Sigma). Obsah DNA v bunkách bol analyzovaný prietokovým cytometrom (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA). Výsledky merania boli vyhodnotené za použitia softwaru Win MDI a FlowJo a vyjadrené ako percentuálny podiel buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu (G1, S, G2/M) a v sub-G0/G1 populácii. Zmeny externalizácie fosfatidylserínu boli analyzované pomocou anexínu VFITC/PI fluorescenčného farbenia vykonaného podľa pokynov výrobcu (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Adherentné aj plávajúce bunky boli zozbierané 24, 48 a 72 hodín po pridaní študovanej látky. Bunky boli farbené s anexín V-FITC (po dobu 15 min. pri izbovej teplote, opláchnuté a farbené s propidium jodidom 53 minimálne 5 min. Fluorescencia anexínu V-FITC a PI bola detekovaná prietokovým cytometrom (FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, USA) v kanáloch FL1 (530/30 nm band pass filter) a FL2 (585/42 nm band pass filter). Vzorky boli analyzované Flowing softwarom a vyjadrené ako percento živých buniek (An⁻/PI⁻), buniek v skorej apoptóze (An⁺/PI⁻), buniek v neskoršej apoptóze/nekróze (An⁺/PI⁺) a mŕtvych buniek (An⁻/PI⁺).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našich experimentoch sme na základe MTT testu zistili, že spomedzi testovaných látok je najúčinnnejší syntetický chalkón 1C na nádorovej bunkovej línii HCT s hodnotou IC₅₀ = 4,13 µmol.l⁻¹. V ďalších experimentoch sme teda pokračovali s týmto derivátom.

Tab. 1 Hodnoty IC₅₀ testovaných látok ± SD v µmol.l⁻¹. Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty z troch nezávislých experimentov.

Testovaná látka	Bunková línia				
	MCF-7	MDA	Jurkat	A549	HCT
ZKCH-1	> 100	53±10,4	10,38±3,3	80±5,7	15,1±0,8
1B	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
1C	16,38±6,2	10,88±1,9	8±1,5	10,67± 4,2	4,13±0,35

Tab. 2 Percentuálne zastúpenie buniek HCT v jednotlivých fázach bunkového cyklu po 24 h, 48 h a 72 h ovplyvnení látkou 1C. Údaje sú znázornené spolu s vyjadrením smerodajných odchýlok (± SD) vypočítaných z troch nezávislých experimentov (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 verzus kontrola).

	čas (h)	subG0/G1	G1	S	G2
Kontrola		0,45±0,21	59,65±3,18	15,25±3,75	24,65±0,78
Látka 1C	24 h	0,76±0,06*	40,30±2,12*	7,20±2,11	51,75±0,07***
	48 h	5,41±1,29**	34,45±0,92***	6,59±3,95	53,55±4,31**
	72 h	15,25±5,87	31,10±3,11***	9,65±1,77	44±7,21**

Vplyv sledovaného derivátu na bunkový cyklus sme analyzovali metódou prietokovej cytometrie. Po 24 hodinovej inkubácii bunkovej línie HCT s látkou 1C došlo k významnému zvýšeniu bunkového obsahu DNA v G2/M fáze (51,75 %) v porovnaní s neovplyvnenými bunkami (24,65 %). Po 48 h a 72 h inkubácii sme aj naďalej pozorovali kumuláciu buniek v G2/M fáze a tiež došlo k nárastu počtu buniek v sub G0/G1 frakcii, ktorá sa považuje za apoptickú.

Tab. 3 Detekcia apoptózy/nekrózy pomocou značenia anexínom V/PI po 24, 48 a 72 h ovplyvnení buniek HCT látkou 1C v koncentrácii 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Výsledky sú prezentované ako priemer \pm SD z troch nezávislých experimentov a vyjadrené ako percento živých buniek (An^-/PI^-), buniek v skorej apoptóze (An^+/PI^-), buniek v neskoršej apoptóze/nekróze (An^+/PI^+) a mŕtvych buniek (An^-/PI^+) (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ verus kontrola).

	čas (h)	An^-/PI^-	An^+/PI^-	An^+/PI^+	An^-/PI^+
Kontrola		95,9 \pm 0,01	1,49 \pm 0,36	1,44 \pm 0,25	1,18 \pm 0,11
Látka 1C	24 h	86,1 \pm 12,02	6,1 \pm 5,40	4,71 \pm 5,08	3,09 \pm 1,54
	48 h	29,55 \pm 9,40**	39,91 \pm 10,76**	16,75 \pm 8,41*	13,79 \pm 11,75
	72 h	17,45 \pm 7,99***	59,15 \pm 18,17**	14,75 \pm 3,46**	8,65 \pm 6,71

Analýza bunkového cyklu poukázala na schopnosť látky 1C indukovať apoptózu buniek HCT, čo sme potvrdili aj metódou značenia anexínom V/PI. Kombináciou anexínu V a PI môžeme rozlíšiť živé bunky (An^-/PI^-), bunky v skorej apoptóze (An^+/PI^-), bunky v neskoršej apoptóze/nekróze (An^+/PI^+) a mŕtve bunky (An^-/PI^+). Naše výsledky ukazujú, že len malé percento neovplyvnených buniek viaže anexín V (2,93 %). Na druhej strane počet buniek v skorej fáze apoptózy po 24, 48 a 72 h inkubácii s 1C stúpa v závislosti od času z 6,1 % na 59,15 %. Po 72 h inkubácii došlo vplyvom látky 1C tiež k nárastu percenta buniek v neskoršej fáze apoptózy/nekrózy z 1,44 % na 14,75 % a stúpol aj počet mŕtvych buniek z 1,18 % na 8,65 %. Naše experimenty poukazujú na to, že novosyntetizované chalkóny vykazujú priaznivú protinádorovú aktivitu a mohli by slúžiť ako východiskové molekuly pre syntézu nových protinádorových liečiv.

Práca bola podporená grantom 21/GSD/2016.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Drutovič D, Chripkova M, Pilatova M, Kruzliak P, Pejesi P, Sarissky M, Lupi M, Damia G, Brogginini M, Mojzis J. Benzylidenetetralones, cyclic chalcone analogues, induce cell cycle arrest and apoptosis in HCT116 colorectal cancer cells. *Tumor Biol.* 2014; 35: 9967-9975.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, a kol. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136 (5):E359-86.
3. Champelovier P, Chauchet X, Hazane-Puch F, Vergnaud S, Garrel C, Laporte F, Boutonnat J, Boumendjel A. Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. *Vitro.* 2013; 27: 2305–2315.
4. Kello M, Drutovic D, Pilatova MB, Tischlerova V, Perjesi P, Mojzis J. Chalcone derivatives cause accumulation of colon cancer cells in G2/M phase and induce apoptosis. *Life Sci.* 2016; 150 : 32-8.
5. Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *Eur J Med Chem.* 2015;98:69-114.
6. Pilatova M, Varinska L, Perjesi P, Sarissky M, Mirossay L, Solar P, Ostro A, Mojzis J. In vitro antiproliferative and antiangiogenic effects of synthetic chalcone analogues. *Toxicol In Vitro.* 2010;24(5):1347-55.
7. Varinska L, Van wijhe M, Belleri M, Mitola S, Perjesi P, Presta M, Koolwijk P, Ivanova L, Mojzis J. Anti-angiogenic activity of the flavonoid precursor 4-hydroxychalcone. *Eur J Pharmacol.* 2012;691(1-3):125-33.

NUTRIČNÁ REGULÁCIA PERIPARTÁLNEHO OBDOBIA U DOJNÍC

Timkovičová Lacková P., Maskal'ová, I., Vajda V.
Ústav výživy, dietetiky a krmovinnárstva, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo sledovať nutričný vplyv v peripartálnej fáze na úroveň adaptácie a stability bachorovej fermentácie a intermediárneho metabolizmu dojníc. Analýzou žľabových vzoriek kŕmnej dávky podľa produkčných fáz bol hodnotený vplyv objemového a koncentrovaného typu KD v príprave na pôrod na profil bachorovej fermentácie a úroveň intermediárneho metabolizmu krvného séra. Limitovaný obsah škrobu a NVS v slamovej diéte pred pôrodom priamo koreluje so zvýšenými hodnotami pH, C₂ a so zníženými hodnotami C₃ bachorového obsahu a so zvýšenou hladinou NEMK a pečeneých enzýmov v krvnom sére. Tento stav metabolizmu poukazuje na prejav negatívnej energetickej bilancie, kde transplacentárny prenos glukózy pre vývoj plodu nie je uhradený príjmom energie a zvýšená lipomobilizácia s príznakmi metabolickej záťaže pečene potvrdzuje stav nedostatočnej adaptácie v príprave na pôrod. Optimálne zastúpenie energie v adaptačnej diéte pred pôrodom priamo koreluje s hodnotami bachorového obsahu a krvného séra a potvrdzuje optimálnu adaptáciu pred pôrodom.

ÚVOD

Peripartálne obdobie dojníc je sprevádzané významnými morfológickými a funkčnými zmenami bachora a zmenami regulácie metabolizmu živín v dôsledku zvyšujúcich sa potrieb energie, glukózy, aminokyselín a vápnika pre gravidnú maternicu a laktujúcu mliečnu žľazu (Overton a kol., 2004). Zvýšený príjem energie formou škrobu pred pôrodom oproti kŕmnej dávke počas státia na sucho podporuje morfológickú a funkčnú adaptáciu bachora (Rabelo a kol., 2003). Zvýšená syntéza kys. propiónovej podporou glukoneogenézy udržiava pozitívnu energetickú bilanciu pred pôrodom (Overton a kol., 2004) a významne reguluje adaptáciu metabolizmu, lipomobilizáciu a ketogenézu po pôrode (Van Knegsel a kol., 2007). Nevýhodou zvýšeného príjmu energie pred pôrodom je riziko prekrmovania energiou u pretučnených dojníc a zvýšená lipomobilizácia po pôrode (Douglas a kol., 2006; Dann a kol., 2006). Na zabránenie prekrmovania energiou pred pôrodom bol navrhnutý systém kŕmenia dojníc jednotnou kŕmnou dávkou v celom období státia na sucho so zníženým zastúpením energie (Janovick Guretzky a kol., 2006). Tento typ kŕmnej dávky so zvýšeným zastúpením slamy eliminuje riziko prekrmovania energiou, podporuje príjem sušiny a zabraňuje lipomobilizácií s následným vznikom metabolických ochorení (Drackley a Janovick-Guretzky, 2007). Nevýhodou tohto typu kŕmnej dávky je otázka adaptácie bachora a metabolizmu pred pôrodom. Cieľom práce bolo sledovať nutričný vplyv KD v peripartálnej fáze s rôznym podielom škrobu na úroveň adaptácie a stability bachorovej fermentácie a intermediárneho metabolizmu dojníc.

MATERIÁL A METODIKA

V kŕmnom pokuse u dojníc holsteinského plemena vo výrobných podmienkach chovu boli vysoko gravidné dojnice v príprave na pôrod v pokusnej skupine kŕmené objemovým typom KD („slamová diéta“) a dojnice v kontrolnej skupine adaptačným typom KD. Analýza vplyvu skrmovanej diéty na úroveň bachorovej fermentácie a intermediárneho metabolizmu bola sledovaná v skupinách 6 dojníc podľa fázy produkcie: 2. – 3. týždeň pred pôrodom, 2. – 3. týždeň po pôrode a pri vrchole 70 - 100 dní laktácie. V žľabových vzorkách kŕmív boli analyzované konvenčnými metódami sušina, dusíkaté látky (NL), hrubý tuk, neutrálne-detergentná vlákna (NDV) a škrob. Nevláknité sacharidy (NVS) a netto energie laktácie (NEL) boli vypočítané rovnicou podľa analyzovaného obsahu živín v kŕmivách. Profil

bachorovej fermentácie bol sledovaný analýzou bachorového obsahu (pH, NH₃, C₂, C₃, C₄, suma UMK a pomer C₂:C₃) odobratého bachorovou sondou 4 – 5 hodín po nakŕmení. Úroveň intermediárneho metabolizmu bola hodnotená analýzou bielkovinového metabolizmu (celkové bielkoviny, albumín, močovina), energetického metabolizmu (TAG, glukóza, NEMK, BHM) a stavu záťaž pečene (AST, GGT, bilirubín) v krvnom sére dojnic.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nutričné zloženie použitých žľabových KD je zhrnuté v Tab.1. Objemový typ KD pred pôrodom so zníženým podielom škrobu 15,9 %, NVS 31,3 % a NEL 6,02 MJ v suš. TMR limituje príjem energie pod hranicu normovanej potreby pred pôrodom. Adaptačná diéta analýzou nutričného zloženia vykazuje v období 2 – 3 týždne pred pôrodom obsah škrobu 25,46 % a NVS 38,54 % na hornej tretine normovanej potreby a potvrdzuje optimálny príjem energie pred pôrodom a tým aj adaptáciu a stabilizáciu metabolizmu bachora na koncentrovaný typ kŕmnej dávky po pôrode.

Tab.1 Nutričné zloženie kŕmnej dávky u dojnic podľa fázy produkcie

Nutričné zloženie	Objemový typ KD		Adaptačný typ KD	
	Pred pôrodom	Po pôrode	Pred pôrodom	Po pôrode
Sušina g/kg	409	426,6	430,1	443,5
NL g/kg suš.	124,7	158,2	145,2	159,4
Tuk g/kg suš.	28,0	59,3	32,1	39,8
NDV g/kg suš.	476,9	280,4	369,3	320,6
Škrob g/kg suš.	159,0	277,8	254,6	278,4
NVS g/kg suš.	313,0	423,6	385,4	435
NEL MJ/kg suš.	6,02	7,13	6,45	6,93

NL - dusíkaté látky; NDV - neutrálne-detergentná vlákna; NVS - nevláknité sacharidy; NEL- netto energia laktácie

Zloženie KD: *Objemový typ KD pred pôrodom*: Kukuričná siláž 15,0 kg, Siláž TTP 6,0 kg, Slama jačmenná 3,0 kg; - *po pôrode a vo vrchole laktácie*: Kukuričná siláž 23,0 kg, Siláž TTP 12,0 kg, Slama jačmenná 0,5 kg, Sójový extrahovaný šrot 1,53 kg, Kukuričný šrot 3,27 kg, Repkový extrah.šrot 2,0 kg;

Adaptačný typ KD pred pôrodom: Kuk. siláž 17,0 kg, Lucern. siláž 5,0 kg, Kuk. šrot 2,0 kg, Pšen. šrot 1,5 kg, Repkový extrah. šrot 1,0 kg, Sójový extrah. šrot 0,5 kg; - *po pôrode a vo vrchole laktácie*: Kuk siláž 17,0 kg, Lucern. siláž 10,0 kg, Sójový extrah. šrot 1,5 kg, Repkový extrah. šrot 1,0 kg, Kuk. šrot 3,5 kg; Pšen. šrot 2,5 kg;

Analýzované hodnoty bachorovej fermentácie sú zhrnuté v Tab.2. Pri objemovom type KD pred pôrodom úroveň bachorovej fermentácie s produkciou UMK 94,3 mmol/l, zníženým podielom kyseliny propiónovej a zvýšeným podielom kyseliny octovej pri zvýšenom pH 6,9 potvrdzuje charakter fermentácie objemového typu kŕmnej dávky s nedostatočnou adaptáciou na koncentrovaný typ kŕmnej dávky v príprave na pôrod. Signifikantne zvýšené hodnoty pH ($P < 0,01$), kyseliny octovej ($P < 0,01$) a pomeru C₂:C₃ ($P < 0,001$) pri objemovom type KD oproti adaptačnej KD pred pôrodom boli ovplyvnené limitovaným obsahom škrobu a NVS.

Tab.2 Analýza bachorovej fermentácie u dojnic podľa fázy produkcie

Bach.obsah	Objemový typ KD			Adaptačný typ KD		
	Pred pôrodom	Po pôrode	Vrchol laktácie	Pred pôrodom	Po pôrode	Vrchol laktácie
pH	6,9±0,2 ^{a,1,c}	6,1±0,2 ^a	6,3±0,4 ^c	6,4±0,3 ¹	6,1±0,3	6,3±0,3
NH ₃ mg/100ml	24,3±2,3	25,2±1,7	25,1±4,5	21,8±1,9 ^{d,e}	26,2±2,4 ^e	28,7±5,5 ^d
C ₂ mmol/l	68,5±8,3 ^{2,g,h}	80,5±3,7 ^{1,h}	80,8±7,8 ^e	83,8±6,2 ²	85,2±8,2	84,3±5,3
C ₃ mmol/l	14,5±3,1 ^{3,j,k}	32,2±3,5 ^k	32,2±9,3 ^j	29,2±3,8 ^{3,1}	36,8±5,3 ¹	34,3±7,3
C ₄ mmol/l	11,2±1,5 ^{n,o}	17,5±0,7 ^{4,o}	16,9±1,5 ⁿ	17,6±2,1	19,5±1,0 ⁴	18,7±2,1
∑ UMK mmol/l	94,3±12,7 ^{5,r,s}	130,3±7,1 ^s	129,8±17,7 ^r	130,5±11,6 ⁵	141,6±13,3	137,3±13,8
C ₂ :C ₃	4,8±0,5:1 ^{6,u,v}	2,5±0,2:1 ^v	2,7±0,5:1 ^u	2,9±0,2:1 ^{6,w}	2,3±0,2:1 ^w	2,6±0,4:1

NH₃ - amoniak; C₂ – kys.propiónová; C₃ – kys.octová; C₄ – kys.maslová; UMK – unikavé masné kyseliny; a,3,k,n,o,5,s,6,u,v: $P < 0,001$; 1,c,e,2,j,4,r,w: $P < 0,01$; d,g,h,l: $P < 0,05$

Naproti tomu v skupinách dojníc po pôrode pri náhlom prechode z objemového na koncentrovaný typ kŕmnej dávky boli potvrdené v chove pri skrmovaní objemového typu KD u dojníc pred pôrodom znížené hodnoty pH ($P < 0,001$), C_2 ($P < 0,05$) a pomeru $C_2:C_3$ ($P < 0,001$) a zvýšené hodnoty C_3 ($P < 0,001$) a sumy UMK ($P < 0,001$) ako následok redukovanej úrovne adaptácie bachora v príprave na pôrod. Optimálne hodnoty bachorovej fermentácie pri adaptačnej diéte pred pôrodom poukazujú na dostatočnú adaptáciu pred pôrodom.

Analyzované ukazovatele krvného séra sú zhrnuté v Tab.3. U dojníc pri skrmovaní objemového typu KD boli potvrdené signifikantne vyššie hodnoty NEMK ($P < 0,05$) pred pôrodom nad hornou hranicou referenčného rozpätia, čo potvrdzuje stav negatívnej energetickej bilancie a zvýšenej lipomobilizácie. Zvýšené hodnoty AST pred pôrodom a po pôrode a zvýšené hodnoty bilirubínu po pôrode potvrdzujú zvýšenú metabolickú záťaž funkcie pečene u dojníc s príznakmi tukovej infiltrácie vyvolané zvýšenou lipomobilizáciou, ktorá je podmienená nedostatočnou adaptáciou bachorového a intermediárneho metabolizmu pri skrmovaní objemového typu KD pred pôrodom. Postupné zvýšenie hodnôt cholesterolu ($P < 0,001$) u dojníc pri vrchole laktácie potvrdzuje stabilizáciu energetickej bilancie a vynášanie tuku vo forme VLDL a úpravu funkčného stavu pečene. Optimálne hodnoty krvných markerov pri adaptačnej diéte pred pôrodom poukazujú na optimálnu adaptáciu dojníc pred pôrodom.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0785/16.

Tab. 3 Hodnotenie krvných markerov u dojníc podľa fázy produkcie

Krvné sérum	Objemový typ KD			Adaptačný typ KD		
	Pred pôrodom	Po pôrode	Vrchol laktácie	Pred pôrodom	Po pôrode	Vrchol laktácie
Celk.bielkoviny g/l	73,8±6,4 ^a	77,6±6,3	81,5±2,9 ^a	75,1±5,2 ^b	74,8±4,4 ^c	82,9±2,1 ^{b,c}
Močovina mmol/l	4,2±0,7 ^{d,e}	5,3±0,7 ^{1,e}	5,9±0,6 ^d	3,9±0,5 ^f	3,6±0,2 ^{1,g}	6,0±0,4 ^{f,g}
Albumín g/l	38,3±2,3	37,1±2,8	39,6±1,3	36,4±3,3	35,4±3,1	38,7±2,5
TAG mmol/l	0,6±0,1 ^{h,i}	0,5±0,1 ^{2,i}	0,5±0,01 ^h	0,43±0,2 ^k	0,7±0,1 ^{2,j,k}	0,4±0,2 ^j
Glukóza mmol/l	3,6±0,4	3,5±0,2 ³	3,6±0,4 ⁴	3,3±0,3	2,9±0,4 ³	2,9±0,2 ⁴
Cholesterol mmol/l	2,1±0,4 ^l	3,0±1,4 ^m	7,4±1,2 ^{5,l,m}	2,5±0,4 ⁿ	2,6±0,6 ^o	4,6±0,8 ^{5,n,o}
NEMK mmol/l	0,41±0,1 ⁶	0,54±0,1	0,38±0,2	0,3±0,1 ⁶	0,4±0,1 ^p	0,24±0,1 ^p
BHM mmol/l	0,4±0,1 ⁷	0,9±0,3 ⁷	0,6±0,1	0,4±0,1 ^s	0,6±0,1 ^t	0,7±0,1 ^{s,t}
AST ukat/l	1,4±0,2 ^{u,v}	1,9±0,3 ^{7,v}	1,8±0,2 ^u	1,3±0,1 ^{w,x}	1,6±0,1 ^{7,x}	1,7±0,2 ^w
GGT ukat/l	0,4±0,2 ^y	0,5±0,1 ^z	0,8±0,2 ^z	0,4±0,1	0,5±0,2	0,6±0,1
Bilirubín umol/l	4,5±1,3	5,9±0,9 ⁸	4,7±1,1	2,9±0,8 ^{yy}	3,6±0,9 ⁸	4,0±0,6 ^{yy}

TAG- triacylglyceridy; NEMK – neesterifikované mastné kyseliny; BHM – kys.betahydroxymaslová; AST – aspartát aminotransferáza; GGT – gama-glutamyltransferáza; 1,f,g,2,l,m,n,x: $P < 0,001$; c,d,h,j,k,5,o,s,u,v,w,8: $P < 0,01$; a,b,e,i,3,6,p,r,t,7,y,z,yy: $P < 0,05$

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Dann, H. M., Litherland, N.B., Underwood, J.P., Bionaz, M., D'Angelo, A., McFadden, J.W., Drackley, J.K. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J. Dairy Sci.* 2006; 89: 3563-3577.
2. Douglas, G. N., Overton, T.R., Bateman, H.G., Dann, H.M., Drackley, J.K. Prepartal plane of nutrition, regardless of dietary energy source, affects periparturient metabolism and dry matter intake in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2006;89.6: 2141-2157.
3. Drackley, J.K., Janovick Guretzky, N.A. Controlled energy diets for dry cows. *Proc. 8th Western Dairy Mgt. Conf., Reno, NV. Oregon St. Univ., Corvallis.* 2007; 7-16.
4. Janovick Guretzky, N.A., Litherland, N.B., Moyes, K.M., Drackley, J.K. Prepartum energy intake effects on health and lactational performance in primiparous and multiparous Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 2006; 89: Sup.1. (Abstr.)
5. Overton, T. R., Waldron, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J. DairySci.* 2004; 87: E105-E119.
6. Rabelo, E., Rezende, R.L., Bertics, S.J., Gumer, R.R. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2003; 86: 916-925.
7. Van Knegsel, A. T. M., Van Den Brand, H., Dijkstra, J., Kemp, B, Van Strallen, W.M., Taminga, S. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. *J. Dairy Sci.* 2007; 90: 1467-1476.

KAZUISTIKA: ADDISONOVA CHOROBA (HYPOADRENOKORTICIZMUS) U LABRADORSKÉHO RETRÍVRA

Titková, R., Příkryl, M., Lukáč, B

Klinika malých zvierat – Oddelenie vnútorných chorôb, UVLF, Košice

ÚVOD

Addisonova choroba (hypoadrenokorticismus) sa rozvíja v dôsledku poklesu produkcie mineralokortikoidov (predovšetkým aldosterónu) a glukokortikoidov (hlavne kortizolu) kôrou nadobličiek (Ramsey, Herrtage, 2015). Aldosterón primárne pôsobí na proximálny obličkový kanálik s cieľom zvýšiť absorpciu sodíka a na distálny kanálik s cieľom zvýšiť reabsorpciu sodíka výmenou za draslíkové ióny. Vďaka osmotickým silám, vedie tento proces k zadržaniu väčšieho množstva vody v tele. Aldosterón tak udržiava objem krvi prostredníctvom retencie sodíka v tele a zároveň sa podieľa na exkrécii iónov draslíka a sodíka. Nedostatok aldosterónu vedie k nízkemu obsahu sodíka (hyponatrémii), vysokému obsahu draslíka (hyperkalémii), acidóze a nižšiemu objemu krvi (hypovolémii až hypovolemickému šoku) (Nielsen a kol., 2008). Kortizol pôsobí na všetky telesné tkanivá a má celú škálu účinkov, ktoré synergicky posilňujú schopnosť tela brániť sa stresu, mobilizuje aminokyseliny a tukové zásoby, zvyšuje hladinu glukózy v krvi, rozkladá svalovú hmotu, pôsobí proti inzulínu, podporuje chuť do jedla, tvorbu červených krviniek, potláča niektoré aspekty imunitných a zápalových reakcií, stimuluje produkciu albumínu. Nedostatok kortizolu preto vedie k anorexii, úbytku na váhe, anémii, hypoalbuminémii a hypoglykémii. Môže ovplyvniť motilitu gastrointestinálneho traktu a vyvolať zvracanie, hnačku alebo nechutenstvo (Kozák a kol., 2008).

Najčastejšou príčinou vzniku tzv. primárneho hypoadrenokorticismu je takmer vždy imunitne sprostredkovaná deštrukcia nadobličiek. To obvykle vedie k nedostatku glukokortikoidov aj mineralokortikoidov. Boli zaznamenané aj prípady izolovaného deficitu glukokortikoidov (atypický hypoadrenokorticismus). Sekundárny hypoadrenokorticismus (spôsobený dysfunkciou hypofýzy) sa vyznačuje deficitom adrenokortikotropného hormónu (ACTH). Akútne a závažné príznaky Addisonovej choroby (tzv. Addisonova kríza) sú život ohrozujúcim stavom a psy musia byť čo najskôr liečení. Cieľom liečby je korekcia hypotenzie, hypovolémie, elektrolytovej nerovnováhy, acidózy a hypoglykémie (Church, 2004).

PRÍPADOVÁ ŠTÚDIA

Naším pacientom bola „Lara“, štvorročná suka plemena labradorský retríver. Klinický prejav ochorenia začal kľčom na hrudníkovej končatine, pokračoval generalizovaným tonickým kľčom (v trvaní 1-2 sekundy), pri ktorom sa pes zvalil na zem. Na druhý deň sa zopakoval ďalší záchvat so slabosťou panvových končatín. Pridružilo sa zvracanie, anorexia a apatia. Klinickým vyšetrením sme zistili základné triasové hodnoty: telesná teplota (TT) = 38.5°C, srdcová frekvencia = 70 úderov/min, dychová frekvencia = 30 vdychov/min, sliznice svetloružovej farby, suché, zvýšený CRT (capillary refill time) = 3s, znížená elasticita kože (mierna dehydratácia), apatia, inapetencia, vedomie intaktné, pes orientovaný, mierna slabosť panvových končatín, pacient citlivo reagoval na kraniálnu oblasť dutiny brušnej. Ultrasonografické vyšetrenie brušnej dutiny nepreukázalo žiaden patognomický prejav gastrointestinálneho, hepatálneho, renálneho alebo urologického ochorenia. Rovnako bolo USG vyšetrením vylúčené aj ochorenie genitálneho aparátu (pyometra). Vyšetrením moča sa zistila znížená merná hmotnosť (< 1,030) bez prítomnosti leukocytov, proteínov, glukózy či krvi. Pacientovi bola odobraná krv na stanovenie hematologických (obr. č. 1) a biochemických parametrov (tab. č. 1). Vyšetrenie červeného krvného obrazu odhalilo znížené hodnoty stredného objemu erytrocytov (MCV) a strednej koncentrácie hemoglobínu (MCH), v diferenciálnom leukograme sme pozorovali monocytózu a takisto bol zaznamenaný

znižený stredný objem trombocytov (MPV). Z biochemických parametrov boli zistené zvýšené hodnoty kreatinínu (CREA) a močoviny (UREA), celkových proteínov (TP), mierna hyperglykémia, hypochlorémia, hyponatrémia a hyperkalémia, pričom došlo aj k narušeniu vzájomného pomeru sodíka k draslíku. Z dôvodu hyperkalémie bolo u pacienta vykonané aj elektrokardiografické vyšetrenie, ktoré odhalilo stratu vlny P, predĺženie QRS komplexu, zvýšenie ST segmentu a ektopické srdcové údery. U pacienta aj napriek hyperkalémii nebol pozorovaný typický symptóm – bradykardia (srdcová frekvencia < 60 úderov/ min). Tento paradox je vysvetľovaný kompenzačnou schopnosťou srdca pri dehydratácii, príp. symptomatickou infúznou terapiou u pacienta. Neurologickým ani ortopedickým vyšetrením sa nepodarilo nájsť príčinu kŕčov a slabosti panvových končatín. Rovnako RTG pravej hrudníkovej končatiny vyvrátil deficit na jej kostnom podklade. Vzhľadom na nešpecifické nálezy bolo sérum pacienta vyšetrené na koncentráciu bazálneho kortizolu (CORT = < 6 ng.ml⁻¹ ↓). Suspektná diagnóza hypoadrenokorticismu bola nakoniec potvrdená diagnostickým testom prvej voľby – ACTH stimulačným testom (CORT = < 8 ng.ml⁻¹). Po stanovení diagnózy bol pacient nasadený na glukokortikoidnú (metylprednizolón, neskôr prednizón) a mineralokortikoidnú terapiu. Substitúcia mineralokortikoidov bola dosiahnutá aplikáciou depotnej subkutánnej suspenzie desoxykortón pivalátu (Zycortal 25mg.ml⁻¹, Dechra), ktorú je potrebné aplikovať doživotne približne každých 25 dní. Zlepšenie klinického stavu pacienta nastalo na druhý deň po zahájení kauzálnej a symptomatickej terapie. Hodnoty zmenených biochemických a hematologických parametrov boli pri kontrolnom odbere (2 týždne od začiatku terapie) v rozpätí referenčných noriem.

ZÁVER

Pretože Addisonovu chorobu nie je jednoduché rozoznať, je polovicou úspechu byť si vedomý tejto diagnózy a pamätať na ňu. Addisonova choroba je potenciálne život ohrozujúci stav (Ramsey, Herrtage, 2015). Klinické príznaky tohto ochorenia nie sú špecifické a môžu sa striedavo zhoršovať a zlepšovať alebo reagovať na nešpecifickú liečbu (napr. infúznou terapiou). Addisonova choroba tak môže byť zamenená za iné ochorenie, napr. ochorenie obličiek (akútne renálne zlyhanie), gastroenteritídu, akútnu pankreatitídu, hepatitídu, nervovosvalové (myastenia gravis) a kardiovaskulárne ochorenie (srdcové zlyhanie) (Galac a kol., 2010).

Obr. 1: Hematologické parametre pacienta stanovené prístrojom ProCyte Dx (IDEXX).

Test	Výsledky	Referenční Interval	NÍZKÝ	NORMÁLNÍ	VYSOKÝ
ProCyte Dx (7. únor 2017 9:39)					
RBC	7,26 x10 ¹² /L	5.65 - 8.87			
HCT	39,2 %	37.3 - 61.7			
HGB	14,5 g/dL	13.1 - 20.5			
MCV	54,0 fL	61.6 - 73.5	Nizký		
MCH	20,0 pg	21.2 - 25.9	Nizký		
MCHC	37,0 g/dL	32.0 - 37.9			
RDW	19,6 %	13.6 - 21.7			
%RETIC	0,4 %	-			
RETIC	25,4 K μ L	10.0 - 110.0			
WBC	12,82 x10 ⁹ /L	5.05 - 16.76			
%NEU	65,4 %				
%LYM	17,4 %				
%MONO	12,1 %				
%EOS	4,4 %				
%BASO	0,7 %				
NEU	8,39 x10 ⁹ /L	2.95 - 11.64			
LYM	2,23 x10 ⁹ /L	1.05 - 5.10			
MONO	1,55 x10 ⁹ /L	0.16 - 1.12			Vysoký
EOS	0,56 x10 ⁹ /L	0.06 - 1.23			
BASO	0,09 x10 ⁹ /L	0.00 - 0.10			
PLT	342 K μ L	148 - 484			
MPV	7,6 fL	8.7 - 13.2	Nizký		
PDW	9,1 fL	9.1 - 19.4			
PCT	0,26 %	0.14 - 0.46			

Podozrenie na ochorenie môže ošetrujúci lekár vysloviť na základe anamnézy, naledovanej podrobným klinickým vyšetrením. Malo by zahŕňať hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, RTG vyšetrenie a EKG. Stanovenie bazálnej koncentrácie kortizolu je účinným skriningovým testom hypoadrenokorticismu. Pre potvrdenie diagnózy je možné vykonať ACTH stimulačný test.

Tabuľka č. 1: Biochemické parametre pacienta stanovené prístrojom Cobas c 111 (Dechra).

Parameter biochemického vyšetrenia krvi	Fyziologické rozpätie	Nameraná hodnota
ALT (μkat/l)	< 0.949	0.54
ALP (μkat/l)	< 1.24	0.82
GMT (μkat/l)	< 0.14	0.12
CREA (μmol/l)	46 – 88	159.4 ↑
UREA (mmol/l)	3.97- 8.05	20.70 ↑
TP (g/l)	47 – 74	91.9 ↑
ALB (g/l)	26 – 41	32.3
GLU (mmol/l)	3.6 – 5.8	6.2 ↑
Ca (mmol/l)	2.05 – 2.86	2.44
Cl⁻ (mmol/l)	110 – 130	92.3 ↓
Na⁺ (mmol/l)	143 – 151	121.9 ↓
K⁺ (mmol/l)	3.5 – 5.1	7.96 ↑
Na⁺: K⁺	27 – 40	15.3 ↓

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Ramsey, I.K., Herrtage, M.E. Adrenal gland diseases. BSAVA Manual of Small Animal Clinical Pathology (3rd edition). 2015, Ed Villers E.J., Ristic J.A BSAVA publications, Gloucester. ISBN 978–1–905319–63–3.
2. Nielsen, L. a kol. Low ratios of sodium and potassium in the serum of 238 dogs. The veterinary Record. 2008; 162 (14): 431–435.
3. Kozák, M. a kol. Choroby psov a mačiek, II. diel. 2008. Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, Košice. ISBN 978–80–8077–105–8.
4. Church, D.B. Canine hypoadrenocorticism. BSAVA Manual of Canine and Feline Endocrinology (3rd edition). 2004, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester. ISBN 0–905214–72–2.
5. Galac, S., Reusch, C.E., Kooistra, H.A., Rijnberk, A. Clinical endocrinology of dogs and cats. An illustrated text (2nd edition). 2010, Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hannover. ISBN 978–3–89993–058–0.

SPRÁVANIE KLIEŠŤOV V ELEKTROMAGNETICKOM POLI

Blažena Vargová¹, Michal Kosterec², Igor Majláth³, Juraj Kurimský², Roman Cimbala²,
Viktória Majláthová¹

¹Parazitologický ústav SAV, Slovenská akadémia vied, Hlinkova 3, 04001 Košice

²Technická univerzita v Košiciach, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Katedra elektroenergetiky, Mäsiarska 74, 04001 Košice

³Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Šrobárova 2, 04001 Košice

ABSTRAKT

Výskumy kliešťov v oblasti fyziky boli v minulosti zamerané prevažne na základné faktory ovplyvňujúce život kliešťov. Základné faktory predstavovali napr.: teplotu, vlhkosť, vplyv svetla. Rôzne fyzikálne faktory ovplyvňujú orientačno-pátracie i apetenčné správanie. Neskôr boli kliešte testované pod vplyvom elektromagnetického žiarenia, avšak tieto testy sa zameriavali najmä na ich vývin a mortalitu, pretože hlavnou myšlienkou bolo ovplyvniť distribúciu a početnosť kliešťov v prirodzenom prostredí. Doposiaľ nie sú známe žiadne behaviorálne testy pod vplyvom elektromagnetického poľa, ktoré by priniesli informácie a lepšie poznatky o ich správaní. Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv Elektromagnetického poľa (EMP) s frekvenciou 900MHz a výkonom 5,02 dBm na odpoveď a správanie kliešťov *Dermacentor reticulatus*.

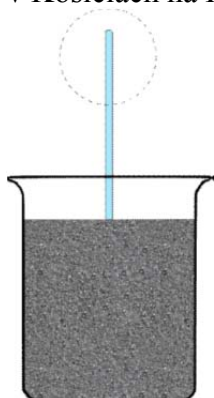
ÚVOD

Celkový vplyv EMP na živé organizmy je nejasný a stále študovaný. Celý ekosystém na Zemi je pod vplyvom prirodzeného EMP, ktorého zdroje sú: slnečné žiarenie, kozmické žiarenie, elektromagnetické pole Zeme (Brizhik, 2011). Počas posledného storočia došlo vplyvom ľudskej činnosti k nárastu hodnôt umelého EMP (Adey, 1993). Účinky EMP boli študované na množstve modelových organizmov od buniek cez rastliny až po hmyz a zvieratá (Cucurachi a kol., 2013). Iba niekoľko štúdií sa zaoberalo vplyvom EMP na kliešte, zamerané boli prevažne na vývoj kliešťov (Korotkov a kol., 1996, Korotkov a kol., 1999). Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv EMP s frekvenciou 900MHz, ktorú emitujú mobilné telefóny, na správanie kliešťov *Dermacentor reticulatus*. Kliešte sú obligátne krv cicajúce organizmy, sú významnými ektoparazitmi domácich aj voľne žijúcich zvierat. Kliešte z čeľade Ixodidae sú významné vektory pôvodcov vírusových, bakteriálnych aj niektorých parazitárnych pôvodcov ochorení. Výskum kliešťov bol doteraz zameraný prevažne na štúdium ekológie, hostiteľov, na prítomnosť patogénov, spôsobujúcich ochorenia ľudí a zvierat. Správanie kliešťov je preštudované len obmedzene, študovaný bol napr. vplyv základných fyzikálnych faktorov (teplota, vlhkosť), avšak efekt ostatných fyzikálnych faktorov ako napr. EMP doposiaľ študovaný nebol. Interdisciplinárnym prístupom v tejto problematike môžeme priniesť nové poznatky o správaní kliešťov pri výbere hostiteľov, resp. pri nových metódach repeleťného účinku založeného na fyzikálnych vlastnostiach niektorých látok. Štúdovanie magnetických, elektrických a elektromagnetických polí v súvislosti s kliešťami má veľkú perspektívu pri odhaľovaní nových poznatkov v tejto oblasti.

MATERIÁL A METÓDIKA

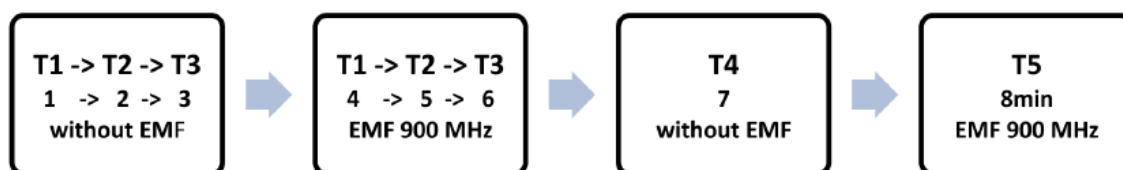
Modelovým organizmom boli kliešte *Dermacentor reticulatus*, ktoré boli zbierané metódou vlnkovania v mesiacoch marec - apríl 2017 v oblasti Jablonov (48°36'19, 45"N; 20°45'00, 44"E). Pre experiment bolo použitých 100 kliešťov, 50 samíc a 50 samcov. Kliešte boli testované individuálne v originálne vytvorenej testovacej aréne, ktorá pozostávala zo sklenenej nádoby naplnenej pieskom, v ktorej bola umiestnená sklenená tyčinka (20 cm), na ktorú boli umiestňované kliešte. Piesok bol pred každým experimentom vlhčený, aby bol zachovaný vlhkosťný gradient od 75 % pri povrchu piesku až 40 % na vrchole sklenenej

tyčinky (Obr. 1). Vlhkosť bola meraná multimetrom LabQuest. Po každom experimente bola tyčinka ošetrená 70 % etanolom pre zrušenie feromónových stôp pre čo najmenšie ovplyvnenie správania kliešťov. Experimenty boli realizované na Technickej univerzite v Košiciach na Katedra elektroenergetiky, v špeciálne elektromagneticky odtienenej komore.



Obr. 4 Testovacia aréna pozostávajúca so sklenenej nádoby s pieskom a sklenenou tyčinkou pre testovanie správania kliešťov *Dermacentor reticulatus* počas expozície EMP.

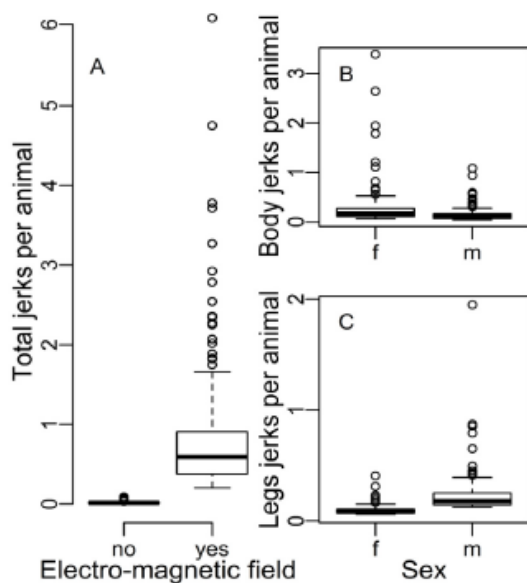
Samotný experiment mal 4 periódy (8 min), počas ktorých boli kliešte pozorované a taktiež bol vytvorený individuálny videozáznam, z ktorého bolo vyhodnocované správanie kliešťov. Prvá fáza bola aklimatizačná, trvala 3 minúty bez EMP, druhá fáza trvala 3 min. avšak s vplyvom 900 MHz, 5,02 dBm EMP. Ďalšie dve fázy boli redukované na 1 minútu a rovnako bez EMP a s vplyvom EMP s rovnakou frekvenciou a výkonom (Obr. 2). Celý experiment prebiehal bez prítomnosti ľudí v uzatvorenej komore, aby nedošlo k skresleniu výsledkov.



Obr. 5 Schematické znázornenie 4 periód experimentu. T1 – T3 predstavuje 3 minútovú aklimatizačnú fázu bez EMP, T1 – T3 predstavuje 3 minútovú expozíciu 900MHz EMP, T4 fáza bez EMP 1 minúta, T5 1 minútová fáza expozície EMP.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky boli prekvapujúce, zistili sme prítomnosť, pravdepodobne abnormálnych pohybov – trnutí celým telom a trnutia predným párom nôh, na ktorých sa nachádza Hallerov orgán, počas expozície EMP. Nevieme však s úplnou presnosťou povedať, či sa jedná o abnormálny pohyb – trnutie v dôsledku vplyvu EMP, alebo je to prirodzená reakcia kliešťov na nejaký stimulujúci podnet, pretože detailné pohyby a správanie kliešťov doposiaľ neboli popísané. Boli použité tri rôzne štatistické modely pre zistenie vplyvu EMP na kliešte *Dermacentor reticulatus*. Prvý model analyzoval, či kliešte vystavené EMP reagovali trnutím častejšie než bez EMP, druhý a tretí model analyzoval adaptáciu kliešťov na EMP a rozdielne správanie - trnutie v pohlaví a rozdielnosť medzi trnutím nohami a celým telom. Prvý model signifikantne preukázal výrazne častejšie trnutia počas expozície EMP. Boli preukázané početnejšie trnutia celým telom u samíc ako u samcov avšak, početnejšie trnutia prvým párom nôh u samcov ako u samíc. Taktiež sme zistili adaptáciu na EMP, čo sa preukázalo znížením počtom trnutia tela a končatín v poslednej minúte testu s EMP. Ako prví sme zistili, že kliešte *Dermacentor reticulatus* sú senzitívne na EMP a dochádza u nich k neobvyčajnej behaviorálnej reakcii, čo poukazuje na nový fenomén s možnými ekologickými dôsledkami.



Graf 1 A. Odpoveď kliešťov trhnutím počas expozície EMP a bez, B. Porovnanie trhnutia celým telom u samíc a samcov, C. porovnanie trhnutia predného páru nôh medzi pohlaviami.

Práca bola podporená Práca bola podporená projektom No. 26220120055 Ministerstvom školstva a agentúry pre štrukturálne fondy a VEGA 1/0417/14.

POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Adey W R. Biological effects of electromagnetic fields. J. Cell. Biochem. 1993; 51: 410–416.
2. Brizhik L. On the role and impact of electromagnetic fields in ecosystems. Int. J. Des. Nat. Ecodynamics 2011; 6: 272–281.
3. Cucurachi S a kol. A review of the ecological effects of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF). Environ. Int. 2013; 51: 116–140.
4. Korotkov I S a kol. The reaction of the tick *Hyalomma asiaticum* (Acarina, Ixodidae) to 1- to 4-GHz microwaves. Med. Parazitol. (Mosk.) 1996; 28–31.
5. Korotkov I, La B, Ms B a Vlu P. The impact of electromagnetic radiation at microwave frequency (9.8 HhZ) on the embryonic and postembryonic development of the tick *Hyalomma asiaticum* (Acarina, Ixodidae). Med. Parazitol. (Mosk.) 1999; 38–42.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2017

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XII. ročník

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, DrSc.

Rok vydania: 2017

Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

ISBN 978-80-971428-5-8