

CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2018

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

XIII. ročník

Košice, 4. a 5. september 2018

**Zborník príspevkov prezentovaných na Seminári doktorandov venovanom
pamiatke akademika Bod'u 4. a 5. septembra 2018 v Košiciach**

Usporiadali:

Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, východoslovenská
pobočka

Zostavila:

Ing. Ľudmila Hamarová, PhD.

Recenzovali:

Doc. MVDr. Katarína Beňová, PhD.
MVDr. Monika Drážovská, PhD.

Organizačný a programový výbor:

MVDr. Dušan Fabian, DrSc.
Prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD.

Neprešlo jazykovou úpravou

ISBN 978-80-972752-3-5

Obsah

| | |
|--|----|
| OSCILUJÚCE ELEKTRICKÉ POLE POTLÁČA PREJAVY ZÁPALOVEJ REAKCIE A PODPORUJE REGENERÁCIU AXÓNOV PO POŠKODENÍ MIECHY | |
| Bačová M., Bimbová K., Lukáčová N., Gálik J. | 5 |
| VPLYV SKRMOVANIA FERMENTOVANÉHO KRMIVA NA KVALITU MÄSA BROJLEROV | |
| Bartkovský M., Marcinčák S., Mačanga J., Roba P. | 8 |
| LIEČBA ATORVASTATÍNOM PO KOMPRESII MIECHY POTLÁČA ZÁPALOVÚ ODPOVEĎ, APOPTÓZU A PODPORUJE AXONÁLNE PRERASTANIE OKOLO MIESTA POŠKODENIA | |
| Bimbová K., Bačová M., Kisucká A., Stropkovská A., Lukáčová N. | 11 |
| VARIABILITA PRODUKCIE BIOFILMU U KOAGULÁZA- NEGATÍVNYCH STAFYLOKOKOV Z RÔZNYCH ZVIERAT | |
| Bino E. | 14 |
| ANALÝZA NEKÓDUJÚCEJ RNA U CHRONICKY DIALYZOVANÝCH PACIENTOV | |
| Biščáková Z., Rabajdová M., Špaková I., Rosenberger J., Mareková M. | 17 |
| ŠTÚDIUM IMUNOGÉNNÝCH PROTEÍNOV <i>RICKETTSIA AKARI</i> POMOCOU PROTEOMICKÝCH METÓD | |
| Csicsay F., Flores-Ramirez G., Danchenko M., Quevedo-Diaz M. | 20 |
| EXTRAKTY Z HÚB AKO INHIBÍTORE BIOFILMU | |
| Čuvalová A., Handrová, L., Kmeť V., Strapáč, I. | 23 |
| IDENTIFIKÁCIA ZÁSTUPCOV RODU <i>PENICILLIUM</i> ZO SLEPAČÍCH VAJEK | |
| Demjanová S., Jevinová P., Pipová M., Regecová I. | 26 |
| FLAVONOLIGNAN SILYBÍN A/B V ADJUVANTNEJ LIEČBE ALBENDAZOLOM PRI TERAPII MYŠÍ NA MODELOVEJ INFEKCII PARAZITOM <i>MESOCESTOIDES VOGAE</i> | |
| Faixová D., Hrkčková G., Mačák Kubašková T., Mudroňová D., Biedermann D. | 29 |
| NOVÁ METÓDA NA KVANTIFIKÁCIU ZACHOVANÉHO TKANIVA PO TRAUME MIECHY S OPTIMÁLNOU REPRODUKCIOU | |
| Fedorova J., Pavel J. | 32 |
| DETEKCIA GLAUKÓMU ZO SLZNEJ TEKUTINY | |
| Glinská G., Krajčíková K., Tomečková V. | 35 |
| POHĽAD NA <i>ESCHERICHIA COLI</i> Z HĽADISKA VIRULENCIE, REZISTENCIE A TVORBY BIOFILMU | |
| Handrová L., Kmeť V. | 38 |
| VPLYV DVOCH ZDROJOV ZINKU A VLÁKNINY NA MINERÁLNY A ANTIOXIDAČNÝ STATUS PRASIAK | |
| Holodová M. | 41 |
| VPLYV SKORÉHO VZDIALENÉHO KONDICIONOVANIA NA CIRKULUJÚCU KRV | |
| Jachová J., Gottlieb M., Némethová M., Mačákova L., Bonová P. | 44 |
| PRVOTNÝ SCREENING REZÍDUIÍ ANTIMIKROBIÁLNYCH LÁTOK V TKANIVÁCH HYDINY PO EXPERIMENTÁLNEJ ÚPRAVE KRMIVA POUŽITÍM MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV | |
| Juščáková D., Marcinčák S., Kožárová, I. | 47 |
| ŠTÚDIUM SLZNEJ TEKUTINY PACIENTOV S PSYCHICKÝMI PORUCHAMI | |
| Krajčíková K., Mašlanková J., Glinská, G., Semančíková, E., Tomečková V. | 50 |
| KAZUISTIKA: ALTERNATÍVNA TERAPIA ALERGIE U PSA | |
| Micháľová A., Fialkovičová M., Minguell F., Rigau T., Takáčová M. | 53 |

| | |
|---|----|
| NEUROGÉNNY POTENCIÁL PROGENITOROV SÍDLIACICH VO VÝSTELKE CENTRÁLNEHO KANÁLA MIECHY POTKANA V RÔZNYCH POSTNATÁLNYCH ŠTÁDIÁCH ONTOGENÉZY | |
| Mochňacký F., Slovinská L., Alexovič Matiašová A., Daxnerová Z., Ševc J..... | 56 |
| VPLYV NUTRACEUTÍK NA BACHOROVÚ A ČREVNÚ FERMENTÁCIU, HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE A PARAZITOLOGICKÝ STATUS JAHNIAT OVPLYVNENÝCH ENDOPARAZITÓZOU..... | |
| Mravčáková D., Várady M., Váradyová Z | 59 |
| MIKROFLÓRA ASOCIOVANÁ S JASKYNNÝMI ŽIVOČÍCHMI RADOV PALPIGRADI A COLLEMBOLA | |
| Onderková A., Parimuchová A., Kováč L. , Pristaš P..... | 62 |
| POROVNANIE DYNAMIKY POSTMORTÁLNYCH PROCESOV V PRSNEJ A STEHENNEJ SVALOVINE BROJLEROVÝCH KURČIAT | |
| Petříková D., Koréneková B., Marcinčák S. Kožárová I..... | 65 |
| ELIMINÁCIA MŔTVYCH BUNIEK V MYŠACÍCH BLASTOCYSTÁCH PRODUKOVANÝCH <i>IN VIVO</i> A <i>IN VITRO</i> | |
| Pisko J. | 68 |
| PREVALENCIA ENDOPARAZITOV U DIVIAČEJ ZVERI V ZVERNÍKU BIEN..... | |
| Selecká E. | 71 |
| OBSAH Ω -3 a Ω -6 MASTNÝCH KYSELÍN PRI CHRONICKÝCH OCHORENIACH | |
| Široká M, Hertelyová Z, Tomečková V. | 73 |
| MOLEKULOVÉ MECHANIZMY ANTIPROLIFERATÍVNEHO ÚČINKU CHALKÓNOV NA LEUKEMICKEJ BUNKOVEJ LÍNII..... | |
| Takáč P. | 76 |
| VÝSKYT ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE U BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z HALDY | |
| Tímková I., Pevná V., Pristaš P., Sedláková-Kaduková J..... | 79 |

OSCILUJÚCE ELEKTRICKÉ POLE POTLÁČA PREJAVY ZÁPALOVEJ REAKCIE A PODPORUJE REGENERÁCIU AXÓNOV PO POŠKODENÍ MIECHY

Bačová M., Bimbová K., Lukáčová N., Gálik J.

Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice

ABSTRAKT

Vylepšenie neurologického stavu pacientov po traume miechy je prioritou mnohých výskumných tímov vo svete. Jednou z potenciálnych liečebných stratégií súčasnosti je aj aplikácia slabého elektrického poľa cez miesto lézie s cieľom podporiť regeneráciu poškodených nervových vlákien. V našich experimentoch sme ihneď po poškodení miechy potkana implantovali miniatúrny stimulátor s oscilujúcim elektrickým poľom (OFS stimulátor, 50 μ A) a sledovali jeho vplyv na regeneráciu poškodeného tkaniva a reguláciu astrogliózy. Na základe histologických a imunohistochemických analýz sme konštatovali zvýšené percento zachovaného tkaniva v skupine zvierat s OFS stimulátorom v porovnaní so zvieratami, ktoré boli po poškodení miechy bez stimulácie. Podobne ovplyvnila stimulácia aj počet neurofilamentov v okolí miesta poškodenia, u zvierat bez stimulácie sme pozorovali signifikantne nižší počet zachovaných nervových vlákien. Stimulácia mala tiež vplyv na redukciu astrogliózy; v skupine zvierat so stimulátorom sme detegovali výrazne nižší počet a denzitu aktivovaných astrocytov v porovnaní so skupinou zvierat bez stimulátora.

Výsledky našich experimentov dokazujú protektívny účinok epidurálnej OFS stimulácie po akútnej traume miechy.

ÚVOD

Traumatické poškodenie miechy má devastujúce účinky na zdravie a život postihnutého. V súčasnosti je jednou z mála akceptovaných možností liečby včasné podanie vysokej dávky steroidov v snahe zabrániť degenerácii tkaniva v dôsledku akútneho zápalového procesu prebiehajúceho v mieste poranenia. Avšak, hlavným limitujúcim faktorom funkčnej regenerácie je neschopnosť poškodených axónov znovu obnoviť svoje prepojenia cez miesto poškodenia. Ak nedôjde k rýchlej reinervácii axonálneho spojenia, toto sa natrvalo preruší a dochádza k intenzívnej degenerácii buniek a okolitého tkaniva. Navyše, prebiehajúci zápalový proces sa spoločne s hypertrofiou astrocytov podieľa na vytváraní gliovej jazvy, ktorá predstavuje mechanickú bariéru pre novo prerastajúce nervové vlákna. Jednou z metód ako umožniť prerastanie a správne nasmerovanie poškodených nervových vlákien je aj aplikácia elektrického poľa cez miesto poškodenia. Borgens a kol. (1987) ukázali, že axóny regenerujú a rastú preferenčne smerom ku katóde (záporný pól), zatiaľ čo nervové vlákna v oblasti anódy sú od anódy odtláčané. V experimentoch kde bola katóda umiestnená rostrálne od miesta poškodenia miechy bola pozorovaná regenerácia v senzorickej oblasti (Borgens a kol., 1990). Pri umiestnení katódy kaudálne od poškodenia miechy, boli obnovené preferenčne motorické funkcie (Fehlings, Tator, 1992). Aby regenerovali obe, ascendentné aj descendentné nervové dráhy súčasne, bola vyvinutá technika stimulácie oscilujúcim elektrickým poľom (OFS stimulácia), pri ktorej dochádza k periodickej zmene polarita elektrického poľa každých 15 minút. Takýto časový interval predstavuje dostatočný čas na regeneráciu axónov na strane katódy, a zároveň čas počas ktorého nedochádza k potláčaniu nervových vlákien na strane anódy. Experimenty s OSF stimuláciou ukázali, že oscilujúce elektrické pole v mieste poškodenej miechy napomáha nielen prerastaniu axónov ale dochádza taktiež k usmerneniu prerastania týchto vlákien. OSF stimulátor bol následne úspešne testovaný na psoch s akútnym poškodením miechy (Borgens a kol., 1999) a povolený bol aj klinický experiment (Shapiro a kol., 2005).

Cieľom našich experimentov bolo testovanie OFS stimulátora vyvinutého na našom pracovisku, štúdium jeho vplyvu na regeneráciu poškodenej miechy a možnosti jeho využitia v rámci kombinovanej terapie v budúcnosti. V experimentoch sme využili histologické, imunohistochemické a behaviorálne analýzy s cieľom preukázať, že takto implantovaný stimulátor je bezpečný, stabilný a vhodný do experimentov takéhoto charakteru.

MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch sme pracovali s dospelými laboratórnymi potkanmi kmeňa Wistar. V priebehu experimentov bola potkanom vykonaná laminektómia a následná kompresia miechy v oblasti Th9 miechového segmentu 40g závažím po dobu 15 minút. Pre aplikáciu elektrickej stimulácie cez poškodené miesto bol využitý miniatúrny elektrický stimulátor (50 μ A) s oscilujúcim elektrickým poľom vyvinutý na našom pracovisku. Polarita elektrického poľa daného stimulátora sa mení každých 15 minút po dobu 6 týždňov. Pred začiatkom experimentov bol stimulátor zaliaty do biokompatibilného silikónového materiálu (Duosil Express, SHERA), aby sa zabezpečila ochrana elektrických obvodov. Po poškodení miechy boli dve Pt/Ir elektródy stimulátora implantované do epidurálneho priestoru, a to dva segmenty kraniálne a kaudálne od miesta poškodenia miechy (Th9). Stimulátor bol následne umiestnený a zafixovaný pod kožu na chrbte zvieratá. Zvieratá boli rozdelené do 3 skupín: intaktné zvieratá s implantovaným stimulátorom, tzv. kontrolná skupina (SCI, n=6); zvieratá s kompresiou miechy (n=8); zvieratá s poškodením miechy a implantovaným stimulátorom (OFS+SCI, n=8). Počas 28 dňového prežívania, bol funkčný stav zvierat monitorovaný prostredníctvom behaviorálneho testovania (BBB skóre). Na konci experimentov boli zvieratá v hlbokjej anestéze (tiopental, 50mg/kg) transkardiálne prepláchnuté fyziologickým roztokom (300nl) a 4% paraformaldehydom (300ml). Izolované tkanivo miechy bolo postfixované 24 hodín v 4% paraformaldehyde a následne preložené do 30% sacharózy za účelom kryoprotekcie. Jednotlivé segmenty miechy (Th7-Th11) boli nakrájané na kryostate (Leica CM1850) na priečne 25 μ m rezy, ktoré boli využité na histologickú (LuxolFastBlue/CresylViolet) a imunohistochemickú analýzu. V rámci imunohistochemickej analýzy boli priečne rezy miechy inkubované s protilátkami na detekciu neurofilamentov (NF) a astrocytov (GFAP).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas 28 dňového prežívania sme v skupine experimentálnych zvierat s poškodenou miechou (SCI) pozorovali oneskorený nástup mikcie a výrazne vyššiu stratu hmotnosti v porovnaní so zvieratami ktorým bol po traume miechy implantovaný stimulátor(OFS+SCI). Navyše, zvieratá s implantovaným stimulátorom vykazovali počas celého prežívania vyššiu lokomočnú aktivitu zadných končatín v porovnaní so zvieratami, ktorým po traume miechy stimulátor implantovaný nebol. Histologická analýza preukázala, že kompresné poškodenie miechy viedlo k masívnemu úbytku bielej hmoty a k výraznej tvorbe drobných kavít v oblasti bielej a sivej hmoty. Celková plocha zachovaného tkaniva miechy bola signifikantne väčšia v rámci OFS+SCI skupiny, a to predovšetkým v kaudálnych (Th10, Th11) segmentoch (Th10: 90,8 \pm 1,94%; Th11: 97,62 \pm 0,9%) v porovnaní s SCI skupinou (Th10: 71,37 \pm 8,73%; Th11: 91,65 \pm 3,62%).

Imunohistochemická analýza vzoriek bola zameraná predovšetkým na detekciu neurofilamentov a astrocytov v okolí miesta poškodenia. Neurofilamenty boli analyzované s cieľom detegovať a kvantifikovať axóny v špecifických regiónoch miechy. Výrazný pokles v počte axónov v porovnaní s kontrolnou skupinou bol detegovaný u oboch experimentálnych skupín zvierat. Avšak, OFS stimulácia významne zvýšila počet axónov v porovnaní s SCI skupinou. Najvýraznejšie rozdiely boli pozorované v rámci liečenej a neliečenej skupiny v

dorzálnych ($p < 0,001$) a laterálnych ($p < 0,001$) stĺpcoch miechy a to predovšetkým v kaudálnych (Th11) miechových segmentov.

Pri analýze gliových buniek sme v skupine SCI zvierat pozorovali značné množstvo aktivovaných astrocytov, ktoré sú charakteristické svojím veľkým jadrom a krátkymi výbežkami. Prítomnosť takýchto foriem astrocytov je typickým sprievodným znakom prebiehajúcej zápalovej reakcie. Kvantitatívna analýza fluorescenčne značených astrocytov ukázala signifikantne nižší počet aktivovaných astrocytov v OFS+SCI skupine v porovnaní s SCI skupinou, čo podporuje našu hypotézu o protizápalovom účinku elektrického gradientu v mieste poškodenia. Denzitometrická analýza astrocytov ukázala nižší podiel aktivovaných astrocytov a nižšiu úroveň astrogliózy pri aplikácii slabej elektrickej stimulácie. Imunoreaktivita GFAP proteínu (hlavný marker astrocytov) bola markantne znížená ($p < 0,001$) v dorzálnych aj laterálnych miechových stĺpcoch v skupine zvierat s implantovaným OFS stimulátorom v porovnaní s nestimulovanými zvieratami. Navyše, u zvierat so stimulátorom nebol pozorovaný signifikantný rozdiel v denzite, či v morfológii astrocytov v porovnaní s intaktnou kontrolou.

Práca bola podporená grantom APVV- 15-0766; ITMS 26220220202 a ITMS 2014+: 313011D103.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Borgens R, Blight A, McGinnis M. Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pigs. *Science*. 1987; 238: 366-369.
- Borgens R, Blight A, McGinnis M. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: the effects of applied fields. *J Comp Neurol*. 1990; 296: 634-653.
- Borgens R, Toombs J, Breur G. a kol. An imposed oscillating electrical field improves the recovery of function in neurologically complete paraplegic dogs. *J. Neurotrauma*. 1999; 16: 639-657.
- Fehlings M, Tator CH. The effect of direct current field polarity on recovery after acute experimental spinal cord injury. 1992; *Brain. Res.* 579: 32-42.
- Shapiro S, Borgens R, Pascuzzi R. a kol. Oscillating stimulation for complete spinal cord injury in humans: a phase 1 trial. *J Neurosurg Spine*. 2005; 2:3-10.

VPLYV SKRMOVANIA FERMENTOVANÉHO KRMIVA NA KVALITU MÄSA BROJLEROV

Bartkovský M., Marcinčák S., Mačanga J., Roba P.

Ústav Hygieny a technológie mäsa/Katedra hygieny a technológie potravín

ABSTRAKT

Zloženie mastných kyselín tuku mäsa monogastrických zvierat je významne ovplyvnené zložením mastných kyselín v krmive. Využívanie fermentovaných obilnín obohatených o polynenasýtené mastné kyseliny v komerčných krmivách je preto sľubným spôsobom zvýšenia obsahu týchto esenciálnych mastných kyselín u živočíchoch. Cieľom tejto práce bolo analyzovať účinok pridania 10 % (hmotn.) fermentovaných obilnín (fermentované krmivo) do komerčného krmiva pre brojlerov a ich vplyv na profil mastných kyselín, chemické zloženie a stabilitu tuku prsnej svaloviny. Fermentované krmivo bolo pripravené v procese Solid-state fermentácie a bolo obohatené o kyselinu gama-linolénovú (3,2 mg/kg). Aplikácia fermentovaného krmiva do komerčnej krmnej zmesi zvýšila množstvo gama-linolénovej kyseliny ($0,263 \pm 0,007$ %), alfa-linolénovej kyseliny a kyseliny olejovej v tuku prsnej svaloviny a taktiež bol ovplyvnený pomer n-6/n-3 mastných kyselín. Oxidačné poškodenie tuku počas skladovania (4°C , 7 dní) bolo v experimentálnej skupine výrazne nižšie a mäso pokusnej skupiny vykazovalo vyššiu oxidačnú stabilitu v porovnaní s kontrolou.

ÚVOD

Mäso a mäsové výrobky sú považované za hlavný zdroj tuku v strave, najmä ako zdroj nasýtených mastných kyselín, ktoré sú spájané práve s chorobami moderného života. Preto bol v posledných rokoch zaznamenaný zvýšený záujem o metódy manipulácie zloženia mastných kyselín (MK) v tuku mäsa produkovaných zvierat, hlavne o zvýšenie podielu polynenasýtených mastných kyselín (PNMK) a naopak o zníženie podielu nasýtených mastných kyselín, ako aj vylepšenie pomeru n-3/n-6 PNMK. Mikrobiálne oleje bohaté na rôzne druhy biologicky aktívnych PNMK predstavujú ľahko dostupnú alternatívu najmä rybích olejov, ktorých produkcia je v súčasnosti regulovaná z hľadiska udržateľného rybného hospodárstva. Ich produkcia v procese klasických submerzných fermentácií však vyžaduje niektoré podmienky, ktoré sú nevýhodou najmä z ekonomického hľadiska. Z výživársko-krmovinárskeho hľadiska je preto zaujímavá produkcia PNMK založená na procese polosuchých kultivácií nižších vláknitých húb. Atraktivnosť takýchto kultivácií spočíva vo využívaní ľahko dostupných substrátov na báze odpadových produktov z poľnohospodárskej a potravinárskej výroby. Okrem produkcie PNMK ako sú napr. kyselina gama-linolénová (GLA), dihomogama-linolénová (DGLA), arachidónová (ARA), prítomné nižšie vláknité huby (napr. rody *Cunninghamella*, *Mortierella*, *Thamnidium*) svojou fermentačnou činnosťou eliminujú činnosť antinutričných látok (Čertík, 2013). Vzhľadom na fakt, že tieto mastné kyseliny môžu byť ľahšie degradovateľné v procese oxidácie (kvôli zvýšenému počtu násobných väzieb) je nevyhnutné tento materiál prispôbiť požiadavke vyššej stability. Výbornými prírodnými antioxidantmi sú karotenoidné pigmenty ako napr. beta-karotén, zeaxantín, astaxantín, atď. V predchádzajúcich experimentoch bolo potvrdené, že niektoré druhy nižších vláknitých húb majú okrem schopnosti produkovať PNMK aj karotenoidné pigmenty (Klempová a kol., 2013). Z týchto kmeňov bol vybraný kmeň *Umbelopsis isabellina* CCF2412. Daný kmeň vykazoval vysokú mieru požadovaných produktov (GLA a beta-karotén) aj v podmienkach polosuchých fermentácií (SSF).

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 80 ks jednoduchových brojlerových kurčiat hybrida ROSS 308 rozdelených do dvoch skupín po 40 ks. Kontrolná skupina (K) bola kŕmená komerčnými kŕmnymi zmesami (KKZ) Br1, Br2, Br3 a Br4. V pokusnej skupine (BP - bioprodukt) bolo kurčatám od 10. dňa výkrmu pridávané ku KKZ fermentované krmivo, vyprodukované fermentáciou nižšej vláknitej huby *Umbelopsis isabellina* CCF2412 na pšeničných otrubách, v dávke 10 %. BP obsahoval v priemere 3,0 g/kg GLA a 3,2 mg/kg beta-karoténu. O pridané množstvo BP bola znížená dávka komerčnej kŕmnej zmesi. Počas výkrmu (38 dní) mali kurčatá prístup ku krmivu a k vode *ad libitum*. Na 39. deň boli kurčatá po omračení usmrtené, vykŕvené a jatočne opracované. Následne boli odobraté vzorky prsnej svaloviny. Vzorky boli zabalené do polyetylénových obalov a skladované v chladničke pri 4 °C počas 7 dní. Pre zistenie stability PNMK počas tepelného opracovania, boli vzorky svaloviny tepelne opracované (100 °C, 20 min). Stanovenie mastných kyselín bolo vykonané podľa Čertík a kol. (2008). Antioxidačná aktivita bola stanovená metódou vychytávania DPPH radikálu podľa Brand-Williams (1995). Oxidácia tukov prsnej svaloviny bola stanovená pomocou metódy tiobarbiturového čísla (TBA) podľa Marcinčák a kol. (2004).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V pripravenom fermentovanom bioprodukte, ako aj v zmesi 10 % BP a KKZ boli detegované všetky požadované bioaktívne látky (GLA, beta-karotén). GLA i beta-karotén boli prítomné aj v ďalších komerčných zmesiach (BR2, BR3) s prídavkom bioproduktu, čím bol zabezpečený ich príjem počas celého obdobia trvania experimentu. V rámci experimentu boli vykonané aj analýzy mäsa zamerané na obsah mastných kyselín (najmä PNMK). Taktiež sme sledovali vplyv tepelného opracovania (varenie, 100 °C, 20 min) na profil mastných kyselín tukov mäsa.

Tab. 1 Profil mastných kyselín, ich pomer a podiel pred a po tepelnom opracovaní prsnej svaloviny

| Mastné kyseliny (%) | Prsia | | Prsia - tepelne opracované | |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | K | PS | K | PS |
| C16:0, PA | 22,32 ± 0,19 | 22,58 ± 0,34 | 23,11 ± 0,26 | 23,44 ± 0,37 |
| C18:0, SA | 10,16 ± 0,12 | 9,77 ± 0,15 | 9,13 ± 0,13 | 9,03 ± 0,16 |
| C18:1-9c, OA | 33,55 ± 0,32 | 35,76 ± 0,42 ^b | 36,77 ± 0,95 ^a | 32,95 ± 0,98 ^b |
| C18:1-11c, VA | 3,89 ± 0,58 | 3,11 ± 0,036 | 3,28 ± 0,13 ^a | 4,19 ± 0,20 ^b |
| C18:2, LA | 17,03 ± 0,19 ^a | 18,32 ± 0,15 ^b | 15,51 ± 0,31 | 16,40 ± 0,58 |
| C18:3, GLA | 0,129 ± 0,006 ^a | 0,263 ± 0,007 ^b | 0,163 ± 0,003 ^a | 0,287 ± 0,007 ^b |
| C18:3, ALA | 0,970 ± 0,19 | 1,12 ± 0,032 | 0,921 ± 0,041 | 0,945 ± 0,037 |
| C20:3, DGLA | 0,885 ± 0,291 | 0,584 ± 0,125 | 0,766 ± 0,090 ^a | 1,009 ± 0,070 ^b |
| C20:4, ARA | 2,59 ± 0,05 ^a | 1,87 ± 0,59 ^b | 2,54 ± 0,34 ^a | 3,24 ± 0,24 ^b |
| C20:5, EPA | 0,354 ± 0,142 ^a | 0,203 ± 0,013 ^b | 0,309 ± 0,041 | 0,313 ± 0,067 |
| C22:5, DPA | 0,020 ± 0,011 | 0,021 ± 0,008 | 0,029 ± 0,019 | 0,032 ± 0,01 |
| C22:6, DHA | 0,367 ± 0,018 | 0,343 ± 0,009 | 0,482 ± 0,065 ^a | 0,667 ± 0,045 ^b |
| ΣNaMK | 33,50 ± 0,15 | 33,02 ± 0,51 | 32,84 ± 0,23 | 33,17 ± 0,57 |
| ΣNeMK | 66,50 ± 1,08 | 66,98 ± 0,22 | 67,16 ± 0,22 | 66,83 ± 0,22 |
| ΣPNMK n-3 | 1,81 ± 0,08 | 1,76 ± 0,18 | 1,82 ± 0,17 | 2,07 ± 0,09 |
| ΣPNMK n-6 | 20,63 ± 2,32 | 20,94 ± 0,65 | 18,98 ± 0,78 | 20,84 ± 0,85 |
| Pomer n-6/n-3 | 11,40 ± 0,55 | 11,87 ± 0,07 | 10,46 ± 0,20 ^a | 10,07 ± 0,09 ^b |

K – kontrolná skupina, PS – pokusná skupina; NaMK – nasýtené mastné kyseliny, NeMK – nenásytené mastné kyseliny, PNMK – polynenasýtené mastné kyseliny, ^{a,b} – štatisticky významný rozdiel v porovnaní s kontrolou platí samostatne pre prsia a pre prsia po tepelnom opracovaní, $P < 0,05$.

Skrmovanie bioproduktu nemalo vplyv na obsah cholesterolu v prsnej svalovine kurčiat. Naopak profil mastných kyselín mäsa bol ovplyvnený. V tuku prsnej svaloviny bol zaznamenaný významný nárast GLA, kyseliny alfa-linolénovej (ALA) a olejovej a navyše poklesol pomer n-6/n-3 MK. Tepelné opracovanie nespôsobilo pokles GLA, ALA avšak obsah ARA bol výrazne nižší o oboch skupín.

Tab. 3 Rozkladné zmeny tukov vyjadrené ako množstvo malóndialdehydu ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) počas chladiarenského skladovania

| Prsia | 1. deň | 4. deň | 7. deň |
|----------|-----------|-----------|------------------------|
| Kontrola | 0,14±0,03 | 0,17±0,01 | 0,64±0,20 ^a |
| GLA | 0,17±0,01 | 0,20±0,03 | 0,39±0,14 ^b |

^{a,b} – štatisticky významný rozdiel v porovnaní s kontrolou

Zdroj: Vlastná tabuľka

Negatívny účinok fermentovaného bioproduktu skrmovaného hydine na rozkladné zmeny tukov mäsa (vyjadreného ako množstvo malóndialdehydu) počas skladovania 7 dní v chladničke nebol zaznamenaný. Z výsledkov vyplýva, že množstvo rozkladných produktov oxidácie tukov v mäse nebolo skrmovaním fermentovaného produktu v množstve 10 % ovplyvnené a oxidačná stabilita mäsa bola porovnateľná s kontrolou.

Realizácia experimentu bola finančne podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-14-0397

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. 1995. ISSN 0023-6438.
- Čertík, M. a kol.: Biotechnology for the functional improvement of cereal-based materials enriched with polyunsaturated fatty acids and pigments. In Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2013, 115:11, 1247-1256. ISSN 1438-9312
- Čertík, M.: Biotransformation of oils to value added compounds. In: Hou C.T., Shaw J.F. (eds.): Biocatalysis and Bioenergy. John Wiley & Sons: New York, 2008, 571–585.
- Klempová, T., Basil, E., Kubátová, A., Čertík, M.: Biosynthesis of gamma-linolenic acid and beta carothene by Zygomycetes fungi, In Biotechnology Journal, 2013, 8, 794-800, ISSN 1860-7314
- Marcinčák, S., Sokol, J., Bystrický, P., Popelka, P., Turek, P., Bhide, M., Máté, D.: Determination of lipid oxidation level in broiler meat by liquid chromatography. In: J. AOAC Inter., 2004, 87: 5, 1148 – 1152.

LIEČBA ATORVASTATÍNOM PO KOMPRESII MIECHY POTLÁČA ZÁPALOVÚ ODPOVEĎ, APOPTÓZU A PODPORUJE AXONÁLNE PRERASTANIE OKOLO MIESTA POŠKODENIA

Bimbová K., Bačová M., Kisucká A., Stropkovská A., Lukáčová N.

Neurobiologický Ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice

ABSTRAKT

Apoptóza a zápalová odpoveď- dva mechanizmy sekundárneho poškodenia predstavujú bariéru, ktorá potláča regeneráciu miechy po jej poškodení. Regulácia týchto procesov v skorom štádiu po poranení by mohla byť prvým krokom pri liečbe tohto závažného ochorenia. V našej štúdii sme na potkanoch kmeňa Wistar pozorovali infiltráciu makrofágov a aktivitu kaspázy 3 po 24 hodinách po kompresii a liečbe s jednorázovou dávkou atorvastatínu (ATR; 5mg/kg; i.p.). Účinok ATR na regeneračnú kapacitu miechy sme sledovali počas 6 týždňového prežívania. Jeden deň po poškodení sme v mieste lézie a v jej okolí pozorovali výraznú infiltráciu M1 a M2 makrofágov ako aj silnú aktiváciu kaspázy 3. Šesť týždňov po poškodení sme zaznamenali úbytok neurofilamentov ako aj slabé prerastanie nových nervových vlákien v epicentre poranenia a tiež v kaudálnom a kraniálnom segmente. Aplikácia ATR znížila príliv oboch typov makrofágov a potlačila aktiváciu kaspázy 3 v poranenom tkanive, čo malo pri dlhodobom prežívaní pozitívny vplyv na zachovanie neurofilamentov a prerastanie nových axónov okolo miesta lézie. Okrem toho, skorá liečba s ATR signifikantne vylepšila motorické skóre zvierat v 30-42 dni prežívania. Výsledky našej štúdie poukazujú na protektívny efekt akútnej liečby atorvastatínom, ktorý by mohol byť v budúcnosti využitý v klinickej praxi ako aj pri kombinovanej terapii.

ÚVOD

Traumatické poškodenia centrálného nervového systému – mozgu a miechy, sú z hľadiska rekonvalescencie považované za veľmi komplexné a ťažko liečiteľné ochorenia. Po traume miechy je neurologický deficit u postihnutého jedinca spôsobený nielen samotným primárnym poškodením, ale aj kaskádou sekundárnych mechanizmov, ktoré spôsobujú šírenie poškodenia kaudálnym aj kraniálnym smerom. Takmer okamžite po mechanickom poškodení dochádza ku vzniku edému miechy a ku krvácaniu. Ako uvádza súčasná literatúra, sekundárne poškodenie je spôsobené súhrou až 25 patologických mechanizmov, medzi ktoré patrí apoptóza, zápalová reakcia ale aj ischemia, excitotoxicita, peroxidácia lipidov alebo produkcia voľných radikálov (Silva a kol., 2014). Programovaná bunková smrť- apoptóza predstavuje jeden z mechanizmov, ktorý sa spúšťa ihneď po traumatickom poškodení a je iniciovaný prílivom vápnikových iónov do bunky. Influx týchto iónov aktivuje hlavné apoptotické enzýmy- kalpaín a kaspázu. Apoptóze podliehajú najmä neuróny, oligodendrocyty a mikrogliové bunky. V oligodendrocytoch sa tento typ bunkovej smrti vyskytuje aj niekoľko týždňov po poškodení, čo v tkanive spôsobuje dlhodobú demyelinizáciu axónov (Crowe a kol., 1997). Podobne ako apoptóza, aj zápalová reakcia nastupuje okamžite po traume a podieľajú sa na nej početné bunkové populácie a nebunkové mediátory. Zahŕňa aktiváciu rezidentných buniek (mikroglia, astrocyty), príliv buniek imunitného systému z krvného obehu (makrofágy a neutrofily) ako aj výraznú nadprodukciu NADPH oxidázy (Rowland a kol., 2008). Aktivácia týchto sekundárnych mechanizmov má na nervové tkanivo v mieche negatívny účinok. Z dlhodobého hľadiska spôsobuje úbytok tkaniva a potláča prerastanie axónov v mieste poškodenia. Inhibícia týchto patologických procesov ihneď po poranení miechy by mohla v neskorších štádiách poškodenia podporiť axonálnu regeneráciu a tým aj vylepšiť motorické funkcie u poranených jedincov.

V našej práci sme na inhibíciu apoptózy a zápalovej odpovede použili liek patriaci do skupiny statínov- Atorvastatín (ATR), ktorý sa primárne využíva na liečbu vysokej hladiny

cholesterolu a aterosklerózy. Zistilo sa však, že dlhodobá aplikácia ATR má aj protizápalový a imunomodulačný efekt, inhibuje apoptotickú bunkovú smrť a demyelinizáciu axónov po traumatickom poškodení (Pannu a kol., 2005). Cieľom našej štúdie bolo potlačiť akútnu zápalovú odpoveď a apoptózu po kompresii miechy, a tým podporiť regeneráciu tkaniva a motorickú aktivitu zadných končatín v priebehu 6 týždňového prežívania experimentálnych zvierat.

MATERIÁL A METÓDY

V našich postupoch boli použité 3-mesačné samice potkanov kmeňa Wistar (n=48). Kompresia miechy na úrovni segmentu Th9 (40g/15min) bola navodená v celkovej anestéze pomocou kompresného aparátu. Experimentálne zvieratá boli rozdelené do 5 skupín: [1] kontrolné zvieratá (n=6); [2-3] Th9 kompresia s 24 hodinovým (n=12) a 6 týždňovým (n=9) prežívaním; [4-5] Th9 kompresia + ATR (5 mg/kg, i.p.) s 24 hodinovým (n=12) a 6 týždňovým (n=9) prežívaním. Na konci experimentu bola miecha experimentálnych zvierat spracovaná a použitá na imunohistochemické hodnotenie alebo na RT-PCR analýzu. Natívne tkanivo na RT-PCR bolo získané po dekapitácii potkanov. Odobraté 1cm segmenty miechy z oblasti Th7-Th10 boli uložené do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ na ďalšie spracovanie. Zo zamrazených vzoriek bola celková RNA získaná použitím Trizolu a následným čistením s propanolom a etanolom. Takto izolovaná RNA bola v termocykléri (T1000™ Thermal Cycler) pomocou High-capacity cDNA reverzného transkripčného kitu prepísaná na cDNA. Na amplifikáciu cDNA bol využitý termocyklér CFX96™ Real-Time, pričom boli použité nasledujúce primery: Gap43 (novo prerastajúce axóny); CD163 (M2 makrofágy); CD86 (M1 makrofágy); Casp3 (kaspáza 3) a Nf-h (neurofilamenty). Na získanie relatívneho množstva génovej expresie (RQ) bol použitý program Bio-Rad CFX Manager. Tkanivo, ktoré bolo využité na imunohistochemickú analýzu bolo vypreparované zo zvierat po transkardiálnej perfúzií s fyziologickým roztokom (300ml) a 4% paraformaldehydrom (300ml). Miesto poškodenia, segmenty nad a pod léziou v rozsahu 0,5 cm boli postfixované 24 hodín v 4% paraformaldehyde a následne boli preložené do 30% sacharózy za účelom kryoprotekcie. Segmenty boli nakrájané na kryostate (Leica CM1850) na 25 μm priečne rezy, ktoré boli inkubované s nasledujúcimi primárnymi protilátkami: casp3 (kaspáza 3); Gfap (astrocyty); Iba-1 (mikroglia); NeuN (neuróny), Gap 43 (novo prerastajúce axóny); Nf (neurofilamenty). Nasledujúci deň boli vzorky inkubované v sekundárnej fluorescenčnej protilátke.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas krátkodobého prežívania (24 hod.) sme u experimentálnych zvierat po kompresii miechy pozorovali infiltráciu M1- prozápalových (CD86) a M2- protizápalových (CD163) makrofágov ako aj štiepenie kaspázy 3 v neurónoch, oligodendrocytoch, astrocytoch a mikrogliových bunkách. Za fyziologických podmienok sa v mieche makrofágy nenáchadzajú, ich prílív je iniciovaný poškodením tkaniva (Carlson a kol., 1998). V našich vzorkách sme 24 hodín po kompresii pozorovali markantné zvýšenie relatívnej expresie CD86 (RQ= 9,75 \pm 1,77). Navýšenie génovej expresie CD163 bolo menej výrazné (RQ= 5,33 \pm 0,61). Akútne podanie protizápalového liečiva ATR (5mg/kg; i.p.) signifikantne znížilo génovú expresiu oboch markerov nad miestom poškodenia (CD86- RQ= 3,9 \pm 2,55; CD163- RQ= 4,36 \pm 0,92) a v mieste lézie (CD86- RQ= 3,45 \pm 1,66; CD163- RQ= 3,1 \pm 0,62). Na základe fenotypu a aktivačného statusu, makrofágy môžu iniciovať kaskádu mechanizmov sekundárneho poškodenia (M1), alebo na druhej strane podporiť neuroregeneráciu poškodenej miechy (M2) (Kong a Gao, 2017). Keďže liečba pomocou ATR vo väčšej miere inhibovala prílív M1 ako M2 makrofágov, z dlhodobého hľadiska by mohol mať tento efekt pozitívny vplyv na regeneráciu poškodeného tkaniva. Kaspáza 3 je kľúčovým enzýmom, ktorý kontroluje zmeny v bunkách počas apoptózy. Po poškodení, akým je aj kompresia miechy, sa

jej štiepenie výrazne zvyšuje, čo spôsobuje nadmerné odumieranie buniek a tým aj úbytok nervového tkaniva (Aydemir a kol., 2016). V našej štúdií sme sa zamerali na rozdiely v štiepení kaspázy 3 po traume miechy a po liečbe. Po Th9 kompresii bola zaznamenaná výrazná expresia kaspázy vo všetkých odobratých segmentoch. Liečba s ATR signifikantne znížila jej expresiu v kraniálnom ($p < 0.0001$) aj kaudálnom segmente ($p < 0.01$). Okrem toho, dvojité imunohistochemické farbenie ukázalo, že 1 deň po poškodení bolo štiepenie kaspázy najvýraznejšie okolo miesta lézie v neurónoch, oligodendrocytoch a astrocytoch. Podobne ako RT-PCR analýza, aj imunofluorescenčné farbenie ukázalo markantnú redukciu rozpadu kaspázy v týchto bunkových typoch po liečbe s ATR. V mikrogliových bunkách sme 24 hod. po kompresii nezaznamenali apoptotickú aktivitu. Počas dlhodobého- 6 týždňového experimentu sme zisťovali, či skorá inhibícia apoptózy a zápalovej reakcie podporuje neuroregeneráciu miechy po poranení. Naše výsledky získané po kompresii miechy a 6 týždňovom prežívaní ukazujú výrazne zníženú expresiu neurofilamentov v mieste poškodenia, čo je pravdepodobne následkom kavitácie a úbytku tkaniva. Na rozdiel od molekulárnej analýzy, IHC ukázala, že k najvýraznejšej strate neurofilamentov dochádza v dorzálnnej a dorzolaterálnej časti miechy a to v celom sledovanom úseku. Okrem úbytku neurofilamentov sme v tejto skupine zaznamenali len minimálny počet novo-prerastajúcich vláken. Jednorázová akútna liečba atorvastatínom pôsobila na neurofilamenty neuroprotektívne, keďže zvýšila ich denzitu v dorzálnnej časti miechy v kaudálnom aj kraniálnom segmente. ATR taktiež signifikantne zvýšil počet novo prerastajúcich axónov nad miestom lézie, čo potvrdila IHC aj RT-PCR analýza. Akútna inibícia zápalovej odpovede a apoptotickej aktivity po poškodení miechy podporila zvýšenie expresie neurofilamentov ako aj novo prerastajúcich vláken okolo miesta lézie, čo malo za následok signifikantné vylepšenie motorického skóre v 30-42 dni prežívania (Bimbová a kol., 2018).

Práca bola podporená grantom APVV- 15-0766; ITMS 26220220202 a ITMS 2014+: 313011D103.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aydemir S, Dogan D, Kocak A, Dilsiz N. The effect of melatonin on spinal cord after ischemia in rats. *Spinal Cord*. 2016; 54: 360–363.
- Bimbova K, Bacova M, Kisucka A, Pavel J, Galik J, Zavacky P, Marsala M, Stropkovska A, Fedorova J, Papcunova S, Jachova J, Lukacova N. A Single Dose of Atorvastatin Applied Acutely after Spinal Cord Injury Suppresses Inflammation, Apoptosis, and Promotes Axon Outgrowth, Which Might Be Essential for Favorable Functional Outcome. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19:1-17.
- Carlson S L, Parrish M E, Springer J E, Doty K, Dossett L. Acute Inflammatory Response in Spinal Cord Following Impact Injury. *Experimental Neurology*. 1998; 151: 77-88.
- Crowe M J, Bresnahan J C, Shuman S L, Masters J H, Crowe M S. Apoptosis And Delayed Degeneration After Spinal Cord Injury In Rats And Monkeys. *Nature Medicine*. 1997; 3:73-76.
- Kong X, Gao J. Macrophage polarization: A key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2017; 21: 941–954.
- Silva A N, Sousa N, Reis L R, Salgado J A. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*. 2014; 114: 25-57.
- Pannu R, Barbosa E, Singh K A, Singh I. Attenuation of Acute Inflammatory Response by Atorvastatin After Spinal Cord Injury in Rats. *Journal of Neuroscience Research*. 2005; 79: 340-350.
- Rowland J W, Hawryluk G W, Kwon B, Fehlings M G. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*. 2008; 25: 1-17.

VARIABILITA PRODUKCIE BIOFILMU U KOAGULÁZA-NEGATÍVNYCH STAFYLOKOKOV Z RÔZNYCH ZVIERAT

Bino E.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Z hľadiska rastu mikroorganizmov v mikroenvironmente rozlišujeme rast v submerznej kultúre kde mikroorganizmy „plávajú“ v tekutine a v emerznej kultúre, keď mikroorganizmy rastú na povrchu a sú k nemu viazané napríklad biofilmom. Vo všeobecnosti, bola tvorba biofilmu preukázaná u viacerých bakteriálnych druhov a teda aj u stafylokokov, avšak doposiaľ známe práce sa týkajú hlavne stafylokokov humánneho pôvodu. Cieľom tejto štúdie bolo testovanie tvorby biofilmu u kmeňov rôznych druhov z rodu *Staphylococcus*, najmä však koaguláza-negatívnych stafylokokov z rozličných druhov zvierat, keďže stafylokoky sú obligátne súčasťou mikrobioty tráviaceho traktu, a za niektorých podmienok sa stávajú ochorenia vyvolávajúcim činiteľom. Testovaných bolo 99 kmeňov izolovaných z trusu 406 zvierat. Kmene boli identifikované pomocou identifikačného systému MALDI-ToF a testované tromi metódami na produkciu biofilmu (kultivácia na Kongo agare, skúmavková metóda, mikrotitračná platničková metóda). Kultiváciou na Kongo agare počas 24-48-72 hodín sa potvrdila produkcia biofilmu u 79 kmeňov stafylokokov, pričom u 20 kmeňov produkcia biofilmu nebola potvrdená. Výsledky skúmavkovej metódy testovania tvorby biofilmu u stafylokokov vo väčšine prípadov korelovali s výsledkami kultivácie na Kongo agare. Mikrotitračnou kvantitatívnou platničkovou metódou bola produkcia biofilmu preukázaná u 58 kmeňov stafylokokov z 99 testovaných.

ÚVOD

Prvý vedec, ktorý sa zaoberal štúdiom biofilmov bol Anton van Leeuwenhoek. Neskôr v roku 1935 prírodovedec Zobel pozoroval rast biofilmu u morských baktérií, čo malo veľký význam pre výskum tvorby biofilmu v ďalších rokoch. Baktérie, ktoré rastú formou biofilmu sa vyznačujú zvýšenou odolnosťou voči obranným reakciám hostiteľa a tiež prirodzenou rezistenciou voči pôsobeniu antibiotík (Costerton a kol., 1999). Na vývoj biofilmu má vplyv mnoho podmienok vonkajšieho prostredia, ako napríklad pH, teplota prostredia, prítomnosť živín a koncentrácia kyslíka. Planktonické bunky sú schopné priľnúť k povrchom za pomoci adhezínov, čiže povrchových proteínov; taktiež je pre tvorbu biofilmu dôležitá prítomnosť gradientu práve medzi povrchom baktérie a daného materiálu, ktorý umožňuje baktériám lepšie prichytenie (Arciola a kol., 2002). Tvorba biofilmu bola preukázaná u niekoľkých bakteriálnych druhov, vrátane stafylokokov. Stafylokoky sa u zvierat vyznačujú komenzálnym výskytom a v súčasnosti je ich validovaných 54 druhov. Na základe schopnosti koagulovať plazmu, stafylokoky rozdeľujeme na koaguláza- negatívne a koaguláza- pozitívne (Votava a kol., 2001). Za určitých podmienok sú niektorí zástupcovia rodu *Staphylococcus* u zvierat ochorenia vyvolávajúcim činiteľom; okrem iných ochorení môžu spôsobovať napr. aj kožné dermatitídy. Cieľom tejto štúdie bolo testovať tvorbu biofilmu u kmeňov koaguláza-negatívnych stafylokokov izolovaných z trusu rôznych zvierat a následne otestovať inhibičnú aktivitu enterocínov (antimikrobiálnych substancií bielkovinového charakteru) izolovaných v našom laboratóriu na tieto biofilm pozitívne kmene.

MATERIÁL A METODIKA

Kmene (99) boli izolované zo 406 zvierat (sliepky-8, králiky-155, kone-32, bažanty-60, pštrosy-140, srny a jelene -12), 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 SynergyTM4 a vyhodnotení podľa Chaieb K. (2007). Ako kultivačné médium bol použitý Brain-Heart infusion-BHI bujón (Difco, USA). Pozitívna kontrola tvorby biofilmu bola kmeň *Streptococcus equi* subsp. *zooeidemicus* CCM 7316 (poskytnutý Dr. Stykovou z UVLF, Košice).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultiváciou na Kongo agare (24h,48h,72h) bolo 79 kmeňov stafylokokov vyhodnotených ako biofilm produkujúcich a 20 kmeňov biofilm neprodukovalo. Výsledky testovania tvorby biofilmu na agare s Kongo červeňou poukázali na to, že kmene stafylokokov izolované z jeleňov a srn (11) boli z väčšej časti netvoriace biofilm (Tabuľka 1) na rozdiel od kmeňov stafylokokov z koní (32), sliepok (6), pštrosov (24) a králikov (16), ktoré zväčša biofilm tvorili (Tabuľka 1). 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. Mikrotitračnou platničkovou kvantitatívnou metódou testované kmene stafylokokov (99) boli vyhodnotené ako stredne produkujúce biofilm-47 (hodnoty 0,103 až 0,975), veľmi silno produkujúce biofilm-11 (hodnoty 1,018 až 2,263), netvoriace biofilm- 41 (hodnoty 0,02 až 0,099). Na základe našich doterajších výsledkov môžeme zhodnotiť, že nami testované kmene stafylokokov z trusu koní (32) pri kvantitatívnej mikrotitračnej platničkovej metóde všetky tvorili biofilm rovnako ako aj kmene stafylokokov získané z trusu sliepok. Podľa Maheta a O'Toola (2001) sú baktérie tvoriace biofilm podstatne rezistentnejšie voči antibiotikám (ATB) než 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, čo úzko súvisí so schopnosťou biofilm-pozitívnych mikroorganizmov odolávať vplyvom prostredia. Keďže v súčasnosti existuje celosvetový problém s rezistenciou baktérií na antibiotiká, bakteriocíny predstavujú významnú skupinu bioaktívnych substancií, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu ako „antimikrobiálne pôsobiace substancie“ schopné inhibovať rast nežiaducej mikrobioty. V ďalšom kroku budú biofilm pozitívne kmene testované na ich citlivosť ku enterocínom charakterizovaným v našom Laboratóriu živočíšnej mikrobiológie.

Tab. 1: Výsledky tvorby biofilmu u stafylokokov tromi rozdielnymi metódami

| Zviera(počet kmeňov) | Kongo + | Kongo - | Skúmavková + | Skúmavková - | Platničková + | Platničková - |
|---------------------------|---------|---------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Kone (32) | 30/32 | 2/32 | 28/32 | 4/32 | 32/32 | 0/32 |
| Králiky (16) | 13/16 | 3/16 | 12/16 | 4/16 | 14/16 | 2/16 |
| Sliepky (6) | 6/6 | 0/6 | 6/6 | 0/6 | 6/6 | 0/6 |
| Bažanty (12) | 7/11 | 4/11 | 4/11 | 7/11 | 2/11 | 9/11 |
| Pštrosov (24) | 21/24 | 3/24 | 5/24 | 19/24 | 3/24 | 21/24 |
| Srny a jelene (13) | 4/11 | 7/11 | 3/11 | 8/11 | 2/11 | 9/11 |

Práca bola podporená projektami VEGA 2/0006/17 a ITMS 26220220204.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- 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* the intercellular adhesion (ica) locus is a molecular marker of the virulent slime-producing strains; *J. Biomed. Mater. Res.*; 59; 3: p. 557-562.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mah, T.-F. C., O'Toole, G. A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 2001, 9, 34-39

ANALÝZA NEKÓDUJÚCEJ RNA U CHRONICKY DIALYZOVANÝCH PACIENTOV

Biščáková Z.¹, Rabajdová M.¹, Špaková I.¹, Rosenberger J.², Mareková M.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ v Košiciach, Lekárska fakulta, Tr. SNP 1, Košice
²I. interná klinika, UPJŠ LF a UNLP v Košiciach, Tr. SNP 1, Košice

ABSTRAKT

Chronické ochorenie obličiek je považované za ochorenie, pri ktorom je funkcia obličiek znížená natoľko, že obličky nie sú schopné udržať fyziologické zloženie vnútorného prostredia za bazálnych podmienok. Klinické štúdie poukazujú, že včasná diagnostika a správne monitorovanie pacienta môže oddialiť, respektíve zabrániť progresii ochorenia ktoré môže viesť až k renálnej insuficiencii. Malé, nekódujúce RNA, nazývané mikro RNA (miRNA), sa javia ako možné biomarkery reagujúce na zmeny vznikajúce v priebehu patologických procesov odohrávajúcich sa v obličkách. Cieľom predkladanej práce bola analýza nekódujúcej miRNA u chronicky dialyzovaných pacientov. U chronicky dialyzovaných pacientov bola detegovaná prítomnosť miRNA a boli zaznamenané zmeny expresie hladín miRNA.

ÚVOD

Chronické ochorenie obličiek predstavuje významný medicínsky problém. Obličky nie sú schopné udržať homeostázu nielen za bazálnych podmienok, ale ani pri použití špeciálnych diétnych, či po medikamentózných opatreniach. Absencia adekvátnej predialyzačnej liečby má za následok vysokú morbiditu a mortalitu u pacientov počas prvých troch mesiacov po začatí dialýzy. Súvisí to predovšetkým s nedostatočným prístupom k dialýze, ale aj s pokročilými neliečenými ochoreniami ako sú napríklad ochorenia srdca a ciev, arytmia, infekčné komplikácie. Poškodenie obličiek môže byť v parenchýme, veľkých cievach alebo vo vývodných cestách. Medzi základné predispozičné faktory pre vznik chronického zlyhávania obličiek patrí napr. diabetes mellitus, arteriálna hypertenzia, kardiovaskulárne ochorenia alebo výskyt akéhokoľvek chronického ochorenia obličiek u najbližších členov rodiny (National Kidney Foundation, 2002). Takmer všetky chronické ochorenia obličiek zdieľajú v pokročilejších štádiách veľmi podobný klinický priebeh charakterizovaný lineárnym poklesom glomerulárnej filtrácie, rozvojom neselektívnej proteinúrie a hromadením odpadových látok vo vnútornom prostredí. Takisto histologický obraz je podobný a zahŕňa glomerulárnu sklerózu, tubulárnu artrofiu a intersticiálnu fibrózu.

Ako neinvasívny marker mnohých chorobných procesov slúžia malé nekódujúce RNA spôsobujúce posttranskripčnú reguláciu génovej expresie, tzv. miRNA (Moldovan a kol., 2014). MiRNA sa zúčastňujú na širokom spektre biologických procesov zahŕňajúcich bunkový cyklus, apoptózu, bunkovú diferenciáciu a epiteliálny-mezenchymálny prechod (Butz a kol., 2012). K rozvoju fibrózy prispievajú poškodené tubulárne epiteliálne bunky, ktoré vznikli mechanizmom z mezenchymálnych buniek. Fibróza je charakterizovaná nerovnováhou v tvorbe matrixu a degradáciou, ktorá vedie k nadmernej akumulácii extracelulárneho matrixu. MiRNA reguluje fibrózu obličiek prostredníctvom priamej represie alebo expresie génov matrixu a prostredníctvom transformácie rastového faktora (TGF- β) (Chung a kol., 2010). Predbežné štúdie naznačujú, že cirkulujúce miRNA môžu regulovať bunky a orgány vzdialené od miesta pôvodu (Valadi a kol., 2007).

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál experimentálnej skupiny v štúdiu tvorila periférna krv pacientov vyšetovaných v dialyzačnom stredisku Fresenius UNLP v Košiciach. Pacienti v experimentálnej skupine (n=18) boli vo veku 30 – 80 rokov. U pacientov v experimentálnej

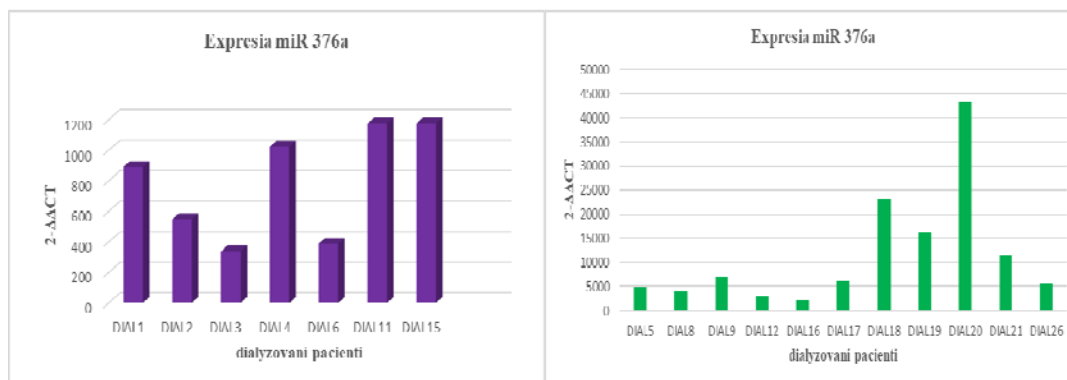
skupine bolo potvrdené chronické zlyhávanie obličiek. Pacientom bol odobratý biologický materiál vo forme plnej krvi odoberanej uzavretým odberovým systémom (Paxgene RNA blood tube) a vo forme séra vzniknutého po odbere uzavretým odberovým systémom Venosafe s prokoagulačným činidlom a bez separačného gélu.

Izolácia, reverzná transkripcia RNA a amplifikácia cDNA

Na izoláciu miRNA zo vzoriek krvi bol použitý komerčný kit Qiagen AllPrep DNA/RNA miRNA Universal Kit, ktorý bol založený na lýze buniek periférnej krvi pacientov. Následne došlo k precipitácii RNA, degradácii, špecifickej purifikácii a elúcií malých miRNA. Na reverznú transkripciu miRNA do cDNA bol využitý TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit s použitím špecifických RT reverse primerov, špecifických pre každú analyzovanú miRNA. Analýza hladín expresie špecifickej miRNA bola uskutočnená metódou Real-Time PCR využitím Rotor-Gene Quadruplex Qiagene cyklu a TaqMan Gene Expression Assays. Amplifikácia špecifických génov prebiehala za daných podmienok: 50 °C/2min, 95 °C/10min, v 38 cykloch 95 °C/15sek, 60 °C/60sekúnd. Následne bolo zaznamenávané fluorescenčné žiarenie detektorom v priebehu každého cyklu a jeho intenzita korelovala s množstvom amplikónu v reakčnej zmesi. Intenzita fluorescencie bola vyjadrená amplifikačnou krivkou. Pri kvantifikácii jednotlivých miRNA bola využitá porovnávacia C_T metóda s endogénnou kontrolou U6 miRNA. Po tejto normalizácii boli využité hodnoty ΔC_T pre stanovenie $\Delta\Delta C_T$ a získanie hodnoty relatívneho množstva stanovovanej miRNA pomocou vzorca $RQ_{(\text{cieľový gén 1})} = 2^{-\Delta\Delta C_T(\text{cieľový gén 1})}$

VÝSLEDKY A DISKUSIA

U chronicky dialyzovaných pacientov boli analyzované zmeny expresie špecifickej hladiny miR376a. Z nameraných hodnôt vzhľadom na hladiny C_t a $2^{-\Delta\Delta C_T}$ cieľovej miR376a môžeme konštatovať, že miR376a u chronicky dialyzovaných pacientov je up-regulovaná, čo je vidieť na grafoch č.1 a 2.



Graf 1 a 2: Zmeny hladiny expresie miR376a u chronicky dialyzovaných pacientov.

Up-regulácia hladiny expresie miR376a bola analyzovaná vzhľadom na zaradenie pacientov do transplantáčného programu, rovnako ako aj vzhľadom na dĺžku dialyzácie, prítomnosť príslušných komorbidít a hladiny vybraných klinicko-biochemických markerov. Na základe vzájomných analýz bola popísaná príslušná korelácia zmeny hladín miR376a a jednotlivých markerov súvisiacich so signálnou cestou TGF-β.

Ďalšia analýza miR376a ako aj štúdium iných miRNA molekúl by mohli byť v budúcnosti využité pri diagnostike ochorení obličiek a monitoringu dialyzačného procesu chronicky dialyzovaných pacientov.

Táto práca bola podporená z projektu VEGA 1/0372/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. Crosstalk between TGF β signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci* 33; 382-393, 2012. doi:10.1016/j.tips.2012.04.003.
- Chung AC, Huang XR, Meng X, Lan HY. Mir-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 21: 1317-1325, 2010. doi:10.1681/ASN.2010020134.
- Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsch CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 18: 371-390, 2014. doi:10.1111/jcmm.12236
- National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39:S1.
- Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic Exchange between cells. *Nat Cell Bio* 9; 654-659, 2007. doi:10.1038/ncb1596.

ŠTÚDIUM IMUNOGÉNNYCH PROTEÍNOV *RICKETTSIA AKARI* POMOCOU PROTEOMICKÝCH METÓD

Csicsay F., Flores-Ramirez G., Danchenko M., Quevedo-Diaz M.

Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

ABSTRAKT

Rickettsia akari, pôvodca riketsiových kiahní, je striktne intracelulárna Gram-negatívna baktéria, ktorá patrí do prechodnej skupiny *Rickettsia* spp. Prípady riketsiových kiahní boli diagnostikované aj v rôznych častiach Európy a na amerických kontinentoch, avšak informácie o imunogenite *R. akari* sú obmedzené a to môže viesť k nesprávnemu stanoveniu diagnózy tejto choroby. Identifikácia imunogénnych molekúl tohto mikroorganizmu môže viesť k presnejšej diagnóze infekcie. V našej práci sme sa zameriavali na štúdium imunogénnych proteínov využitím proteomických techník ako SDS-PAGE, 2D elektroforéza a hmotnostná spektrometria (MALDI-TOF). Naším cieľom bolo izolovanie a identifikovanie imunogénnych bielkovín *R. akari*, ktoré by nám v budúcnosti mohli prispieť k vylepšeniu laboratórnej diagnostiky riketsiových kiahní, prípadne aj iných riketsióz.

Podarilo sa nám izolovať a identifikovať niekoľko zaujímavých imunoreaktívnych proteínov, ktoré môžu byť vhodnými kandidátmi nie len pre štandardizáciu imuno-enzýmovej metódy, ale aj pre vývoj účinnej vakcíny proti týmto infekčným ochoreniam.

ÚVOD

Riketsiózy sú zoonotické infekcie spôsobené zástupcami rodu *Rickettsia*. *Rickettsia akari* spôsobuje ochorenie tzv. riketsiové kiahne (rickettsialpox), ktoré boli prvý krát opísané v roku 1946 v New York City po vypuknutí epidémie. Vektorom a zároveň aj rezervoárom je roztoč *Liponyssoides sanguineus* a primárnym hostiteľom je myš domáca, ale vyskytuje sa aj v populácii iných voľne žijúcich hlodavcov (Paddock a kol., 2007). Výskyt ochorenia bol potvrdený takmer na celom svete, čo súvisí s kozmopolitným rozšírením myši domácej.

R. akari, ako aj ostatné riketsie majú afinitu k cievnym endoteliálnym bunkám, ochorenie vyvolávajú infiltráciou a degeneráciou týchto buniek, čím vznikajú petechiálne krvácaniny, hemorágie, následne spôsobujú pyrexiiu a v ťažších prípadoch až endotoxínový šok. (Raoult a kol., 1999).

Prvým klinickým príznakom je papulovezikulárna lézia v mieste inokulácie, ktorá sa mení na inokulačnú chrastu s lokálnou bolestivou lymfadenopátiou. Objavuje sa zvýšená telesná teplota, triaška, myalgia a po 2-3 dňoch generalizovaná kožná vyrážka na tele (Faccini-Martinez a kol., 2014).

Diagnostika riketsiových kiahní je náročná, pre potvrdenie správnej diagnózy sú dôležité molekulárne laboratórne metódy (PCR, nPCR, qPCR) alebo serologické metódy ako imunofluorescenčný test, ELISA, komplement fixačný test či Western blot.

Terapia spočíva v adekvátnej antibiotickej liečbe, najúčinnejšími antibiotikami sú makrolidové antibiotiká, doxycylin a chloramfenikol (Botelho-Nevers a kol. 2012).

MATERIÁL A METODIKA

R. akari, kmeň Kaplan sme kultivovali v žltkových vakoch kuracích embryí pri teplote 35°C, ktoré sme inokulovali v 6. dni inkubácie a žltkové vaky sme zbierali po 7 dňoch. Bakteriálne bunky boli purifikované pomocou sacharózového gradientu v rozsahu 30-60% a následne lyzované pomocou lyzačného pufri LPA (lysophosphatidic acid) obsahujúci inhibítor proteáz. Bakteriálne proteíny v lyzáte sme precipitovali pridaním zmesi metanol:chloroform a po centrifugácii sme získaný pelet resuspendovali v pufri IEF (Isoelectric focusing). Solubilizované proteíny sme rozdelili pomocou 2D elektroforézy na 7 cm NL 3-10 pásikoch (Bio-Rad) a 13% polyakrylamidovom géli. Boli pripravené 2 identické 2D gély, jeden sme

použili na Western blot a druhý sme zafarbili roztokom Coomassie Brilliant blue R250. Rozseparované proteíny z gélu na PVDF membránu sme blotovali mokrou cestou v elektrickom poli 100V počas 2 hodín. Preblotované membrány sa blokovali v 5% roztoku odstredeného mlieka v TBS-T. Membrána následne bola inkubovaná buď s králičím sérom proti *R. akari* v riedení 1: 1000 alebo s ľudským sérom riedeným 1: 1000 v 5% mlieku v TBS-T počas 2 hodín pri laboratórnej teplote. Naviazané imunoglobulíny (Ig) proti *R. akari* sa sondovali použitím polyklonálnych prasacích protilátok proti králičím Ig označené chrenovou peroxidázou (horseradish peroxidase, HRP) respektíve polyklonálnych králičích protilátok proti ľudským Ig označené HRP. Vzniknuté imunokomplexy sme vizualizovali chemiluminiscenčne (ECL), vyvolaním na fotografických filmoch.

Druhý gél na identifikáciu proteínov farbený v Coomassie Brilliant blue R250 sme odfarbili v roztoku 10% kyseliny octovej so 40% etanolom vo vode. Vyrezané proteínové škvŕny sme premyli a odfarbili v 50mM roztoku hydrogénuhličitanu amónneho s 50% acetonitrilom, a ku gélovým kockám sme pridali roztok trypsínu. Po 12 hodinovej inkubácii pri teplote 37°C sme naštiepené peptidy extrahovali pomocou zmesi 1% kyseliny trifluóroctovej v 70% acetonitrile a po zahustení vzoriek na finálny objem 10-15µl, sme vzorky analyzovali hmotnostnou spektrometriou MALDI –TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou 2D elektroforézy a farbením Coomassie sme odhalili prítomnosť 88 proteínových škvŕn v rozsahu 10 až 130kDa, s hodnotami izoelektrického bodu (Pi) 3-10. Analýzou MALDI-TOF sme identifikovali 32 rickettsiálnych proteínov z celkového počtu 88 proteínov škvŕn.

Technikou Western blotu sme určili 8 nasledovných unikátnych imunogénnych rickettsiálnych proteínov: OmpB (Uniprot: A8GPL7), Chaperonový proteín DnaK (Uniprot: A8GMF9), 60kDa chaperonin GroeL (Uniprot: A8GPB6), peptidoglykán asociovaný lipoproteín (Uniprot: A8GPW0), 111kDa povrchový antigén (Uniprot: A8GNM2), subjednotka membránovej proteázy (Uniprot: A8GN16), superoxid dismutáza (Uniprot: A8GNP0) a 44kDa necharakterizovaný proteín.

Vo Western blote, ako primárnu protilátku sme použili 3 rôzne krvné séra: ľudské pacientske sérum, krvné sérum infikovaného králika a hyperimúnne králičie sérum.

Zistili sme, že proteíny A8GMF9, A8GN16 reagujú špecificky iba s hyperimúnnym králičím sérom, proteíny A8GNM2, A8GNP0 len so sérom infikovaného králika, kým proteín A8GPL7 v oboch prípadoch. Podobne reagoval aj proteín A8GPB6, ktorý okrem králičieho séra vykazoval pozitívnu reakciu aj s pacientskym sérom.

Peptidoglykán asociovaný proteín a 44 kDa proteín reagovali so všetkými krvnými sérami.

Zaujímavým zistením bola pre nás aj výrazná pozitívna imunogénna reakcia rickettsiálneho lipopolysacharidu (LPS) v prípade všetkých krvných sér.

V našom experimente sme dokázali detegovať imunogénne proteíny ako nové biomarkery pre diagnostiku riketsiôz. Zistili sme, že okrem proteínov, môžu významnú rolu hrať aj ďalšie imunogénne makromolekuly, konkrétne lipopolysacharidy.

Vzhľadom na mnohé všeobecné príznaky pripomínajúce bežne sa vyskytujúce infekčné ochorenia, klinická diagnóza riketsiôz je veľmi náročná. Žiadne laboratórne rýchlotesty nie sú k dispozícii na diagnostiku riketsiálnych ochorení v začiatočnom štádiu ochorenia; sérologické testy zostávajú nenahraditeľným nástrojom pre ich diagnostiku.

Ďalším krokom nášho experimentu bude produkcia rekombinantných proteínov vo vhodnom expresnom systéme, ich purifikácia a následné využitie pre vytvorenie špecifických protilátok, ktoré by sa mohli úspešne využiť nie len pre diagnostické, ale aj pre preventívne účely riketsiových nákaz.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Botelho-Nevers E, Socolovschi C, Raoult D, Parola P. Treatment of Rickettsia spp. infections: a review, *Expert Rev AntiInfect Ther*, 10, 2012, pp. 1425-1437
- Faccini-Martínez Á, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *Int J Infect Dis*. 2014; 28:126-39
- Paddock C.D, Eremeeva M.E. Rickettsialpox. In: Raoult D, Parola P, editors. Rickettsial diseases. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 63–86.
- Raoult D, Birtles R.J, Montoya M, Perez E, Tissot-Dupont H, Roux V, Guerra H. Survey of three bacterial louse-associated diseases among rural Andean communities in Peru: prevalence of epidemic typhus, trenchfever, and relapsingfever. *Clin. Infect. Dis*. 1999, 29: 434-436.

EXTRAKTY Z HÚB AKO INHIBÍTORY BIOFILMU

Čuvalová A.¹, Handrová L.¹, Kmet' V.¹, Strapáč, I.²

¹ Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

² Katedra chémie, biochémie a biofyziky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

ABSTRAKT

Práca bola zameraná na vplyv vodných extraktov z húb *Macrolepiota procera* (Bedľa vysoká), *Hypsizygus tessellatus* (Shimeji biele), *Pleurotus ostreatus* (Hliva ustricová) a *Hirneola auricula Judae* (Uchovec bazový) na tvorbu biofilmu u štyroch kmeňov *Staphylococcus aureus* a ovplyvňovanie quorum sensing (QS) u dvoch kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* metódou merania chemiluminiscencie reportérovým kmeňom *E. coli* JM109 (s rekombinovaným plazmidom pSB 1142). Tvorba biofilmu a antibiofilmová aktivita bola stanovená použitím Maxisorp mikrotitračných platničiek a vplyv na QS bol testovaný v bielych platničkách. Najsilnejší antibiofilmový účinok mali extrakty *P. ostreatus* a *H. auricula Judae*. Všetky extrakty preukázali signifikantnú QS inhibíciu.

ÚVOD

V posledných rokoch narastá záujem o mechanizmy pôsobenia prírodných produktov, pretože sú hlavným zdrojom chemickej rozmanitosti a poskytujú dôležité terapeutické látky pre mnohé bakteriálne ochorenia (Payne a kol., 2007).

Huby sú oceňované nielen pre ich textúru a chuť, ale najmä pre ich nutričnú, chemickú a antibakteriálnu aktivitu. Kvôli tomu sú využívané ako funkčné potraviny a cenný zdroj pri vývoji prírodných liekov a potravinových aditív. Tiež by mohli byť významným zdrojom pri hľadaní nových bioaktívnych zlúčenín na inhibíciu produkcie biofilmu a QS (Martín-Rodríguez a kol., 2014; Alves a kol., 2014). V tejto súvislosti sa objavili flavonoidy a fenolické zlúčeniny ako potenciálne inhibítory tvorby biofilmu a produkcie faktorov virulencie v patogénnych baktériách zasahovaním do QS mechanizmov (Nazzaro a kol., 2013). Hoci interakcie medzi baktériami a hubami sú z veľkej časti zdokumentované (Frey-Klett a kol., 2011), existuje relatívne málo výskumov o inhibícii QS pomocou hubových extraktov (Martín-Rodríguez a kol., 2014).

Cieľom tejto práce bolo sledovať účinok vodných extraktov z húb *Hypsizygus tessellatus*, *Macrolepiota procera*, *Pleurotus ostreatus* a *Hirneola auricula Judae* na tvorbu biofilmu u izolátov *S. aureus*, ako aj vplyv na quorum sensing s izolátmi *P. aeruginosa*.

MATERIÁL A METODIKA

Celkovo sa v práci použili 4 kmene *Staphylococcus aureus*, z ktorých dva boli izolované z ovčieho mlieka (SA12, SA14) a dva boli izolované z kliešťov *Ixodes ricinus* (SA5, SA51). Na ovplyvňovanie QS boli použité dva klinické izoláty *Pseudomonas aeruginosa* 119 a 44. Supernatanty z pseudomonád boli použité ako prírodné zdroje acyl homolaktónov (AHL), signálnych molekúl s C10-C4 acylovým reťazcom. Ako QS reportérový kmeň sa použila *Escherichia coli* JM109 s plazmidom pSB 1142 (*luxCDABE* obsahujúci gény *lasR* a *lasI*), ktorý poskytol Dr. Matthew Fletcher (Institute of Infection, Immunity & Inflammation, Centre for Biomolecular Sciences, University Park, University of Nottingham, United Kingdom).

Stafylokoky sa kultivovali na krvnom agare (základ pre krvný agar, Oxoid, Veľká Británia s 5 %-ným prídavkom defibrinovanej baranej krvi), pseudomonády v živnom bujóne (Oxoid, Veľká Británia) a *E. coli* JM109 na živnom agare (Oxoid, Veľká Británia) s pridaním 20 µg · ml⁻¹ tetracyklínu počas 24 hodín pri teplote 37°C.

Extrakty z húb *Hypsizygus tessellatus*, *Macrolepiota procera*, *Pleurotus ostreatus* a *Hirneola auricula Judae* boli pripravené metódou podľa Strapáča a kol. (2016) na katedre chémie, biochémie a biofyziky, Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

Bezbankové supernatanty baktérií *P. aeruginosa* boli pripravené z 24- hodinovej kultúry centrifugáciou (10000 rpm, 10 minút) a následnou filtráciou (veľkosť pórov 0,22 µm, TPP, Trasadingen, Švajčiarsko). Supernatanty boli skladované pri teplote 4 °C.

Detekcia tvorby biofilmu sa stanovila použitím Nunc Maxisorp mikrotitračných platničiek (Nunc, Roskilde, Denmark) s farbením kryštálovou violeťou (O'Toole, 2011). Antibiofilmová aktivita extraktov z húb bola testovaná pridaním 20 µL extraktu. Ako kontrola sa použila bakteriálna suspenzia v Brain Heart bujóne (Oxoid, Veľká Británia) bez účinných látok.

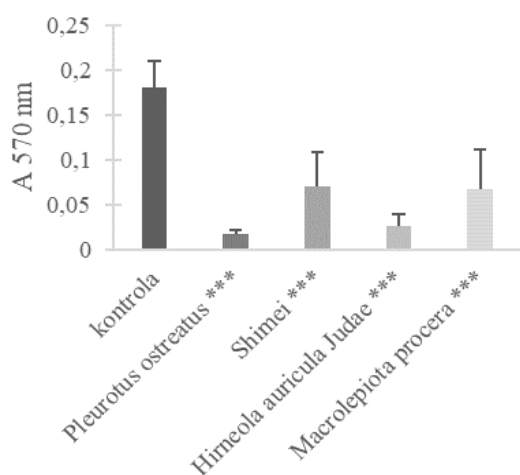
Vplyv štyroch hubových extraktov na quorum sensig u *E. coli* JM109 s plazmidom pSB 1142 a *P. aeruginosa* (PSA44, PSA119) bol testovaný pridaním 10 µL extraktu a kvantitatívne analyzovaný použitím 96 jamkových mikrotitračných imunoplatničiek (SPL Life sciences, Gyeonggi-do, Korea) (Wang a kol., 2007). Luminiscencia sa merala použitím Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, Vermont, USA) a vizualizovala pomocou Fusion Fx (Vilber, Collégien, France). Relatívne svetelné jednotky (Relative Light Unit) sú definované ako počet na jednotku optickej denzity (OD495).

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

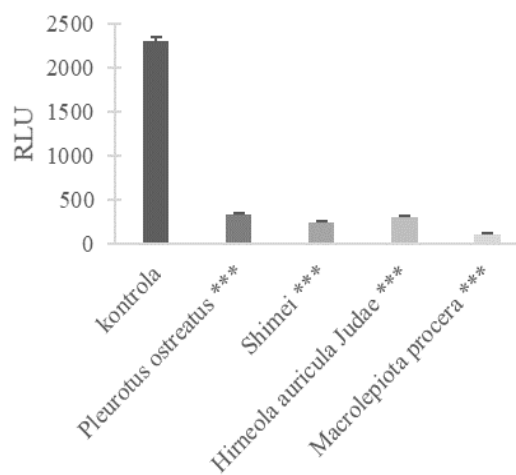
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci našej práce sme sledovali vplyv vybraných štyroch extraktov z húb na tvorbu biofilmu u stafylokokov a QS u pseudomonád.

Na tvorbu biofilmu mali signifikantne inhibičný účinok tri z použitých vodných extraktov z húb. Štvrtý, extrakt z *Hypsizygus tessellatus*, signifikantne inhiboval biofilm u izolátov z kliešťov a *S. aureus* 14 z mlieka, ale u *S. aureus* 12 nesignifikantne zvýšil tvorbu biofilmu. Najväčší antibiofilmový účinok mali extrakty z húb *Pleurotus ostreatus* a *Hirneola auricula Judae*, u ktorých sme zaznamenali signifikantnú inhibíciu u troch zo štyroch izolátov. Extrakt z huby *Macrolepiota procera* mal signifikantne inhibičný účinok iba na *S. aureus* 51 a *S. aureus* 12, u zvyšných dvoch spôsobil iba nesignifikantnú inhibíciu. Výsledky znázornené v grafe č.1 ukazujú signifikantne inhibičný účinok extraktov na *S. aureus* 51. Inhibíciu rastu testovaných kmeňov sme nezaznamenali u žiadneho z použitých izolátov.



Graf 1. Účinok hubových extraktov na tvorbu biofilmu u *S. aureus* 51



Graf 2. Účinok hubových extraktov na QS u *P. aeruginosa* 44

Inhibičný vplyv extraktu *M. procera* na tvorbu biofilmu u *S. aureus* zaznamenali aj Carvalho a kol. (2015). Li a Dong (2010) dokázali antibiofilmové účinky extraktu z *Hirneola auricula Judae* u *E. coli*. Antibiofilmová aktivita bola spojená s obsahom fenolových zlúčenín a organických kyselín v hubových extraktoch.

Quorum sensing bolo signifikantne inhibované všetkými štyrmi použitými extraktmi z húb. Výsledky inhibície sú podobné pre oba testované kmene *P. aeruginosa*, pričom najväčší účinok sme zaznamenali pri extrakte z *Macrolepiota procera* a *Hypsizygus tessellatus*, následne *Pleurotus ostreatus* a extrakt z *Hirneola auricula Judae* mal najmenší účinok. Graf č. 2 zobrazuje signifikantnú anti-QS aktivitu hubových extraktov u *P. aeruginosa* 44. Inhibícia QS u *C. violaceum* CV026 bola spôsobená vplyvom bioaktívnych metabolitov *P. ostreatus* a *H. auricula Judae* (Zhu a kol., 2011a) a pigmentov *H. auricula Judae* (Zhu a kol., 2011b).

Doteraz nebola uvedená štúdia, ktorá preukazuje inhibičný vplyv extraktu z *Pleurotus ostreatus* a *Hypsizygus tessellatus* na tvorbu biofilmu baktérie *S. aureus* a extraktu z *Macrolepiota procera* a *Hypsizygus tessellatus* na inhibíciu QS u *P. aeruginosa*, napriek tomu sú potrebné ďalšie štúdie na objasnenie mechanizmu účinku.

Táto práca bola podporená grantami APVV 14-0274, VEGA 2/0085/18 a ITMS 26220220204.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alves MJ, Ferreira ICFR, Lourenço I, Costa E, Martins A, Pintado M. Wild Mushroom Extracts as Inhibitors of Bacterial Biofilm Formation. *Pathogens*. 2014; 3: 667-679.
- Carvalho MP, Türck P, Abraham WR. Secondary Metabolites Control the Associated Bacterial Communities of Saprophytic Basidiomycotina Fungi. *Microbes Environ*. 2015; 30: 196-198.
- Frey-Klett P, Burlinson P, Deveau A, Barret M, Tarkka M, Sarniguet A. Bacterial-fungal interactions: Hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2011; 75: 583-609.
- Li B, Dong M. Inhibition of *Escherichia coli* biofilm by *Auricularia auricula* extract. *Modern Food Sci. Tech.* 2010; 26: 1067-1070.
- Martín-Rodríguez AJ, Reyes F, Martín J, Pérez-Yépez J, León-Barrios M, Couttolenc A, Espinoza C, Trigos A, Martín VS, Norte M, Fernández JJ. Inhibition of bacterial quorum sensing by extracts from aquatic fungi: first report from marine endophytes. *Mar. drugs*. 2014; 12: 5503-5526.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R. Quorum Sensing and Phytochemicals. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 12607-12619.
- O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* 2011; 47.
- Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2007; 6: 29-40.
- Strapáč I, Baranová M, Smrčová M, Bedlovičová Z. Antioxidant Activity of Honey Mushrooms (*Armillaria mellea*). *Folia Veterinaria*. 2016; 60: 37-41.
- Wang Y, Dai Y, Zhang Y, Hu YB, Yang BY, Chen SY. Effects of quorum sensing autoinducer degradation gene on virulence and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. China C Life Sci.* 2007; 50: 385-391.
- Zhu H, Wang SX, Zhang SS, Cao CX. Inhibiting effect of bioactive metabolites produced by mushroom cultivation on bacterial quorum sensing-regulated behaviors. *Chemotherapy*. 2011a; 57: 292-297.
- Zhu H, He CC, Chu QH. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. *Lett Appl Microbiol.* 2011b; 52: 269-274.

IDENTIFIKÁCIA ZÁSTUPCOV RODU *PENICILLIUM* ZO SLEPAČÍCH VAJEC

Demjanová S., Jevinová P., Pipová M., Regecová I.

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológia mäsa, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bola identifikácia zástupcov *Penicillium* spp. izolovaných z povrchu vaječnej škrupiny a z vaječného obsahu. Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením 150 kusov slepačích vajec sa získalo spolu 233 izolátov mikromycét. Na základe makroskopických a mikroskopických znakov a jednoduchou PCR metódou bolo 87 izolátov zaradených do rodu *Penicillium*. Izoláty zaradené do rodu *Penicillium* boli ďalej podrobené kreatínovej skúške, testu s Ehrlichovým činidlom a sekvenácií. Pozitívna kreatínová skúška bola zaznamenaná u 48 izolátov, negatívna u 9 izolátov a u 30 izolátov nebol preukázaný rast na CREA. Ehrlichovým testom bola potvrdená produkcia kyseliny cyklopiazónovej u 13 izolátov a produkcia iných alkaloidov u 20 izolátov. Na základe týchto výsledkov a sekvenáciou bolo 6 izolátov identifikovaných ako *Penicillium chrysogenum*. Pre presnú identifikáciu ďalších izolátov je potrebné vykonať ďalšie skúšky.

ÚVOD

Potraviny vo všeobecnosti predstavujú ideálne prostredie pre rast a množenie mikroskopických vláknitých húb. Konzumné vajcia tiež nie sú výnimkou. Kutikula, škrupina a podškrupinové blany vajec predstavujú prirodzenú bariéru pre vstup mikroorganizmov do ich vnútorného obsahu (Mansour a kol., 2015). Vplyvom skladovacích podmienok a starnutia vajec sa však účinok týchto bariér oslabuje. Mikroskopické vláknité huby sú tak schopné penetrovať svojimi hýfami cez póry vaječnej škrupiny a membrán až do vnútorného obsahu vajec (Perez-Nadales a kol., 2014). Mikromycéty kontaminujúce vajcia môžu v dôsledku svojej metabolickej činnosti spôsobiť zníženie kvality vajec vedúcej k ich skazeniu, a to produkciou proteolytických a lipolytických enzýmov, ale taktiež produkciou mykotoxínov (Brown a kol., 2012). Tento fakt má za následok výrazné ekonomické straty a riziko intoxikácie spotrebiteľa predstavujúce nebezpečenstvo pre verejné zdravie (Rodríguez a kol., 2015). Najčastejšie kontaminujúcimi mikroskopickými vláknitými hubami sú *Penicillium* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Mucor* spp. a *Rhizopus* spp. Zdrojom kontaminácie môže byť vzduch, podstielka, trus, materiál použitý na hniezdo, nesprávna manipulácia a sanitácia, pričom k ich rastu prispieva hlavne zvýšená vlhkosť vzduchu a teplota okolia (Al-Obaidi a kol., 2011).

Penicillium spp. patrí medzi najčastejšie izolované mikroskopické vláknité huby v potravinárskom sektore. Sú to mezofilné mikromycéty rastúce pri teplotách v rozmedzí 5 - 37 °C a pH 3 – 4,5. Vyskytujú sa v pôde, na rozkladajúcej sa vegetácii a komposte, na sušených potravinách, korení, obilninách, čerstvom ovocí a zelenine, ako aj vo vzduchu a prachu (Samson a kol., 2010). Pri vysokej vlhkosti stavebného materiálu dokážu rásť aj na stenách budov (Storey a kol., 2004). Mnohé druhy majú schopnosť produkovať široké spektrum metabolitov, vrátane látok s antibiotickým a antivirálnym účinkom a mykotoxínov (Rundberget a kol., 2004). Väčšina týchto mykotoxínov je spojená so znehodnotením potravín a obilia (Krska a kol., 2008). Z tohto dôvodu je identifikácia zástupcov rodu *Penicillium* dôležitá.

MATERIÁL A METODIKA

Mikromycéty boli izolované z povrchu škrupiny 150 kusov slepačích vajec a z vnútorného obsahu vajec podľa pokynov STN ISO 21527-1 a STN ISO 21527-2. Získaná základná suspenzia a následné desaťnásobné riedenia sa metódou rozteru v množstve 0,1 ml naočkovali na povrch agarového média s dichloranom a glycerolom (DG18) a agarového média

s dichloranom, bengálskou ružovou a chloramfenikolom (DRBC) (OXOID, Veľká Británia) a inkubovali 5 dní pri teplote 25 °C. Porastené kolónie boli následne preočkované na povrch agarového média s kvasničným extraktom a sacharózou (YES), Czapekovho agarového média s kvasničným extraktom (CYA) (Hi-Media, India), zemiakového agarového média s dextrózou (PDA) a Sabouraudovho agarového média s dextrózou (SDA) (OXOID, Veľká Británia) a inkubované 7 dní pri teplote 25 °C. Fenotypová identifikácia bola vykonávaná podľa kritérií Frisvada a Samsona (2004). Makroskopickým a mikroskopickým vyšetrením boli potvrdené charakteristické morfologické znaky zástupcov *Penicillium* spp. U izolátov zaradených do rodu *Penicillium* bol vykonaný Ehrlichov test s použitím filtračného papiera a kreatínová skúška preočkovaním na povrch agarového média s kreatínom, sacharózou a farebným indikátorom brómkrezolovou purpurovou (CREA). Naočkované platne boli inkubované 5 dní pri teplote 25°C.

Z izolátov prvotne identifikovaných ako *Penicillium* spp. sa izolovala DNA pomocou E.Z.N.A.[®] Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, USA). Takto získaná DNA bola podrobená meraniu čistoty a koncentrácie na BioSpec nanometer spektrofotometer (SHIMADZU, Rakúsko).

Izoláty mikromycét boli následne identifikované metódou PCR podľa Pedersena a kol. (1997) za použitia FIREpol[®] Master Mix (Ecoli s.r.o., SR) a špecifických primerov: ITS 212d (AAATATAAATTATTTAAACTTTC) a ITS 549 (CTGGATAAAAATTTGGGTG), navrhnutých na základe sekvencií ITS oblasti a 5.8S rRNA z *Penicillium* spp. dostupných v databáze GenBank-European Molecular Biology Laboratory (GenBank-EMBL). Amplifikovaný špecifický PCR produkt (336 bp) v množstve 5 µl bol analyzovaný v 1,5 % agarózovom géli v TBE (Tris-borát-EDTA) tlmivom roztoku. Do agarózového gélu sa kvôli vizualizácii DNA pridávala Gel[™] Red (Biotium Inc., USA). Po nanosení produktov do agarózového gélu prebiehala elektroforéza približne 1 hodinu pri 120 V a následne boli jednotlivé produkty vizualizované pomocou readeru Mini Bis Pro[®] (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael). Získané PCR produkty boli podrobené sekvenovaniu (GATC Biotech AG, Nemecko) a jednotlivé sekvencie porovnané so sekvenciami v databáze NCBI GenBank.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením slepačích vajec sa získalo spolu 233 izolátov mikromycét, z ktorých 87 bolo na základe makroskopických a mikroskopických znakov a jednoduchou PCR metódou zaradených do rodu *Penicillium*.

Typickými makroskopickými znakmi *Penicillium* spp. na diagnostických pôdach je tvorba kolónií spočiatku bielej farby, potom prechádza do modrozelenej, sivozelenej, olivovozelenej, prípadne žltej a ružovej. Kolónie sú ploché, vláknité, zamatové až plsténé s častým výskytom kvapôčok farebného alebo hyalinného exudátu. Na kolóniách môže byť prítomné ryhovanie smerom od stredu a biely okrajový lem. Spodná strana kolónií je bledá, krémová až žltá, žltá až hnedá alebo červená.

Charakteristickými mikroskopickými znakmi *Penicillium* spp. sú konidiofóry tvorené stopkou s hladkými, drsnými alebo bradavičnatými stenami a vetvenou časťou penicillus. Stopka je niekedy zakončená vezikulom a zo stopky vyrastajú vetvy a metuly cylindrického tvaru s hladkou stenou. Vetvenie môže byť monoverticilatné, biverticilatné, terverticilatné alebo quaterverticilatné, zakončené fialidami ampuliformného alebo acerózneho tvaru. Spóry sú malé guľaté až oválne, vytvárajú reťazce.

Izoláty mikromycét zaradené do *Penicillium* spp. boli podrobené kreatínovej skúške, ktorou sa potvrdila schopnosť niektorých druhov *Penicillium* spp. metabolizovať kreatín. Pozitívna reakcia bola zaznamenaná u 48 izolátov, negatívna u 9 izolátov. U 30 izolátov nebol preukázaný na CREA žiaden rast (viď. Tabuľka 1).

Tab. 2 Kreatínová skúška

| Reakcia | +++ | ++ | + | - | Žiaden rast |
|----------------|-----|----|----|---|-------------|
| Počet izolátov | 17 | 18 | 13 | 9 | 30 |

Produkcia kyseliny cyklopiazónovej a iných alkaloidov bola potvrdená Ehrlichovým činidlom za vzniku farebných prstencov na filtračnom papieri. Ako znázorňuje Tabuľka 2, produkcia kyseliny cyklopiazónovej bola potvrdená u 13 izolátov, produkcia iných alkaloidov u 20 izolátov.

Tab. 3 Ehrlichov test

| Reakcia | Fialový prstenec | Červený prstenec | Žltý prstenec | Žiaden prstenec |
|----------------|------------------|------------------|---------------|-----------------|
| Počet izolátov | 13 | 11 | 9 | 54 |

Na základe týchto výsledkov a následnou sekvenáciou (GATC Biotech AG, Nemecko) bolo 6 izolátov identifikovaných ako *Penicillium chrysogenum*.

Pre presnú identifikáciu ďalších izolátov je potrebné vykonať ďalšie skúšky. Cieľom tejto štúdie je identifikovať hlavne toxínogénne druhy, ktoré môžu predstavovať zdravotné riziko z pohľadu produkcie rôznych druhov mykotoxínov a ďalších sekundárnych metabolitov.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0705/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Al-Obaidi F A, Al-Shadeedi S M J, Al-Dalawi R H. Quality, chemical and microbial characteristics of table eggs at retail stores in Baghdad. *Inter. J. Poultry. Sci.* 2011;10:5:381-385.
- Brown G D, Denning D W, Gow N A, Levitz S M, Netea M G, White T C. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4:165rv13.
- Frisvad J C, Samson R A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology.* 2004; 49:1-174.
- Krska R, Schubert-Ullrich P, Molinelli A, Sulyok M, MacDonald S, Crews C. Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess.* 2008; 25:2:152-163.
- Mansour A F A, Zayed A F, Basha O A A. Contamination of the shell and internal content of table eggs with some pathogens during different storage periods. *Assiut. Vet. Med. J.* 2015; 61:146:8-15.
- Pedersen H, Valentin-Hansen P. Protein-induced fit: the CRP activator protein changes sequence-specific DNA recognition by the CytR repressor, a highly flexible LacI member. *The EMBO Journal.* 1997; 16:8:2108-2118.
- Perez-Nadales E, Nogueira M D, Baldwin C, Castanheira S, El Ghalid M, Grund E. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 2014; 70:42-67.
- Rodríguez A, Rodríguez M, Anreade M J, Córdoba J J. Detection of filamentous fungi in foods. *Curr. Opin. Food. Sci.* 2015; 5:36-42.
- Rundberget T, Skaar I, Flaoyen A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 90:2:181-188.
- Samson R A, Houbraken J, Thrane U, Frisvad J C, Andersen B. Food and indoor fungi. CBS KNAW Biodiversity Centre, Utrecht. 2010. 390 p.
- STN ISO 21527-1: Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Časť 1: Metóda počítania kolónií vo výrobkoch s aktivitou vody väčšou ako 0,95.
- STN ISO 21527-2: Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Časť 2: Metóda počítania kolónií vo výrobkoch s aktivitou vody menšou ako 0,95 alebo rovnajúcou sa 0,95.
- Storey E, Dangman K H, Schenck P, DeBernardo R L, Yang C S, Bracker A, Hodgson M J. Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. University of Connecticut Health Center, Farmington, 2004; 58 p.

FLAVONOLIGNAN SILYBÍN A/B V ADJUVANTNEJ LIEČBE ALBENDAZOLOM PRI TERAPII MYŠÍ NA MODELOVEJ INFEKЦИИ PARAZITOM *MESOCESTOIDES VOGAE*

Faixová D.¹, Hrčková G.², Mačák Kubašková T.², Mudroňová D.¹, Biedermann D.³

¹ Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 040 01 Košice, Slovensko

² Parazitologický Ústav, Slovenská akadémia vied, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovensko

³ Ústav mikrobiológie, Česká akadémia vied, Vídeňská 1083, Praha 4-Krč, 142 20, Česká republika

ABSTRAKT

Silybin A/B sú flavonolignaný najviac zastúpené v silymaríne, ktorý je izolovaný z rastliny *Silybum marianum* s dokázanými hepatoprotektívnymi, antioxidantnými, imunomodulačnými a protinádorovými účinkami. V práci prezentujeme výsledky *in vivo* štúdií, v ktorých sme sledovali farmakologické a imunomodulačné účinky silybinu (SB) samotného a v kombinácii s antihelmintikom albendazol na modelovej parazitickej infekcii myši. V experimente boli použité myši kmeňa Balb/c, ktoré boli infikované larvami pásomnice *Mesocestoides vogae* a od 14. dňa po infekcii a po dobu 15 dní boli liečené uvedenými látkami buď samostatne alebo v kombinácii. Sledovali sme jednak účinnosť liečby v pečeni a v peritoneálnej dutine, kde bola liečba účinnejšia u samíc v porovnaní so samcami. Súčasne sme sledovali vybrané humorálne a celulárne imunologické parametre, ktoré ukázali, že silybin mal významné antioxidantné účinky v peritoneálnych exudátových bunkách myši a súčasne došlo aj k stimulácii fagocytárnej aktivity v krvi. Naše výsledky ukazujú, že terapia vysokými dávkami silybinu nemá významné larvicídne účinky, avšak dokáže redukovať oxidačný stres a pozitívne ovplyvniť proporcie a funkcie buniek vrodenej a adaptívnej imunity počas infekcie. Doplnková terapia silybinom k antihelmintiku albendazolu sa javí ako vhodnejšia terapeutická alternatíva vďaka imunomodulačným a cytoprotektívnym účinkom silybinu.

ÚVOD

Plody *Silybum marianum* sa používali už vyše 2000 rokov na liečbu širokého spektra ochorení pečene a žlčníka a na prevenciu poškodenia pečene pri otravách rôznymi chemickými a prírodnými toxínmi (uštipnutia hadov, poštípacia hmyzom, otravy hubami, prípadne alkoholom). Táto liečivá rastlina sa používa už od staroveku. Theoprastus (4. storočie pred Kristom) bol pravdepodobne prvý, ktorý popísal túto rastlinu pod názvom „Pternix“ a neskôr ju spomenuli Dioskurides s Pliniom v práci „Materia Medica“ (1. storočie po Kristovi) (Morazzoni a kol. 1995). Hlavná zložka *Silybum marianum* je silymarín – štandardizovaný extrakt získaný zo semien, ktorý obsahuje približne 70 – 80 % silymarínových flavonolignanov a približne 20 – 30 % chemicky nedefinovaných frakcií, najmä polyfenolové zložky. Hlavná zložka silymarínového komplexu je silybin. Okrem silybinu, ktorý je zmesou dvoch diastereoizomérov – A a B, približne v pomere 1:1, je silymarínový komplex tvorený značným množstvom iných flavonolignanov – isosilybinom, dehydrosilybinom, silychristinom, silydianinom a flavonoidmi, hlavne taxifolínom (Sobolová a kol. 2006). Polyfenolové zložky silymarínového komplexu sú podľa všetkého nie veľmi dobre absorbovateľné v intestinálnom trakte, avšak majú rozdielne účinky ako monomerné flavanolignány. Typické použitie tejto rastliny je najmä pri liečbe ochorení pečene a gastrointestinálneho traktu. Okrem týchto vlastností sa sledovali účinky silybinu a silymarínu aj pri iných závažných ochoreniach a boli dokázané aj protirakovinové, chemoprotektívne, hypocholesterolemické, kardioprotektívne, neuroaktívne a neuroprotektívne vlastnosti (Gažák a kol. 2007). Albendazol je širokospektrálne antihelmintikum, ktoré ako jediné účinkuje proti všetkým vývojovým štádiám helmintov (vajíčkam, larvám aj dospelým jedincom). Pravdepodobný mechanizmus účinku tejto látky je

degenerácia mikrotubulov črevných buniek. Metabolizuje sa v pečeni na aktívny metabolit albendazol sulfoxid a vylučuje sa žlčou. Eliminačný polčas je 7 – 12 hodín. Nežiaduce účinky zahŕňajú bolesť hlavy, závraty, meningeálne príznaky a horúčku a pri dlhodobom podávaní sa môže vyskytnúť reverzibilná alopecia. Z gastrointestinálnych nežiaducich účinkov sa popisujú nauzea, zvracanie a abnormálne pečenné testy. Zriedkavo sa vyskytuje leukopénia, pancytopénia a agranulóza (Lincová a kol. 2007). Larválne štádiá vybraných druhov medicínsky a veterinárne významných pásomnic sú schopné nepohlavného rozmnožovania v tkanivách hostiteľa, kde vyvolávajú závažné ochorenia, napríklad alveolárnu echinokokózu. Kvôli asymptomatickému priebehu v skorých štádiách sa s liečbou začne v štádiu, keď je liečba antihelmintikami zdĺhavá a často len parazitostatická, preto sa hľadajú alternatívne spôsoby na zvýšenie jej účinkov a redukciu patologických prejavov ochorenia. Z týchto dôvodov bolo cieľom práce sledovať farmakologické a imunomodulačné účinky aplikácie samotného silybínu a jeho kombinácie s albendazolom u myši infikovaných larvami pásomnice *Mesocestoides vogae*.

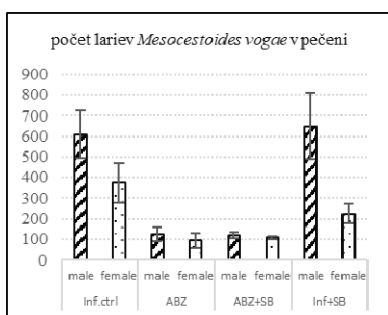
MATERIÁL A METODIKA

Sledovali sme účinok flavonolignan silybínu A/B (SB) na parazitárnu infekciu vyvolanú pásomnicou *Mesocestoides vogae* u Balb/c myši, ktoré boli sondou perorálne infikované larvami. Myši boli rozdelené do 4 terapeutických skupín podľa spôsobu liečby, a to (1) kontrolná neliečená skupina, (2) skupina liečená albendazolom (15 mg/kg), (3) skupina liečená samotným silybínom (200 mg/kg) a (4) skupina liečená kombináciou albendazolu a silybínu. Piatu skupinu tvorili zdravé myši, ktorým bol podávaný silybín. Každá skupina bola tvorená troma samicami a troma samcami. Terapia začala od 14. dňa po infekcii a trvala po dobu 15 dní. Účinok liečby sa sledoval nasledujúci deň po skončení liečby (30. deň po infekcii), kedy boli zvieratá usmrtené a bol izolovaný nasledovný biologický materiál: larvy z peritoneálnej dutiny a pečene, krv, peritoneálne exudátové bunky a lymfatické uzliny, a slezina. Larvy z pečene boli izolované po ich uvoľnení z tkaniva po natrávení trypsínom. Larvy boli spočítané po resuspendovaní v agare a ich počty sme porovnali medzi terapeutickými skupinami a aj v rámci oboch pohlaví myši. Boli izolované bunky slezín myši (kultivácia: 70 h pri 37 °C, 5 % CO₂ v kompletnom RPMI médiu), u ktorých sme zisťovali účinok látok na proliferáciu T-lymfocytov a produkciu cytokínov (IL-4, IL-10 a IFN- γ) v supernatantoch splenocytov. Následne sme stanovili index proliferácie aktivity nestimulovaných a Con-A stimulovaných splenocytov pomocou Brdu ELISA kolorimetrického testu. Pomocou prietokovej cytometrie sme v izolovaných peritoneálnych exudátových bunkách sledovali oxidatívny stres a aktivitu fagocytov. Na stanovenie produkcie cytokínov sme použili ELISA kity. Výsledky boli hodnotené v štatistickom programe GraphPad Prism.

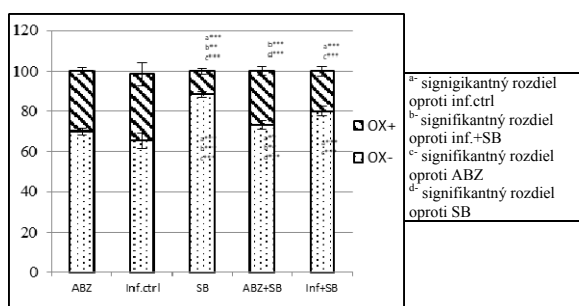
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V experimente na myšiach oboch pohlaví infikovaných týmto parazitom sme sledovali účinok liečby samotným albendazolom (štandardné antihelmintikum), silybínom alebo ich kombináciou. U samíc infikovaných myši sme zistili nižší počet lariev *Mesocestoides vogae* v peritoneálnej dutine a v pečeni ako u samcov a terapia vysokými dávkami silybínu významne neovplyvnila účinok albendazolu v porovnaní s terapeutickou skupinou, ktorej bola podaná liečba iba albendazolom (graf č.1). V práci Velebný a kol. (2010) sa overoval účinok silymarínu v dávke 35 mg/kg v kombinovanej liečbe s antihelmintikom praziquantel na tú istú modelovú infekciu a zistilo sa, že uvedená dávka prispela k významnému zníženiu infekcie. V našej štúdii silybín podávaný infikovaným myšiam samotne alebo ako adjuvant vykazoval signifikantné imunomodulačné účinky. Zistili sme, že silybín znižuje proliferáciu index T-lymfocytov stimulovaných Con A a albendazol ho naopak zvyšuje (Graf č. 3).

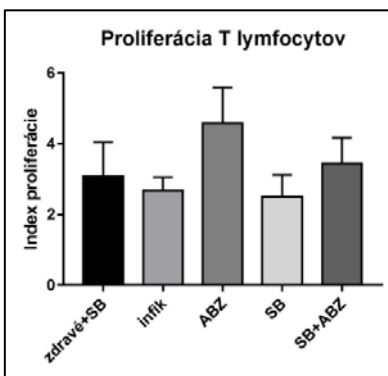
Počas infekcie larvami *M. vogue* v peritoneálnej dutine myši úmerne s narastajúcim počtom lariev v dôsledku ich proliferácie narastá aj počet peritoneálnych buniek, pričom sa zvyšuje najmä zastúpenie myeloidných buniek v neprospech lymfoidných, ktorých funkcie sú navyše potlačené pôsobením sekrečných antigénov lariev (Vendeľová a kol. 2015). Fagocytárna aktivita bola u týchto buniek znižovaná od 14. dňa po infekcii čo súviselo s ovplyvnením Fc receptorov na týchto bunkách (Hrčková a kol., 2016). V našej práci sme zistili, že v skupine kde bol aplikovaný silybín v kombinácii s albendazolom bol index fagocytárnej aktivity vyjadrujúci pohlcovaciu kapacitu fagocytov signifikantne zvýšený v porovnaní s myšami ošetrovanými len albendazolom, ako aj s neošetrovanou infikovanou kontrolou (Graf č. 4). Dôležitým zistením bola signifikantná redukcia oxidatívneho stresu v peritoneálnych bunkách u myši ošetrovaných silybínom. Z našich výsledkov vyplýva, že terapia vysokými dávkami samotného silybínu nemá larvicídny účinok, avšak redukuje oxidatívny stres a produkciu reaktívnych molekúl kyslíka imunitnými bunkami, čo pravdepodobne ovplyvnilo proliferáciu lariev. Vďaka imunomodulačným a cytoprotektívnym vlastnostiam flavonolignan silybínu sa adjuvantná terapia albendazolom so silybínom môže pokladať za vhodnú alternatívu klasickej monoterapie.



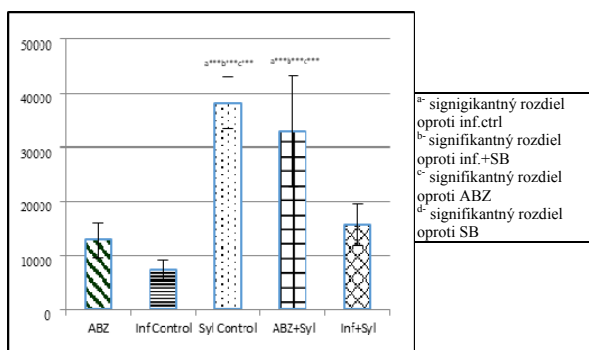
Graf č. 1 Počet lariev *M.vogae* v pečeni



Graf č. 2 Oxidatívny stres



Graf č. 3 Index proliferácie lymfocytov stimulovaných konkavalínom A
Index proliferácie u zdravých Balb/c myši je 4.5±1.2.



Graf č. 4 Fagocytárny index

Štúdie boli financované z projektov VEGA č. 2/0091/17 a bilaterálneho mobilného projektu SAV-AV ČR č. 16-13.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Morazzoni, P.; Bombardelli, E. *Fitoterapia*, 1995, 64, 3.
 Sobolová, L.; Škottová, N.; Věčeřa, R.; Urbánek, K. *Pharmacol. Res.*, 2006, vol.53, 104.
 Gažák, R.; Walterová, D.; Křen, V. *Current Medicinal Chemistry*, 2007, vol.14, 315-338.
 Lincová, D.; Farghali H.; a kol. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2007, vol.672, 538.
 Velebný S., Hrčková, G. a kol. *Parasitology International*, 2010, vol.59, 524-531.
 Vendeľová, E. a kol. *Parasite Immunology*, 2015, vol. 37, 493-504.
 Hrčková a kol. *Helminthologia*, 2016, vol. 53, 3-13.

NOVÁ METÓDA NA KVANTIFIKÁCIU ZACHOVANÉHO TKANIVA PO TRAUME MIECHY S OPTIMÁLNOU REPRODUKCIOU

Fedorova J. Pavel J.

Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum, SAV, Košice

ABSTRAKT

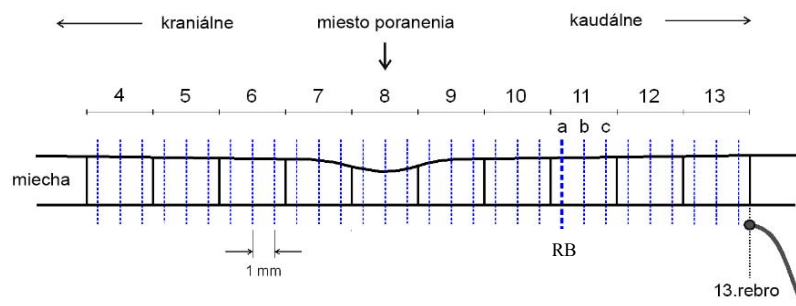
Traumatické poranenie miechy predstavuje závažný klinický problém, na ktorý doposiaľ neexistuje efektívna a akceptovaná terapia. Po primárnom mechanickom poranení tkaniva sa poškodenie kontinuálne rozvíja v sekundárnej fáze, čím dochádza k značnej atrofii nervového tkaniva v mieste lézie. Pre optimálnu kvantifikáciu zachovaného tkaniva miechy v kranio-kaudálnom smere iba meranie plochy nie je postačujúce a je potrebné zohľadniť práve výraznú objemovú stratu tkaniva v epicentre poranenia. Správna determinácia rozsahu poškodenia je pritom kľúčovým aspektom pre posúdenie prípadného terapeutického efektu. Cieľom našej práce bolo preto navrhnúť metódu vhodnú na takúto kvantifikáciu tkaniva, a to stanovením korekčných faktorov pozdĺž miechy potkana. Týmto spôsobom je možné prepočítať zachované tkanivo vyjadrené ako percento z celkovej plochy, ktoré zároveň zohľadňuje prítomnosť vytvorených kavít a cýst na predpovedanú oblasť pred poškodením miechy. Takýto prístup kombinovaný so semi-automatickou analýzou pomocou NIH ImageJ softvéru, tak predstavuje rýchlu a spoľahlivú metódu vhodnú pre optimálnu kranio-kaudálnu histologickú kvantifikáciu rozsahu poškodenia po kompresnom poranení miechy.

ÚVOD

Traumatické poranenie miechy (TPM) zapríčiňuje mnohé závažné neurologické deficity, ktoré celoživotne v negatívnej miere ovplyvňujú fyzické a psychické zdravie postihnutých pacientov. Primárny mechanický inzult priamo poškodzuje nervové bunky v oblasti traumy a zároveň iniciuje komplexnú kaskádu autodeštruktívnych procesov vedúcu k bunkovej smrti ďalších neurónov a gliových buniek, a tým k výraznej strate tkaniva. Primárne poškodenie sa tak kontinuálne rozvíja a finálny neurologický deficit je možné stanoviť až niekoľko týždňov po traumatickej udalosti, pričom strata neurologickej funkcie závisí od rozsahu poškodenia daného spinálneho segmentu. Aj napriek enormnej snahe doposiaľ neexistuje klinicky akceptovaná terapia, ktorá by prinavrátila pacientom stratené neurologické funkcie. Práve správna determinácia straty resp. zachovania nervového tkaniva po traume miechy je rozhodujúcim krokom pre vhodné stanovenie miery prípadného terapeutického účinku. Po počiatočnom edéme miechy však dochádza v mieste poranenia k výraznej atrofii tkaniva, čo značne sťažuje jeho správnu kvantifikáciu. Cieľom našej práce bolo preto navrhnúť metódu, ktorá zohľadňuje túto objemovú stratu v epicentre poranenia a zároveň ponúka rýchle, objektívne a dobre reprodukovateľné meranie rozsahu zachovania tkaniva po traume miechy.

MATERIÁL A METODIKA

V experimentoch sme použili dospelé potkany kmeňa Wistar (♀) s hmotnosťou od 230-300g. Experimentálne zvieratá sme náhodne rozdelili do štyroch skupín: (1) kontrolné zvieratá určené na predikciu plochy intaktnej miechy (n=6), (2) 30g kompresia trvajúca 15 min (n=12), (3) 40g kompresia trvajúca 15 min (n=12), (4) 50g kompresia trvajúca 15 min (n=12). Kontrolným intaktným zvieratám sme odobrali tkanivo (podľa Obr.1) a pripravené 25 µm priečne rezy ofarbili štandardným histologickým farbením Luxol fast blue a Cresyl violet. Ofarbené rezy miechy sme následne použili na stanovenie korekčných faktorov, a to modifikovanou metódou Olbyho a Blakemora (1996). Na základe kranio-kaudálneho rozsahu kompresného poškodenia, sme vybrali referenčný bod – 11a definovaný ako najbližší kaudálny región miechy, ktorý už nie je zasiahnutý poškodením.

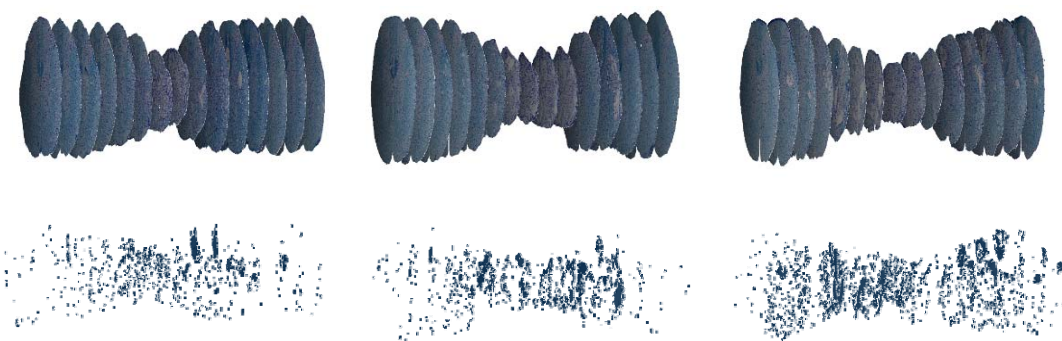


Obr. 1 Schéma odberu tkaniva miechy

Korekčné faktory pre jednotlivé regióny sme potom stanovili porovnaním plochy priečných rezov pozdĺž miechy s referenčným bodom. Zvieratám v skupine 2 až 4 sme kompresné poranenie navodili aplikovaním impaktora (priemer 2,5 mm) umiestneného na konci zaťaženej kompresnej tyče priamo na obnažený spinálny segment v oblasti Th9-10 po dobu 15 minút. Po 28 dňoch sme zvieratám odobrali identickú časť miechy, ktorá obsahovala ako spinálny segment vystavený kompresii tak aj jeho príslušné oblasti v kranialnom a kaudálnom smere a spracovali rovnakým spôsobom ako tkanivo intaktných zvierat. Kompaktnosť nervového tkaniva a rozsah poškodenia sme analyzovali v programe NIH ImageJ 1.51. Po kalibrácii mierky, sme digitálny RGB obraz miechy premenili na 8-bitový s intenzitou šedej od 0 do 255. Následne sme obraz previedli do čierno-bielej škály použitím Huangovho treshlodu, ktorý nám poskytol spoľahlivé oddelenie zafarbenej časti miechy a pozadia a odmerali plochu. Okrem toho sme kvantifikovali množstvo kavít s veľkosťou od 200 μm^2 , a to metódou invertovaného digitálneho obrazu miechy. Dáta o zachovanom tkanive každého zvierat'a sme prerátali s vopred stanovenými korekčnými faktormi podľa vzorca:

$$\% \text{ zachovaného tkaniva} = \frac{\text{odmeraná plocha miechy (mm}^2\text{)}}{\text{predpokladaná plocha intaktnej miechy (mm}^2\text{)}} \times 100$$

Získané výsledky sme vyjadrili ako priemer všetkých zvierat v skupine \pm SEM.

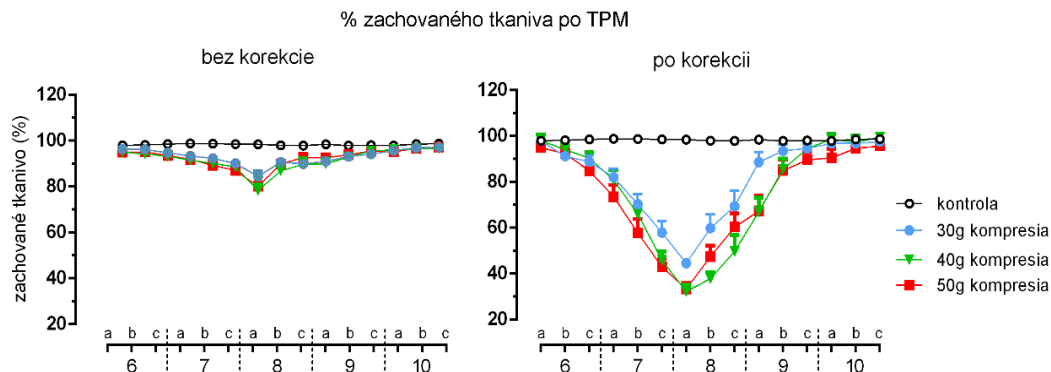


Obr. 2 Histopatologický progres poškodenia nervového tkaniva 28 dní po kompresnom poranení miechy

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Patofyziológia poškodenia sa rozvíja nástupom sekundárnych autodeštruktívnych mechanizmov, ktoré oblasť trauma zreteľne zväčšia a sú zodpovedné za atrofiu tkaniva a progresívny vznik centrálnych cýst a kavít (Silva a kol., 2014). Po 28 dňoch od kompresie sme v epicentre poranenia pozorovali u zvierat očakávanú výraznú tkanivovú stratu, ktorá bola zároveň závislá od sily indukovanej kompresie (Obr.2). Krania-kaudálny rozsah poškodenia po kompresii predstavoval 10mm–11mm–13mm/30g-40g-50g. Neurologický deficit pritom závisel na množstve zachovaného tkaniva v epicentre lézie (hodnota BBB skóre

predstavovala 10,4-8,8-8,1/30g-40g-50g). Prítomnosť kavít väčších ako 200 μm^2 sme pozorovali najmä kaudálnym smerom od miesta poškodenia, čo svedčí o prebiehajúcej demyelinizácii a degenerácii tkaniva. Región 11a zvolený ako referenčný bod pre stanovenie korekčných faktorov však už nevykazoval známky poškodenia a množstvo kavít a rovnako percento zachovanej plochy v ňom bolo u všetkých skupín porovnateľné s kontrolnými hodnotami.



Obr. 3 Zachované tkanivo miechy 28 dní po traume pred a po korekcií

Kvantifikácia nervového tkaniva bez použitia korekcie preukázala vo všetkých skupinách zvierat hodnoty vyššie ako 80% zachovaného tkaniva v epicentre, čo výrazne skresľuje reálny obraz poškodenia. Po zohľadnení objemovej straty a prerátaní získaných výsledkov so stanovenými korekčnými faktormi sme pozorovali výrazný rozdiel, a to 44%-33%-32% zachovaného tkaniva/ 30g-40g-50g (Obr.3). Semi-automatická analýza prostredníctvom NIH ImageJ softvéru pritom umožňuje štandardné meranie plochy, ktoré nie je ovplyvnené subjektívnou selekciou a pritom zohľadňuje množstvo kavít a cýst v kranio-kaudálnom rozsahu. Naša metóda teda ponúka rýchlu, objektívnu a optimálnu kvantifikáciu zachovaného tkaniva po traume miechy, ktorá zodpovedá reálnemu poškodeniu v epicentre lézie.

Práca bola podporená grantom VEGA č. 2/0160/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Olby, N.J., Blakemore, W.F. A new method of quantifying the extent of tissue loss following spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol.* 1996; 138: 82-92.
- Silva, N.A., Sousa N., Reis R.L., Salgado A.J. From basics to clinical: A comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2014; 144:25-57.

DETEKCIA GLAUKÓMU ZO SLZNEJ TEKUTINY

Glinská G., Krajčíková K., Tomečková V.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

ABSTRAKT

Slzy nie sú bežne používaným klinicko-biochemickým analytom, ale predstavujú zaujímavú biologickú tekutinu, s veľmi malým objemom, ale pozoruhodným zložením. V našej práci sme skúmali slznú tekutinu metódou fluorescenčnej analýzy. Výsledky ukázali významné rozdiely v štruktúre slznej tekutiny zdravých jedincov v porovnaní so slznou tekutinou pacientov s vysokým vnútroočným tlakom a rôznym typom glaukómu.

ÚVOD

Primárny glaukóm s otvoreným uhlom (PGOU), je jednou z hlavných príčin slepoty na celom svete (Agnifili a kol., 2015). Glaukóm je definovaný ako progresívna neuropatia zrkovitého nervu. Hlavným rizikovým faktorom je vysoký očný tlak, ale presná patogenéza je stále nejasná. *Ex vitro* štúdie na ľudských donorských očiach ukázali v sietnici pacientov s glaukómom histopatologické ukladanie imunoglobulínov (Tezel, 2013). Tieto protilátky pravdepodobne sprostredkujú poškodenie gangliových buniek sietnice. Dôležitými faktormi v patogenéze ochorenia sú skleróza trabekula, ktorá je spojená so zmenami molekulového zloženia komorovej tekutiny (Azkargorta, 2016). S cieľom objasniť patofyziológiu glaukómu pacientov s PGOU sa vykonali viaceré proteomické analýzy ich slznej tekutiny. Výsledky ukázali zmeny interakcie proteínov podieľajúcich sa na zápalovej reakcii aj medzibunkovej signalizácii (Hagan, 2016; Di Venere, 2018). Glaukóm je v počiatočných štádiách asymptomatický. Diagnostika glaukómu zahŕňa meranie vnútroočného tlaku pomocou tonometrie, vyšetrenia optického nervu oftalmoskopicky, prípadne optickou koherentnou tomografiou, testu zorného poľa s použitím perimetrie, vyšetrenie uhla prednej komory pomocou gonioskopie a meranie hrúbky rohovky pomocou pachymetrie. Tieto techniky dokážu detekovať glaukóm až v pokročilom štádiu. Novším prístupom je elektroretinogram, ktorý môže merať funkciu časti sietnice v počiatočnom štádiu glaukómu (Patangay a kol., 2018) a optická tomografická angiografia, ktorá porovnáva rozdiely medzi zorným poľom a hustotou ciev peripapilárnej oblasti (Yarmohammadi a kol., 2017). Ďalším novším parametrom je meranie hysterézie rohovky, ktorá koreluje s vnútroočným tlakom, progresiou straty zorného poľa a poškodením zrkovitého nervu (Deol a kol., 2015). Slzy ako jedna z ľudských telesných tekutín predstavujú vodnú zmes proteínov, mucínov, lipidov, sacharidov, hormónov, neurotransmitterov, elektrolytov a ďalších látok. Proteínové aj lipidové biomarkery sú intenzívne študované mnohými technikami, z ktorých každá má svoje výhody aj nevýhody. V našej práci sme skúmali slznú tekutinu pacientov s vysokým vnútroočným tlakom a rôznym typom glaukómu pomocou metódou fluorescenčnej analýzy.

MATERIÁL A METODIKA

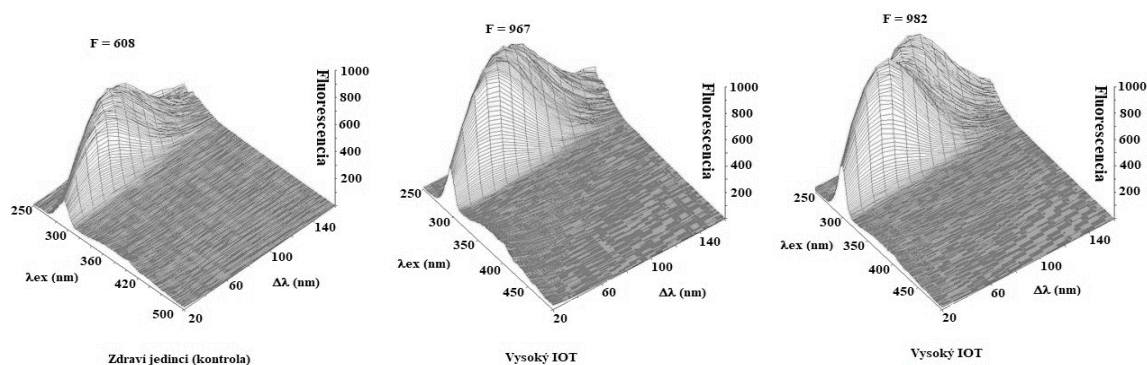
Slzná tekutina bola odobratá metódou výplachu (z ľavého oka a z pravého oka samostatne) fyziologickým roztokom. Roztok ($V = 100 \mu\text{l}$) bol pridaný do spojovkového vaku ľavého oka (rovnaký postup bol opakovaný pri zbere slznej tekutiny z pravého oka). Následne bol obsah slznej tekutiny ihneď odsatý použitím 100 mikrolitrovej mikropipety a uložený v plastových skúmavkách ($V = 200 \mu\text{l}$), ktoré boli zmrazené a uskladnené pri $t = -80^\circ \text{C}$ až do merania.

Synchronný fluorescenčný fingerprint (SFF) meria v slznej tekutine celkovú fluorescenciu všetkých endogénnych fluorofórov. Intenzita celkovej endogénnej fluorescencie jednotlivých vzoriek slznej tekutiny bola analyzovaná v kyvete ($500 \mu\text{l}$) pomocou metódy SFF na prístroji Perkin Elmer luminiscenčnom spektrofotometri LS 55 pri laboratórnej teplote $t = 25^\circ \text{C}$.

Desať jednoduchých synchronných spektier slznej tekutiny sa meralo pri rôznych excitačných vlnových dĺžkach v rozsahu $\lambda_{ex} = 200-390$ nm. Výsledný 3-D fluorescenčný synchronný SFF bol spracovaný pomocou softvéru WinLab (verzia 4, 2001).

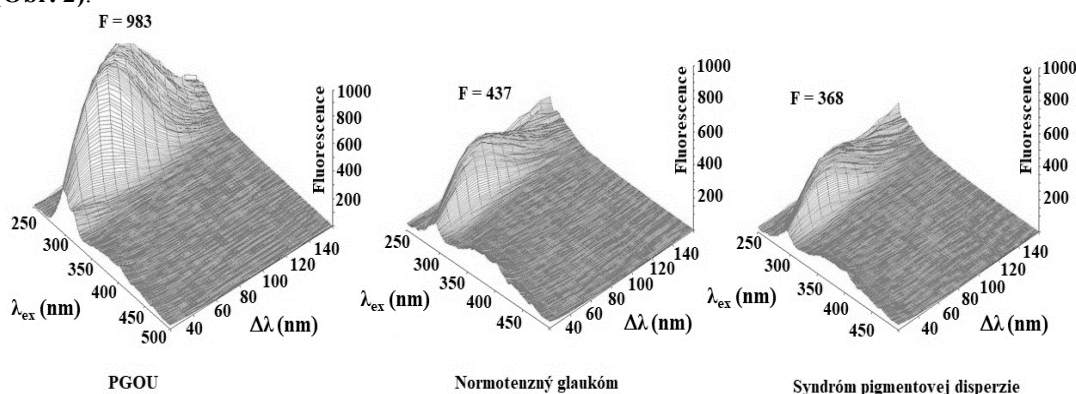
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Synchronný fluorescenčný fingerprint definuje slznú tekutinu komplexne ako multifluorescenčnú zmes a považuje sa za charakteristický odtlačok prsta zdravých jedincov, ale umožňuje aj analýzu slznej tekutiny ako zmesi u pacientov s glaukómom. Celková kvalitatívna a kvantitatívna zmena jednotlivých zložiek v komplexe slznej tekutiny má informačnú hodnotu, ktorá sa prejaví na zobrazení trojdimenzionálneho fluorescenčného synchronného fingerprintu v charakteristicky určených oblastiach vlnovej dĺžky, usporiadaného z jednotlivých jednoduchých synchronných spektier, ktoré majú rôznu intenzitu fluorescencie umiestnených pri špecifických excitačných vlnových dĺžkach. V prvej skupine (Obr. 1) sme porovnávali dvoch rôznych pacientov s vyšším vnútroočným tlakom s kontrolnou vzorkou. V slznej tekutine pacientov s vyšším vnútroočným tlakom bol detekovaný jeden pík ($F = 967$, $\lambda_{ex} = 277$ nm/ $\Delta\lambda = 70$ nm), iný pacient s vysokým vnútroočným tlakom mal pík ($F = 982$, $\lambda_{ex} = 293$ nm/ $\Delta\lambda = 60$ nm), ale obaja mali vyššiu intenzitu endogénnej fluorescencie ako v slznej tekutine zdravých subjektov ($F = 608$, $\lambda_{ex} = 278$ nm/ $\Delta\lambda = 70$ nm).



Obr. 1 Porovnanie SFF slznej tekutiny pacientov s vysokým vnútroočným tlakom (IOT) a zdravých jedincov.

V druhej skupine sme porovnávali pacientov s rôznym typom glaukómu: primárny glaukóm s otvoreným uhlom (PGOU), normotenzným glaukómom a syndrómom pigmentovej disperzie. Porovnanie intenzity fluorescencie slz pacientov s rôznym typom glaukómu ukázalo rozdiely (Obr. 2).



Obr. 2 Porovnanie SFF slznej tekutiny pacientov s rôznym typom glaukómu.

Najvyššiu fluorescenciu mali slzy pacientov s PGOU ($F = 983$, $\lambda_{\text{ex}} = 283 \text{ nm}$ / $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$). Nižšiu fluorescenciu mali slzy pacientov s normotenzným glaukómom ($F = 437$, $\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$ / $\Delta\lambda = 70 \text{ nm}$). Slzy pacientov so syndrómom pigmentovej disperzie vykazovali najnižšiu fluorescenciu ($F = 368$).

Podrobná analýza SFF nie je pre diagnostiku nevyhnutná. Jednoduché porovnanie výsledkov môže potvrdiť zmeny fluorofórov v slznej tekutine po zvýšení vnútroočného tlaku u pacientov s glaukómom a zdravých. Výsledkom rôznych typov glaukómu je modifikované grafické zobrazenie SFF ako výsledok narušenia rovnováhy vzájomných interakcií fluorofórov v slznej tekutine. Umiestnenie píku a celkovej intenzity fluorescencie môže byť odlišné a zmenené. Naše výsledky ukázali významné rozdiely v štruktúre slznej tekutiny zdravých jedincov v porovnaní so slznou tekutinou pacientov s vysokým IOT a rôznym typom glaukómu. Fluorescenčné profily SFF slznej tekutiny zdravých pacientov a pacientov s glaukómom sú úzko spojené s konkrétnymi biochemickými, prípadne patologickými zmenami, ktoré sa prejavajú ako kvantitatívna informácia v zmenenej štruktúre slznej tekutiny, ktorá je charakteristická pre dané ochorenie. Fluorescenčná spektroskopia sa zatiaľ na výskum glaukómu zo slznej tekutiny nepoužívala. Tieto výsledky naznačujú možné využitie slznej tekutiny na skrining rôznych typov glaukómov a fluorescenčnej analýzy ako lacného, nového, citlivého, neinvazívneho, včasného a rýchleho diagnostického nástroja glaukómu.

Práca bola finančne podporená grantom vvgS-2018-747.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Agnifili L, Pieragostino D, Mastropasqua A, Fasanella V, Brescia L, Tosi GM, Sacchetta P, Mastropasqua L. Molecular biomarkers in primary open-angle glaucoma: from noninvasive to invasive. *Prog Brain Res.* 2015; 221:1-32.
- Azkargorta M, Soria J, Acera A, Iloro I, Suarez T, Elortza F. Human tear proteomics and peptidomics in ophthalmology: Toward the translation of proteomic biomarkers into clinical practice. *J Proteomics.* 2016 May 13.
- Deol M, Taylor DA, Radcliffe NM. Corneal hysteresis and its relevance to glaucoma. *Current Opinion in Ophthalmology.* 2015;26:96-102
- Di Venere M., Vigiolo S., Caqnone M., Bardoni A., Salvini R., Iadarola P. Advances in the analysis of "less-conventional" human body fluids: An overview of the CE- and HPLC-MS applications in the years 2015-2017. *Electrophoresis,* 2018 Jan ;39(1):160-178.
- Hagan S., Martin E., Enriquez-de-Salamanca A. Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J.* 2016 Jul 13;7:15
- Patangay S, Derafshi Z, Vajaranant TS, Park JC, Ghahari E, McAnany JJ, Hetling JR. Three Dimensional Stimulus Source for Pattern Electroretinography in Mid- and Far-peripheral Retina. *Translational Vision Science and Technology.* 2018;7:8
- Tezel G, Thornton IL, Tong MG, Luo C, Yang X, Cai J, Powell DW, Soltau JB, Liebmann JM, Ritch R. Immunoproteomic Analysis of Potential Serum Biomarker Candidates in Human Glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013; 13(1):23-31.
- Yarmohammadi A, Zangwill LM, Diniz-Filho A, Saunders LJ, Suh MH, Wu Z, Manalastas PIC, Akagi T, Medeiros FA, Weinreb RN. Peripapillary and Macular Vessel Density in Patients with Glaucoma and Single-Hemifield Visual Field Defect. *Ophthalmology.* 2017;124:709-719

POHĽAD NA *ESCHERICHIA COLI* Z HĽADISKA VIRULENCIE, REZISTENCIE A TVORBY BIOFILMU

Handrová L., Kmeť V.

Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Košice

ABSTRAKT

Aviárne patogénne *Escherichia coli* (APEC) spôsobujú septikémiu, polyserozitídu, aerosakulitídu a iné prevažne extraintestinálne ochorenia u kurčiat a iných druhov vtákov. Hlavným cieľom štúdie bolo detegovať APEC a vyhodnotiť minimálnu inhibičnú koncentráciu (MIC) a rezistenciu na dvadsať antibakteriálnych látok pomocou modifikovanej mikrodilučnej metódy. Zamerali sme sa aj na tvorbu biofilmu, keďže je spájaný s vyššou odolnosťou na antimikrobiálne látky a prežitie baktérií. Izoláty sa zatriedili do štyroch tried: veľmi slabý (12/19), slabý (2/19), stredný (12/19) a silný (3/19) producent biofilmu. Prítomnosť génov faktorov virulencie *iutA*, *cvaC*, *iss*, *tsh*, *papC*, *kps*, *iha* a génov spojených s metabolizmom železa *sitA*, *feoB*, *irp2*, *fyuA*, *iron*, *ireA* bola detegovaná pomocou PCR. Gény virulencie sa viac vyskytovali v izolátoch s veľmi slabou produkciou biofilmu. Gény spojené s metabolizmom železa - *sitA*, *fyuA*, *ireA* boli viac zastúpené v izolátoch lepšie produkujúcich biofilmy.

ÚVOD

Escherichia coli je súčasťou prirodzenej mikroflóry čreva cicavcov a ľudí. Niektoré kmene sú schopné vyvolať intestinálne či extraintestinálne ochorenia, ktoré sú spôsobené prítomnosťou faktorov virulencie (Kaper, 2004). Gény kódujúce adhezíny, toxíny alebo rôzne systémy na získanie železa boli opísané ako obzvlášť dôležité počas patogenézy septikémie. Zoonotický potenciál APEC je už niekoľko rokov centrom mnohých diskusií. APEC nesie gény kódujúce podobné, ak nie identické vlastnosti identifikované v ľudských NMEC (kmene *E.coli* spôsobujúce neonatálnu meningitídu) a UPEC (uropatogénne *E.coli*). Mnohé APEC a ľudské UPEC zdieľali spoločné séroskupiny, fylogenetické skupiny a gény virulencie. Kmeň APEC získal mnoho rôznych génov rezistencie voči antimikrobiálnym látkam a génov virulencie (Kim a kol., 2007). APEC odolné voči antibiotikám sa k ľuďom dostanú najčastejšie potravou (napr. manipulácia so surovým kuracím mäsom - koža z trupu).

MATERIÁL A METODIKA

Z kloakálnych výterov brojlerov pochádzajúcich z fariem na východnom Slovensku bolo izolovaných 19 kmeňov *E. coli* (Handrová, 2018). Testovanie antimikrobiálnej citlivosti sa uskutočnilo s použitím veterinárneho MIC kitu firmy Bel-MIDITECH, Bratislava, Slovensko a vyhodnotilo na základe CSLI Vet01 (CSLI, 2015). V antibiotickom paneli boli použité antimikrobiálne látky: ampicilín (AMP); ampicilín + sulbaktám (A + IB); ertapeném (ETP); ceftiofur (CFF); ceftriaxón (CRT); ceftazidím (CAZ); ceftazidím + klavulanát (CAC); cefchinóm (CFQ); gentamicín (GEN); streptomycín (STM); neomycín (NEO); spektinomycín (SPE); kyselina nalidixová (NAL); enrofloxacin (ENR); ciprofloxacín (CIP); chloramfenikol (CMP); florfenikol (FLO); tetracyklín (TTC); kolistín (COL) a trimetoprim + sulfónamid (COT). Skrining génov virulencie obsahoval gény: receptor pre aerobaktín - *iutA* (Johnson a Stell, 2000); kolicín V – *cvaC* (Johnson a Stell, 2000); gén pre zvýšené prežitie v sére – *iss* (Foley a kol., 2000); termo-senzitívny hemaglutinín – *tsh* (Dozois a kol. 2000); gén pre P fimbrie - *papC* (Le Bouguéneć a kol., 1992); kapsulárny polysacharid - *kps* (Johnson a Stell 2000); železo- regulujúci gén a homológny adhezín - *Iha* (Johnson a kol., 2000). Detekcia génov spojených s metabolizmom železa pozostávala zo *sitA* - železo/mangánový transport (Rodrigues-Siek a kol., 2005); *feoB* - sprostredkovanie príjmu železa (Rodrigues-Siek a kol., 2005); *IreA* – železo regulujúci element (Russo a kol., 2001); yersiniabaktínových siderofórov

– *irp2* (Schubert a kol., 1998) a *fyuA* (Schubert a kol., 1998) a salmochelínového siderofóra - *IroN* (Johnson a Stell, 2000). Schopnosť tvorby biofilmu sa hodnotila kvantitatívnym testom kryštál -violeť podľa Stepanovic v mikrotitračných platničkách (Nunc, Roskilde, Dánsko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

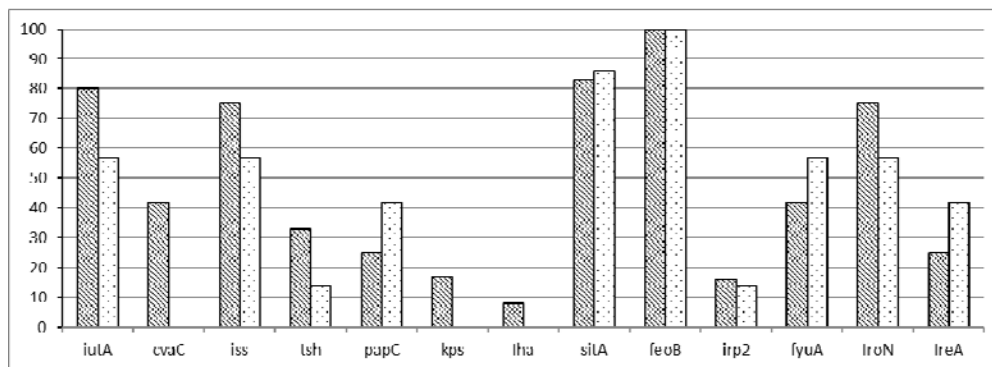
Tvorba biofilmu bola v našej štúdií zaznamenaná u 19 izolátov *E.coli*, pričom najviac kmeňov produkovalo veľmi slabý biofilm (12/19). Dva kmene produkovali slabý a dva stredne silný biofilm. Vo vzorke devätnástich kmeňov sa vyskytli tri kmene, ktoré na rozdiel od ostatných, formovali výrazne silný biofilm, tie preukázali prítomnosť virulencného génu *iutA* (2/3), u jedného kmeňa bol zaznamenaný výskyt *iss* a *papC*. Antimikrobiálna multirezistencia (súčasná rezistencia na 3 až 4 skupiny antimikrobiálnych látok) bola zaznamenaná u všetkých izolátoch. Prevládala rezistencia na ampicilín (19/19), trimetoprim + sulfónamid (18/19), enrofloxacín (17/19), ostatné antibiotiká sú uvedené v tab.č.1. Vo vzťahu ku formovaniu biofilmu nebola zaznamenaná vyššia rezistencia izolátov produkujúcich silný biofilm.

Tab. 1 Spektrum prítomnosti rezistencie kmeňov *E.coli* podľa produkcie biofilmu.

| Skupina podľa produkcie biofilmu | spektrum rezistencie kmeňov |
|---------------------------------------|---|
| <i>veľmi slabý producent biofilmu</i> | <i>amp,stm,nal,enr,cip,ttc,cot</i> <i>amp,stm,neo,spe,nal,enr,cip,ttc,col,cot</i> <i>amp,stm,nal,enr,cip,cmp,flo,ttc,cot</i> <i>amp,nal,enr,cip,cot</i> <i>amp,spe,nal,enr,cip,flo,cot</i> <i>amp,stm,nal,enr,cip,flo,ttc,cot</i> <i>amp,a+ib,nal,enr,cip,cmp,flo,ttc,cot</i> <i>amp, enr, cip, ttc, cot</i> <i>amp, cff, stm, spe, nal, enr, cip, ttc, cot</i> <i>amp,cmp,flo,ttc,cot</i> <i>amp,gen,stm,nal,enr,cip,ttc,cot</i> <i>amp,stm,neo,nal,enr,cip,cmp,ttc,cot</i> |
| <i>slabý producent biofilmu</i> | <i>amp,stm,neo,nal,enr,cip,cot</i> <i>amp,stm,spe,nal,enr,cip,ttc,cot</i> |
| <i>stredný producent biofilmu</i> | <i>amp, stm, flo, tet, cot</i> <i>amp, gen,stm,nal,enr,cip,ttc,cot</i> |
| <i>silný producent biofilmu</i> | <i>amp, cff, gen, stm, spe, nal, ttc</i> <i>amp,stm, nal, enr, cip, cmp, ttc, cot</i> <i>amp,gen,stm,nal,enr,cip,ttc,cot</i> |

Typický patotyp APEC obsahuje rôzne gény kódujúce transportéry železa – *irp2*, *fyuA*, *iroN* a *sitA* a plazmatické kódované gény, vrátane *cvl/cvaC*, *tsh* a *iss* (Rodriguez – Siek a kol., 2005). Rozšírená črta virulentných APEC kmeňov je ich rezistencia na sérum (*iss*), čo uľahčuje rozlíšenie medzi virulentnými a nevirulentnými kmeňmi (Foley a kol., 2000). Pri našich vzorkách sme potvrdili prítomnosť génu *iss* v 13, *tsh* a *cvaC* v 5, *irp2* v 2, *fyuA* v 9, *iroN* v 13 a *sitA* v 16 prípadoch z 19 testovaných kmeňov. Gény zapojené do metabolizmu získavania železa *irp2* a *fyuA* boli opísané v izolátoch APEC od Gophna a kol. (2001). Potvrdili sa tiež v našich vzorkách APEC. Pre lepšie porovnanie kmeňov z pohľadu produkcie biofilmu sú vytvorené dve skupiny (prvá zahŕňa slabú produkciu biofilmu, druhá strednú a silnú). Genetické vybavenie izolátov produkujúcich stredný a silný biofilm poukázalo na nižšiu prevalenciu génov virulencie oproti kmeňom so slabým formovaním. Zo siedmich detegovaných génov bol vyšší iba jeden – *papC* kódujúci fimbrie. Gény súvisiace s metabolizmom železa neboli výrazne vyššie resp. nižšie vo vzťahu ku tvorbe biofilmu. Gény *sitA*, *fyuA*, *ireA* boli vyššie zastúpené v druhej skupine a *irp2*, *IroN* v prvej. V porovnaní s inými štúdiami (Naves a kol., 2008, Pavlickova a kol., 2017) sa *papC* potvrdil v kmeňoch s

lepšie tvoriacim biofilmom a *tsh*, podobne ako naše výsledky, bol detegovaný u slabých producentov biofilmu. *IutA* bol reprezentovaný v oboch skupinách. Zaznamenala sa aj prítomnosť *fyuA* u všetkých silných producentov. Literatúra obsahuje iba niekoľko dokumentov, ktoré korelujú faktory virulencie skúmané v tejto štúdii so schopnosťou patogénnych *E. coli* tvoriť biofilmy *in vitro*. Sú však potrebné ďalšie štúdie zahŕňajúce väčší počet klinických izolátov na potvrdenie našich údajov produkcie biofilmu s koreláciou s faktormi virulencie.



Obr. 2 Zastúpenie génov (v %) v dvoch skupinách: prvá (slabý producent biofilmu) a druhá (silný a stredný producent biofilmu).

Táto práca bola podporená grantami VEGA 2/0085/18, APVV-16-0171 a ITMS 26220220204.

POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Stepanović, S. a kol. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal Compilation APMIS*, (115),2007, 891–9. ISSN 0903-4641. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Kim, T.E. a kol. Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 3309–3315
- Johnson, JR., Stell, AL. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *Journal of Infectious Diseases*, 181(1),2002, 261–272. DOI: 10.1086/315217
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S (ISBN 1-56238-907-6 [Print]; ISBN 1-56238-908-4[Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania USA
- Foley, SL., Home, SM., Giddings, CW. a kol. *Iss* from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases*, 2000, 44(1): 185–191.
- Dozois, CM. a kol. Relation between the *Tsh* autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infection and Immunity*, 68(7), 2000, 4145–4154
- Le Bouguéneq, C., Archambaud, M., Labigne, A. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30(5): 1992, 1189–1193.
- Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*, (151), 2005, 2097–2110. DOI: 10.1099/mic.0.27499-0
- Russo T.A a kol. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* (10), 2001, 6209-16. DOI: 10.1128/IAI.69.10.6209-6216.2001
- Schubert, S. a kol. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infection and Immunity*, 66(2), 1998, 480-5.
- Naves, P. a kol. Correlation between virulence factors and *in vitro* biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*, 45(2),2008, 86–91. DOI: 10.1016/j.micpath.2008.03.003
- Pavlickova, S. a kol. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. *Journal of environmental science and health, part b*, (0), 2017, 0, 1–7. DOI: 10.1080/03601234.2017.1318637
- Gophna, U. a kol. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol. Lett.* 196,2001, 57–60
- Kaper, JB, Nataro, JP, Mobley, HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews*, 2004, *Microbiology*, vol 2, doi:10.1038/nrmicro818
- Handrová, L.; Čuvalová, A., Kmet', V. (2018). The relationship between biofilm formation, genes of virulence and iron metabolism in *Escherichia coli*. 14th International scientific conference ANIMAL PHYSIOLOGY 2018; Book of abstracts, p. 26

VPLYV DVOCH ZDROJOV ZINKU A VLÁKNINY NA MINERÁLNY A ANTIOXIDAČNÝ STATUS PRASIAŤ.

Holodová M.

Centrum biovied SAV v.v.i., organizačná zložka ÚFHZ, Košice

ABSTRAKT

Vláknina a rôzne zdroje zinku môžu vplývať na absorpciu minerálnych látok z gastrointestinálneho traktu a následne ovplyvniť minerálny a antioxidačný status zvierat. Cieľom štúdie bolo porovnať účinok dvoch typov vlákniny a zdrojov zinku na koncentráciu zinku a aktivitu superoxid dismutázy (SOD, Cu/Zn SOD) v plazme, pečeni, obličkách a pankrease prasiat po odstave, a taktiež koncentráciu metalotransportérov: Zn-metalotioneínu (Zn-MT1) a Zn-transportér (ZnT1) v pečeni. Experiment bol uskutočnený na 24 kastrovaných samcoch prasiat Danbred x Duroc s počiatočnou telesnou hmotnosťou približne 11 kg. Prasatá boli rozdelené podľa hmotnosti do štyroch skupín, kŕmené bazálnou diétou (BD), ktorá bola obohatená o 1% hrubej vlákniny vo forme 1,7% celulózy alebo 5% zemiakovej vlákniny a o 120 mg Zn/kg v anorganickej forme ako ZnSO₄ alebo organickej forme ako Zn chelát glycinového hydrátu (ZnGly). V priebehu 4 týždňov prasatá z jednotlivých skupín prijímali BD obsahujúcu: 1. celulózu+ ZnSO₄ (C), 2. celulózu+ ZnGly (C+ZnGly), 3. zemiakovú vlákninu+ ZnSO₄ (PF) alebo 4. zemiakovú vlákninu+ ZnGly (PF+ZnGly). Príjem experimentálnych diét neovplyvnil koncentrácie Zn v plazme, ani v tkanivách prasiat. Najvyššia aktivita celkovej SOD a Cu/Zn SOD bola zaznamenaná v pečeni prasiat, ktoré boli kŕmené diétami obsahujúcimi zemiakovú vlákninu (PF, PF+ZnGly). Rovnako koncentrácia ZnT1 bola najvyššia v pečeni zvierat, ktoré prijímali obe diéty s PF, zatiaľ čo koncentrácia Zn-MT1 v pečeni nebola zmenená. Naše výsledky ukázali, že príjem krmiva obohateného o zemiakovú vlákninu zlepšil zinkový a antioxidačný status prasiat po odstave, kvôli zvýšenej hladine ZnT1 a aktivite SOD v pečeni.

ÚVOD

Prítomnosť zinku v organizme je nevyhnutná pre správne fungovanie celej rady enzymatických systémov. Adekvátny príjem Zn v potrave je dôležitý nielen v období rastu, kde jeho nedostatok vedie k oneskorenému telesnému i duševnému vývoju, ale aj v dospelosti. Niektoré štúdie poukazujú na vyššiu biodostupnosť Zn z jeho organických komplexov-chelátov kvôli ich vyššej stabilite v tráviacom trakte (Spears, 2003). Absorpcia zinku prebieha v tenkom čreve monogastrických zvierat a môže byť ovplyvnená viacerými faktormi. Vlákna môže negatívne ovplyvňovať absorpciu a biologickú dostupnosť stopových prvkov, ale ich vzájomné interakcie závisia od typu vlákniny a aditíva (Spears, 2003). Niektoré štúdie ukázali, že zemiaková vláknina pozitívne vplyva na pasáž tráveniny, morfológiu a morfometriu čreva a tiež funkciu pankreasu (Tušnio, 2011).

Cieľom nášho experimentu bolo porovnať účinok dvoch typov vlákniny a zdrojov zinku na koncentráciu zinku a aktivitu superoxid dismutázy (SOD, Cu/Zn SOD) v plazme, pečeni, obličkách a pankrease prasiat, a koncentrácie Zn-metalotioneínu (Zn-MT1) a Zn-transportéru (ZnT1) v pečeni.

MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol prevedený na 24 kastrovaných odstavčatách plemena Danbred x Duroc, ktorých počiatočná váha 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. Zinok v BD bol vo forme ZnSO₄.H₂O alebo Zn chelátu glycinového hydrátu (ZnGly). Prvá skupina zvierat (C) bola kŕmená BD, ktorá obsahovala 1,5% celulózy (Lonocel) + ZnSO₄. Druhej skupine (C+ZnGly) bola

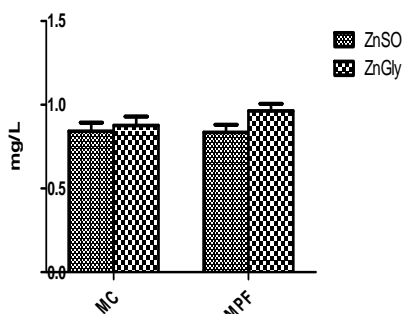
podávaná BD s 1,5% celulózy + ZnGly. BD tretej (PF) a štvrtej skupiny (PF+ZnGly) obsahovala 5% zemiakovej vlákniny (Potex), pričom Zn v 3. skupine bol vo forme ZnSO₄, a v 4. skupine vo forme ZnGly.

Obsah Zn v plazme, pečeni, obličkách a pankrease bol stanovený pomocou atómového absorpčného spektrometra (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko) metódou na plameni (FAAS) za použitia acetylénu ako spaľovacieho plynu. Aktivita SOD, Cu/Zn SOD v pečeni (U/mg proteínu) bola analyzovaná spektrofotometricky (Marklund a Marklund, 1974). Koncentrácie metalotransportérov Zn-MT1 a ZnT1 v pečeni (µg/g tkaniva) boli merané spektrofotometricky ELISA kitom (Neo Scientific, Erba Lachema).

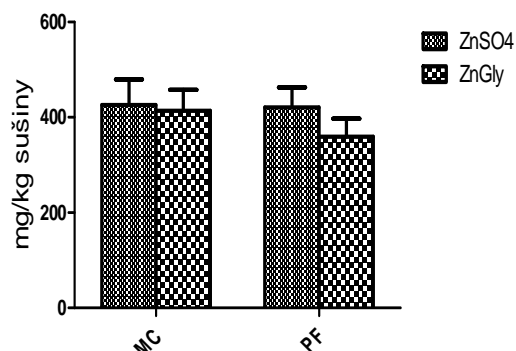
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vhodným a najčastejším parametrom na posúdenie biovyužitelnosti zinku z jeho rôznych zdrojov je stanovenie koncentrácie Zn v plazme a v orgánoch akými sú pečeň, obličky, pankreas a popol kostí. Vo všeobecnosti sa organické zdroje Zn považujú za biovyužiteľnejšie kvôli lepšej stabilite Zn komplexov v tráviacom trakte zvierat (Spears, 2003). Na druhej strane, zemiaková vláknina stimuluje bakteriálnu fermentáciu, zlepšuje absorpciu a depozíciu minerálnych látok (Pastuszewska a kol., 2010), čo by spolu s organickým zdrojom Zn mohlo zvýšiť Zn status zvierat. Príjem experimentálnych diét obohatených o zinok v jeho organickej forme a zemiakovú vlákninu však nijako neovplyvnil hladiny zinku v plazme prasidiat (Obr.1). Rovnako koncentrácie zinku v pečeni, obličkách a pankrease prasidiat neboli príjmom experimentálnych diét signifikantne zmenené (Obr.2-4). Naše výsledky naznačujú, že forma prijímaného zinku a vlákniny nemá vplyv na depozíciu Zn v tkanivách a Zn status malých prasidiat po odstave.

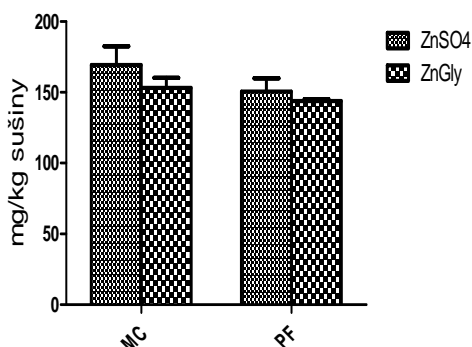
Obr. 1 Koncentrácia Zn v plazme



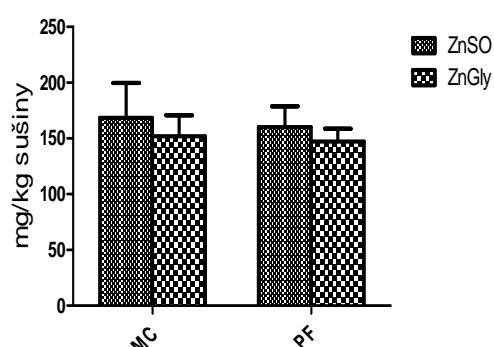
Obr. 2 Koncentrácia Zn v pečeni



Obr. 3 Koncentrácia Zn v obličkách



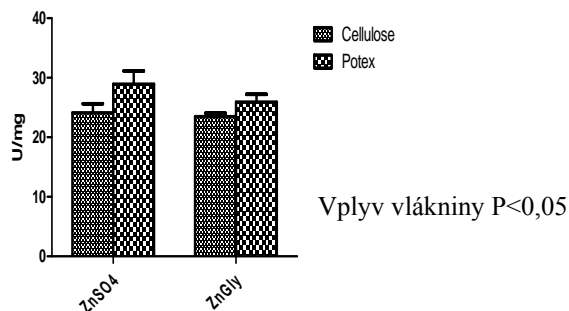
Obr. 4 Koncentrácia Zn v pankrease



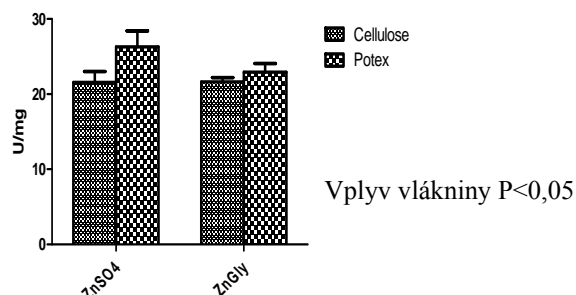
Zvýšená aktivita celkovej SOD a Cu/Zn SOD bola zaznamenaná v oboch skupinách prasidiat (Obr. 5,6), ktoré boli kŕmené diétami obsahujúcimi zemiakovú vlákninu (PF, PF+ZnGly).

Zinok, ako štrukturálny komponent SOD a Cu/Zn SOD, zohráva dôležitú úlohu v antioxidačnej ochrane organizmu. Aj keď koncentrácia Zn v pečeni nebola príjmom diét zmenená, príjem zemiakovej vlákniny mal za následok zvýšenie aktivity SOD a tým zvýšil antioxidačnú ochranu buniek pečene.

Obr. 5 Aktivita SOD v pečeni

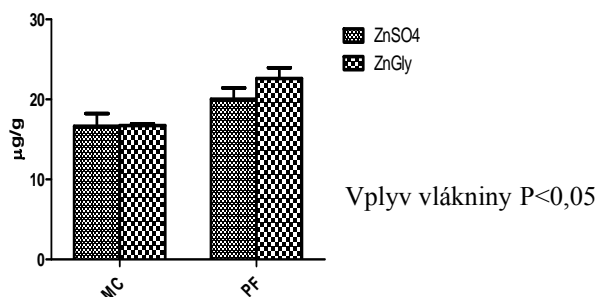


Obr. 6 Aktivita Cu/Zn SOD v pečeni

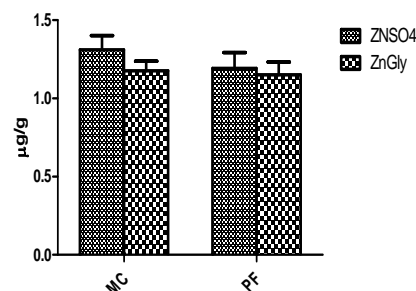


Zinkový transportér ZnT1 je lokalizovaný na bazolaterálnom buniek a je zodpovedný za efflux Zn z bunky do okolitých tkanív. Najvyššia koncentrácia ZnT1 v pečeni bola v skupinách prasiat (Obr. 7), ktoré prijímali obe diéty s obsahom zemiakovej vlákniny (PF, PF+ZnGly), zatiaľ čo obsah Zn-MT1, intracelulárneho proteínu slúžiaceho ako rezervoár Zn v bunke, nebol vplyvom príjmu experimentálnych diét zmenený (Obr. 8).

Obr. 7 Koncentrácia ZnT1 v pečeni



Obr. 8 Koncentrácia Zn-MT1 v pečeni



Naše výsledky ukázali, že príjem krmiva obohateného o zemiakovú vlákninu zlepšil zinkový a antioxidačný status prasiat, kvôli zvýšenej hladine ZnT1 a aktivite SOD v pečeni.

Práca bola podporená grantami APVV-0667-12, VEGA 2/0069/17, COST Action FA1401 a ITMS 26220220204.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 16;47(3):469-74.
- 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.
- Spears, J.W. 2003. Comparative Trace Element Nutrition. *Trace Mineral Bioavailability in Ruminants*, 1:1506–1509.
- Tuśnio A, Pastuszewska E, Świącz 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.

VPLYV SKORÉHO VZDIALENÉHO KONDICIONOVANIA NA CIRKULUJÚCU KRV

Jachová J., Gottlieb M., Némethová M., Mačákova L., Bonová P.

Neurobiologický ústav BMC SAV Košice, Slovenská republika

ABSTRAKT

Ischemická tolerancia predstavuje neuroprotektívny endogénny mechanizmus, ktorý je možné navodiť rôznymi typmi subletálneho stresu, vrátane ischemie vzdialeného orgánu. Vzhľadom na to, že ischemické podmienky v mozgu sa výrazne odzrkadlia na systémovej úrovni, rozhodli sme sa pozorovať, ako tieto zmeny ovplyvnia navodenie ischemickej tolerancie. V našich experimentoch sme sledovali niekoľko najviac ovplyvnených biochemických parametrov v krvi (koncentrácia glutamátu, aktivita antioxidantných enzýmov) v priebehu 7 dní po navodení globálnej ischemie s predošlým skorým (1 hodina) kondicionovaním. Rozsah ischemického poškodenia sme určovali počtom degenerujúcich neurónov a testovaním neurologických funkcií použitím pamäťového testu. Významnú zmenu v aktivite superoxidodismutázy v erytrocytoch sme nepozorovali, avšak aktivita katalázy v plazme bola kondicionovaním výrazne redukovaná. Koncentrácia glutamátu sa v porovnaní s ischemickou skupinou zvýšila po jednom dni reperfúzie a zostala zvýšená aj v priebehu ďalších dní. Kondicionovaním sa znížil počet degenerujúcich neurónov o takmer 30%, avšak zlepšenie pamäti sme nepozorovali. Na základe našich výsledkov možno potvrdiť pozitívny efekt skorého kondicionovania pred globálnou ischemiou na prežívanie postihnutých neurónov, avšak bez zlepšenia neurologického deficitu. Antioxidantná ochrana bola ovplyvnená len čiastočne. Pretože došlo k zvýšeniu krvnej hladiny glutamátu u kondicionovaných zvierat predpokladáme, že zvýšený eflux glutamátu by mohol predstavovať jeden z neuroprotektívnych mechanizmov navodených ischemickou toleranciou.

ÚVOD

Patofyziológia ischemie nervového tkaniva je veľmi komplexná a vyvoláva mnohé sekundárne procesy, vedúce k prehlbovaniu poškodenia. V súčasnosti stále nie je známy celkový mechanizmus jej prejavov, a tým nie je možné eliminovať tieto procesy v klinickej praxi. Z tohto dôvodu je potrebné upriamiť štúdium na mechanizmus a najmä možnosti redukcie dopadov ischemického poškodenia. Glutamát predstavuje hlavný excitačný neurotransmitter takmer vo všetkých oblastiach CNS. Počas synaptického prenosu dochádza k jeho uvoľneniu z presynaptického neurónu do synaptickej štrbiny, následnému naviazaniu na glutamátové receptory postsynaptického neurónu a ich aktivácii. Za ischemických podmienok je glutamát vylučovaný z neurónov v nadmernej miere. Vysoká extracelulárna koncentrácia glutamátu je pre okolité bunky toxická. Spôsobuje nadmernú excitáciu neurónov a spustenie celej kaskády biochemických dejov vedúcich k nevratnému poškodeniu neurónu. Tento jav nazývame excitotoxicita. Zvýšená hladina glutamátu počas ischemie a reperfúzie bola pozorovaná nie len v nervovom tkanive, ale aj v krvi (Kravcukova a kol., 2009, 2010). Prestup glutamátu z tkaniva do krvi je možný pomocou glutamátových transportérov prítomných na endotelových bunkách, podmienený rozdielnym koncentračným gradientom glutamátu medzi extracelulárnym priestorom, endotelovými bunkami a plazmou (O'Kane a kol., 1999; Gottlieb a kol., 2003). Okrem excitotoxicity sa na výslednom poškodení vysokou mierou podieľa aj oxidatívny stres v podobe poškodenia proteínov, lipidov a nukleových kyselín. Tvorba voľných radikálov prebieha počas ischemicko-reperfúzneho poškodenia rôznymi mechanizmami a má negatívny dopad nielen na nervové tkanivo, ale taktiež na obehový systém a jeho súčasti. V práci Kravcukova a kol. (2009) dokázali priamy vplyv ischemie mozgu na obehový systém v podobe zvýšeného oxidatívneho stresu.

V súvislosti s redukciou rozsahu ischemického a ischemicko-reperfúzneho poškodenia nervového tkaniva je v súčasnosti veľká nádej vkladaná do výskumu fenoménu ischemickej tolerancie. Pre klinickú prax má obzvlášť význam tolerancia vyvolaná vzdialeným kondicionovaním. Pre tento spôsob navodenia zvýšenej rezistencie citlivého nervového tkaniva je charakteristická aplikácia subletálneho stresu vo vzdialenom orgáne. Z tohto poznania vychádza aj naša práca. V experimentoch sme sa zamerali na štúdium účinku vzdialeného prekondicionovania na jednu z najvýznamnejších súčastí ischemiou spustenej kaskády biochemických reakcií vedúcej k zániku postihnutej bunky, excitotoxickéj aminokyseliny glutamát. Je veľmi pravdepodobné, že zvýšená prítomnosť oxidatívneho stresu v krvi sa odzrkadlí aj na činnosti jednotlivých enzymatických a neenzymatických antioxidantov, schopných voľné radikály vychytávať. Takýmto spôsobom možno nepriamo zistiť stav oxidatívneho stresu monitorovaním zmien aktivity alebo koncentrácie antioxidačných látok. V našich experimentoch sme sa preto zamerali aj na monitorovanie zmien antioxidačných enzýmov ako je kataláza a superoxiddismutáza.

MATERIÁL A METÓDY

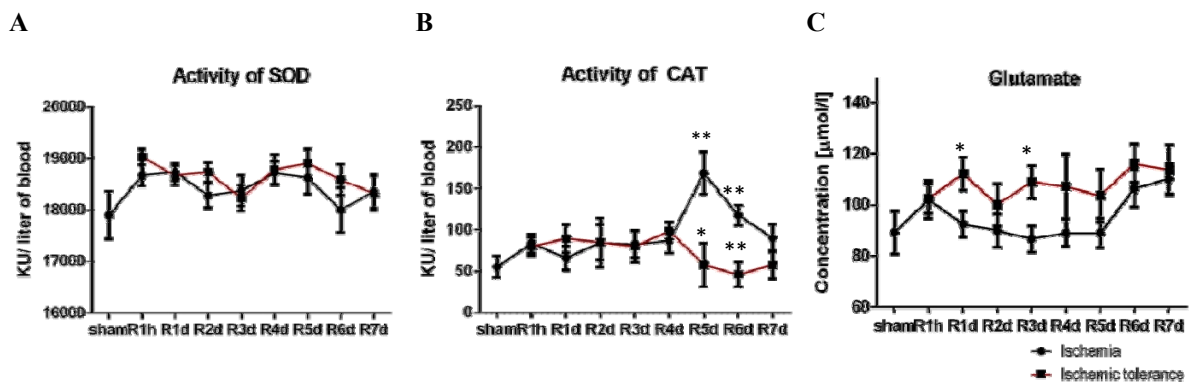
Zvieratá boli rozdelené do dvoch skupín. Prvá skupina obsahovala zvieratá podrobené 10 minútovej globálnej ischemii štvorciovým podväzom. Zvieratám druhej skupiny bola navodená ischemická tolerancia vzdialeným prekondicionovaním, teda zastavením prítoku krvi do kostrového svalu zadnej končatiny pomocou kompresného mechanizmu (turniketom), jednu hodinu pred globálnou ischemiou. Zvieratá prežívali 7 dní, pričom im bola odoberaná vzorka krvi po jednej hodine reperfúzie s následnými jednodňovými intervalmi. Vzorky sham kontrol boli odoberané jeden deň po oklúzii vertebrálnych artérií. Po siedmych dňoch sme zvieratá usmrtili a vypreparovali mozog. Pomocou Fluorojade B farbenia sme určili počet degenerujúcich neurónov v oblasti CA1 hipokampu. Neurolofické funkcie sme testovali použitím pamäťového testu Morisovo vodné bludisko. Krvnú koncentráciu glutamátu sme stanovovali pomocou enzýmovo-fluorimetrickej metódy (Graham a Aprison, 1966). Celková koncentrácia glutamátu bola vyjadrená v μmol na liter krvi ($\mu\text{mol/l}$). Aktivitu antioxidačných enzýmov sme určovali kolorimetrickou metódou a bola vyjadrená v kU na liter krvi.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najmä pri neurodegeneratívnych ochoreniach je obzvlášť dôležité sledovať vplyv na úrovni systémového obehu z dôvodu určenia špecifických markerov a monitoringu progresu ochorenia. Štúdie dokazujú, že ischemiou spôsobená situácia na úrovni nervového tkaniva sa vo významnej miere odzrkadľuje na úrovni periférnej krvi. Z tohto dôvodu sme sa v našich experimentoch rozhodli sledovať, ako ovplyvní vybrané biochemické parametre krvi navodenie ischemickej tolerancie a prispieť tak k pochopeniu jej možných mechanizmov.

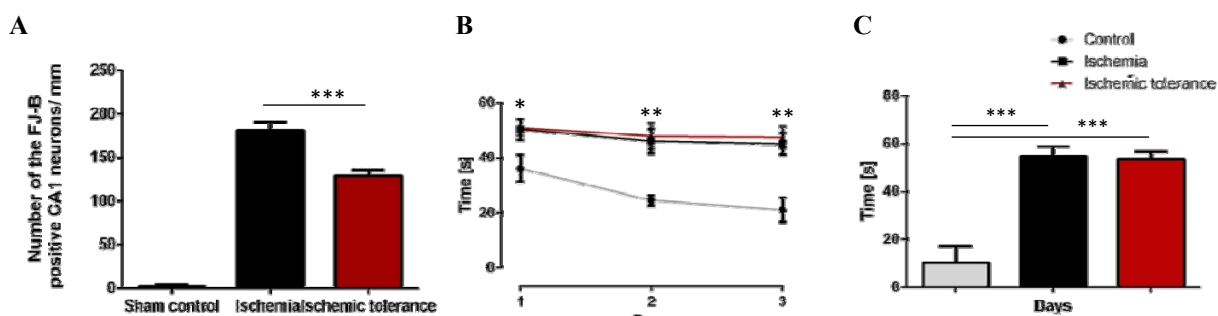
Antioxidačná ochrana bola ovplyvnená len čiastočne. Zmenu v aktivite superoxiddismutázy v erythrocytoch sme po kondicionovaní nepozorovali v porovnaní s ischemickou skupinou, avšak aktivita katalázy v plazme ovplyvnená bola. Po navodení tolerancie došlo k jej redukcii o 65% v piatom a šiestom dni reperfúzie v porovnaní so situáciou navodenia globálnej ischemie bez kondicionovania, kedy jej aktivita výrazne stúpa (Obr. 1 A,B). Krvná koncentrácia glutamátu sa kondicionovaním zvyšuje už po prvej hodine a v porovnaní s ischemickou skupinou ostáva zvýšená aj v priebehu ďalších dní (Obr. 1 C).

Navodenie ischemickej tolerancie spôsobilo pokles degenerujúcich neurónov o 30% oproti skupine so samotnou globálnou ischemiou (Obr. 2 A). K vylepšeniu schopnosti učenia (Obr. 2 B) a referenčnej pamäti (Obr. 2 C) však nedošlo.



Obr. 1 Vybrané sledované biochemické parametre v krvi.

A: Aktivita enzýmu superoxidodismutázy (SOD). B: Aktivita enzýmu katalázy (CAT). C: Koncentrácia glutamátu. Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SEM, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$.



Obr. 2 Vplyv ischemickej tolerancie na počet degenerujúcich neurónov a pamäť.

A: Počet degenerujúcich neurónov. B: Schopnosť učenia. C: Referenčná pamäť. Výsledky sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SEM, (*) $p < 0,05$.

Rôzne spôsoby navodenia ischemickej tolerancie spravidla vedú k zvýšenému prežívaniu neurónov, ktoré súvisí s obnovou pôvodných metabolických a biochemických pochodov postihnutých buniek. Obnova metabolizmu cyklu glutamátu v ischemii postihnutom nervovom tkanive by mohla predstavovať jeden z kľúčových mechanizmov neuroprotektie. Bonová a kol. (2013) zistili, že navodenie ischemickej tolerancie súvisí s aktiváciou mechanizmov eliminácie toxického hladiny glutamátu. Podobný efekt sme pozorovali aj v našom modeli globalnej ischemie po navodení ischemickej tolerancie metódou vzdialeného prekondicionovania. Pretože došlo k zvýšeniu krvnej hladiny glutamátu u kondicionovaných zvierat predpokladáme, že zvýšený efflux glutamátu by mohol predstavovať jeden z neuroprotektívnych mechanizmov navodených ischemickou toleranciou.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0094/18 a 2/0029/18.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bonová, P. a kol. Development of a pattern on biochemical parameters in the core and penumbra during infarct evolution after transient mcao in rats. *Neurochemistry international*. 2013b, 62: 8-14.
- Graham L. T., Jr., Aprison M. H. Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and gamma-aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. *Anal Biochem*. 1966, 15: 487-97.
- Gottlieb, M, Wang, Y., Teichberg, V.I. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. *Journal of neurochemistry*. 2003, 87:119-126.
- Kravcukova, P. a kol. Transient forebrain ischemia impact on lymphocyte dna damage, glutamic acid level, and sod activity in blood. *Cellular and molecular neurobiology*. 2009, 29: 887-894.
- Kravcukova, P. a kol. Effects of one-day reperfusion after transient forebrain ischemia on circulatory system in the rat. *General physiology and biophysics*. 2010, 29: 113-121.
- O'Kane, R.L. a kol. Na⁺- dependent glutamate transporters (eaat1, eaat2 and eaat3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *The journal of biological chemistry*. 1999, 274: 31891-31895.

PRVOTNÝ SCREENING REZÍDUIÍ ANTIMIKROBIÁLNYCH LÁTOK V TKANIVÁCH HYDINY PO EXPERIMENTÁLNEJ ÚPRAVE KRMIVA POUŽITÍM MIKROBIÁLNYCH INHIBIČNÝCH TESTOV

Juščáková D., Marcinčák S., Kožárová I.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo stanoviť prítomnosť rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách brojlerových kurčiat (svalovina, srdce, pečeň, žalúdok, obličky, pľúca, slezina, koža, tuk) a v šŕave získanej z vyšetrovaných tkanív bez a po skrmovaní kŕmnej zmesi s prídavkom krmiva fermentovaného produkčným kmeňom nižších vláknitých húb triedy *Zygomycetes*, *Mortierella alpina* CCF2861. K stanoveniu rezíduí boli použité tri mikrobiologické screeningové metódy, screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR), Premi[®]Test a Explorer 2.0 test. Všetky tri screeningové metódy detegovali pozitívne, resp. dubiózne výsledky a poukázali na prítomnosť rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách všetkých experimentálnych skupín brojlerových kurčiat. Vzhľadom na dosiahnuté výsledky a antimikrobiálny potenciál fermentovaného krmiva, možnú prítomnosť falošne pozitívnych (nezhodných) výsledkov je potrebné vylúčiť a pozitívny výsledok potvrdiť kvantitatívnou konfirmačnou analýzou.

ÚVOD

Zvieratá určené na produkciu potravín sú úzko prepojené s verejným zdravím. Veterinárne lieky (antimikrobiálne látky) sa môžu povoliť alebo použiť u zvierat určených na produkciu potravín len vtedy, ak farmakologicky účinné látky, ktoré sa v nich nachádzajú, boli posúdené ako bezpečné podľa požiadaviek na bezpečnosť potravín. Na ochranu verejného zdravia sa preto nariadením Komisie (EÚ) č. 37/2010 stanovujú maximálne limity rezíduí (MRL) antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu, ktoré sa povinne kontrolujú. Pre prvotný screening rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách potravinových zvierat sú príslušným orgánom Slovenskej republiky schválené nasledovné úradné metódy laboratórnej diagnostiky potravín, platňová metóda STAR (R – 25, 2006) a liekovková metóda Premi[®]Test (R – 26, 2006). Medzi ďalšie testy odporúčané na účely kontroly rezíduí vo svete patrí Explorer 2.0 test. Vzhľadom k tomu, že screeningové metódy predstavujú prvý stupeň v kontrole rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu, uvedené metódy boli použité aj na screening rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách hydiny po experimentálnej úprave krmiva.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité jednodňové brojlerové kurčatá hybrid COBB 500 rozdelené do štyroch experimentálnych skupín po 50 ks. Kontrolná skupina (KS 1 a KS 2) a pokusná skupina (PS 1 a PS 2) boli kŕmené rovnakými komerčnými kŕmnymi zmesami (KKZ) BR1, BR2 a BR3 (DeHeus, ČR). KKZ BR1 obsahovala prídavok nikarbazínu v množstve 101 mg.kg⁻¹ a KKZ BR2 prídavok salinomycínu sodného v množstve 70 mg.kg⁻¹. V skupine KS 2 a PS 2 bol brojlerovým kurčatám od 10. dňa výkrmu pridávaný ku KKZ prídavok 10 % krmiva fermentovaného produkčným kmeňom *Mortierella alpina* CCF2861 (Zbierka kultúr húb, Karlova Univerzita, Praha, ČR) 2 krát denne, t.j. ráno a večer. Počas celého obdobia výkrmu mali kurčatá prístup k vode a ku krmivu *ad libitum*. Na 40. deň veku boli brojlerové kurčatá usmrtené povoleným spôsobom a tkanivá boli zabalené, označené a skladované pri teplote -20 °C do analýzy. Na analýzu bolo použitých 12 tkanív z každej experimentálnej skupiny zvierat (ľavá prsná svalovina (PSE), ľavá horná a dolná stehenná svalovina (SSHĽ, SSDĽ), srdce, pečeň, žalúdok, obličky, pľúca, slezina, koža a svalovina z krídla, tuk) a mäsová šŕava (tkanivová tekutina) z týchto tkanív. STAR: Princípom metódy je agarový difúzny test, pri ktorom sa na piatich Petriho miskách používajú testovacie kmene s citlivosťou: agar s pH 7,2 s *Bacillus subtilis* na aminoglykozidy,

agar s pH 8 s *Kocuria varians* na makrolidy a beta-laktámy, agar s pH 6 s *Bacillus cereus* na tetracyklíny, agar s pH 8 s *Escherichia coli* na chinolóny, agar s pH 7,4 s *Bacillus stearothermophilus* na beta-laktámy a sulfónamidy. Testovacie platne boli pripravené podľa postupu metódy. Vzorky vyšetovaných tkanív boli získané z maticí použitím sterilného korkovrtu (Ø 9 mm), narezané sterilným skalpelom na disky s hrúbkou 2 mm a poukladané na povrch testovacích agarových platní. Vzorky mäsovej šťavy boli získané rozmrazením 3 g vzorky v mikrovlnnej rúre nastavením na „Defrost“ po dobu 2 ± 1 min. Uvoľnená mäsová šťava bola aplikovaná na povrch testovacích platní pomocou papierových diskov (Ø 9 mm, Albet Lab Science, Nemecko, 30 µl). Inkubácia prebiehala pri podmienkach stanovených metódou.

Premi®Test a Explorer 2.0: Princípom oboch testov je širokospektrálny agarový difúzny test v liekovkách s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. 100 µl získanej mäsovej šťavy sa aplikovalo do liekoviek. Liekovky boli najskôr preinkubované a následne inkubované podľa pokynov uvedených výrobcami oboch testov (R-Biopharm AG, Nemecko; Zeu-Immunotec, Španielsko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Metóda STAR: Výsledky boli stanovené meraním veľkostí inhibičných zón (IZ) od okraja vyšetrovanej vzorky po vonkajší okraj IZ pomocou digitálneho posuvného meračla s presnosťou na 0,01 mm. Vzorky boli považované za pozitívne, ak IZ bola ≥ 2 mm na platniach *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. rhizophila* a ≥ 4 mm na platniach *B. stearothermophilus*.

Premi®Test a Explorer 2.0: Výsledky boli stanovené posúdením farby dolných dvoch tretín agarového média. Fialové, resp. žlté/fialové sfarbenie pevného média poukazuje na prítomnosť rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetrovanej vzorke, ktorých množstvo je nad úrovňou (pozitívna vzorka), resp. na úrovni (dubiózna vzorka) detegovateľnosti testov. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetovaných tkanivách pomocou metódy STAR, Premi®Test a Explorer 2.0 test sú prezentované v Tabuľke 1 a 2.

Tab. 4 Výsledky stanovenia screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetovaných maticiach pomocou metódy STAR, Premi®Test a Explorer 2.0

| Skupina zvierat | Matica | STAR | | | | | | | | | | Premi®Test | EXPLORER |
|-----------------|--------------------|---|--------------------|---------------------------------|--------------------|----------------------------------|---|--------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------|----------|
| | | <i>B.stearothermophilus</i> IZ (mm+SD) | | <i>B.subtilis</i> IZ (mm+SD) | | <i>B.cereus</i> IZ (mm+SD) | | <i>E.coli</i> IZ (mm+SD) | | <i>K.rhizophila.</i> IZ (mm+SD) | | | |
| | | T | Š | T | Š | T | Š | T | Š | T | Š | | |
| PS 1 BR2+SAL | PSL | 2,74 ± 0,69 | / | / | / | / | / | / | / | 0,77 ± 0,20 | 1,77 ± 0,18 | ± | + |
| | SSLH | 3,17 ± 0,15 | 3,80 ± 1,51 | / | / | / | / | / | / | / | / | - | - |
| | SSLD | 4,28 ± 0,70 | / | / | / | / | / | / | / | / | / | - | - |
| | SRDCE | 7,69 ± 0,49 | 5,27 ± 0,27 | / | / | / | / | / | / | 1,01 ± 0,26 | 4,50 ± 0,32 | ± | ± |
| | PEČEŇ | 11,38 ± 0,43 | 5,24 ± 0,41 | 2,33 ± 0,85 | / | / | / | / | / | 3,71 ± 0,27 | 0,67 ± 0,16 | - | ± |
| | ŽALÚDOK | 4,01 ± 0,20 | 4,09 ± 0,24 | / | / | / | / | / | / | / | 3,89 ± 0,34 | - | - |
| | OBLIČKY | 7,72 ± 1,01 | 3,60 ± 0,51 | / | / | / | / | / | / | 1,34 ± 0,13 | 1,41 ± 0,29 | - | - |
| | PLÚCA | 9,98 ± 0,95 | 5,40 ± 0,23 | 2,87 ± 0,45 | 3,29 ± 0,28 | / | / | / | / | 3,10 ± 0,83 | 0,93 ± 0,54 | - | - |
| | SLEZINA | 11,05 ± 0,71 | 4,92 ± 0,69 | / | / | / | / | / | / | 2,54 ± 0,14 | / | - | ± |
| | KOŽA KRÍDLA | 4,15 ± 0,19 | 3,14 ± 0,35 | / | / | / | / | / | / | / | / | - | - |
| KOŽA SVAL | 4,59 ± 0,17 | 4,78 ± 0,54 | / | / | / | / | / | / | 0,78 ± 0,27 | / | ± | ± | |
| TUK | 4,54 ± 0,48 | 2,26 ± 1,17 | / | / | / | / | / | / | 2,04 ± 0,80 | / | + | - | |
| KS 1 BR3 | PSL | 3,63 ± 0,27 | / | / | / | / | / | / | / | 2,34 ± 0,51 | / | - | ± |
| | SSLH | 4,97 ± 0,59 | / | / | / | / | / | / | / | 1,09 ± 0,50 | / | - | ± |
| | SSLD | 4,46 ± 0,45 | / | / | / | / | / | / | / | 2,13 ± 0,42 | / | - | + |
| | SRDCE | 5,45 ± 0,78 | / | / | / | / | / | / | / | 15,36 ± 1,56 | 11,71 ± 0,47 | + | + |
| | PEČEŇ | 6,88 ± 2,44 | 3,76 ± 0,29 | / | / | / | / | / | / | 3,13 ± 0,38 | 5,00 ± 0,79 | ± | + |
| | ŽALÚDOK | 3,05 ± 0,41 | 1,86 ± 0,39 | / | / | / | / | / | / | 12,42 ± 1,07 | / | + | + |
| | OBLIČKY | 7,71 ± 0,44 | 3,04 ± 0,16 | / | / | / | / | / | / | 2,73 ± 0,41 | 4,32 ± 0,40 | - | ± |
| | PLÚCA | 9,48 ± 1,27 | 6,27 ± 0,13 | / | / | / | / | / | / | 3,87 ± 0,79 | 1,32 ± 0,23 | ± | + |
| | SLEZINA | 12,22 ± 0,12 | / | / | / | / | / | / | / | 4,23 ± 0,39 | / | ± | + |
| | KOŽA KRÍDLA | 3,98 ± 1,92 | 1,37 ± 0,27 | / | / | / | / | / | / | 1,88 ± 0,75 | / | - | + |
| KOŽA SVAL | 2,87 ± 0,38 | 2,69 ± 0,22 | / | / | / | / | / | / | 14,01 ± 0,56 | 11,76 ± 1,10 | ± | ± | |
| TUK | 1,11 ± 0,23 | 2,06 ± 0,24 | / | / | / | / | / | / | / | / | + | + | |

Legenda: Zvýraznené veľkosti IZ predstavujú pozitívne výsledky; SD – smerodajná odchýlka; + pozitívna vzorka; - negatívna vzorka; ± dubiózna vzorka; T – tkanivo; Š – mäsová šťava

Tab. 5 Výsledky stanovenia screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok vo vyšetrovaných maticiach pomocou metódy STAR, Premi®Test a Explorer 2.0

| Skupina zvierat | Matica | STAR | | | | | | | | | | Premi®Test | EXPLORER |
|-------------------------|-------------|---|-------------|---------------------------------|-------------|-------------------------------|---|-----------------------------|-------------|-----------------------------------|--------------|------------|----------|
| | | <i>B.stearothermophilus</i> IZ (mm+SD) | | <i>B.subtilis</i> IZ (mm+SD) | | <i>B.cereus</i> IZ (mm+SD) | | <i>E.coli</i> IZ (mm+SD) | | <i>K.rhizophila</i> IZ (mm+SD) | | | |
| | | T | Š | T | Š | T | Š | T | Š | T | Š | | |
| PS 2 BR2+SAL + FK | PSĽ | 5,52 ± 0,75 | 3,74 ± 0,35 | / | / | / | / | / | / | 1,67 ± 0,88 | / | ± | + |
| | SSLH | 4,09 ± 0,91 | 5,27 ± 0,60 | / | / | / | / | / | / | 1,19 ± 0,28 | 3,82 ± 0,25 | - | - |
| | SSLĐ | 5,45 ± 1,05 | 2,49 ± 0,54 | / | / | / | / | / | / | / | 2,00 ± 0,19 | - | - |
| | SRDCE | 2,48 ± 0,31 | 5,19 ± 0,68 | / | / | / | / | / | / | / | 1,31 ± 0,15 | ± | - |
| | PEČEŇ | 7,91 ± 1,68 | 6,11 ± 0,46 | 1,43 ± 0,23 | / | / | / | / | / | 3,87 ± 0,21 | 4,74 ± 0,75 | ± | + |
| | ŽALÚDOK | 3,12 ± 0,35 | 4,73 ± 0,53 | / | / | / | / | / | / | / | 1,90 ± 0,23 | - | ± |
| | OBLIČKY | 8,16 ± 0,87 | / | / | / | / | / | / | / | 1,42 ± 0,49 | / | - | - |
| | PLŮCA | 9,54 ± 0,32 | 6,24 ± 0,31 | 2,93 ± 0,15 | 3,46 ± 0,72 | / | / | / | / | 2,65 ± 0,25 | 1,79 ± 0,45 | - | ± |
| | SLEZINA | 10,86 ± 0,98 | / | / | / | / | / | / | / | 2,24 ± 0,77 | / | - | - |
| | KOŽA KRÍDLA | 5,50 ± 0,34 | 4,45 ± 1,07 | / | / | / | / | / | / | / | 1,75 ± 0,28 | - | ± |
| KOŽA SVAL | 4,85 ± 0,55 | 6,93 ± 0,28 | / | / | / | / | / | / | / | 1,50 ± 0,18 | - | ± | |
| TUK | 3,62 ± 0,33 | 3,48 ± 0,52 | / | / | / | / | / | / | / | 1,13 ± 0,55 | - | ± | |
| KS 2 BR3 + FK | PSĽ | 6,79 ± 0,62 | 4,02 ± 0,23 | / | / | / | / | / | / | 16,01 ± 0,65 | 12,98 ± 1,29 | ± | ± |
| | SSLH | 4,55 ± 0,28 | 2,54 ± 0,35 | / | / | / | / | / | / | 15,24 ± 0,50 | 11,77 ± 2,59 | - | ± |
| | SSLĐ | 5,73 ± 0,31 | 0,46 ± 0,14 | / | / | / | / | / | / | 15,49 ± 1,13 | 11,61 ± 0,94 | - | ± |
| | SRDCE | 6,52 ± 0,35 | 5,36 ± 0,77 | / | / | / | / | / | / | 12,91 ± 0,71 | 1,79 ± 0,14 | ± | ± |
| | PEČEŇ | 9,85 ± 0,74 | 7,69 ± 1,06 | / | / | / | / | / | / | 4,05 ± 0,48 | 2,53 ± 0,21 | ± | ± |
| | ŽALÚDOK | 3,39 ± 0,37 | 4,26 ± 0,79 | / | / | / | / | / | / | 11,10 ± 0,68 | / | - | + |
| | OBLIČKY | 8,37 ± 0,50 | 5,30 ± 1,18 | / | / | / | / | / | / | 3,64 ± 0,34 | 6,72 ± 0,65 | + | ± |
| | PLŮCA | 10,80 ± 0,83 | 4,53 ± 0,31 | / | / | / | / | / | / | 4,48 ± 0,43 | 0,47 ± 0,15 | - | ± |
| | SLEZINA | 11,71 ± 0,37 | / | / | / | / | / | / | / | 4,24 ± 0,42 | / | - | ± |
| | KOŽA KRÍDLA | 2,10 ± 0,32 | 3,44 ± 1,02 | / | / | / | / | / | / | / | 1,12 ± 0,22 | - | + |
| KOŽA SVAL | 5,26 ± 0,34 | 4,21 ± 0,24 | / | / | / | / | / | / | 1,86 ± 0,31 | 1,67 ± 0,31 | ± | ± | |
| TUK | 7,23 ± 0,42 | 4,17 ± 1,04 | / | / | / | / | / | / | / | / | ± | + | |

Legenda: Zvýraznené veľkosti IZ predstavujú pozitívne výsledky; SD – smerodajná odchýlka; FK - fermentované krmivo + pozitívna vzorka; - negatívna vzorka; ± dubiózna vzorka; T – tkanivo; Š – mäsová šťava

Pri vyšetrovaní tkanív metódou STAR boli pri všetkých skupinách brojlerových kurčiat detegované porovnateľné výsledky s výnimkou skupiny KS 2, pri ktorej sa prejavil antimikrobiálny efekt fermentovaného krmiva. Vyšetrované tkanivá vykazovali pozitívny výsledok na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus*, *K. rhizophila* a *B. subtilis*.

Premi®Test detegoval pozitívny výsledok v skupine PS 1 pri jednej matici (tuk) a v skupine KS 1 pri troch maticiach (srdce, žalúdok, tuk). Ostatné tkanivá vykazovali negatívny, resp. dubiózny výsledok. V skupine PS 2 nebol detegovaný žiaden pozitívny výsledok a v skupine KS 2 boli detegované dva pozitívne výsledky (obličky, tuk).

Explorer 2.0 test detegoval pozitívny výsledok v skupine PS 1 pri jednej matici (PSĽ) a v skupine KS 1 pri ôsmich maticiach (PSĽ, srdce, pečeň, žalúdok, plúca, slezina, koža krídla a tuk). Ostatné tkanivá vykazovali negatívny, resp. dubiózny výsledok. V skupine PS 2 boli detegované dva pozitívne výsledky (PSĽ, pečeň) a v skupine KS 2 tri pozitívne výsledky (žalúdok, koža krídla a tuk).

Screening rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu je veľmi dôležitý pre ochranu verejného zdravia a garanciu bezpečnosti potravín. Vzhľadom na výsledky prezentované v tejto práci a experimentálnu úpravu krmiva je pre vyslovenie konečného záveru a potvrdenie látky zodpovednej za pozitívny výsledok potrebné vykonať konfirmačnú analýzu.

Spracovanie príspevku bolo podporené projektmi VEGA MŠVVAŠ SR a SAV č. 1/0576/17 a APVV-14-0397.

POUŽITÁ LITERATÚRA

NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010 o farmakologicky účinných látkach a ich klasifikácii, pokiaľ ide o maximálne limity rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. Úradný vestník Európskej únie L 15, 2010, 1–72.
http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2026%20PREMi%20test.pdf
http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2025%20STAR%20test.pdf

ŠTÚDIUM SLZNEJ TEKUTINY PACIENTOV S PSYCHICKÝMI PORUCHAMI

Krajčíková K., Mašlanková J., Glinská, G., Semančíková, E., Tomečková V.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

ABSTRAKT

Oftalmologické ochorenia sú často pridružené k psychickým poruchám bez doposiaľ známych molekulárnych mechanizmov. Oftalmologické ochorenia sú často sprevádzané vyššou hladinou matrixových metaloproteináz. Cieľom práce bolo zistiť zmeny v hladinách rôznych foriem matrixovej metaloproteinázy 2 a 9 v slznej tekutine pacientov s psychickými poruchami v porovnaní so zdravými kontrolnými subjektmi pomocou želatínovej zymografie. U zdravých subjektov a pacientov s panickou poruchou neboli detekované matrixové metaloproteinázy 2 a 9. U pacientov s depresívnou poruchou a primárne bipolárnou poruchou bol pozorovaný nárast aktívnych foriem matrixovej metaloproteinázy 2 a 9. Psychické poruchy môžu viesť k zmenám slzných proteínov, čo môže odzrkadľovať budúci vývoj oftalmologických morbidít.

ÚVOD

Matrixové metaloproteinázy (MMPs) sú endopeptidázy, ktoré pre svoju katalytickú aktivitu vyžadujú dvojmocný kation zinku a vápnika. Štiepia komponenty extracelulárnej matrix (ECM) a chemokíny. *In vitro* a *in vivo* sú ich substrátmi najmä kolagén, elastín, želatína a kazeín (Zitka a kol., 2010). Napriek širšej škále substrátov jednotlivé izoformy vykazujú výraznú špecifitu voči jednému konkrétnemu substrátu. Substrátová špecifita vychádza zo štruktúry jednotlivých izoform. Typická štruktúra MMP je tvorená nasledovnými doménami: predoména, propeptid, katalytická doména a hemopexínová doména. Katalytické domény sú medzi izoformami homológne, štruktúrna heterogenita sa prejavuje na úrovni ostatných domén. U ľudí je známych 23 izoform MMP. Na základe štruktúry a substrátovej špecifity ich zatriedime nasledovne: kolagenázy, želatinázy, stromelyzíny, matrilizíny, MMP membránového typu a nekategorizované MMP. Všeobecne je ich funkciou reorganizácia tkaniva (oprava tkanív, morfogénéza, angiogénéza) (Jabłońska-Trypuć a kol., 2016). Regulácia správnej funkcie a homeostázy prebieha na viacerých úrovniach – od expresie cez aktiváciu zymogénu až po endogénnu inhibíciu. Fyziologicky sa ich hladiny zvyšujú pri embryonálnom vývine, morfogénéze a reštrukturalizácií tkanív. Taktiež vznikajú v rámci odpovede na zápal a oxidačný stres (Guľašová, 2016). Výsledkom neprimeranej expresie je nadmerná degradácia ECM, čo vedie k deštrukcii a dysfunkcii príslušného tkaniva. Dve želatinázy, MMP-9 a MMP-2, pôsobia pri rozvoji a sprostredkovaní rôznych patologických stavov. Ich zvýšené hladiny boli detekované napr. pri nádorových ochoreniach (Gimeno-García a kol., 2016), neuropsychických ochoreniach (Rybakowski a kol., 2013), metabolickom syndróme (Yadav a kol., 2014), hypertenzii (Vasanthi a kol., 2017), osteoartritíde (Zeng a kol., 2015) a mnohých ďalších. Svoj podiel majú aj na rozvoji očných ochorení. Narúšajú rohovkový epitel počas zápalu sprostredkovanom TNF- α (Yang a kol., 2012), ktorý je dôležitou bariérou chrániacou oko pred stresormi z okolia (mikrobiálne patogény, alergény). Pri mechanickom poškodení rohovky bola stanovená prítomnosť MMP-2 v rohovkovom epiteli pacientov bez detekcie MMP-2 u zdravých kontrolných subjektov (Garrana a kol., 1999). Vzhľadom na to, že želatinázy sú sekrečné enzýmy, ich aktivita bola analyzovaná nielen v tkanive, ale aj v slznej tekutine. Aktívna MMP-9 bola detekovaná v slzách pacientov so závažným vredovým ochorením, pričom v kontrolnej skupine nebola detekovaná MMP-2 ani MMP-9 (Singh a kol., 2012). Rovnako zvýšená MMP-9 bola v slzách pacientov vo všetkých typoch glaukómov (Sahay a kol., 2017) a syndróme suchého oka (Messmer a kol., 2016).

MATERIÁL A METODIKA

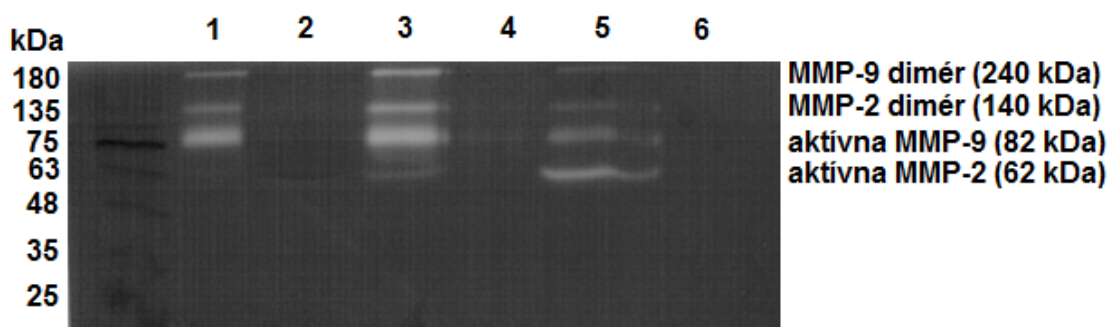
Od pacientov s diagnózou depresívnej poruchy (n=2), panickej poruchy (n=2) a primárne bipolárnej poruchy (n=1) bez oftalmologických morbidít a zdravým kontrolným subjektom (n=5) bola odobratá slzná tekutina použitím Sugi® celulózovej mikrošpongie. Koniec špongie bol umiestnený do dolného spojovkového vaku a následne premiestnený do mikroskúmavky a uskladnený pri $t = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do uskutočnenia meraní. Extrakcia proteínov z mikrošpongie prebehla pridaním 50 μl fyziologického roztoku na mikrošpongiu. Mikroskúmavka bola na konci prepichnutá a vložená do väčšej skúmavky a centrifugovaná pri 15 000 rpm 5 min pri teplote $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugácii bolo na mikrošpongiu pridaných ďalších 50 μl fyziologického roztoku a mikrošpongia bola opätovne centrifugovaná pri rovnakých podmienkach.

Vo vzorkách bolo stanovené celkové množstvo proteínov pomocou Bradfordovej metódy a hladiny proteínov vo vzorkách boli normalizované na úroveň najnižšej stanovenej koncentrácie.

Pre metódu želatinovej zymografie boli vzorky zmiešané s 8x Loading buffer v príslušnom pomere. Vzorky boli delené elektroforeticky na 10 % polyakrylamidovom géli kopolymerizovanom s 2 % želatinou pri 120 V dokiaľ farebná sonda nedosiahla koniec gélu. Po elektroforéze bol gél premývaný v 2,5 % Triton X-100 a inkubovaný vo vyvíjacom roztoku počas 40 hodín pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubácii bol gél farbený 0,5 % roztokom Coomassie Brilliant Blue v izopropanole a kyseline octovej po dobu jednej hodiny pri izbovej teplote a odfarbený v odfarbovacom roztoku I (40 % metanol, 10 % kyselina octová) po dobu 4 hodín a odfarbovacom roztoku II (5 % metanol, 10 % kyselina octová) po dobu 20 hodín. Enzymatické aktivity boli definované ako biele pásy na modrom pozadí.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Želatinovou zymografiou boli stanovované pro- a aktívne formy MMP-2 a MMP-9 (Obr.1). Vo vzorkách pacientov s primárne bipolárnou poruchou (3) a depresiou (5) boli detekované obe aktívne formy MMP2 aj MMP-9. Vo vzorke pacienta s depresívnou poruchou (1) bola detekovaná iba MMP-9 izoforma. U zdravých kontrolných subjektov (6) nebola detekovaná žiadna z foriem MMP-2 a MMP-9 rovnako ako v prípade pacientov s panickou poruchou (2,4).



Obr. 1 Zymogram slznej tekutiny pacientov s psychiatrickými poruchami: 1 - depresívna porucha, 2 - panická porucha, 3 - primárne bipolárna porucha, 4 - panická porucha, 5 - depresívna porucha, 6 - zdravý kontrolný subjekt

V tejto štúdií boli stanovované želatinázy MMP-2 a MMP-9 v slznej tekutine pacientov s psychickými poruchami ako markery narušenej homeostázy rohovkového epitelu. Vzhľadom na to, že tieto želatinázy sú zapojené do zápalových a degradačných procesov, môžeme predpokladať, že samotné psychické ochorenia alebo aplikované liečivá môžu prispievať k zápalovým procesom v oku, čím môžu byť príčinou neskoršieho rozvoja očných ochorení (syndróm suchého oka). Potvrdenie tejto hypotézy si vyžaduje ešte ďalšie hlbšie štúdie.

Chceme vyjadriť srdečné poďakovanie za poskytnutie vzoriek primárke MUDr. Eve Pálovej, PhD. z psychiatrického oddelenia Univerzitnej nemocnice L. Pasteura Košice a LF UPJŠ a Mgr. Anne Zimovej a Mgr. Marcelu Petrenkovej za asistenciu. Práca bola finančne podporená grantom vvg-2018-747.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Garrana RM, Zieske JD, Assouline M, Gipson IK. Matrix metalloproteinases in epithelia from human recurrent corneal erosion. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1999;40:1266-1270
- Gimeno-García AZ, Triñanes J, Quintero E, Salido E, Nicolás-Pérez D, Adrián-de-Ganzo Z, Alarcón-Fernández O, Abrante B, Romero R, Carrillo M, Ramos L, Alonso I, Ortega J, Jiménez A. Plasma matrix metalloproteinase 9 as an early surrogate biomarker of advanced colorectal neoplasia. *Gastroenterología y Hepatología*. 2016;39:433-441
- Guľašová Z. Štúdium klinicko-biochemických zmien na molekulovej úrovni pri kardiovaskulárnych ochoreniach: dizertačná práca. Košice: Univerzita P. J. Šafárika, 2016
- Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016;31:177-183
- Messmer EM, von Lindenfels V, Garbe A, Kampik A. Matrix Metalloproteinase 9 Testing in Dry Eye Disease Using a Commercially Available Point-of-Care Immunoassay. *Ophthalmology*. 2016;123:2300-2308
- Rybakowski JK, Remlinger-Molenda A, Czech-Kucharska A, Wojcicka M, Michalak M, Losy J. Increased serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) levels in young patients during bipolar depression. *Journal of Affective Disorders*. 2013;146:286-289
- Sahay P, Rao A, Padhy D, Sarangi S, Das G, Reddy MM, Modak R. Functional Activity of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Tears of Patients with Glaucoma. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2017;58:106-113
- Singh A, Maurya OPS, Jagannadhan MV, Patel A. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) activity in corneal ulcer and ocular surface disorders determined by gelatin zymography. *Journal of Ocular Biology, Diseases, and Informatics*. 2012;5:31-35
- Vasanthi R, Santha K, Periyasamy S, Sethupathy S. High serum Matrix metalloproteinase- 9 level in patients with Essential hypertension. *Journal of Dental and Medical Sciences*. 2017;16:50-52
- Yadav SS, Mandal RK, Singh MK, Verma A, Dwivedi P, Sethi R, Usman K, Khattri S. High Serum Level of Matrix Metalloproteinase 9 and Promoter Polymorphism – 1562 C:T as a New Risk Factor for Metabolic Syndrome. *DNA and Cell Biology*. 2014; 33:816-822
- Yang YN, Wang F, Zhou W, Wu ZQ, Xing YQ. TNF- Stimulates MMP-2 and MMP-9 Activities in Human Corneal Epithelial Cells via the Activation of FAK/ERK Signaling. *Ophthalmic Research*. 2012; 48:165-170
- Zeng GQ, Chen AB, Li W, Song JH, Gao CY. High MMP-1, MMP-2, and MMP-9 protein levels in osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*. 2015;14:14811-14822
- Zitka O, Kukacka J, Krizkov S, Huska D, Adam V, Masarik M, Prusa R, Kizek R. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17:3751-3768

KAZUISTIKA: ALTERNATÍVNA TERAPIA ALERGIE U PSA

Micháľová A., Fialkovičová M., Minguell F., Rigau T., Takáčová M.

Klinika malých zvierat – Oddelenie vnútorných chorôb, UVLF, Košice

ÚVOD

Koža je najväčším orgánom tela. Tvorí bariéru medzi vonkajším a vnútorným prostredím, ochraňuje organizmus pred chemickými, fyzikálnymi a patogénnymi vplyvmi. Je primárnym zmyslovým orgánom pre teplotu, tlak, dotyk, bolesť a svrbenie (Kanitakis, 2002). Podľa TCM je koža vonkajším (Yang) a zároveň aj vnútorným (Yin) orgánom. Je považovaná za druhé pľúca. Na správne určenie dermatologickej diagnózy je potrebné určenie typu lézie, lokalizácia, profundita a patogénny faktor, ktorý ju spôsobuje (De-Hui Shen a kol., 1995). Na základe etiológie môžu byť dermatologické ochorenia rozdelené na vnútorné, ktorých príčinou je imbalancia vychádzajúca z vnútra organizmu a externé, ktoré sú zapríčinené vonkajším problémom, alebo súčasne obidvomi príčinami. Medzi vonkajšie príčiny kožnej deficiencie patrí podľa TCM Chlad, Vietor, Letné Teplo, Sucho, Vlhko, Horúčava/Oheň. Nemôžeme tvrdiť, že ide o tzv. „zlé faktory“, ale pokiaľ je organizmus vo vzťahu k nim oslabený majú na organizmus negatívny vplyv (Schoen, 2001). Dermatologické ochorenia sa vyskytujú vo veterinárnej medicíne u mnohých zvierat. Nie su to ochorenia, ktoré by akútne ohrozovali život, ale vyžadujú veľmi dôslednú diagnostiku a terapiu, ktorá je zvyčajne zdĺhavá a niekedy aj finančne náročná. Dôležitým faktorom je taktiež čas, dôkladná anamnéza a spolupráca majiteľa zvierat'a s veterinárnym lekárom. Keďže kožné problémy bývajú riešené hlavne symptomatologicky, tak vo väčšine prípadov bývajú prvou a najrýchlejšou terapeutickou voľbou kortikoidy, čo žiaľ nie je vždy správne. (Svoboda a kol., 2000). Podľa TCVM sú prejavy alergických reakcií výsledkom deficitu obranných Qi systémov Obličiek a Pľúc, alebo nedostatku energie Yin v Krvi a Pečeni (Xie, Preast, 2013). Pretože deficit Pľúc vzniká dôsledkom pôsobenia Tepla a Vetra a deficit Obličiek vzniká dôsledkom nadbytku Vetra a Vlhka, tak v tomto prípade považujeme za nutné použiť akupunktúrne body, ktoré odstránia tento vietor a tonifikujú tieto orgány (Xie a kol., 1994). Medzi tieto body patrí TO-5, MM-12, HČ-4-11, ktoré odstránia nadbytok Vetra a Tepla. Na vyživenie krvi môžeme použiť SL-6 a na stlmenie svrbenia použijeme akupunktúrny bod S-7. (Maciocia, 1997). Prostredníctvom bodu O-3 a PL-9 môžeme tonifikovať obličky a pľúca. Ak pri týchto deficienciách dochádza aj k postihnutiu Pečene pridáme už k vyššie spomenutým bodom aj body P-1-2-3, a MM-18. (Schoen, 2001). V prípade potravinovej alergie je potrebné upraviť diétu podľa potreby pacienta, ročného obdobia a všetky problematické potraviny bezpodmienečne vylúčiť a zvierat'u nepodávať. Kožné ochorenia sú často charakterizované Vlhkom a Teplom (zápal, začervenanie, výtoky). Pri tejto diagnóze je vhodné podľa TCVM kŕmiť zviera studenými potravinami a obmedziť prísun teplých typov potravín. (Xie a Preast, 2010).

PRÍPADOVÁ ŠTÚDIA

Sledovaným pacientom bola päťročná suka plemena Bordeauxská doga „Penny“, ktorá trpela vypadávaním srsti a vznikom svrbivých kožných zmien v oblasti pravej prednej končatiny a v oblasti brucha. Prvý krát prišla na kliniku dňa 4.4. 2017, kedy sa majitelia rozhodli po neúspešnej farmakologickej liečbe vyskúšať alternatívnu terapiu. Zo začiatku sa symptómy objavovali hlavne počas jari a leta, neskôr už celoročne. Zvýšenú citlivosť prejavovalo zviera hlavne na alergény z vonkajšieho prostredia. Pacientovi bol dlhodobo podávaný kortizón, neskôr bola aplikovaná autovakcína počas obdobia jeden a pol roka, ale žiaľ bez pozitívneho výsledku. Zvierat'u bol taktiež vykonaný krvný test na potravinové alergie v ktorom bola potvrdená alergia na sóju a teľacie mäso. Po základnom klinickom vyšetrení boli všetky triasové hodnoty v norme, avšak jazyk bol svetlý a suchý. Koža bola suchá, srst' matná,

s kožnými eflorescenciami v podobe pruritických exantémov a červených fľakov prítomných v oblasti abdomenu a extremitas anterior dextra. Po zoškrabe kože nebola zaznamenaná ani prítomnosť ektoparazitov ani plesní. Okrem kožných zmien zviera netrpelo žiadnymi inými symptómami. Vyšetrenie krvného obrazu preukázalo zvýšenú hladinu eozinofilov (tabuľka číslo 1). Ostatné krvné parametre boli v rozmedzí fyziologických hodnôt. Zvieraťu sme po klinickom vyšetrení a stanovení diagnózy aplikovali terapiu prostredníctvom akupunktúry kde sme použili nasledujúce akupunktúrne body: MM13-18-23, HČ-4, PL-7, P-3 v časovom intervale 20 minút. Na ďalšiu terapiu prišlo zviera 18.4.2017, kedy majitelia popísali, že pes sa stále škriabe. Zo zdravotných dôvodov a na odporúčenie veterinárov suka postupne prešla na diétu BARF. Keďže tento prechod musel byť urobený postupne, zviera bolo zo začiatku kŕmené kombinovane, t.j. 50% diéty tvorili granule a 50% diéty tvorila naturálna strava a po čase prešlo zviera čisto na diétu BARF. Pri druhom stretnutí sme pacientovi aplikovali akupunktúrnú terapiu v podobe nasledujúcich bodov: HČ-11, HC-14, MM-40, P-3, MM-18, PL-9. Tretie sedenie sa uskutočnilo 2.5.2017, kedy sa zaznamenal u pacienta výrazne znížený pruritus a zlepšenie stavu kožných lézií, avšak bola zaznamenaná otitída. V rámci akupunktúry sme použili nasledujúce body: HČ-11, PL-9, MM-12-13-18, P-3 a s rovnakou terapiou sme pokračovali aj pri štvrtom stretnutí dňa 16.5.2017. Po ďalších dvoch týždňoch čo bolo 30.5.2017 sme zvolili akupunktúrnú terapiu týchto bodov: HČ4-11, PL-9, MM12-13-18-40, P3. Zviera malo stále otitídu, pruritus a 2 pustuly v oblasti brucha. Dňa 13.6.2017 sme pacientovi aplikovali poslednú akupunktúrnú terapiu. Stav kože sa síce výrazne upravil, otitída, lézie a pruritus úplne vymizli, ale zviera vykazovalo miernu agresivitu voči ostatným psom, preto sme ako akupunktúrnú terapiu zvolili nasledovné body: HČ4-11, PL-9, MM-12-18, P-3 a odporúčili sme majiteľom, aby bol suke podávaný výživový doplnok s obsahom silimarínu a ďalších prírodných zložiek na úplnú detoxikáciu organizmu a upokojenie zvieraťa počas obdobia jedného mesiaca. Po tejto terapii sa stav zvieraťa úplne upravil a došlo k úplnému vymiznutiu symptómov a aj prejavov agresivity voči ostatným psom.

ZÁVER

V tomto prípade hovoríme o skríženom type alergickej reakcie na potraviny a alergény z prostredia. Keďže po neúspešnej terapii kortikoidmi sa stav pacienta nezlepšoval, stav sme sa snažili stabilizovať prostredníctvom dlho používaných tradičných metód tradičnej čínskej medicíny, ktorým je akupunktúra a následne pokračovali použitím fytoterapeutík. Keďže tradičná čínska medicína sa na každého jedinca zameriava ako na individuálny celok, pri každej návšteve sme taktiež museli prihliadať na aktuálny energetický a zdravotný stav pacienta. (Maciocia, 1997). Preto sme pri jednotlivých terapiách nepoužívali vždy úplne rovnaké akupunktúrne body. V závere terapie sme vybrali ako doplnok fytoterapeutikum s obsahom silimarínu, ktorý má podľa tradičnej čínskej medicíny detoxikačný, upokojujúci a protisvrbivý účinok. (Fougere, Wynn, 2007). Podľa TCM patrí pečeň pod element dreva. Charakteristickým emocionálnym prejavom tohto elementu je agresivita a hnev. Pruritus je podľa TCM viazaný k pečeni, takže pokiaľ máme výrazne pruritické stavy je dobré pečeň detoxikovať, aby sa nahromadený „vietor“ v pečeni postupne mohol eliminovať. (Xie a kol., 1994). Keďže sme postupovali podľa tradičných princípov a filozofie TCM, použili sme vybrané akupunktúrne body a fytoterapeutiká a stav pacienta sme stabilizovali.

Tab. 1 Hematologické parametre pacienta stanovené prístrojom LaserCyte Dx (IDEXX).

| TEST | VÝSLEDKY | REFERENČNÉ HODNOTY |
|-------|-----------------------------------|--------------------|
| RBC | 5,53 m/ μ L | 5,50-8,50 |
| HCT | 38,2% | 37,0-55,0 |
| HBG | 13,6 g/dL | 12,0-18,0 |
| MCV | 69,1 fL | 60,0-77,0 |
| MCH | 24,6pg | 18,5-30,0 |
| MCHC | 35,6g/dL | 30,0-97,5 |
| RDW | 15,4% | 14,7-17,9 |
| RETIC | 34,5 K/ μ L | 10,0-110,0 |
| WBC | 15,46 K/ μ L | 5,50-16,90 |
| NEU | 9,55 K/ μ L | 2,00-12,00 |
| LYM | 2,65 K/ μ L | 0,50-4,90 |
| MONO | 1,32 K/ μ L | 0,30-2,00 |
| EOS | 1,92 K/μL ↑ | 0,10-1,49 |
| BASO | 0,02 K/ μ L | 0,00-0,10 |
| PLT | 268 K/ μ L | 175-500 |

POUŽITÁ LITERATÚRA

- De-Hui Shen a kol: Manual of dermatology in Chinese medicine, Seattle, 1995, Eastland Press.
- Fougere B. J., Wynn S. G., Veterinary herbal medicine: Mosby, 2007: ISBN-13: 978-0323-02998-8.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. European Journal of Dermatology, 12(4), 390–401.
- Maciocia G. *The practice of Chinese medicine*. New York, NY, USA: Churchill Livingstone; 1997.
- Schoen, A.M.(2001). Veterinary acupuncture: Ancient art to modern medicine [2nd ed] : 3- 293. Edit for SCHOEN A.M. Saint-Louis : MOSBY.
- Svoboda M. a kol: Choroby psa a mačky. 1. Diel, Brno, 2000: 336, ISBN: 80-902595-2-9.
- Xie H. et al: Traditional Chinese Veterinary Medicine. Beijing Agricultural University Press, Beijing, China 1994. ISBN-13: 978-7-81002-626-0.
- Xie H., Preast V. Xie's Chinese Veterinary Herbology. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell 2010.
- Xie H., Preast V. Traditional Chinese Veterinary Medicine Fundamental Principles, 2nd edition. Tianjin China 2013. ISBN: 978-1-934786-41-3.

NEUROGÉNNY POTENCIÁL PROGENITOROV SÍDLIACICH VO VÝSTELKE CENTRÁLNEHO KANÁLA MIECHY POTKANA V RÔZNYCH POSTNATÁLNYCH ŠTÁDIÁCH ONTOGENÉZY

Mochnacký F.¹, Slovinská L.², Alexovič Matiašová A.¹, Daxnerová Z.¹, Ševc J.¹

¹Katedra bunkovej biológie, UPJŠ, Košice

²Neurobiologický ústav BMC, SAV, Košice

ABSTRAKT

Predošlé výskumy ukázali, že počas postnatálneho obdobia života potkana dochádza vo výstelke centrálného kanála (CK) miechy k dynamickým zmenám. Naším cieľom bolo otestovať početnosť a neurogénny potenciál progenitorov sídliačich vo výstelke CK potkana v rôznych postnatálnych štádiách ontogenézy po kultivácii *in vitro* podmienkach. Analýza ukázala, že progenitorové bunky na P8 tvoria signifikantne viac neurosfér (P8: 12,0±3,8; P29: 7,3±1,1; P90: 5,9±1,5 neurosfér na mm²) so signifikantne väčším polomerom (P8: 55,7±8,6µm; P29: 25,2±3,4µm; P90: 18,6±4,7µm) než progenitorové bunky dospeljej miechy. Po diferenciacii sa progenitory diferencujú na neuróny hlavne na P8 (P8: 18,0±7,3%; P29: 3,3±1,8%; P90: 5,5±0,8%). Oligodendrocyty vznikajú hlavne na P8 a P29 (P8: 13,4±5,0%; P29: 17,4±6,7%; P90: 5,9±1,7%). Progenitory na P29 a P90 sa diferencujú hlavne na bunky astroglie (P8: 25,4±10,1%; P29: 62,9±3,8%; P90: 47,8±9,9%). Naše výsledky dokazujú, že v artifiálnych podmienkach sa množstvo a aktivita progenitorových buniek postupne znižuje, pričom s vekom klesá ich schopnosť tvoriť neuróny a oligodendrocyty. Tieto výsledky predstavujú cenný podklad pre *in vivo* regeneračné štúdie.

ÚVOD

Výskum na našom pracovisku priniesol poznatky o zmenách prebiehajúcich vo výstelke CK miechy v rôznych postnatálnych štádiách ontogenézy potkana. Zistilo sa, že po narodení v mieche stále prebiehajú pomerne dynamické deje, čo vyvrátilo doterajšie názory o statickej povahe miechy v postnatálnom období (Alexovič Matiašová a kol., 2017; Ševc a kol., 2011; Ševc a kol., 2014). Bunky nachádzajúce sa vo výstelke CK sú počas skorých postnatálnych fáz ontogenézy (do P15) zväčša nediferencované (nepublikované výsledky), intenzívne proliferujú a majú krátky bunkový cyklus (Alexovič Matiašová a kol., 2017). Počas P8 dochádza v CK k vrcholu proliferatívnej aktivity, ktorá potom postupne upadá. S klesajúcou proliferáciou sa taktiež predlžuje dĺžka bunkového cyklu (Alexovič Matiašová a kol., 2017). V neskorších fázach postnatálneho vývinu výstelka CK dozrieva a nachádzajú sa v nej prevažne diferencované bunky (nepublikované výsledky). Naším cieľom bolo stanoviť v *in vitro* podmienkach diferenciačný potenciál progenitorových buniek sídliačich vo výstelke centrálného kanála potkana v rôznych štádiách ontogenézy. Na základe poznatkov predchádzajúcich výskumov predpokladáme, že v skorých postnatálnych štádiách ontogenézy bude neurogénny potenciál progenitorov výstelky CK vyšší než u dospelých jedincov.

MATERIÁL A METODIKA

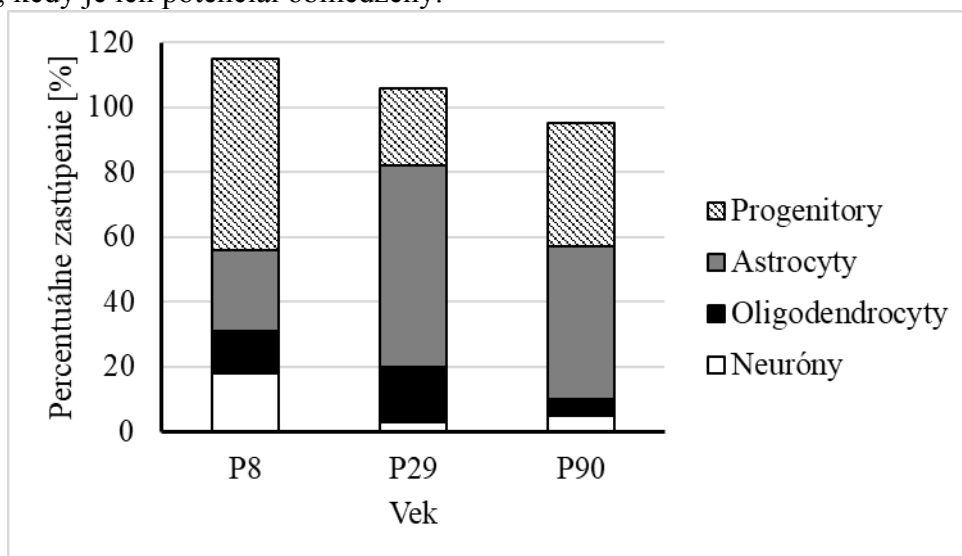
V experimente sme použili laboratórne potkany kmeňa Wistar vo veku P8 (skorý postnatálny vývin), P29 (neskorý postnatálny vývin) a P90 (dospelosť). Zo zvierat sme odobrali miechový segment L3-L4 (P8: 2,66 mm, P29: 5,6 mm, P90: 6,44 mm), pričom dĺžka odobratého segmentu bola zvolená tak, aby v jednotlivých obdobiach obsahovala približne rovnaký počet buniek, ktoré tvoria stenu centrálného kanála (Alexovič Matiašová a kol., 2017). Izolované tkanivo sme preniesli do roztoku obsahujúceho 0,01% papain a 0,01% DNázu. Po 1,5 h (37°C) sme tkanivo mechanicky disociovali na bunkovú suspenziu, ktorú sme následne

centrifugovali. Bunkovú kultúru sme kultivovali v proliferačnom médiu (DMEM, Ham's F12 (1/1 v/v), 5 mg/ml streptomycín, 5 IU/ml penicilín, B27, N2) s rastovými faktormi bFGF-2 (20 ng/ml) a EGF (20 ng/ml) po dobu 12 dní, aby sa vytvorili neurosféry. Následne sme vyhodnotili polomer neurosfér a počet neurosfér na mm². Po analýze sme neurosféry mechanicky disociovali a kultivovali v 3% teľacom fetálnom sére (FCS) bez rastových faktorov po dobu 14 dní, aby sme navodili diferenciáciu buniek. Bunky sme imunofluorescenčne označili za použitia neuronálnych (anti-TUJ1, anti-MAP2, anti-DCX), oligodendrocytových (anti-Olig2, anti-NG2, anti-APC), astrogliových (anti-GFAP, anti-Vimentin, anti-S100b) a progenitorových (anti-Nestin) markerov. Na nukleárne farbenie sme použili Draq5. Snímky sme zhotovili na konfokálnom mikroskope s použitím softvéru LAS AF a fenotyp buniek sme vyhodnotili v programe ImageJ.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe údajov z literatúry predpokladáme, že progenitorové bunky s neurogénym potenciálom a schopnosťou tvoriť neurosféry sa nachádzajú v/v tesnej blízkosti CK, pričom ich identita stále nie je ozrejmená. Preto sme podľa práce Alexovič Matiašová a kol. (2017) stanovili dĺžku odobratých miechových segmentov tak, aby sme kultivovali porovnateľné počty buniek, ktoré tvoria výstelku CK v analyzovaných obdobiach. Vďaka tomu sme mohli porovnať počty neurosfér medzi jednotlivými vekmi. Zistili sme, že progenitorové bunky zvierat vo veku P8 vytvárajú signifikantne viac neurosfér než progenitorové bunky zvierat vo veku P90 (P8: 12,0±3,8; P29: 7,3±1,1; P90: 5,9±1,5 neurosfér na mm²). Polomer neurosfér vytvorených z progenitorov zvierat vo veku P8 je taktiež signifikantne väčší než u zvierat vo veku P90 (P8: 55,7±8,6µm; P29: 25,2±3,4µm; P90: 18,6±4,7µm). Naše výsledky sú podporené výsledkami štúdie od Slovinská a kol. (2015) kde taktiež preukázali signifikantne väčší počet vytvorených neurosfér so signifikantne väčším polomerom v neonatálnom období (P1) v porovnaní s neurosférami dospelých jedincov. Progenitorové bunky sa diferencujú na neuróny vo veku P8 signifikantne viac než vo veku P29 a P90 (P8: 18,0±7,3%; P29: 3,3±1,8%; P90: 5,5±0,8%) (Obr. 1.). Slovinská a kol. (2015) taktiež pozorovali vyššiu diferenciáciu na neuróny v neonatálnom období než u dospelých jedincov, avšak bez štatistickej významnosti. Na oligodendrocyty sa progenitorové bunky diferencujú najmä vo veku P8 a P29 a v menšej miere vo veku P90 (P8: 13,4±5,0%; P29: 17,4±6,7%; P90: 5,9±1,7%), avšak medzi týmito skupinami nie sú signifikantné rozdiely (Obr. 1.). V porovnaní s výsledkami od Slovinská a kol. (2015) sa naše dáta rozchádzajú, pretože v tejto štúdii pozorovali mierne vyššiu diferenciáciu na oligodendrocyty u dospelých jedincov než u neonatálnych jedincov. Avšak ani tento rozdiel nebol štatisticky významný. V najväčšej miere sa progenitorové bunky diferencujú na bunky astrogliovej línie (P8: 25,4±10,1%; P29: 62,9±3,8%; P90: 47,8±9,9%), pričom v porovnaní s P8 dochádza vo veku P29 a P90 k signifikantnému nárastu astrogliového potenciálu (Obr. 1.). V tomto prípade naše výsledky opäť nekorelujú s výsledkami od Slovinská a kol. (2015), kde pozorovali vyššiu diferenciáciu na astrogliovú líniu v neonatálnom období v porovnaní s dospelými jedincami, no znova bez štatistickej významnosti v rozdiel. V štúdii od Slovinská a kol. (2015) rozdiely v diferenciácii progenitorových buniek na konečný bunkový typ medzi rôznymi vekmi zvierat (P1 a dospelí jedinci) neboli štatisticky významné. Predpokladáme, že nesúlad v našich dátach je spôsobený výberom neonatálneho veku. Podľa Alexovič Matiašová a kol. (2017) dochádza vo veku P8 k rapidnej proliferácii v oblasti CK a táto proliferácia je signifikantne vyššia ako vo veku P1. To by mohlo vysvetľovať rozdiely medzi našimi výsledkami a výsledkami práce Slovinská a kol. (2015). Naše výsledky potvrdzujú predpoklad o klesajúcom potenciále progenitorových buniek počas ontogenézy. Na základe týchto výsledkov teda predpokladáme, že progenitorové bunky sídlia vo výstelke CK miechy môžu prispievať k regeneračnej

kapacite po poškodení silnejšie v skorých postnatálnych štádiách ontogenézy než u dospelých jedincov, kedy je ich potenciál obmedzený.



Obr. 1 Približné percentuálne zastúpenie fenotypov diferencovaných z progenitorových buniek v *in vitro* podmienkach izolovaných z miechy potkana vo veku P8, P29 a P90.

Práca bola podporená grantami APVV-15-0239, VEGA 2/0145/16, VEGA 1/0820/17

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alexovič Matiašová A, Ševc J, Tomori Z, Gombalová Z, Gedrová S, Daxnerová Z. Quantitative analyses of cellularity and proliferative activity reveals the dynamics of the central canal lining during postnatal development of the rat. *J Comp Neurol.* 2017; 525(3): 693-707.
- Ševc J, Daxnerová Z, Haňová V, Koval' J. Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. *Acta Histochem.* 2011; 113(2): 156-162.
- Ševc J, Matiašová A, Kútina V, Daxnerová Z. Evidence that the central canal lining of the spinal cord contributes to oligodendrogenesis during postnatal development and adulthood in intact rats. *J Comp Neurol.* 2014; 522(14): 3194-3207.
- Slovinská L, Szekiová E, Blaško J, Devaux S, Salzet M, Čížková D. Comparison of dynamic behavior and maturation of neural multipotent cells derived from different spinal cord developmental stages: an *in vitro* study. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2015; 75(1): 107-114.

VPLYV NUTRACEUTÍK NA BACHOROVÚ A ČREVNÚ FERMENTÁCIU, HEMATOLOGICKÉ PARAMETRE A PARAZITOLOGICKÝ STATUS JAHNIAT OVPLYVNENÝCH ENDOPARAZITÓZOU

Mravčáková D.¹, Várady M.², Váradyová Z.¹

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

²Parazitologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť účinok zmesi vybraných liečivých rastlín (Herb) na hematologické a parazitologické parametre jahniat experimentálne nakazených gastrointestinálnym (GI) parazitom *Haemonchus contortus*. Dvadsaťštyri jahniat bolo rozdelených do štyroch experimentálnych skupín: nakazené zvieratá (I), nakazené zvieratá suplementované krmivom s Herb (I+Herb), nenakazené zvieratá (C) a nenakazené zvieratá suplementované krmivom s Herb (C+Herb). Hemogram červených krviniek v nakazených skupinách ukázal typický klinický príznak hemonchózy - anémiu. Priemerný prírastok živej hmotnosti bol vyšší v skupine I+Herb v porovnaní so skupinou I meraný v dňoch (D) D32 ($p < 0,01$) a D50 ($p < 0,001$). Vzorky trusu a počty vajčiek na gram trusu (EPG) boli kvantifikované v dňoch D0, D20, D32, D50 a D60. EPG v nakazených skupinách sa zvyšovalo až do D32. Po dni D32 bolo EPG v skupine I+Herb signifikantne nižšie ako v skupine I ($p < 0,05$). EPG v skupine I+Herb bolo nižšie aj na D50 a D60 v porovnaní so skupinou I ($p < 0,05$). Výsledky ukázali, že rastlinné nutraceutiká pridávané do krmiva jahniat prispeli k spomaleniu dynamiky infekcie a zlepšili produkčné ukazovatele jahniat.

ÚVOD

Vo veterinárnej medicíne sú liečivé rastliny obsahujúce sekundárne metabolity s dôležitými biologickými aktivitami stále častejšie používané ako nutraceutiká so schopnosťou ovplyvniť zdravotný stav zvierat a prostredníctvom vedecky preukázateľných farmakologických účinkov (Githiori a kol., 2006; Váradyová a kol., 2018). Nedávna štúdia (Spiegler a kol., 2017) rastlinných polyfenolov s antihelmintickými účinkami poukázala na možnosti využitia sekundárnych metabolitov liečivých rastlín pri alternatívnej liečbe GI parazitóz k súčasným štandardným antihelmintikám. Jedným z najznámejších a najpatogénnejších GI parazitických nematódov oviec a kôz je *Haemonchus contortus*, ktorý má vysokú reprodukčnú schopnosť a odolnosť voči antihelmintikám. Rastlinné nutraceutiká môžu mať priamy farmakologický vplyv na biológiu parazita, alebo môžu nepriamo ovplyvniť odolnosť hostiteľa voči parazitárnej infekcii (Váradyová a kol., 2017). Cieľom experimentu bolo zistiť vplyv zmesi vybraných medicínálnych rastlín na bachorovú a črevnú fermentáciu *in vitro*, hematologické, imunologické a parazitologické parametre jahniat experimentálne nakazených parazitom *H. contortus*.

MATERIÁL A METODIKA

Zmes sušených rastlín (Herb) obsahovala: 8.55% *Althaea officinalis*, *Petasites hybridus*, *Inula helenium*, *Malva sylvestris*, *Chamomilla recutita*, *Plantago lanceolata*, *Rosmarinus officinalis*, *Solidago virgaurea*, *Fumaria officinalis*, *Hyssopus officinalis*, *Melisa officinalis*, 5% *Foeniculum vulgare* a 1% *Artemisia absinthium*. Medicínálne rastliny boli z komerčných zdrojov a boli testované *in vitro* v bachorovej tekutine a inokulu z fécés na stanovenie fermentačných parametrov po 24 hod inkubácie (Váradyová a kol., 2005). Analýza sekundárnych metabolitov v rastlinách bola vyhodnotená kvalitatívne (Wencelová a kol., 2014) a aj kvantitatívne v metanolových extraktoch pomocou ultra-vysoko-účinnnej

kvapalinovej chromatografie (UPLC/MS/MS). Dvadsaťštyri jahničiek (zošľachtená valaška, vek 3-4 mesiace, $12,5 \pm 1,64$ kg) bolo ustajnených s voľným prístupom k vode. Každé zviera bolo kŕmené diétou pozostávajúcou z lúčneho sena (600 g sušiny/deň) a koncentrátu (350 g sušiny/deň). Jahňatá boli rozdelené do štyroch experimentálnych skupín (n=6 jahniat/skupinu): nakazené *H. contortus* (I), nakazené *H. contortus* a suplementované s Herb v krmive (100 g sušiny/deň), nenakazené zvieratá a nenakazené zvieratá suplementované s Herb v krmive po dobu 60 dní. Zvieratá boli nakazené perorálne s približne 5000 larvami tretieho štádia (L3) kmeňa *H. contortus* citlivého na antihelmintiká (MHco1). V dňoch (D) D20, D27, D32, D50 a D60 boli zvieratá odvážené a boli odobraté vzorky krvi na hematologické analýzy, na stanovenie zápalových parametrov (sérum amyloid A, sérum kalprotektín) a bolo odobraté féces na detekciu vajčiek v truse.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bachorové a črevné fermentačné parametre jednotlivých liečivých rastlín boli rozdielne ($p < 0,001$), ale nemali negatívny vplyv na fermentáciu. Z tabuľky č. 1 je zrejmé, že počet erytrocytov, HGB a HCT boli rozdielne v skupine I vs. C a v skupine I vs. C+Herb v D20 ($p < 0,001$), D32 ($p < 0,05$, $p < 0,01$ a $p < 0,001$) a D50 ($p < 0,001$). Kompletný hemogram červených krvných parametrov v oboch nakazených skupinách ukázal typický klinický príznak hemonchózy - anémiu. V našom experimente podávanie Herb nemalo prospešný vplyv na červené krvné parametre nakazených jahniat aj keď niektoré rastliny, ktoré obsahujú bioaktívne látky napr. *Sericea Lespedeza* (Shaik a kol., 2006), *Psidium guajava* a *Carissa spinarum* (Jan a kol., 2015) dokázali pozitívne ovplyvniť červené krvné parametre u kôz nakazených *H. contortus*.

Tab. 1
Erytrocyty (RBC), hemoglobín (HGB) a hematokrit (HCT) v skupinách jahniat

| | Deň | I | I+Herb | C | C+Herb | SD | I vs I+Herb | I vs C | I vs C+Herb |
|--------------|-----|------|--------|------|--------|------|-------------|--------|-------------|
| RBC (T/L) | 0 | 10 | 11 | 11 | 10 | 1,53 | Ns | Ns | Ns |
| | 20 | 6 | 7 | 10 | 10 | 1,07 | Ns | *** | *** |
| | 32 | 6 | 6 | 10 | 9 | 1,59 | Ns | *** | * |
| | 50 | 6 | 6 | 11 | 10 | 1,21 | Ns | *** | *** |
| HGB (g/L) | 0 | 107 | 102 | 106 | 101 | 10,2 | Ns | Ns | Ns |
| | 20 | 60 | 65 | 92 | 93 | 9,35 | Ns | *** | *** |
| | 32 | 58 | 56 | 100 | 92 | 9,82 | Ns | *** | *** |
| | 50 | 58 | 61 | 100 | 94 | 11,5 | Ns | *** | *** |
| HCT (L/L) | 0 | 0,21 | 0,22 | 0,23 | 0,23 | 0,03 | Ns | Ns | Ns |
| | 20 | 0,14 | 0,16 | 0,22 | 0,23 | 0,03 | Ns | *** | *** |
| | 32 | 0,15 | 0,14 | 0,27 | 0,20 | 0,03 | Ns | *** | ** |
| | 50 | 0,14 | 0,15 | 0,23 | 0,22 | 0,02 | Ns | *** | *** |

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Ns, nie je signifikantný rozdiel

Priemerný nárast živej hmotnosti nakazených jahniat s prídavkom Herb (I+Herb) bol signifikantne vyšší ($p < 0,001$) v porovnaní s nakazenými zvieratami (Tabuľka č. 2). Denný prírastok živej hmotnosti bol signifikantne nižší v skupine I (44 g/deň) než v skupine I+Herb (108.4 g/deň) a bol najvyšší v skupine C+Herb (134.6 g/d). EPG bolo signifikantne nižšie o 45% medzi 32. a 50. dňom infekcie a 63% medzi 32. a 60. dňom u nakazených jahniat

liečených Herb. Tento počet sa výrazne znížil po D32, čo mohlo byť dôsledkom priameho antihelmintického účinku medicínálnych rastlín (Waller a kol., 2001).

Tab. 2

Priemerná váha (BW) a živý váhový prírastok (LWG) jahniat s prídavkom Herb v krmive

| | Deň | I | I+Herb | C | C+Herb | SD | I vs I+Herb | I vs C | I vs C+Herb |
|-------------|-----|------|--------|------|--------|------|-------------|--------|-------------|
| BW (kg) | 0 | 12,2 | 12,5 | 12,7 | 12,5 | 1,64 | Ns | Ns | Ns |
| | 32 | 13,8 | 16,8 | 18,1 | 17,8 | 2,23 | Ns | ** | ** |
| | 50 | 14,4 | 17,9 | 19,3 | 19,6 | 2,55 | *** | *** | *** |
| LWG (kg) | 32 | 1,68 | 4,28 | 5,35 | 5,37 | 1,12 | ** | *** | *** |
| | 50 | 2,22 | 5,42 | 6,58 | 6,73 | 1,27 | *** | *** | *** |

p < 0,01; *p < 0,001; Ns, nie je signifikantný rozdiel

Koncentrácia sérového amyloidu A nebola v skupinách jahniat ovplyvnená, pravdepodobne tento marker nešpecifickej imunity nemusí byť vhodný pri vyhodnotení parazitárnej infekcie počas dlhších časových období. Koncentrácia kalprotektínu v sére bola signifikantne vyššia (p < 0,001) v skupine I+Herb iba na D32. Prídavanie herbálnych nutraceutík do krmiva nakazených jahniat GI nematódom *H. contortus* môže stimulovať imunitný systém a pomôcť zvieratám lepšie zvládnuť infekciu ako aj zlepšiť ich produkčné ukazovatele.

Práca bola podporená projektom Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV 14-0169) a projektom Kompetenčné centrum pre biomodulátory a výživové doplnky (ITMS 26220220204).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasit.* 2006; 139:308-320.
- Jan OQ, Kamili N, Ashraf A, Iqbal A, Sharma RK, Rastogi A. Haematobiochemical parameters of goats fed tannin rich *Psidium guajava* and *Carissa spinarum* against *Haemonchus contortus* infection in India. *J. Parasit. Dis.* 2015; 39:41-48.
- Shaik SA, Terrill TH, Miller JE, Kouakou B, Kannan G, Kaplan RM, Burke JM, Mosjidis JA. *Sericea Lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 2006; 139:150-157.
- Spiegler V, Liebau E, Hensel A. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Nat Prod Rep.* 2017; 34:627-643.
- Váradyová Z, Baran M, Zelenák I. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Anim Feed Sci Technol.* 2005; 123-124: 81-94.
- Váradyová Z, Kišidayová S, Čobanová K, Grešáková E, Babják M, Königová A, Urda Dolinská M, Várady M. The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and haematological parameters of the lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Rum Res.* 2017; 151:124-132.
- Váradyová Z, Mravčáková D, Babják M, Bryszak M, Grešáková E, Čobanová K, Kišidayová S, Plachá I, Königová A, Cieslak A, Slusarczyk S, Pecio L, Kowalczyk M, Várady M. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res.* 2018; 14:78.
- Waller PJ, Bernes G, Thamsborg SM, Sukura A, Richter SH, Ingebrigtsen K, Höglund J. Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. *Acta Vet Scand.* 2001; 42:31-44.
- Wencelová M, Váradyová Z, Mihaliková K, Jalč D, Kišidayová S. Effects of selected medicinal plants on rumen fermentation in a high-concentrate diet *in vitro*. *J Anim Plant Sci.* 2014; 24:1388-1395.

MIKROFLÓRA ASOCIOVANÁ S JASKYNNÝMI ŽIVOČÍCHMI RADOV PALPIGRADI A COLLEMBOLA

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

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

²Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

ABSTRAKT

Mikroflóra asociovaná s jaskynnými druhmi *Eukoeneria spelaea* (Palpigradi) a *Arrhopalites aggtelekiensis* (Collembola) prirodzene sa vyskytujúcimi v Ardovskej jaskyni v Slovenskom krase sa analyzovala kultivačnými metódami. V analyzovanej populácii dominovali gram-pozitívne baktérie. Pri oboch druhoch sa pozorovala vyššia diverzita ektomikroflóry v porovnaní s endomikroflórou. Prekvapujúco, napriek rozdielnej potravovej stratégii študovaných druhov sa pozorovala vyššia podobnosť endomikroflóry než ektomikroflóry.

ÚVOD

Chvostoskoky (Collembola) predstavujú jednu z najpočetnejších skupín terestriálnych článkonožcov, ktoré sú najlepšie adaptované pre život v jaskynnom prostredí a pod zemou (Kováč a kol., 2015). V rámci Európy rovnako obývajú podzemné prostredie šŕúrovky (Palpigradi), patriace medzi pavúkovce (Arachnida) (Kováč a kol., 2002). Jaskyne sú vo všeobecnosti prostredím poskytujúcim špecifické biotické a abiotické podmienky. Jednou z najvýznamnejších je dostupnosť potravy, ktorá limituje výskyt fauny (Smrž a kol., 2015). Ardovská jaskyňa, nachádzajúca sa na území Slovenského krasu, je miestom prirodzeného výskytu jedincov druhov *Eukoeneria spelaea* (Palpigradi) a *Arrhopalites aggtelekiensis* (Collembola). Vzhľadom na obmedzené možnosti dostupnej potravy je ich potravná preferencia veľmi zaujímavá. Napriek tomu, že druh *E. spelaea* patrí medzi pavúkovce, ktoré sú typickými predátormi, v tráviacom trakte týchto jedincov bola preukázaná prítomnosť cyanobaktérií (Smrž a kol., 2013; Smrž a kol., 2015). Zdroj potravy druhu *A. aggtelekiensis* ostáva stále neobjasnený. V dôsledku jeho výskytu na živých kvapľoch v miestach stekajúcej vody je predpokladaná úloha filtrátora. Analýza mikroflóry osídľujúcej tráviaci trakt týchto živočíchov, má významnú úlohu v objasnení ich potravných preferencií. Vzhľadom na výskyt týchto druhov v rámci jednej jaskyne je tiež zaujímavá analýza ich ektomikroflóry.

MATERIÁL A METODIKA

Celkovo 15 jedincov, z toho 11 jedincov druhu *Eukoeneria spelaea* a 4 jedince druhu *Arrhopalites aggtelekiensis*, bolo získaných z odberov realizovaných v mesiacoch máj 2017 a máj 2018 v Ardovskej jaskyni v Slovenskom krase. Pre získanie baktérií z povrchu tela boli jedince opláchnuté 100 µl PBS. Baktérie z tráviaceho traktu boli získané narezaním jedinca v brušnej časti tela a preplachom PBS s objemom 100 µl pomocou pipety. Zo získaných objemov bolo 50 µl vysievaných na platne so živným agarom (NA – nutrient agar), ktoré boli kultivované 48 hodín pri teplote 20 °C. Na identifikáciu získaných bakteriálnych kolónií bola použitá hmotnostná spektrometria MALDI-TOF (Biotyper, Bruker Daltonics, Nemecko). Výsledky identifikácie boli interpretované dendrogramom, pričom hlavné vetvy dendrogramu predstavovali bakteriálne biotypy. Podobnosť mikroflóry bola graficky vyjadrená použitím PCA diagramu (ClustVis, <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>), bakteriálna diverzita sa stanovila pomocou Shannonovho indexu ($H = -\sum[(\pi) * \ln(\pi)]$; SUM – súčet, π – počet jedincov druhu; Shannon C., 1948).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

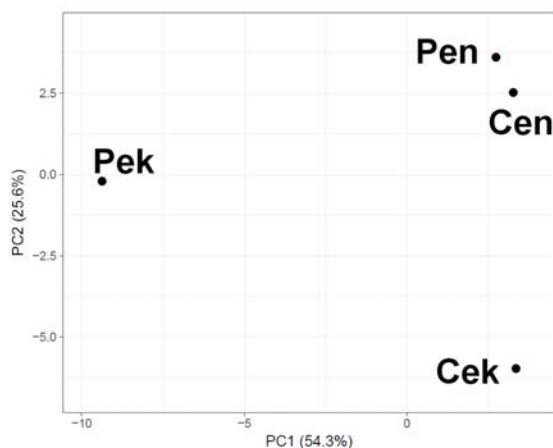
Z celkového počtu 11 jedincov druhu *Eukoenenia spelaea* sa nám podarilo získať 140 bakteriálnych kolónií z povrchu tela (Pek) u všetkých jedincov a 44 bakteriálnych kolónií z tráviaceho traktu (Pen) u 8 jedincov. Z celkového počtu 4 jedincov druhu *Arrhopalites aggtelekiensis* sme získali 49 bakteriálnych kolónií z povrchu tela (Cek) a 38 bakteriálnych kolónií z tráviaceho traktu (Cen) u všetkých jedincov. Výsledný dendrogram z MALDI-TOF analýzy preukázal existenciu minimálne 72 bakteriálnych biotypov asociovaných so študovanými druhmi. Vysoké hodnoty Shannonovho indexu diverzity (Tab. 1) vypovedajú tiež o vysokej diverzite bakteriálnych druhov v rámci ich ektomikroflóry a rovnako v rámci mikroflóry ich tráviacich traktov.

Tab. 1 Prehľad identifikovaných bakteriálnych izolátov a hodnoty Shannonovho indexu diverzity u *Arrhopalites aggtelekiensis* (Cen – endomikroflóra, Cek – ektomikroflóra) a *Eukoenenia spelaea* (Pen – endomikroflóra, Pek - ektomikroflóra).

| | Pen | Pek | Cen | Cek |
|--|-----------------------------|-----------------------------|---|---------------------------------|
| Počet izolátov | 44 | 140 | 38 | 49 |
| Počet druhov | 7 | 8 | 3 | 11 |
| Počet identifikovaných izolátov | 24 | 29 | 11 | 25 |
| Dominantný druh | <i>Arthrobacter oxydans</i> | <i>Arthrobacter oxydans</i> | <i>Bacillus mycoides</i> , <i>B. weihenstephanensis</i> | <i>Rhodococcus erythropolis</i> |
| Shannonov index diverzity | 1,83 | 3,31 | 2,25 | 2,69 |

Z izolátov získaných z endomikroflóry jedincov druhu *E. spelaea* sa podarilo identifikovať prevažne gram-pozitívne baktérie rodu *Arthrobacter*, konkrétne *A. aurescens* (1 izolát), *A. globiformis* (1 izolát), *A. oxydans* (12 izolátov), *A. polychromogenes* (1 izolát) a druhov *Micrococcus luteus* (3 izoláty) a *Paennibacillus amyolyticus* (5 izolátov). V rámci ektomikroflóry taktiež prevládali spomínané gram-pozitívne baktérie rodu *Arthrobacter* (22 izolátov) a tiež sa vyskytli gram-pozitívne druhy *Agromyces fucosus* (1 izolát), *A. hippuratus* (2 izoláty), *Kocuria rosea* (2 izoláty), *Microbacterium saperdae* (1 izolát) a *Rhodococcus erythropolis* (1 izolát). V tráviacom trakte *A. aggtelekiensis* prevládali baktérie druhu *Bacillus mycoides* (5 izolátov) a *B. weihenstephanensis* (1 izolát) a jeden izolát druhu *Arthrobacter kerguelensis*. V rámci ektomikroflóry bola zaznamenaná vysoká diverzita identifikovaných druhov, gram-negatívne baktérie rodu *Flavobacterium* (*F. hibernum*, *F. hydatis*, *F. saccharophilum*, spolu 4 izoláty), *Pseudomonas jessenii* (1 izolát) a gram-pozitívne druhy *Agromyces hippuratus* (1 izolát), *Arthrobacter kerguelensis* (4 izoláty), *Bacillus simplex* (1 izolát), *Kocuria palustris* (1 izolát), *Rhodococcus erythropolis* (8 izolátov), a *Viridibacillus neidei* (1 izolát). Prevažnú časť izolátov však nebolo možné identifikovať použitým prístupom. Na základe podobnosti MALDI TOF proteinových profilov sme tieto izoláty typizovali a podobnosť mikroflóry študovaných organizmov zobrazili PCA diagramom (Obr. 1). Podobnosť mikroflóry tráviaceho traktu (endomikroflóra) oboch živočíchov naznačuje podobný zdroj potravy, čo pravdepodobne súvisí s nízkou variabilitou a dostupnosťou potravy v jaskynnom prostredí. Naopak, rozdielnosť v ektomikroflóre súvisí pravdepodobne

s rozdielnym miestom výskytu živočíchov – *A. aggtelekiensis* sa vyskytuje na kvapľoch so stekajúcou vodou, kým *E. spelaea* v sedimente.



Obr. 1 Podobnosť mikrofóry asociovanej s *Eukoenenia spelaea* (Pen – endomikroflóra, Pek - ektomikroflóra) a *Arrhopalites aggtelekiensis* (Cen – endomikroflóra, Cek – ektomikroflóra) dokumentovaná pomocou PCA analýzy.

Pre presnejšie určenie zdrojov potravy týchto živočíchov je však potrebné získať väčšie množstvo bakteriálnych izolátov z tráviaceho traktu a tiež otestovať ich pre overenie prítomnosti lýtických enzýmov.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

Kováč L, Mock A, Luptáčik P, Palacios-Vargas J. Distribution of *Eukoenenia spelaea* (Peyerimhoff, 1902) (Arachnida, Palpigradida) in the Western Carpathians with remarks on its biology and behaviour. *Studies on Soil Fauna in Central Europe* 2002; 93-99

Kováč L, Parimuchová A, Miklisová D. Distributional patterns of cave Collembola (Hexapoda) in association with habitat conditions, geography and subterranean refugia in the Western Carpathians. *Biological Journal of the Linnaean Society* 2015; 1-22

Smrž J, Kováč L, Mikeš J, Lukešová A. Microwhip Scorpions (Palpigradi) Feed on Heterotrophic Cyanobacteria in Slovak Caves – A Curiosity among Arachnida. *PloS ONE* 2013; 8(10): 1-5

Smrž J, Kováč L, Mikeš J, Šustr V, Lukešová A, Tajovský K, Nováková A, Režňáková P. Food sources of selected terrestrial cave arthropods. *Subterranean Biology* 2015; 16: 37-46

Shannon C. A mathematical theory of communication. *Bell Syst. Tech. J.* 1948;27:379–423

POROVNANIE DYNAMIKY POSTMORTÁLNYCH PROCESOV V PRSNEJ A STEHENNEJ SVALOVINE BROJLEROVÝCH KURČIAT

Petríková, D., Koréneková B., Marcinčák, S. Kožárová, I.

Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Práca sa zaoberá štúdiom dynamiky hladín kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnôt pH v priebehu postmortálnych procesov v prsnej a stehennej svalovine kurčiat. Do pokusu boli zahrnuté 1 dňové kurčatá plemena Cobb, kŕmené BR1 do 20. dňa, BR2 do 30. dňa a BR3 do 39. dňa, kedy boli usmrtené. Vo vzorkách prsnej (10) a stehennej svaloviny (10) bola stanovená kyselina mliečna, fosfáty a pH mäsa na 1, 3 a 7. deň uskladnenia pri 4 °C. Výsledky práce poukazujú na signifikantné ($p \leq 0,001$) zvýšenie hladín kyseliny mliečnej a fosfátov a zníženie hodnôt pH v prsnej svalovine na 3. deň pokusu. Tento priebeh zmien sa menej výrazne prejavil aj v stehennej svalovine kurčiat.

ÚVOD

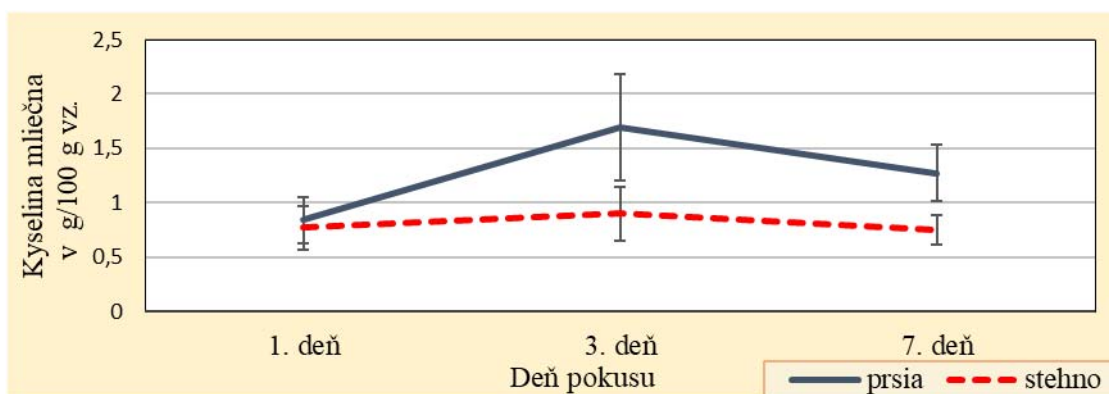
Hydinové mäso je veľmi obľúbené u konzumentov, najviac žiadané je mäso z brojlerov. Brojlery najúčinnšie pretransformujú krmivo na mäso. Najhodnotnejšie mäsité časti hydiny sú prsia a stehná. Pri šľachtení mäsových typov brojlerových kurčiat sa dáva na zastúpenie týchto častí najväčší dôraz (Paška a Sidor, 2000). Zistené bolo odlišné zloženie prsnej a stehennej svaloviny brojlerových kurčiat. Prsná svalovina obsahuje 21 – 23 % bielkovín, 1,90 – 1,97 % tuku, 75,28 – 76,01 % vody a 0,74 – 0,77 % kolagénu, kým stehenná svalovina má 19,03 – 19,93 % bielkovín, 4,70 – 6,05 % tuku a 0,91 – 1,13 % kolagénu (Králik, 2017). Hydina má rozdiely aj vo farbe mäsa. Červené vlákna, ktoré sa nachádzajú na stehne sú bohaté na myoglobín a majú väčší počet väčších mitochondrií. Biele vlákna v oblasti prs majú menej myoglobínu a menší počet menších mitochondrií. Známe sú aj ako glykolytické vlákna kvôli vysokému obsahu glykogénu (Barbut, 2002). Cieľom práce bolo porovnať dynamiku zmien kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnôt pH v prsnej a stehennej svalovine brojlerových kurčiat.

MATERIÁL A METODIKA

Kurčatá mäsového hybridu Cobb 500 (Hydina Slovensko s.r.o.) vo veku 1. deň v počte 50 ks boli chované na hlbokoj podstielke. Prístup k vode mali *ad libitum*. Kŕmené boli 2 krát denne kŕmnom zmesou BR1 do 20. dňa, BR2 do 30. dňa a BR3 do 39. dňa, kedy boli usmrtené. Odobraté boli vzorky prsnej (10) a stehennej (10) svaloviny, ktoré boli uskladnené pri 4°C. Fyzikálno – chemické analýzy sa vykonali 24 h po porážke, t.j. 1. deň pokusu a na 3. a 7. deň pokusu. Na stanovenie kyseliny mliečnej a fosfátov sa využila metóda elektroforetickej analýzy, používaná na kontrolu zrenia mäsa u rôznych druhov zvierat (Koréneková a kol., 2014, Mačanga a kol., 2011). Kyselina mliečna a fosfáty boli extrahované zo svaloviny destilovanou vodou. Vzorky po filtrácii boli stanovené Elektroforetickým analyzátorom (EA 102, Villa Labeco s.r.o., SR) za použitia vodivostného detektora. Prúd v predseparačnej kolóne (dĺžka 90mm) bol 250 μ A a v analytickej kolóne (dĺžka 160 mm) 50 μ A. Použitý bol vodiaci elektrolyt: 10 mmol HCl + β -alanín + 0,1% m-HEC a zakončujúci elektrolytu: 5 mmol kyselina kaprónová + 5 mmol TRIS. Analýzy boli vyhodnotené programom ITP Pro 32 (KasComp, Bratislava, SR) a udávané v g/100g vzorky. Hodnoty pH boli stanovené sklenenou elektródou vo vodnom extrakte svaloviny pH-metrom (InoLab WTW 720). Štatistická analýza bola vykonaná v programe Microsoft Excel 2013 použitím Studentovho t-testu, a ďalších štatistických metód ako aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, korelačný koeficient.

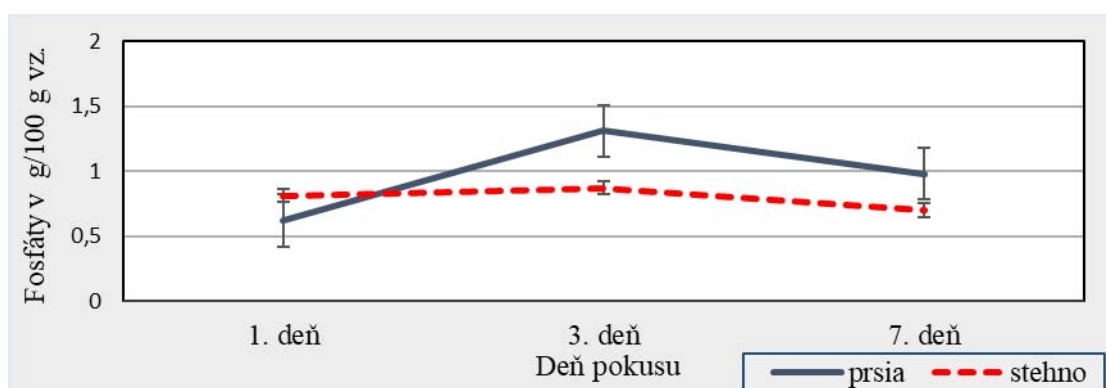
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prsnej svalovine bola koncentrácia kyseliny mliečnej v 1. deň pokusu $0,84 \pm 0,21$. Počas prvých 3 dní zrecieho procesu sa významne zvýšila ($p \leq 0,001$) a dosiahla hodnotu $1,69 \pm 0,49$ (Graf č. 1). Hodnota korelačného koeficientu bola $-0,84$. Na 7. deň pokusu bol pozorovaný významný pokles ($p \leq 0,5$) kyseliny mliečnej $1,27 \pm 0,26$ oproti 3. dňu pokusu. V stehennej svalovine bola v 1. deň pokusu koncentrácia kyseliny mliečnej $0,77 \pm 0,20$. Na 3. deň pokusu bolo zistené zvýšenie kyseliny mliečnej ($0,90 \pm 0,25$), avšak nie tak výrazné ako v prsnej svalovine. V 7. deň pokusu došlo k poklesu kyseliny mliečnej na hodnotu $0,75 \pm 0,14$. Dynamika kyseliny mliečnej v celom časovom intervale zrecieho procesu v mäse odráža kvantitatívnu premenu glykogénu na kyselinu mliečnu. V počiatkovej fáze je jej nárast najvýraznejší (Kopřiva a Steinhäuser, 1992). Vyššie koncentrácie v prsnej než stehennej svalovine boli namerané počas celého pokusu, ktoré boli významné ($p \leq 0,001$) na 3. deň, ako aj 7. deň. Korelačný koeficient dosiahol na 7. deň hodnotu $-0,80$.



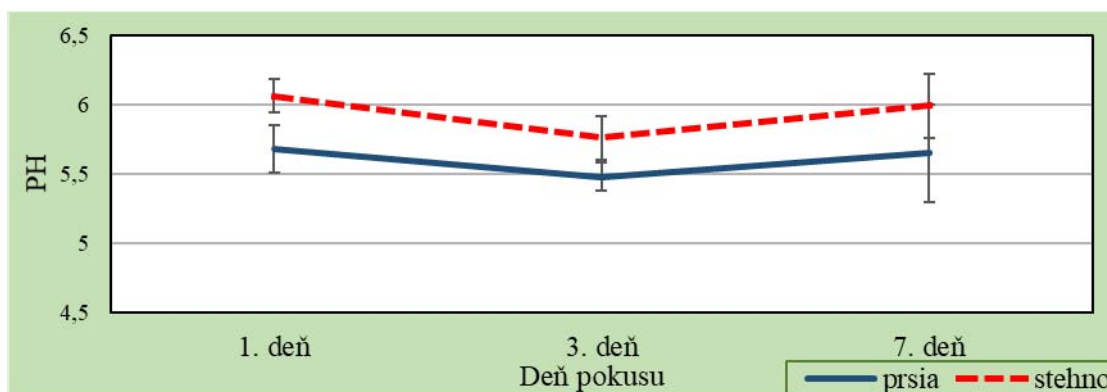
Graf 1 Porovnanie hladín kyseliny mliečnej v prsnej a stehennej svalovine brojlerových kurčiat

Pri hodnotení dynamiky zmien fosfátov (Graf č. 2) v prsnej svalovine bol zistený jej významný nárast ($p \leq 0,001$) na 3. deň ($1,31 \pm 0,32$), oproti začiatku pokusu ($0,62 \pm 0,09$). Na 7. deň bol zistený významný ($p \leq 0,01$) pokles ($0,98 \pm 0,23$) v porovnaní s 3. dňom pokusu. V stehennej svalovine bol nárast fosfátov ($p \leq 0,05$) na 3. deň pokusu menej výrazný ($0,87 \pm 0,33$) v porovnaní so začiatkom pokusu ($0,81 \pm 0,32$). Na 7. deň bol zistený významný pokles ($p \leq 0,05$) fosfátov ($0,70 \pm 0,16$) oproti 3. a 1. dňu pokusu. V prsnej svalovine boli na 1. ($p \leq 0,05$) a na 3. a 7. deň ($p \leq 0,001$) pokusu pozorované vyššie koncentrácie fosfátov. Korelačný koeficient dosiahol na 7. deň hodnotu $-0,83$.



Graf 2 Porovnanie hladín fosfátov v prsnej a stehennej svalovine brojlerových kurčiat

Hodnota pH závisí najmä od množstva kyseliny mliečnej v svalovine vznikajúcej pri anaeróbnej glykogenolyze a glykolýze. Hodnota pH 24 klesá *post mortem* na 5,4 – 5,7 (Maltin, a kol., 2003). V našom experimente bol v prsnej svalovine (Graf č. 3) pozorovaný signifikantný pokles ($p \leq 0,01$) hodnôt pH na 3. deň ($5,48 \pm 0,10$) oproti 1. dňu ($5,68 \pm 0,17$). Na 7. deň bol zistený signifikantný ($p \leq 0,05$) nárast pH ($5,65 \pm 0,35$) oproti 3. dňu. V stehennej svalovine bol zistený signifikantný ($p \leq 0,001$) pokles hodnôt pH na 3. deň ($5,76 \pm 0,16$) oproti 1. dňu ($6,06 \pm 0,12$). Na 7. deň bol zistený signifikantný ($p \leq 0,05$) vzostup pH ($5,99 \pm 0,23$) oproti 3. dňu. V stehennej svalovine boli signifikantne vyššie hodnoty pH na 1., 3. deň ($p \leq 0,001$) a 7. deň ($p \leq 0,01$) než v prsnej svalovine.



Graf 3 Porovnanie hodnôt pH v prsnej a stehennej svalovine brojlerových kurčiat

V dôsledku rozdielnych typov svalových vlákien v prsnej a stehennej svalovine brojlerových kurčiat bola v práci pozorovaná rozdielna intenzita postmortálnych zmien na základe zmeraných fyzikálnych a chemických parametrov. Predpokladáme, že to bolo spôsobené metabolickými rozdielmi v postmortálnej premene svaloviny na mäso v týchto typoch svalovín.

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-14-0397 a projektom VEGA: 1/0576/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barbut, S.: Poultry Products Processing, Industry Guide. CRC Press LLC. Florida. 2002, USA.
- Kopřiva, V., Steinhauser, L.: Průběh zrání vakuově baleného masa. Prům. Potr. 1, 1992, 13-14.
- Koréneková B, Nagy J, Smulders FJM, a kol. Lactic acid concentration and pH values in muscles of European brown hare, In: Trends in game meat hygiene, From forest to fork, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2014; 400p.
- Kralik, G., Kralik, Z.: Poultry products enriched with nutrines have beneficial effects on human health, Med.Glas (Zenica), 2017, 14, 1, s. 1-7.
- Mačanga, J., Koréneková, B., Nagy, J., Marcinčák, S., Popelka, P., Kožárová, I., Korének, M.: Post-mortem changes in the concentration of lactic acid, phosphates and pH in the muscles of wild rabbits according to the perimortal situation. Meat Sci., 2011, 88, 4, s. 701-704.
- Paška, I., Sidor, E.: Integrovaná živočíšna výroba. Nitra: SPU, 2000, 101 s. 6.
- Maltib, C., Balcerzk, D., Tilley, R., Delday, M.: Determinants of meat quality: tenderness. Proceedings of the Nutrition Society, 62, 337-347.

ELIMINÁCIA MŔTVYCH BUNIEK V MYŠACÍCH BLASTOCYSTÁCH PRODUKOVANÝCH *IN VIVO* A *IN VITRO*

Pisko J.

Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo vyvinúť metodiku, pomocou ktorej by bolo možné kvantifikovať počet fagocytovaných apoptotických buniek a apoptotických buniek vylúčených do embryonálnych dutín, a následne porovnať fungovanie eliminačných mechanizmov v skupinách *in vivo* a *in vitro* získaných myšacích blastocýst. Blastocysty sme získali od hormonálne stimulovaných samíc: skupinu *in vivo* predstavovali čerstvo izolované blastocysty, *in vitro* skupinu tvorili blastocysty, ktoré boli získané kultiváciou 2-bunkových embryí v KSOM médiu v priebehu 72 hodín v štandardných podmienkach. Incidencia fagocytózy apoptotických buniek bola vyhodnotená dvoma typmi morfológicko-fluorescenčného farbenia pomocou konfokálnej mikroskopie: F-aktín farbenie kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením spolu s TUNEL farbením a Lysotracker test kombinovaný s Hoechst 33342 DNA farbením. Výsledky potvrdili skutočnosť, že bunky v preimplantačnom embryu sú schopné fagocytózy, patria do skupiny tzv. neprofesionálnych fagocytov. Ďalej ukázali, že v blastocystách získaných kultiváciou *in vitro* je podiel buniek, ktoré unikli fagocytóze vyšší, než v blastocystách vyvíjajúcich sa v prirodzených *in vivo* podmienkach. Experimenty ukazujú, že na identifikáciu presného podielu fagocytovaných apoptotických buniek bude potrebné porovnať výsledky získané viacerými detekčnými metódami, pričom Lysotracker test sa predbežne javí ako presnejšia technika než trojité farbenie s F-aktínom.

ÚVOD

Fyziologickou súčasťou vývinu skorého embrya je riadená eliminácia poškodených alebo inak neprospešných buniek. Relatívne vysoká frekvencia výskytu buniek, u ktorých bol spustený mechanizmus samozničenia (apoptózy), bola popísaná v populáciách oboch embryonálnych línií: v embryoblaste i v trofoblaste (Kšišňanová a kol., 2017). Špecifikom embrya je, že mŕtve bunky odstraňuje dvojakým spôsobom: vylúčením do embryonálnych dutín (tzv. extrúziou) alebo prostredníctvom fagocytózy, ktorú vykonávajú susedné embryonálne bunky (Fabian a kol., 2005). Bunky, ktoré uniknú fagocytóze sa cestou sekundárnej nekrózy rozpadajú na neorganizovaný bunkový odpad (Hart a kol., 2008). To vedie k neefektívnej strate organického materiálu, uvoľneniu degradačných enzýmov z lyzozómov a akumulácii extracelulárnej DNA – tzn. bioaktívnych látok s vysokým škodlivým potenciálom (Platt a kol., 1998).

Cieľom práce bolo vyvinúť metodiku, pomocou ktorej by bolo možné kvantifikovať počet fagocytovaných a vylúčených apoptotických buniek a následne porovnať fungovanie eliminačných mechanizmov v skupinách *in vivo* a *in vitro* získaných myšacích blastocýst.

MATERIÁL A METODIKA

Expandované blastocysty boli získané z hormonálne stimulovaných ICR myší. Blastocysty skupiny *in vivo* boli čerstvo izolované z fertilizovaných samíc na 4. deň gravidity (120 hodín *post hCG*). V *in vitro* skupine, blastocysty boli získané kultiváciou 2-bunkových embryí v KSOM médiu v priebehu 72 hodín v štandardných podmienkach.

Incidenca fagocytózy apoptotických buniek bola vyhodnotená dvoma typmi morfológicko-fluorescenčného farbenia pomocou konfokálnej mikroskopie:

1. F-aktín farbenie kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a TUNEL farbením
2. Lysotracker test kombinovaný s Hoechst 33342 DNA farbením

Klasifikácia buniek:

1. Trojitým farbením s F-aktínom boli vyšetrené *in vivo* (n= 56) a *in vitro* (n= 56) získané blastocysty myši. Jadrá vykazujúce apoptotické znaky (tzn. fragmentovaná jadrová morfológia vizualizovaná Hoechst 33342 DNA farbením, a/alebo špecifická DNA fragmentácia vizualizovaná pozitívnym TUNEL značením) lokalizované v blastocoelovej dutine alebo v perivitálnom priestore boli klasifikované ako vylúčené (tzv. extrudované) apoptotické bunky. Ako fagocytované apoptotické bunky boli klasifikované jadrá s apoptotickými znakmi pohltené susednými embryonálnymi bunkami, ktoré vykazovali kontinuálnu plazmatickú membránu vizualizovanú farbením F-aktínom a prítomnosť jadra s normálnou morfológiou. Apoptotické jadrá, ktoré boli ohraničené časťami plazmatických membrán troch susediacich embryonálnych buniek boli klasifikované ako nefagocytované apoptotické bunky. Všetky ostatné jadrá, kde nebolo možné s určitosťou charakterizovať príslušnosť k danej skupine (fagocytované vs. nefagocytované apoptotické bunky), boli označené ako dubiózne prípady.

2. Lysotracker testom boli v pilotnom experimente vyšetrené iba *in vivo* (n= 33) získané blastocysty myši. Apoptotické jadrá kolokalizované s prítomnosťou kyslých organel (značené Lysotracker testom) boli klasifikované ako fagocytované apoptotické bunky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

1. F-aktín farbenie kombinované s Hoechst 33342 DNA farbenie a TUNEL farbenie

V blastocystách získaných *in vitro* bolo trojitým farbením s F-aktínom identifikovaných v priemere 6,88 apoptotických buniek na blastocystu, a v skupine *in vivo* 5,18 apoptotických buniek na blastocystu ($P < 0,01$). V *in vitro* získaných blastocystách bol zaznamenaný vyšší výskyt extrudovaných buniek (15,58%), ako v *in vivo* skupine (8,97%) ($P < 0,05$). Prevažná väčšina extrudovaných buniek bola lokalizovaná v blastocoelovej dutine. V *in vitro* kultivovaných blastocystách bol priemerný počet fagocytovaných apoptotických buniek 1,59 / blastocystu (čo predstavovalo 23,12% z celkového počtu vyšetrených apoptotických buniek) a 2,23 dubióznych prípadov / blastocystu. V *in vivo* získaných blastocystách bol priemerný počet fagocytovaných apoptotických buniek 1,36 / blastocystu (čo predstavovalo 26,12% z celkového počtu vyšetrených apoptotických buniek) a 1.57 dubióznych prípadov / blastocystu.

2. Lysotracker test kombinovaný s Hoechst 33342 DNA farbením

V *in vivo* získaných blastocystách vyšetrených Lysotracker testom bol priemerný počet fagocytovaných apoptotických buniek 2,26 / blastocystu.

Výsledky potvrdzujú skutočnosť, že bunky v preimplatačnom embryu sú schopné fagocytózy, patria do skupiny tzv. neprofesionálnych fagocytov. Jednou z úloh týchto neprofesionálnych fagocytov je aj eliminácia apoptotických buniek. Časť apoptotických buniek však nie je fagocytovaná, ale vylúčená do embryonálnych dutín, pričom v blastocystách získaných kultiváciou *in vitro* je podiel buniek, ktoré unikli fagocytóze vyšší, než v blastocystách vyvíjajúcich sa v prirodzených *in vivo* podmienkach. Pilotné experimenty ukazujú, že na identifikáciu presného podielu fagocytovaných apoptotických buniek bude potrebné porovnať výsledky získané viacerými detekčnými metódami.

Práca bola podporená grantmi APVV14-0763 a ITMS 26220220204 - Kompetenčné centrum pre biomodulátory a výživové doplnky (Probiotech).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. 2005 64: 221-231
Hart SP, Dransfield I, Rossi AG. Phagocytosis of apoptotic cells. *Methods*. 2008 44: 280-285

Kšišňanová M, Čikoš Š, Babel'ová J, Šefčíková Z, Špírková A, Koppel J, Fabian D. The responses of Mouse Preimplantation embryos to leptin *In Vitro* in a Transgenerational Model for Obesity. *Frontiers in Endocrinology*. 2017 8: 1-11

Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Cell biology*. 1998 8: 365-372

PREVALENCIA ENDOPARAZITOV U DIVIAČEJ ZVERI V ZVERNÍKU BIEN

Selecká E.

Katedra epizotológie a parazitológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V poslednom období sme pri diviačej zveri zaznamenali nárast populačnej hustoty. Vzástol aj počet zvernicových chovoch. Tým sa vytvárajú veľmi priaznivé podmienky pre šírenie parazitóz. Za súčasnej situácie je teda veľmi aktuálne venovať prevencii a liečbe parazitóz pri diviačej zveri.

ÚVOD

V našej práci sme preskúmali chovateľské a ekologické podmienky poľovníckeho obhospodarovania vo zverníku pri diviačej zveri vo vzťahu k pľúcny a gastrointestinálnym červom, zistili ich celkovú prevalenciu ako aj intenzitu invázie vo vegetačnom období a mimo vegetačného obdobia.

Diviačí zverník Bieň sa nachádza v južnej časti Kremnických hôr v nadmorskej výške 350 – 450 m. Ako účelové zariadenie Technickej univerzity vo Zvolene plní úlohy pedagogicko – výchovné, vedecko – výskumné a ekonomické.

Zverník Bieň je rozhodnutím OÚ Zvolen z 25.01.2002 uznaný na intenzívny chov diviačej zveri.

MATERIÁL A METODIKA

Odber vzoriek na koprologické vyšetrenie sa vykonal v dvoch etapách.

V prvej etape sa vzorky trusu odobrali v letnom období (jún 2011) za účelom sledovania zastúpenia parazitov vo vegetačnom období. Celkovo bolo odobratých 27 vzoriek z jednotlivých častí zverníka.

V druhej etape sa odber vzoriek vykonal mimo vegetácie (27 vzoriek).

Vzorky boli odobraté z čerstvého trusu do vzorkovníc, ktoré boli označené číslom časti zverníka. Vzhľadom na liekovú formu použitého liečiva (premix) vzorky boli zberané ako „zmesné“.

Pre diagnostiku helmintov bola použitá flotačná koproovoskopická metóda podľa Brezu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V monitoringu sme zamerali pozornosť na vyhodnotenie nálezov helmintofauny dýchacej a tráviacej sústavy v dvoch etapách - vo vegetačnom a mimo vegetačného obdobia. Sledovala sa intenzita invázie a druhové zastúpenie 2 hlavných skupín helmintov – pľúcnych a gastrointestinálnych nematódov. Koprologicky sa vyšetřilo v každej etape 27 vzoriek trusu diviakov. Negatívne vyšetřenie trusu sa vyskytovalo vo vegetačnom období 3 prípadoch (1,1%).

Najčastejšie zastúpené helminty v hodnotených skupinách v čase vegetácie (júl):

Prehľad nálezov koprologického vyšetřenia:

PLŮCNE ČERVY (*Metastrongylus* spp.) sa z vyšetřených vzoriek (27 ks) vyskytovali v 8 vzorkách (29,6%).

GASTROINTESTINÁLNE ČERVY predstavovali významnejšie zastúpenie: *Trichuris* spp. 1 vzorka (3,7%), 1 vzorka *Ascaris* (3,7%), *Capillaria* spp. 3 vzorky (11,1%).

KOKCÍDIE (*Eimeria* spp.) sa vyskytovali v 11 vzorkách (51,8%).

V období mimo vegetácie (zima) boli zastúpené tieto helminty:

Prehľad nálezov koprologického vyšetřenia mimo vegetácie.

PLÚCNE ČERVY *Metastrongylus* spp.) 2 vzorky (7,4%).

GASTROINTESTINÁLNE ČERVY *Trichuris* spp. 4 vzorky (14,8%), *Ascaris* 3 vzorky (11,1%), *Capillaria* spp. 3 vzorky (11,1%).

KOKCIDIE (*Eimeria* spp.) boli prítomné v 15 vzorkách (55%).

Výsledky získané koprologickým vyšetrením vo vegetačnom a mimovegetačného obdobia poukazujú na to, že na výskyt parazitov u diviačej zveri môže vplývať viac ekologických faktorov, ako sú geografické, geomorfologické, klimatické a trofické podmienky biotopu. Vysoká invázia diviakov v letnom období (obdobie vegetácie) súvisí s ideálnymi podmienkami pre vývoj medzihostiteľov. Prekysličená pôda a husté porasty vo zverníku Bieň predstavujú ideálne podmienky pre vývoj populácie dážďoviek, čo je spojené aj so zvýšeným výskytom metastrongylov vo vegetačnom období. Hoci má metastrongylóza väčšinou latentný priebeh, je okrem trofických podmienok jedným z limitujúcich faktorov výšky prírastku (Halasz, 1991). Veľmi napadnutá diviačia zver môže byť tiež vhodným zdrojom pre infekciu KMO, ale aj mnohé iné ochorenia rôznej etiológie (Farkaš, 1997).

K zníženiu invadovanosti pľúcnymi nematódami a k regulácii početnosti a vekovej skladby u diviačej zveri výrazne prispieva selektívny odstrel a kontrolovaný chov diviačej zveri.

Vekovú dynamiku invázneho cyklu metastrongylov podmieňuje vznik nesterilnej postinváznej imunity, ktorá sa začína vytvárať u diviačiat už po prvých inváziách a následných reinváziách (Kiš a kol., 2009). Imunita sa zvyšuje až do veku 3 rokov, keď náhle stúpne, čo sa prejavuje prudkým poklesom invadovanosti v 4. roku života pri súčasnom zvyšovaní imunity v ďalších rokoch života (Halász, 1991). Vznik imunity voči metastrongyloom potvrdzujú aj naše výsledky, a preto sa odporúča loviť slabé, vychudnuté jedince. Dôležité je správne zostaviť plán lovu – 75% ulovených jedincov by mali tvoriť diviačatá.

Vzhľadom na nepriaznivú situáciu invázie helmintov hlavne metastrongylov a kokcidií, bolo by vhodné v budúcnosti vo vyšetreniach pokračovať v širšom súbore, nakoľko metastrongylóza ako aj iné parazitózy vrátane kokcidií výrazne oslabujú imunitný systém a majú význam v patogenéze iných ochorení hlavne KMO.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Farkaš J. Chceme mať zdravé diviaky. *Poľovníctvo a rybárstvo*. 1991, 48(4), 16 p.

Halász J. Príspevok k výskytu metastrongylózy pri svini divjej (*Sus scrofa* L.) na Slovensku. 1991, *Folia venatoria*, č.21, p.99-111.

Kiš O., Ciberej J., Laciak V. *Folia venatoria*, 2009, s. 38-39.

OBSAH Ω -3 A Ω -6 MASTNÝCH KYSELÍN PRI CHRONICKÝCH OCHORENIACH

Široká M.¹, Hertelyová Z.², Tomečková V.¹

¹Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ

²Ústav experimentálnej medicíny, LF UPJŠ

ABSTRAKT

Táto práca študuje súvislosť medzi obsahom ω -3 a ω -6 polynenasýtených mastných kyselín a desaturázovou aktivitou s kardiovaskulárnymi ochoreniami a metabolickým syndrómom. Lipidy z krvnej plazmy boli izolované Folschovou metódou a získané mastné kyseliny boli analyzované použitím plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom. Výsledky ukázali, že metabolický syndróm a kardiovaskulárne ochorenia sú sprevádzané vyššou desaturázovou aktivitou v prospech ω -6 polynenasýtených mastných kyselín, čo môže prispievať k zvýšeniu pomeru ω -6/ ω -3 polynenasýteným mastným kyselinám. Ďalej potvrdzujú, že zníženie množstva ω -3 mastných kyselín v krvnej plazme koreluje s rozvojom metabolického syndrómu a s obezitou.

ÚVOD

Polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK) sú študované pre ich vplyv na ľudské zdravie, predovšetkým v súvislosti s kardiovaskulárnymi, metabolickými, neurologickými a ďalšími ochoreniami (Su a kol., 2008). Pre ľudí sú esenciálne a zohrávajú v organizme dôležité úlohy, pretože sú prekursori pre tvorbu eikozanoidov, ovplyvňujú fluiditu bunkových membrán, bunkovú signalizáciu a génovú transkripciu (Mori, 2016). Človek môže z prijatých kyselín α -linolénovej (ALA, ω -3) a linolovej (LA, ω -6) syntetizovať dlhšie a viac nenasýtené PNMK (EPA, DHA alebo AA). Deje sa to prostredníctvom série elongačných a desaturačných reakcií. Mastné kyseliny z oboch ω -3 a ω -6 radov súťažia o rovnaké enzýmy. Nedostatok ALA v strave ľudí vedie k zníženiu obsahu DHA a zvyšuje množstvo kyseliny osbondovej (DPA-6, ω -6) v tkanivách (Russo, 2009). Zmeny aktivít delta-5 a delta-6-desaturáz sú spojené s viacerými ochoreniami ako sú neurologické, kardiovaskulárne, metabolické ochorenia či zápal alebo rakovina (Žák a kol., 2016). V súčasnosti je v našej strave pomer ω -6/ ω -3 PNMK vyšší než 15:1 zatiaľ čo vedci stanovili, že počas vývoja človeka to bolo len približne 1:1 (Hodgson, Mori, Wahlqvist, 2005). Zníženie tohto pomeru v našej strave a následne v krvnej plazme zvyšuje tvorbu protizápalových eikozanoidov z ω -3 PNMK a znižuje tvorbu prozápalových eikozanoidov z ω -6 PNMK, čo vedie k zníženiu zápalovej reakcie organizmu, bunkového starnutia a rizika vzniku ochorení (Johnson, Bradford, 2014; Kiecolt-Glaser a kol., 2013). V tejto štúdii bolo analyzované množstvo PNMK v krvnej plazme ľudí s kardiovaskulárnymi ochoreniami a metabolickým syndrómom použitím plynovej chromatografie s plameňovo-ionizačným detektorom (GC-FID). Boli tiež stanovené aktivity delta-5 a delta-6-desaturáz pre ω -6 a ω -3 PNMK a bol vyhodnotený pomer ω -6/ ω -3 PNMK.

MATERIÁL A METODIKA

Sledovaní jedinci boli rozdelení do troch skupín: kontrolná skupina (K) všeobecne zdravých jedincov, skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami (KVO), ktorí už boli farmakologicky liečení a skupina pacientov s metabolickým syndrómom (MS), ktorí neboli liečení ale boli zaradení do programu na zníženie telesnej hmotnosti. Odobrané vzorky krvi boli rozdelené na krvnú plazmu a erytrocyty pomocou centrifugácie pri 3500 rpm po dobu 5 minút a uskladnené pri -80°C . Na izoláciu lipidov z krvnej plazmy bola použitá Folchova metóda používajúca zmes dichlormetánu a metanolu v pomere 2:1. Po izolácii boli lipidy hydrolyzované a voľné mastné kyseliny boli transesterifikované pomocou metanolátu sodného (Tvrzická a kol., 2002). Získané metylestery mastných kyselín boli extrahované do heptánu a merané pomocou GC-FID. Výpočtom plochy pod príslušným píkom

na chromatograme bolo vyhodnotené množstvo každej mastnej kyseliny uvedené v molárnych percentách (mol%). Pomer ω -6/ ω -3 mastným kyselinám bol vypočítaný ako pomer medzi súčtom všetkých stanovených mastných kyselín v jednotlivých skupinách. Aktivita desaturáz bola vypočítaná ako pomer mastných kyselín popísaných v časti výsledky a diskusia. Získané výsledky boli vyhodnotené pomocou deskriptívnej štatistiky (početnosť, aritmetický priemer \pm štandardná odchýlka, percentuálne zastúpenie) pomocou štatistického testu jednosmerná Anova. Vzťahy medzi dvoma a viac premennými (skupiny K, KVO a MS) boli hodnotené Tukey testom, rozdiely boli považované za štatisticky významné pri $P < 0,05$. Štatistická analýza bola realizovaná pomocou programu Microsoft Office Excel 2007, SPSS verzia 19,0 a MINITAB pre Windows 11.21.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvyššie zastúpenie ω -3 PNMK bolo pozorované v skupine K. Najvýraznejší bol rozdiel u ALA, no zanedbateľné nie sú ani EPA a DHA (**Tab.1**). Najnižší obsah ω -3 PNMK bol zaznamenaný v skupine MS. Porovnanie týchto výsledkov ukázalo významné rozdiely medzi všetkými troma skupinami. Najnižšie zastúpenie ω -6 PNMK bolo zistené v skupine C, ale rozdiely medzi skupinami neboli štatisticky významné.

Tab. 1 Zastúpenie ω -6 a ω -3 PNMK v skupinách

| PNMK | K | KVO | MS |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| LA (C18:2, n-6) | 27,22 \pm 4,92 ^a | 29,05 \pm 3,95 ^a | 27,36 \pm 9,56 ^a |
| GLA (C18:3, n-6) | 0,40 \pm 0,19 ^b | 0,35 \pm 0,19 ^b | 3,54 \pm 0,69 ^a |
| ALA (C18:3, n-3) | 0,81 \pm 0,41 ^a | 0,44 \pm 0,08 ^b | 0,48 \pm 0,20 ^b |
| DGLA (C20:3, n-6) | 1,36 \pm 0,36 ^b | 2,00 \pm 0,40 ^a | 1,47 \pm 0,21 ^b |
| AA (C20:4, n-6) | 8,71 \pm 2,22 ^a | 7,54 \pm 2,40 ^a | 7,21 \pm 2,78 ^a |
| EPA (C20:5, n-3) | 0,23 \pm 0,08 ^a | 0,17 \pm 0,05 ^b | 0,20 \pm 0,02 ^{ab} |
| DTA-6 (C22:4, n-6) | 0,21 \pm 0,04 ^{ab} | 0,24 \pm 0,07 ^a | 0,15 \pm 0,09 ^b |
| DPA-6 (C22:5, n-6) | 0,14 \pm 0,05 ^a | 0,15 \pm 0,04 ^a | 0,86 \pm 0,05 ^b |
| DPA-3 (C22:5, n-3) | 0,23 \pm 0,02 ^a | 0,20 \pm 0,05 ^{ab} | 0,17 \pm 0,05 ^b |
| DHA (C22:6, n-3) | 2,05 \pm 0,41 ^a | 1,92 \pm 0,37 ^a | 1,44 \pm 0,36 ^b |

K - kontrolná skupina, KVO – skupina pacientov s kardiovaskulárnymi ochoreniami, MS – skupina pacientov s metabolickým syndrómom

LA – kyselina linolová, GLA – kyselina γ -linolénová, ALA – kyselina α -linolénová, DGLA – kyselina dihomogamma-linolénová, AA – kyselina arachidónová, EPA – kyselina timnodonová, DTA-6 – kyselina adrenová, DPA-6 – kyselina osbondová, DPA-3 – kyselina dokozapentaénová, DHA – kyselina klupanodónová

Hodnoty v tabuľke reprezentujú aritmetický priemer \pm SD

a, b reprezentujú štatisticky významné rozdiely medzi skupinami; za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$ (Tukey test)

Pri sledovaní pomeru ω -6/ ω -3 PNMK sme zaznamenali významné rozdiely medzi všetkými skupinami. Najnižší pomer ω -6/ ω -3 PNMK (10,3:1) bol pozorovaný v skupine K a najvyšší v skupine MS (17:1). Strednú hodnotu (13:1) nadobúdal v skupine KVO. Ďalej bola sledovaná aj aktivita desaturáz PNMK. Pre ω -6 PNMK bola vypočítaná aktivita delta-6-desaturázy ako pomer množstva GLA/LA a aktivita delta-5-desaturázy ako pomer množstva AA/DGLA. Významne vyššia aktivita delta-6-desaturázy pre ω -6 PNMK bola pozorovaná v skupine MS (0,13 \pm 0,06). Aktivita delta-5-desaturázy pre ω -6 PNMK bola najvyššia v skupine K (6,51 \pm 2,55) a najnižšia v skupine MS (5,72 \pm 2,85). Aktivita desaturáz pre ω -3 PNMK bola vypočítaná spoločne pre delta-6 a delta-5-desaturázy pretože množstvo kyseliny dokozatetraénovej (DTA, C20:4, n-3) v meraných vzorkách nebolo vyhodnotené. Táto

aktivita bola vypočítaná ako pomer EPA/ALA. Najvyššiu hodnotu nadobudla v skupine C ($0,57\pm 0,26$) a najnižšiu v skupine MS ($0,29\pm 0,09$). Rozdiely medzi týmito dvoma skupinami boli štatisticky významné. Epidemiologické štúdie ukázali, že diéta s pomerom ω -6/ ω -3 PNMK v rozmedzí 10-4:1 je spojená s nižším výskytom metabolického syndrómu, aterosklerózy a kardiovaskulárnych ochorení (Reiner a kol., 2011, Simopolous, 2008). V našej štúdii, pacienti s metabolickým syndrómom mali horší profil PNMK ako pacienti s kardiovaskulárnymi ochoreniami, hoci metabolický syndróm podporuje aterosklerotický proces. Môže to súvisieť s tým, že pacienti v KVO skupine už boli farmakologicky liečení zatiaľ čo pacienti skupiny MS nie. V skupine MS bola aktivita desaturáz vyššia pre ω -6 PNMK než pre ω -3 PNMK čo je v súlade s výsledkami predchádzajúcich štúdií (Žák a kol., 2016). Naše výsledky potvrdzujú, že zníženie množstva ω -3 PNMK v krvnej plazme koreluje s rozvojom metabolického syndrómu a s obezitou. Taktiež naznačujú, že metabolický syndróm a kardiovaskulárne ochorenia sú sprevádzané vyššou desaturázovou aktivitou v prospech ω -6 PNMK, čo môže prispieť k zvýšeniu pomeru ω -6/ ω -3 PNMK.

Práca bola podporená grantom VEGA1/0584/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hodgson JM, Mori TA, Wahlqvist ML. Omega-6 polyunsaturated. In Caballero, B. Encyclopedia of human nutrition (second edition). Oxford: Elsevier, 2005. 569 p. ISBN 0-12 150110-8.
- Johnson M, Bradford CH. Omega-3, Omega-6 and Omega-9 Fatty Acids: Implications for Cardiovascular and Other Diseases. *J Glycomics Lipidomics*. 2014; 4:1-8
- Kiecolt-Glaser J K a kol. Omega-3 fatty acids, oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*. 2013; 28:16-24.
- Mori T. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: epidemiology and effects on cardiometabolic risk factors. *Food Funct*. 2014; 5: 2004-2019.
- Reiner Ž a kol. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemia. *Eur Heart J*. 2011; 32:1769-1818.
- Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol*. 2009; 77:937– 946.
- Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*. 2008; 233:674-688.
- Su, KP a kol. Mind-body interface: the role of n-3 fatty acids in psychoneuroimmunology, somatic presentation, and medical illness comorbidity of depression. *Asia Pac. J. Clin. Nutr*. 2008; 17:151-157.
- Tvrzická E a kol. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection Quantitative aspects. *Anal Chim Acta*. 2002; 465:337–350.
- Žák A a kol. Desaturázy mastných kyselín: patofyziologie a klinický význam. *Čas. Lék. čes*. 2016; 155:15-21.

MOLEKULOVÉ MECHANIZMY ANTIPROLIFERATÍVNEHO ÚČINKU CHALKÓNOV NA LEUKEMICKEJ BUNKOVEJ LÍNII

Takáč P.

Ústav farmakológie, LF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Leukémie patria k malígnym ochoreniam, ktoré každý rok prispievajú k významnej úmrtnosti. Okrem klasickej terapie, ktorá je doprevádzaná množstvom závažných nežiaducich účinkov sa v poslednej dobe do popredia dostávajú prírodné látky s chemopreventívnym a chemoterapeutickým potenciálom. K nim patria aj chalkóny, prírodne sa vyskytujúce látky podobné flavonoidom, ktorých biologická aktivita bola preukázaná v mnohých štúdiách. Okrem toho majú schopnosť potláčať rast viacerých typov nádorových buniek vrátane leukemických. Cieľom práce bolo bližšie analyzovať mechanizmy antiproliferatívneho účinku nového syntetického chalkónu 1C na bunkách akútnej T-lymfoblastovej leukémie (Jurkat) pomocou prietokovej cytometrie. Zistili sme, že derivát 1C vyvolal zmeny v progresii bunkového cyklu a indukuje mitochondriálnu dráhu apoptózy, ktorá bola potvrdená poklesom MMP, aktiváciou kaspázy 3 a štiepením PARP. Tieto výsledky ukazujú, že nové syntetické chalkóny majú potenciál v terapii leukémií.

ÚVOD

Leukémie sú nádorové ochorenia, pri ktorých dochádza v kostnej dreni k hromadeniu bielych krviniek, hlavne ich nezrelých foriem (Yan a kol. 2014). Klasifikujú sa na lymfocytárne a myeloidné na základe pôvodu nádorových buniek a na akútne a chronické podľa priebehu a progresie ochorenia. Na ovplyvňovanie a inhibíciu proliferácie leukemických buniek sa v súčasnosti využíva viacero terapeutických prístupov vrátane chemoterapie, rádioterapie a transplantácie kmeňových buniek. V tejto súvislosti sa poukazuje na potenciál mnohých prírodných látok v prevencii aj terapii nádorových ochorení vrátane rôznych typov leukémií (Asmaa a kol. 2014, Kinghorn 2015). Chalkóny sú prírodne sa vyskytujúce biarylpropenóny, ktoré patria do skupiny flavonoidov a vyskytujú sa vo viacerých druhoch ovocia a zeleniny. Sú známe bohatou biologickou aktivitou vrátane antimalarickej, protizápalovej, antifungálnej, antivírusovej aj protinádorovej (Batovska a kol. 2007, Lahtchev a kol. 2008). Cieľom práce bolo bližšie analyzovať mechanizmy antiproliferatívneho účinku nového syntetického chalkónu na bunkách akútnej T-lymfoblastovej leukémie (Jurkat).

MATERIÁL A METODIKA

Na experimenty sme použili syntetický chalkón 1C v koncentrácii 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Mechanizmus účinku tejto látky na Jurkat bunkách sme analyzovali prietokovou cytometriou. Na analýzu distribúcie bunkového obsahu boli bunky zozbierané v súlade s experimentálnou schémou, 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 $\mu\text{g/ml}$, SigmaAldrich) a bunky boli farbené 30 min Vindelovým roztokom s obsahom propídiu jodidu (PI, 25 $\mu\text{g/ml}$, Sigma). Obsah DNA v bunkách bol analyzovaný prietokovým cytometrom (FACS Calibur, BD Biosciences). 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 mitochondriálneho membránového potenciálu boli analyzované pomocou prietokového cytometra použitím tetrametylén rodamin etyl esteru (TMRE) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Jurkat bunky (1×10^6) boli kultivované v Petriho miskách s látkou

(1C, $c=5,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$) po dobu 24, 48 a 72 hodín. Bunky boli zozbierané a spoločne premyté v PBS. Následne boli bunky ekvivalentne rozdelené a pred analýzou ofarbené (TMRE, $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Zmena aktivity kaspázy 3 bola analyzovaná použitím kitu BD Biosciences Pharmingen Caspase-3-PE (San Diego, CA, USA). Jurkat bunky (1×10^6) boli kultivované v Petriho miskách s látkou (1C, $c=5,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$) po dobu 24, 48 a 72 hodín. Bunky boli pozbierané a spoločne premyté v PBS. Následne boli ekvivalentne rozdelené a pred analýzou ofarbené (Caspase-3-PE). Analýzu štiepeného PARPu sme stanovili pomocou prietokového cytometra použitím Cleaved-PARP (Asp214) XP® Rabbit mAb (PE Conjugate) Cell Signaling Technology, (Danvers, MA, USA). Jurkat bunky (1×10^6) boli kultivované v Petriho miskách s látkou (1C, $c=5,0 \mu\text{mol.l}^{-1}$) po dobu 24, 48 a 72 hodín, pozbierané, spoločne premyté v PBS, následne ekvivalentne rozdelené a pred analýzou ofarbené pomocou Cleaved-PARP (Asp214) XP® Rabbit mAb (PE Conjugate). Pri všetkých analýzach bola fluorescencia stanovená po 15 minútovej inkubácii pri izbovej teplote v tme pomocou prietokového cytometra BD FACS Calibur (BD Biosciences). Analyzovaných bolo minimálne 10^4 buniek. Fluorescencia bola detekovaná filtrom 585/42 (FL-2).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

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

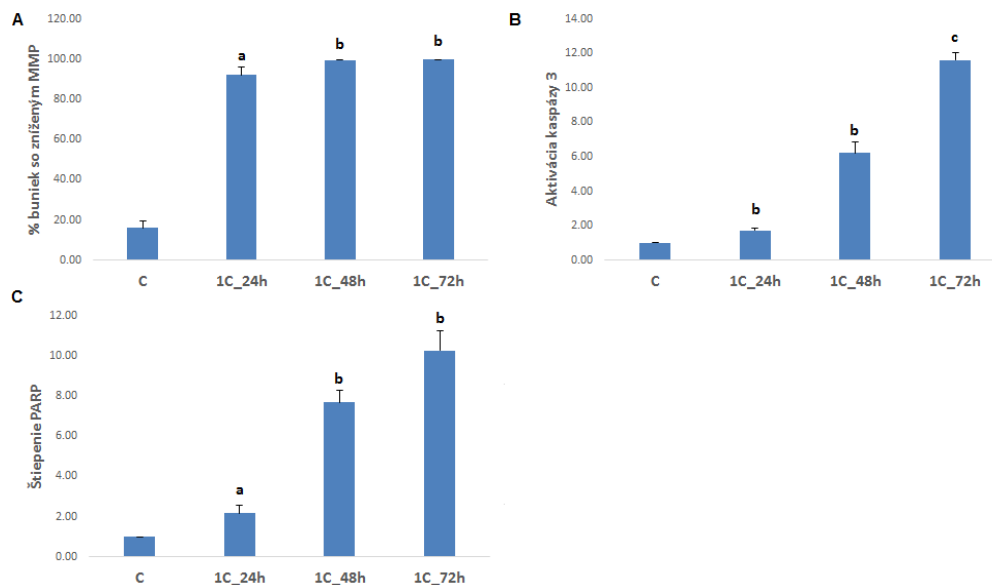
| | subG0/G1 | G1 | S | G2 |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|-------------------------------|
| Kontrola | 1,70 \pm 0,26 | 43,15 \pm 2,75 | 20,35 \pm 2,55 | 34,80 \pm 0,50 |
| 1C 24h | 13,85 \pm 0,95 ^b | 31,35 \pm 5,25 ^b | 14,70 \pm 2,00 | 40,10 \pm 6,30 |
| 1C 48h | 47,55 \pm 5,25 ^b | 22,85 \pm 1,05 ^b | 13,70 \pm 2,70 | 15,90 \pm 1,50 ^b |
| 1C 72h | 54,60 \pm 0,60 ^c | 20,75 \pm 0,75 ^b | 11,21 \pm 2,80 | 13,45 \pm 1,45 ^c |

Vplyv sledovaného derivátu na bunkový cyklus sme analyzovali metódou prietokovej cytometrie na základe obsahu DNA. Vplyvom látky došlo už po 24 h inkubácii k signifikantnému nárastu počtu buniek v sub G0/G1 frakcii (13,85 %) v porovnaní s kontrolou (1,70 %), čo sa považuje za marker bunkovej smrti-apoptózy. Signifikantný nárast počtu buniek v tejto frakcii sa zvyšoval aj na 48 a 72 h. Navyše analýza bunkového cyklu potvrdila zmeny v počte buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu. Po 24 h inkubácii s látkou 1C sa zvýšil počet buniek v G2/M fáze (40,10 %) vs kontrola (34,80 %) avšak po 48 h a 72 h inkubácii došlo, naopak, k významnému poklesu počtu buniek v tejto fáze bunkového cyklu (Tab. 1). Zmeny v normálnej progresii bunkového cyklu mohli prispieť k inhibícii proliferácie buniek Jurkat.

Analýza bunkového cyklu poukázala na schopnosť látky 1C indukovať apoptózu buniek Jurkat. Ďašia analýza pomocou prietokovej cytometrie potvrdila schopnosť tohto chalkónu indukovať mitochondriálnu cestu apoptózy u Jurkat buniek. Vplyvom testovanej látky došlo už na 24 h k signifikantnému nárastu počtu buniek so zníženým mitochondriálnym membránovým potenciálom (MMP), pričom v ďalších časoch sme aj naďalej pozorovali rovnako signifikantný nárast (Obr. 1A). Pokles MMP sa považuje za jeden z faktorov potvrdzujúcich aktiváciu mitochondriálnej dráhy apoptózy (Ott a kol. 2002). Indukcia apoptózy v nádorových bunkách je spojená s aktiváciou kaspázy-3 a štiepením proteínu PARP. Aktivácia tejto kaspázy spolu so štiepením jej substrátu (PARP) svedčí o aktivácii mitochondriálnej cesty apoptózy (Zimmermann a kol. 2001). V našich experimentoch sme zistili, že látka 1C po 24, 48 aj 72 h inkubácii významne indukovala aktiváciu kaspázy 3 (Obr. 1B), čo korelovalo so štiepením PARP (Obr. 1C). Naše experimenty ukazujú, že antiproliferatívna aktivita nového chalkónu 1C je spojená so zmenami v progresii bunkového

cyklu a indukciou apoptózy u buniek Jurkat. Tieto výsledky by mohli byť využité na vývoj a syntézu nových liečiv v terapii nádorových ochorení vrátane leukémií.

Obr. 1 Aktivácia mitochondriálnej dráhy apoptózy u buniek Jurkat po 24, 48 a 72 h inkubácii s látkou 1C
A: Analýza mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP) **B:** Aktivácia kaspázy 3 **C:** Štiepenie PARP. Údaje sú znázornené spolu s vyjadrením smerodajných odchýlok (\pm SD) vypočítaných z troch nezávislých experimentov (^a $p < 0,05$, ^b $p < 0,01$, ^c $p < 0,001$ verzus kontrola).



Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a inovácie pre projekt Medicínsky univerzitný vedecký park v Košiciach (MediPark, Košice - Fáza II.), kód ITMS2014+ 313011D103, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja a grantu SEPO-II (kód ITMS: 26220120039).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asmaa MJS, Al-jamal HAN, Ang CY, Asan JM, Seeni A, Johan MF. Apoptosis induction in MV4-11 and K562 human leukemic cells by *Pereskia sacharosa* (Cactaceae) leaf crude extract. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15: 475-481.
- Batovska D, Parushev ST, Slavova A, Bankova V, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H. Study on the substituents' effects of a series of synthetic chalcones against the yeast *Candida albicans*. *Eur J Med Chem.* 2007; 42: 87-92.
- Kinghorn A D. Review of anticancer agents from natural products. *J Nat Prod.* 2015; 78: 2315–2315.
- Lahtchev KL, Batovska DI, Parushev STP, Ubiyovk VM, Sibirny AA. Antifungal activity of chalcones: a mechanistic study using various yeast strains. *Eur J Med Chem.* 2008; 43: 2220-2228.
- Ott M. a kol. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 31: 1259–1263.
- Yan H, Hu W, Zhang J, Wang Y, Xia K, Peng M. Resveratrol induces human K562 cell apoptosis, erythroid differentiation, and autophagy. *Tumor Biol.* 2014; 35: 5381–5388.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001; 92: 57-70.

VÝSKYT ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE U BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z HALDY

Timková I., Pevná V., Pristaš P., Sedláková-Kaduková J.

Katedra mikrobiológie, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Antibiotická rezistencia je akútnym problémom súčasnej spoločnosti. Nadmerné užívanie a subterapeutické množstvá antibiotík vedú k rozvoju rezistencie baktérií, a to nielen u neinfekčných druhov, ale aj u patogénnych, čo predstavuje významnú medicínsku hrozbu. Cieľom nášho experimentu bolo určiť početnosť baktérií v 1 g vzorky horniny odobratej z haldy, a taktiež MIC (minimal inhibitory concentration) antibiotík u izolátov získaných z haldy neďaleko mesta Hnúšťa (SK). Mikroorganizmy použité v tomto experimente boli rutinne kultivované a dilučnou metódou testované na rezistenciu voči rôznym koncentráciám vybraných antibiotík – ampicilínu, chloramfenikolu, tetracyklínu a kanamycínu. Výsledky ukazujú vysokú mieru rezistencie baktérií voči chloramfenikolu a kanamycínu, zatiaľ čo voči tetracyklínu boli izoláty vysoko senzitivné. MIC tohto antibiotika je 20 µg/ml.

ÚVOD

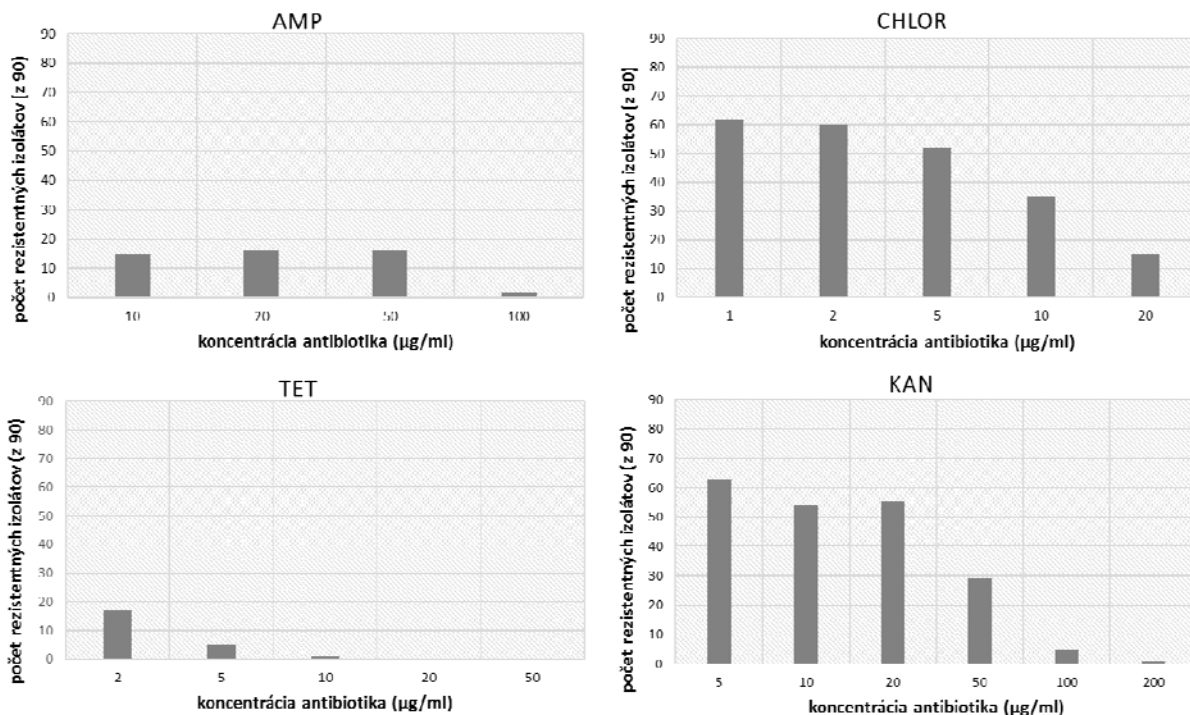
Antibiotiká sú mikrobiálne produkované substancie, ktoré zabíjajú mikroorganizmy alebo inhibujú ich rast. Využívajú sa na liečbu širokej škály bakteriálnych infekčných ochorení u zvierat, ale aj ľudí (Hussein a kol., 2009). Nadmerné, neuvážené či subterapeutické množstvá užívaných antibiotických preparátov viedli k postupnej strate ich antimikrobiálnej účinnosti, a teda k vzniku rezistencie baktérií voči nim (Kuiken a kol., 2005). Nadobúdanie a šírenie determinantov antibiotickej rezistencie medzi populáciami virulentných baktérií je najzávažnejším problémom pri riešení infekčných ochorení, pričom hlavnú úlohu pri vývine a šírení antibiotickej rezistencie medzi patogénnymi mikroorganizmami hrá horizontálny génový transfer (Martinez a kol., 2000). Selečný tlak vytvorený nadmernými množstvami antibiotík však nie je nevyhnutný na selekciiu génov antibiotickej rezistencie. Tie sú totiž lokalizované na replikóne spolu s iným selečným markerom. Jedným z príkladov môže byť aj väzba medzi týmito génmi rezistencie a génmi rezistencie voči ťažkým kovom, ktoré sa veľmi často nachádzajú v environmentálnych izolátoch (Davison, 1999). Ko-existencia týchto dvoch druhov determinantov rezistencie na jednom genetickom elemente dovoľuje, aby bola antibiotická rezistencia vyselektovaná vďaka selečnému tlaku vytvorenému ťažkými kovmi, ktoré sa nachádzajú v kontaminovanom prostredí (Alonso a kol., 2000). A práve naša práca sa zaoberala antibiotickou rezistenciou u baktérií získanými z prostredia hald s vysokým obsahom kovov, kde sa mohol tento vplyv selečného tlaku uplatňovať. Naším cieľom bolo určiť početnosť baktérií v 1 g vzorky horniny odobratej z haldy, a taktiež MIC (minimal inhibitory concentration) antibiotík u izolátov z nej získaných.

MATERIÁL A METODIKA

Dve vzorky (100 g/vzorka) boli odobraté z vrchnej vrstvy hald (0-10 cm) neďaleko mesta Hnúšťa (SK). Lokalita bola vybraná pre predpoklad jej vysokej kontaminácie ťažkými kovmi. Nakoľko gény rezistencie voči ťažkým kovom predstavujú selečný marker determinantov antibiotickej rezistencie, táto lokalita sa javí ako vhodný zdroj environmentálnych izolátov.

1 g odobratej, vysušenej vzorky horniny sme rozsuspendovali v 10 ml PBS tlmivom roztoku a intenzívne premiešali 30 minút pri laboratórnej teplote. Suspenziu sme následne nariedili v desatinnom riedení, 50 µl z nich sme inokulovali na TSA (Tryptic Soy Agar) agarové platne a kultivovali (48 hod., 25°C, v tme). Po kultivácii sme určili početnosť baktérií na 1 g haldy, tzv. CFU (colony forming units). Na základe rôzneho fenotypu bakteriálnych kolónií na TSA

agare bolo 90 baktérií podrobených testovaniu rezistencie voči vybraným antibiotikám v koncentráciách: ampicilín - 10, 20, 50, 100 µg/ml; chloramfenikol - 1, 2, 5, 10, 20 µg/ml; tetracyklín - 2, 5, 10, 20, 50 µg/ml a kanamycín - 5, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml. Testovanie bolo uskutočnené na MH agare (Mueller-Hintonovej agare) dilučnou metódou. Po kultivácii (48 hod., 25°C, v tme) sme vyhodnotili rast baktérií a označili ich ako rezistentné alebo senzitívne.



Obr. 1 Počty rezistentných izolátov voči ampicilínu (AMP), chloramfenikolu (CHLOR), tetracyklínu (TET) a kanamycínu (KAN)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po 48 hodinách kultivácie primárneho záchytu z haldy sme stanovili počet bakteriálnych CFU - 3.02×10^7 /g⁻¹ suchej vzorky. Naše zistenie korešponduje s hodnotami pre haldy podľa Williamsa a kol. (2015) - $2,4 \times 10^7$ - 1.2×10^8 CFU/ g⁻¹ suchej vzorky. Ako je zobrazené na Obr. 1, najvyššiu antibiotickú rezistenciu sme detegovali v prípade chloramfenikolu a kanamycínu. Aj pri najvyššej testovanej koncentrácii týchto antibiotík sme pozorovali prítomnosť rezistentných izolátov, aj keď v prípade kanamycínu sa zdá, že hodnota 200 µg/ml bude blízka hodnote MIC, nakoľko pri tejto koncentrácii sme pozorovali len jeden rezistentný izolát. Naopak, veľmi nízke počty rezistentných baktérií sme pozorovali u tetracyklínu, u ktorého sme aj určili MIC – 20 µg/ml. Taktiež Berg a kol. (2005) vo svojom experimente pozoroval najnižšiu mieru rezistencie práve voči tomuto antibiotiku. V našom pokuse, pri ampicilíne, podobne ako pri kanamycíne, sa zdá, že MIC pre toto antibiotikum bude blízka hodnote 100 µg/ml, nakoľko pri tejto koncentrácii antibiotika sme detegovali len dva rezistentné izoláty. Berg a kol. (2005), narozdiel od nás, zas pozoroval najvyššiu mieru rezistencie spomedzi všetkých testovaných antibiotík, až 95%, práve u ampicilínu, a to pri koncentrácii 64 µg/ml. Naše dosiahnuté výsledky sú zaujímavé, pretože v prostredí haldy sme nepredpokladali prítomnosť antibiotík, ktoré by vďaka selekčnému tlaku vyselektovali antibioticky rezistentné izoláty. Dá sa preto predpokladať, že vysoká miera antibiotickej rezistencie u baktérií získaných z haldy súvisí s ťažkými kovmi a ich selekčným tlakom vedúcim k selekcii antibioticky rezistentných izolátov.

Experimentom sme zistili vysoké počty rezistentných bakteriálnych izolátov najmä voči chloramfenikolu a kanamycínu, najnižšiu rezistenciu sme pozorovali v prípade tetracyklínu, kde sme určili MIC - 20µg/ml. Výsledky sú z medicínskeho hľadiska alarmujúce, nakoľko sme našim experimentom dokázali vysokú kontamináciu životného prostredia génmi antibiotickej rezistencie. Tieto výsledky sú zároveň prekvapivé, pretože sme antibiotickú rezistenciu dokázali v lokalite, kde sme kontakt baktérií s antibiotikami nepredpokladali. Je preto pravdepodobné, že za týmito skutočnosťami stojí jednak selekčný tlak ťažkých kovov a takisto aj väzba génov rezistencie voči antibiotikám a ťažkým kovom, ktorá zabezpečuje spoločný prenos antibiotickej rezistentného fenotypu a fenotypu rezistentného voči ťažkým kovom medzi druhovo rôznymi mikroorganizmami. Do budúcnosti je potrebné rozšíriť experiment a vykonať ďalšie pokusy s vyššími koncentraciami ampicilínu, kanamycínu a chloramfenikolu, aby sme MIC stanovili aj pre tieto antibiotiká.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alonso A., Sanchez P., Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R contains a cluster of genes from gram-positive bacteria involved in antibiotic and heavy metal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1778-1782.
- Berg J., Tom-Petersen A., Nybroe O. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Letters in applied Microbiology* 2005; 40:146-151.
- Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 1999; 42:73-91.
- Hussein AI., Ahmed AM., Sato M., Shimamoto T. Characterization of integrons and antimicrobial resistance genes in clinical isolates of Gram-negative bacteria from Palestinian hospitals. *Microbiol Immunol.* 2009; 53:595-602.
- Kuiken T., Leighton FA., Fouchier RA., LeDuc JW., Peiris JS., Schudel A., Stohr K., Osterhaus AD. Public health: pathogen surveillance in animals. *Science* 2005; 309:1680-1.
- Martinez JL., Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1771-1777.
- Williams JO., Hakam K. Microorganisms associated with dump sites in Port Harcourt Metropolis, Nigeria. *Journal of Ecology and the Natural Environment* 2015; 8:9-12.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2018
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XIII. ročník

Zostavila: Ing. Ľudmila Hamarová, PhD.

Rok vydania: 2018

Prvé vydanie

Vydal: Centrum biovied SAV, v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat
Šoltésovej 4/6, 04001 Košice

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

ISBN 978-80-972752-3-5