

CENTRUM  
**BIOVIED**  
SLOVENSKÁ  
AKADÉMIA VIED

# VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2019

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

**XIV. ročník**

**Košice, 14. a 15. november 2019**

**Zborník príspevkov prezentovaných na Seminári doktorandov venovanom  
pamiatke akademika Boďu 14. a 15. novembra 2019 v Košiciach**

**Usporiadali:**

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV  
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach  
Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

**Zostavila:**

RNDr. Veronika Kovaříková, 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 978-80-972752-7-3**

Rok 2019 je významným historickým míľníkom pre všetky tri inštitúcie, ktoré sa podieľajú na organizovaní Seminára doktorandov venovanému pamiatke akademika Bod'u. Zakladajúcou inštitúciou seminára bol **Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach**, ktorý si v tomto roku pripomína 50. výročie založenia. Práve zakladateľovi ústavu, akademikovi Bod'ovi, je tento seminár venovaný. Akademik Koloman Bod'a patril medzi popredných slovenských vedcov. Na ňom je postavená bohatá tradícia základného výskumu v oblasti fyziológie hospodárskych zvierat. Profesor Koloman Bod'a inicioval výskum v niektorých progresívnych oblastiach biotechnológií, ktoré sa naďalej rozvíjali a tvoria súčasť dnešného vedeckého programu ústavu. Ide o rozvoj poznania mikroflóry tráviaceho traktu hospodárskych zvierat využitím metód molekulárnej biológie, štúdium fyziologických procesov tráviaceho traktu, výskum v oblasti preimplantačnej embryológie.

Ako druhý vstúpila do spoluorganizovania seminára **Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach**, ktorá si v tomto roku pripomína 70. výročie založenia. Za 70 rokov sa univerzita dostala do povedomia mladým ľuďom nie len ako škola, v ktorej si nadobudnú vedomosti a skúsenosti pre veterinársku prax, ale aj ako miesto, kde sa môže začať ich vedecký život. Doktorandské štúdium je k tomu prvým krokom.

Tretím spoluorganizátorom sa stala **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach**, ktorá si v roku 2019 tiež pripomína okrúhle jubileum, 60 rokov založenia univerzity. Jej prístup do seminára doktorandov bol veľkým obohatením. Rozšírili sa vedecké oblasti, ktorými sa mladí vedci v biologických vedách zaoberajú. Je veľmi dôležité spomenúť, že spoločnosť dvoch univerzít a ústavu Slovenskej akadémie vied je významným krokom pre výrazný multidisciplinárny prístup mladých vedcov k riešeným výskumným úlohám, pre možnosti konfrontácie dosiahnutých výsledkov a v neposlednom rade aj pre možnosť prezentovania svojich výsledkov pred svojimi kolegami.

Je to zhoda náhod, že rok 2019 je takým významným rokom pre organizátorov seminára. 50, 60, alebo 70 rokov pôsobenia na akademickom a vedeckom poli v Košiciach ukazuje, že veda a vedecká výchova je súčasťou nášho života, že je jednou z najdôležitejších vecí, ktoré dávajú šancu mladým ľuďom budovať si svoju budúcnosť podľa svojich predstáv.

Všetky tri inštitúcie sa snažia vytvoriť také prostredie, aby Seminár doktorandov venovaný profesorovi Kolomanovi Bod'ovi predstavoval aj v budúcich rokoch kvalitné vedecké podujatie v biologických vedách v Košiciach.

Prof. MVDr. Štefan Faix, DrSc  
ÚFHZ CBv SAV



## Obsah

ŠTÚDIUM VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A ICH VYUŽITIE PRE RÔZNE ŠTÁDIA IBD OCHORENIA A RAKOVINY ČREVA S CIEĽOM OPTIMALIZOVAŤ FEKÁLNU MIKROBIÁLNU TERAPIU.....	
Adamková P., Hradická P., Demečková V. ....	8
CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI FEKÁLNYCH STAFYLOKOKOV Z KRÁLIKA PLEMENA PANNON WHITE .....	
Bino E. ....	11
IDENTIFIKÁCIA <i>CLADOSPORIUM</i> SPP. METÓDOU PCR-RFLP .....	
Demjanová S., Jevinová P., Pipová M., Regecová I. ....	14
MORSKÉ BAKTÉRIE RODU <i>BACILLUS</i> – PRIRODZENÍ PRODUCENTI LIPOPEPTIDOVÝCH BIOSURFAKTANTOV .....	
Englerová K., Nemcová R., Maďar M., Mucha R., Styková E. ....	17
SLEDOVANIE VYBRANÝCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETROV U MYŠÍ PRI ZÍSKAVANÍ ANIMÁLNEHO GNOMODELU ULCERÓZNEJ KOLITÍDY .....	
Faixová D., Mudroňová D., Lauko S., Gancarčíková S. ....	20
MIERA INHIBÍCIE HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU VYBRANÝMI SULFÓNAMIDMI M. Haus, Vašková J. ....	23
VPLYV LAKTÁCIE NA MINERÁLNY STATUS VYSOKOPRODUKČNÝCH DOJNÍC....	
Holodová M. ....	26
VPLYV PRODUKTOV KMEŇOVÝCH BUNIEK NA ANGIOGENÉZU CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY .....	
Humeník F., Maloveská M., Farbáková J., Petrovová E., Mudroňová D, Mojžišová Z., Čížek M. Čížková D. ....	29
VYUŽITIE KINEMATICKEJ ANALÝZY U PSOV S DYSPLÁZIOU LAKŤOVÉHO KLĪBU.....	
Huňáková K., Hluchý M., Ševčík K., Kuricová M., Ledecký V. ....	32
INTESTINÁLNE PARAZITY HLODAVCOV V CHOVOCH A PREDAJNIACH SO ZVIERATAMI NA SLOVENSKU.....	
Jarošová J., Antolová D. ....	35
SPOLOČENSTVÁ CHVOSTOSKOKOV (COLLEMBOLA) POZDĹŽ MIKROKLIMATICKY INVERZNÉHO SUTINOVÉHO SVAHU ZÁDIELSKEJ TIESŇAVY.....	
Jureková N. ....	38
PREPOJENIE TUBOVÝCH SCREENINGOVÝCH TESTOV A ELISA METÓDY PRI STANOVENÍ REZÍDUÍ KOKCIDIOSTATÍK V TKANIVÁCH HYDINY.....	
Juščáková D., Kožárová I. ....	41
ŠTÚDIUM KULTIVOVATELNEJ MIKROBIOCENÓZY ZUBNÝCH BIOFILMOV U PSOV .....	
Kačírová J., Maďari A., Nemcová R., Maďar M.....	44
CHARAKTERIZÁCIA <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZOLOVANÝCH Z HNAČKUJÚCICH TELIAT.....	
Karahutová L., Kmeť V. ....	47
PALMÁRNA SUBLUXÁCIA KORUNKOVÉHO KLĪBU U ŽRIEBÄT .....	
Kol'vek F., Žert Z., Nosál S. ....	50
BIO-MECHANOCHEMICKÁ SYNTÉZA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC POMOCOU RASTLÍN A ICH ANTIBAKTERIÁLNA AKTIVITA .....	
Kováčová M., Daneu N., Tkáčiková Ľ., Baláž M. ....	53

VPLYV SEZÓNNOСТИ AKO HLAVNÉHO FAKTORA PÔSOBIACEHO NA KVALITU SUROVÉHO KRAVSKÉHO MLIEKA.....	
Kováčová M., Dudriková E., Maľová J., Vataščinová T. ....	56
ODLIŠNÁ ODPOVEĎ MYŠACÍCH EMBRYÍ POCHÁDZAJÚCICH Z MATIEK S ROZLIČNOU TELESNOU KONDÍCIU NA INZULÍN <i>IN VITRO</i> .....	
Kšišňanová M. ....	59
ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY MEDICINÁLNYCH RASTLÍN U JAHNIAT EXPERIMENTÁLNE NAKAZENÝCH ENDOPARAZITÓZOU.....	
Kucková K. ....	62
ANIMÁLNY MODEL GNOTOBIOTICKÝCH MYŠÍ BALB/C V ŠTÚDII ULCERÓZNEJ KOLITÍDY.....	
Lauko S., Gancarčíková S., Hrčková G., Hajdučková V., Kačírová J., Mudroňová D., Maďar M. ....	65
POHLAVNÝ DIMORFIZMUS V METABOLIZME LIPIDOV: DÔLEŽITÝ FAKTOR KLINICKEJ PRAXE.....	
Leškaničová A., Chovancová O., Babinčák M., Maceková D., Kostolný J., Šmajda B., Kisková T. ....	68
IZOLÁCIA <i>TREPONEMA</i> SPP. Z KOŽE POSTIHNUTEJ DIGITÁLNOU DERMATITÍDOU U HOVÄDZIEHO DOBYTKA.....	
Marčeková P., Maďar M., Mudroň P., Styková E. ....	70
CHALKÓNY AKO INHIBÍTORE RASTU NÁDOROVÝCH BUNIEK PRSNÍKA.....	
Michalková R., Takáč P., Kello M., Kudličková Z., Mojžiš J. ....	73
KAZUISTIKA: KVANTOVÁ FYZIKA V DIAGNOSTIKE A TERAPII MALÝCH ZVIERAT.....	
Micháľová A., Fialkovičová M., Takáčová M. ....	76
VPLYV ENDOPARAZITÓZY A NUTRACEUTÍK NA BACHOROVÝ MIKROBIÓM JAHNIAT.....	
Mravčáková D. ....	79
ZMENY BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ TRIBEČ VÍRUSU V ZÁVISLOSTI OD <i>EX VIVO</i> HOSTITEĽSKÉHO SYSTÉMU.....	
Peňazziová K., Csank T., Pistl J. ....	82
VPLYV PALINY ( <i>ARTEMISIA ABSINTHIUM</i> L.), RUMANČEKA ( <i>MATRICARIA CHAMOMILLA</i> L.), ZEMEDYMU ( <i>FUMARIA OFFICINALIS</i> L.) A SLEZU ( <i>MALVAE SYLVESTRIS</i> L.) NA ANTIOXIDAČNÉ A FERMENTAČNÉ PARAMETRE OVIEC <i>IN VITRO</i> .....	
Petrič D. ....	85
ÚČINOK HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA POSTMORTÁLNE PROCESY VO SVALOVINE BROJLEROVÝCH KURČIAT.....	
Petríková D., Koréneková B., Marcinčák S., Kožárová I. ....	88
GENOMICKÝ POHĽAD NA ADAPTÁCIU <i>ACINETOBACTER LWOFFII</i> K1 NA EXTRÉMNE PODMIENKY PROSTREDIA.....	
Petrová N., Pristaš P. ....	91
EFEROCYTÓZA V MYŠACOM PREIMPLATAČNOM EMBRYU.....	
Pisko J. ....	94
POROVNANIE IRITAČNÉHO POTENCIÁLU JEDU MEDZI AFRICKÝM A ÁZIJSKÝM DRUHOM „PEUVAJÚCICH“ KOBIER POUŽITÍM METODIKY HET-CAM A HODNOTIACEHO SYSTÉMU PODĽA LUEPKEHO.....	
Polláková M., Petrovová E., Petrilla V., Sopková D. ....	97
VPLYV VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC NA TVORBU EXTRACELULÁRNEJ FOSFOLIPÁZY KVASINKOU <i>Candida albicans</i> .....	

Proškovcová M., Čonková E., Váczi P. ....	100
POUŽITIE GLUTARALDEHYDOVÉHO KOAGULAČNÉHO TESTU PRI DIAGNOSTIKE OCHORENÍ PAZNECHTOV DOJNÍC.....	
Slovák P., Mudroň P. ....	103
FOKÁLNA INFEKCIA DENTOGÉNNEHO PÔVODU.....	
Stašková A., Lauko S., Jenča A., Nemcová R. ....	105
ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA U BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z JEDINEJ ZLATEJ BANE NA SLOVENSKU.....	
Timková I., Lachká M., Maliničová L., Kisková J., Nosáľová L., Pristaš P., Sedláková- Kaduková J. ....	109
MODULÁCIA AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE INZULÍNU POUŽITÍM IMIDAZOLOVÝCH IÓNOVÝCH KVAPALÍN.....	
Vaník V., Fedunová D., Bednáríková Z., Marek J., Gažová Z. ....	112
ANTIPARAZITÁRNY ÚČINOK ENTEROCÍN-PRODUKUJÚCICH BAKTÉRIÍ NA INFEKCIU <i>TRICHINELLA SPIRALIS</i> .....	
Vargová M., Dvorožňáková E., Humníková Z., Revajová V., Lauková A. ....	115
ANTIFUNGÁLNE VLASTNOSTI <i>LACTOBACILLUS PLANTARUM</i> Z OVČIEHO MLIEKA.....	
Vataščinová T., Pipová M., Maľa P., Demjanová S., Bujňák L., Kováčová M. ....	118

# ŠTÚDIUM VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A ICH VYUŽITIE PRE RÔZNE ŠTÁDIA IBD OCHORENIA A RAKOVINY ČREVA S CIEĽOM OPTIMALIZOVAŤ FEKÁLNU MIKROBIÁLNU TERAPIU

Adamková P., Hradická P., Demečková V.

Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

## ABSTRAKT

Zápalové ochorenia čriev (inflammatory bowel diseases, IBD) predstavujú globálny problém v 21. storočí, ktorý je spájaný aj so zvýšenými hladinami prozápalového makrofágového subtypu M1, čo vedie k chronickej zápalovej odpovedi. Väčšina súčasných terapií pre IBD je zameraných na ovplyvnenie zápalu pomocou naturálnych imunomodulátorov, akými sú napríklad probiotiká. V súčasnosti je preukázané, že mnohé kmene laktobacilov sú účinnými modulátormi črevného zápalu v dôsledku ich schopnosti repolarizovať M1 makrofágy na anti-inflamačný subtyp M2, ktorý je žiaduci v počiatkovej akútnej fáze IBD. Zmeny v zložení a počte baktérií sú považované za ďalší kľúčový prvok v črevných zápalových procesoch, z čoho vyplýva, že terapie založené na modulácii mikrobióty môžu predstavovať vhodný prístup pre ich liečbu. Fekálna mikrobiálna transplantácia (FMT), sa pre jej extrémne vysokú mieru úspešnosti pri liečbe klostrídiovej kolitídy, javí ako vhodný terapeutický prístup aj pri liečbe IBD. Výber darcu však naďalej ostáva veľkou výzvou, pretože hlavnou hrozbou FMT je možnosť zavedenia a šírenia vírusových alebo bakteriálnych infekcií. Avšak cieľná modulácia črevného imunitného systému/mikrobiómy pomocou autochtónnej mikrobióty obohatenej o vhodné probiotické kmene vzhľadom na štádium ochorenia, by mohla predstavovať vysoko účinný terapeutický prístup pre pacientov s IBD.

## ÚVOD

Zápalové ochorenia čriev, ktoré zahŕňajú hlavne Crohnovu chorobu (Crohn's disease, CD) a ulceróznou kolitídu (ulcerative colitis, UC) predstavujú skupinu chronických poškodení charakterizovaných zápalom gastrointestinálneho traktu (GIT), typicky s relapsujúcim a remitujúcim klinickým priebehom. Črevo okrem tráviacej funkcie, predstavuje súčasne najväčší imunitný orgán v tele, keďže obsahuje okrem buniek nehemoepiteliálneho pôvodu (epitel, Panethove bunky, pohárikovité bunky) aj systém mononukleárných fagocytov, vrátane makrofágov a dendritických buniek, ktoré hrajú odlišné, ale komplementárne úlohy pri rozlišovaní medzi neškodnými antigénmi a potenciálnymi patogénmi (Chassaing a kol., 2014). Zároveň je črevo miestom existencie veľkého množstva baktérií, pričom homeostáza tejto veľkej mikrobiálnej biomasy je nevyhnutným predpokladom na udržanie zdravia hostiteľa spôsobom maximalizácie prospešných symbiotických vzťahov a zároveň minimalizácie rizík vyplývajúcich z faktu, že existujú v tesnej blízkosti imunitných buniek, s ktorými sú v neustálej komunikácii. Aj keď táto komunikácia predstavuje vysoko účinný a kontrolovaný proces, v prípade jeho narušenia dochádza k dysfunkcii črevného imunitného systému, čo následne indukuje celý rad chorôb vrátane IBD (Li a kol., 2018). Niekoľko bakteriálnych druhov mikrobióty predstavuje prospešné mikroorganizmy a vykazuje probiotické účinky. Ide najmä o druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Tieto baktérie významne zlepšujú zdravie ľudí prostredníctvom viacerých účinkov vrátane biosyntézy vitamínov, kompetície s patogénnymi mikróbov o väzbové miesta na slizničných epiteliálnych bunkách a modulácie imunitnej reakcie hostiteľa (Hardy a kol., 2013). Aj keď sa mnohé výskumy zameriavajú na moduláciu a reguláciu imunitnej odpovede probiotickými organizmami, presné mechanizmy nie sú celkom objasnené. Bolí však dokázané priaznivé účinky probiotík, ktoré sú založené na ich schopnosti regulovať produkciu protizápalových a pro-zápalových cytokínov prostredníctvom pôsobenia na bunky imunitného systému (Dong a kol., 2012). Dôležitú úlohu v slizničnom imunitnom systéme zohrávajú práve makrofágy, pretože predstavujú centrálnu mediátory intestinálnej imunitnej homeostázy a zápalu (Shaw a



kol., 2018). Avšak, paradoxne, sú tiež zapojené do chronických patologických zmien GIT, ako je IBD, kedy bolo v zapálenom čreve dokázané zvýšenie počtu novoprijatých monocytov a aktivovaných makrofágov. Aj keď vzťah medzi makrofágmi a patogenézou kolitídy nie je doposiaľ dostatočne pochopený, ukázalo sa, že makrofágy M1 sa pri ulceróznej kolitíde zvýšili a makrofágy M2 sa znížili. Intestinálny zápal pri IBD je kontrolovaný komplexnou súhrou vrodených a adaptívnych imunitných mechanizmov. Predpokladá sa, že hlavnými účastníkmi produkcie zápalových cytokínov v čreve sú práve aktivované makrofágy a následná nerovnováha cytokínov prispieva k patogenéze IBD. Cytokíny, ako látky produkované imunokompetentnými, ale aj neimunologickými bunkami, hrajú kľúčovú úlohu v signalizácii, ale aj v IBD, kedy sú zodpovedné za T-bunkovú diferenciáciu Th1, Th2, T regulačných a Th17 buniek. Zastúpenie cytokínov sa v priebehu ochorenia mení, čo má priamy vplyv na recidívu a exacerbáciu zápalového procesu v IBD (Monteleone a kol., 2006). Makrofágy, ako antigén prezentujúce bunky riadia mnoho zápalových reakcií pri IBD, hlavne produkciou TNF- $\alpha$ , ktorý vykazuje svoje pro-zápalové účinky prostredníctvom zvýšenej produkcie IL-1 $\beta$  a IL-6, expresie adhézných molekúl, proliferácie fibroblastov, ako aj inhibície apoptózy. TNF- $\alpha$  a IL-1 sú rozhodujúcimi cytokínmi v patogenéze IBD kvôli ich imunologickým upregulačným a pro-zápalovým aktivitám. Ďalším dôležitým cytokínom syntetizovaným makrofágmi je pleiotrópny IL-6, ktorého účinky sú prevažne pro-zápalové (Begue et al., 2006). IL-12 a IL-23 sú úzko súvisiace cytokíny s dôležitými úlohami pri regulácii zápalu tkaniva, pričom viaceré vedecké štúdie podporujú dôležitosť týchto cytokínov pri regulácii zápalu slizníc najmä v črevách (Vignali a Kuchroo, 2012).

#### MATERIÁL A METODIKA

Cytokínový profil a úroveň fagocytózy boli určované na THP-1 ľudskej monocytickej bunkovej línii (ATCC-American Type Culture Collection, USA). Bunky boli kultivované v kultivačnom médiu R10 (RPMI-1640 s L-glutamínom (Sigma-Aldrich Corporation, USA), 10 % (v/v) fetálne bovinné sérum (FBS; Gibco, USA)) v inkubátore pri teplote 37°C s 5% obsahom CO<sub>2</sub> v atmosfére s 95% vlhkosťou. Diferenciácia na M1 a M2 makrofágy bola generovaná podľa Habil a kol. (2011). Bakteriálne kmene *Lactobacillus plantarum* LS/07 (LP) (LF UPJŠ, Štofilová a kol., 2015), a *Lactobacillus reuteri* (LR) (UVLF Košice, Gancarčíková a kol., 2018) boli kultivované v MRS bujóne (Sigma-Aldrich Corporation, USA) po dobu 19 hodín, kedy koncentrácia ceznočnej kultúry predstavovala 10<sup>9</sup> cfu/ml (otestované prostredníctvom Muse Cell Analyzer). Pri testovaní cytokínového profilu bola použitá koncentrácia 10<sup>6</sup> cfu/ml a merané cytokíny (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12/23, TNF- $\alpha$ ) boli kvantifikované sendvičovou ELISOU. Fagocytárne vlastnosti boli zisťované po kultivácii makrofágových subtypov M1/M2 s baktériami LP a LR, ktoré boli 30 minút (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubované s fluorescenčným farbivom CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester). Inhibícia fagocytózy pri oboch makrofágových subtypoch bola dosiahnutá pridaním cytochalasínu D a vzorky boli analyzované prietokovou cytometriou (BD FACSVersé, softvér BD FACSuite).

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci prvej časti našej štúdie zameranej na schopnosť fagocytózy M1 a M2 makrofágových subtypov po kokultivácii s LP alebo s LR, sme zaznamenali vyššiu fagocytárnu aktivitu u M2 makrofágov. Najvyššia fagocytóza bola pozorovaná po 12 hodinách pri kokultivácii s LP, naopak pôsobením LR bola najvyššia aktivita zaznamenaná už po prvej hodine, a teda pri kokultivácii s kmeňom LR prebiehala fagocytóza rýchlejšie. Naše výsledky potvrdzuje aj štúdia Schulz a kol. (2019), v ktorej vykazoval M2 makrofágový subtyp rovnako vyššiu fagocytárnu aktivitu.

**Tab. 1: Cytokínový profil M1 a M2 makrofágov po kokultivácii s LP a LR.**

	M1		M2	
	LP	LR	LP	LR
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/10 <sup>6</sup> b)	13,60 $\pm$ 1,71	71,33 $\pm$ 20,04	140,51 $\pm$ 25,99	632,61 $\pm$ 10,39
<b>IL-6</b> (pg/10 <sup>6</sup> b)	11,79 $\pm$ 0,50	12,59 $\pm$ 0,69	11,20 $\pm$ 0,48	12,75 $\pm$ 1,76
<b>IL-12/23</b> (pg/10 <sup>6</sup> b)	122,35 $\pm$ 8,75	134,34 $\pm$ 20,46	452,71 $\pm$ 20,91	619,34 $\pm$ 42,01
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/10 <sup>6</sup> b)	61,56 $\pm$ 17,66	766,77 $\pm$ 15,88	172,52 $\pm$ 20,03	857,04 $\pm$ 23,34

(b – bunky)

V korelácii s našimi výsledkami je aj štúdia Habil a kol. (2011), ktorá bola zameraná na detekciu IL-6 a TNF- $\alpha$ . Tieto výsledky poukazujú na anti-inflamačný účinok kmeňa LP, ktorého zapojenie môže byť prospešné ako prevencia, prípadne v iniciačných štádiách IBD. A naopak pro-inflamačné pôsobenie kmeňa LR môže byť využité v opätovnom naštartovaní imunitného systému, ktorý je výrazne suprimovaný napríklad v neskoršom rakovinovom štádiu. Naše výsledky teda potvrdzujú súčasné zistenia, že aj keď probiotiká môžu zdieľať niektoré zdravie prospešné vlastnosti, je nevyhnutné vyhnúť sa zovšeobecňovaniu, keďže každý probiotický kmeň vplyva na imunitný systém špecifickým spôsobom. Preto je naozaj dôležité starostlivo posúdiť imunoregulačné vlastnosti každej probiotickej baktérie, a jej výber ako adjuvant/terapeutikum bude závisieť nielen od určenia správnej diagnózy, ale aj štádia ochorenia. Vhodne vyselektované probiotiká môžu predstavovať efektívne modulátory črevnej imunity aj v rámci novej fekálnej mikrobiálnej terapie. Keďže diferenciácia monocytov v *in vitro* podmienkach na M1/M2 makrofágový subtyp neumožňuje simulovať presný priebeh polarizácie, ktorý zahŕňa rad prechodných fenotypov ako sú M2a, M2b alebo M2c makrofágy. Tie môžu mať značný vplyv na produkciu cytokínov, a tým ovplyvniť priebeh imunitných reakcií v organizme. A preto, aj keď naše výsledky preukázali, že testované kmene môžu byť sľubnými kandidátmi na ciele moduláciu autochtónnej mikroflóry pacientov s IBD, je žiaduce pokračovať aj s *in vivo* experimentmi.

Práca bola podporená grantmi APVV-16-0176, VVGS-PF2019-1064, VVGS-2019-1073.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Begue B, et al. Implication of TNF-related apoptosis-inducing ligand in inflammatory intestinal epithelial lesions. *Gastroenterology*. 2006; 130:1962–74.
- Dong H, et al. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br. J. Nutr.* 2012; 108:459-70.
- Gancarčíková S, et al. The Influence of Feed-Supplementation with Probiotic Strain *Lactobacillus reuteri* CCM 8617 and Alginate on Intestinal Microenvironment of SPF Mice Infected with *Salmonella Typhimurium* CCM 7205. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018.
- Habil N, et al. Probiotic bacterial strains differentially modulate macrophage cytokine production in a strain-dependent and cell subset-specific manner. *Beneficial Microbes*. 2011; 2: 283-93.
- Hardy H, et al. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013; 5: 1869-912.
- Chassaing B, et al. Mammalian Gut Immunity. *Biomed Journal*. 2014; 37: 246–258.
- Li H, et al. TL1A blocking ameliorates intestinal fibrosis in the T cell transfer model of chronic colitis in mice. *Pathology, Research and Practice*. 2018; 214:217–227.
- Monteleone G, et al. New mediators of immunity and inflammation in inflammatory bowel disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2006; 22:361–364.
- Shaw TN, et al. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. *Journal of Experimental Medicine*. 2018; 215: 1507–18. doi: 10.1084/jem.20180019.
- Schulz D, et al. In-Depth Characterization of Monocyte-Derived Macrophages using a Mass Cytometry-Based Phagocytosis Assay. *Scientific Reports*. 2019; 9: 1925.
- Štofilová J, et al. Co-administration of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM7766 with prebiotic inulin alleviates the intestinal inflammation in rats exposed to N,N-dimethylhydrazine. *International Immunopharmacology*. 2015; 36:1–36.
- Vignali DA, Kuchroo VK. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nature Immunology*. 2012; 13: 722–728.

# CHARAKTERISTIKA A VLASTNOSTI FEKÁLNYCH STAFYLOKOKOV Z KRÁLIKA PLEMENA PANNON WHITE

Bino E.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Panónske biele (Pannon White) plemeno je typické mäsové plemeno králikov v Maďarsku s priemernou hmotnosťou 4,5-5kg. Výskyt infekcií v chovoch hospodárskych zvierat spôsobených meticilín rezistentnými stafylokokmi je vzrastajúcim problémom a môže mať nepriaznivý vplyv na kvalitu chovu. Preto boli fekálne stafylokoky z králikov Pannon White testované na rôzne parametre (čo doposiaľ nebolo zaznamenané), vrátane ich citlivosti na antimikrobiálne látky-enterocíny. Testovaných bolo 22 zmesných vzoriek trusu získaných zo 122 králikov plemena Pannon White, ktoré boli rôzneho veku a pohlavia. Desať kmeňov (z 19) bolo taxonomicky zaradených ku druhu *Staphylococcus xylosus* pomocou identifikačného systému MALDI-Tof. Jeden kmeň bol *S. capitis* a zvyšné kmene boli nešpecifikované. Testovaním antibiotickej citlivosti bolo zistených desať kmeňov ako multirezistentných vrátane rezistencie na meticilín. Avšak, stafylokoky vykazovali citlivosť voči šiestim enterocínom s aktivitou od 100 do 25 600 AU/ml. Priemerné množstvo kyseliny mliečnej produkovanej stafylokokmi bolo  $1,54 \pm 0,009$  mmo/l. Čo sa týka hemolytickej aktivity, DNÁzy a tvorby biofilmu, testované stafylokoky boli negatívne. Keďže stafylokoky rezistentné na meticilín môžu ohrozovať chov, preukázanie ich citlivosti ku enterocínom vrátane meticilín rezistentných kmeňov prispieva nielen k základnému výskumu, ale indikuje tiež možné využitie enterocínov v chovateľskej praxi.

## ÚVOD

Stafylokoky sú Gram-pozitívne baktérie z čeľade *Staphylococcaceae*, ktoré tvoria bežnú súčasť mikrobioty kože, slizníc a tráviaceho traktu zvierat (DeVos a kol., 2009). Výskyt infekcií v chovoch hospodárskych zvierat spôsobených meticilín rezistentnými stafylokokmi by mohol mať nepriaznivý vplyv na kvalitu chovu. Dôležité je teda nájsť nielen spôsob, akým by sa dalo takýmto ochoreniam predchádzať, ale aj vhodný spôsob eliminácie pri ich výskyte. Stafylokoky rezistentné na meticilín predstavujú v mikrobiológii významnú skupinu baktérií, keďže môžu výrazne ovplyvniť liečbu infekcií zvierat antibiotikami. Napríklad intenzívny systém produkcie králikov, najmä v období odstavenia a po odstavení, môže u králikov spôsobiť veľa fyziologických a environmentálnych stresov, čo môže mať za následok koncentráciu a šírenie rôznych bakteriálnych činiteľov vrátane stafylokokov, a tým pádom aj zhoršenie zdravotného stavu králikov (Thank a kol., 2017). Antibiotiká vo všeobecnosti naďalej zohrávajú významnú úlohu pri prevencii alebo liečbe infekcií, ale rezistencia na konvenčné antibiotiká môže viesť k zlyhaniu liečby a zvýšeniu rezistentných kmeňov (Asi a kol., 2015). Preto sa klasické antibiotiká musia čiastočne nahradiť inými antimikrobiálnymi látkami prírodného pôvodu. Túto vlastnosť majú antimikrobiálne pôsobiace látky bielkovinovej povahy nazývané bakteriocíny (Nes a kol., 2002).

## MATERIÁL A METODIKA

Odobrali sme vzorky trusu ( $n = 22$ , fekálne zmesi, v každom z 22 balení vzoriek bol trus od 5 do 6 králikov) spolu zo 122 králikov plemena Pannon White (väčšinou materská a tiež otcovská línia). Králiky boli chované v štandardných podmienkach, v klietkach s drôtenými sieťami s voľným prístupom k vode a krmivu (*ad libitum*). Vzorky trusu boli spracované štandardnou metódou mikrobiálneho riedenia podľa ISO. Bakteriálne druhy boli identifikované pomocou identifikačného systému MALDI Biotyper<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, USA). Desať kmeňov bolo identifikovaných ako *Staphylococcus xylosus* a následne boli genotypované pomocou PCR. Profil antibiotickej citlivosti/rezistencie identifikovaných

stafylokokov bol testovaný pomocou difúznej diskovej metódy s využitím štrnásť antibiotík: oxacilín (OX-1 µg) lincomycín (LIN-2 µg), klindamycín (DA-2 µg), fosfomycín (PH-5 µg), novobiocín (Nb-5 µg), metilín (MET-10 µg), tobramycín (TOB-10 µg), ampicilín (AMP-10 µg), azitromycín (AZM-15 µg), erytromycín (E-15 µg), chloramfenikol (CHC- 30 µg), tetracyklín (TC-30 µg), vankomycín (VAN-30 µg) a gentamicín (Gn-120 µg). Produkcia kyseliny mliečnej bola analyzovaná kvantitatívnou spektrofotometrickou metódou. Na stanovenie aktivity DNázy (nukleáza) bol použitý DNázový agar (Oxoid, USA). Hemolýza bola odčítaná na BHA agare (Difco, USA) s 5% obsahom defibrinovanej baranej krvi. Tvorba biofilmu bola testovaná dvoma rozličnými metodikami: kultiváciou na agare s kongo červeňou -24h,48h,72h a „double“ metódou v mikrotitračných platničkách-24h-570nm po odčítaní pomocou readra SynergyTM4 a vyhodnotení podľa Chaieb a kol. (2007). Ako kultivačné médium bol použitý Brain-Heart infusion-BHI bujón (Difco, USA). Citlivosť metilín rezistentných stafylokokov ku enterocínom (antimikrobiálnym proteínom) bola testovaná na BHA agare pomocou „agar spot testu“ proti hlavnému indikátorovému kmeňu *Enterococcus avium* EA5. V teste bolo použitých šesť čiastočne purifikovaných enterocínov-EntA, EntM, Ent55, Ent412, Ent9296, Ent4231.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Devätnásť izolátov bolo podrobených MALDI-TOF identifikácii s taxonomickým zaradením 10 kmeňov ku druhu *S. xylosus*. Jeden kmeň bol zaradený ku druhu *S. capitis* (Scallia) a sedem kmeňov nebolo taxonomicky zaradených. Bolo zaznamenaných desať multirezistentných kmeňov (52,6%); teda rezistentných najmenej na 4 a najviac na 10 antibiotík (ATB) z 13 použitých. Milton a kol. (1992) opísali úzky vzťah medzi rezistenciou na makrolidy a rezistenciou na linkozamidy u baktérií druhu *S. xylosus*. Jedenásť stafylokokov z 19 (57,9%) bolo rezistentných na metilín a 11 kmeňov bolo rezistentných aj na oxacilín. Kolonizácia stafylokokmi rezistentnými na metilín akéhokoľvek živočíšneho druhu môže predstavovať riziko prenosu plazmidov antimikrobiálnej rezistencie medzi stafylokokmi a inými baktériami (Yasuda a kol. 2000). Metilínová rezistencia u stafylokokov je sprostredkovaná génom *mecA*; je to gén, ktorý kóduje nový proteín viažuci penicilín (PBP2a). Tento proteín viažuci penicilín sprostredkuje rezistenciu na metilín (oxacilín) u stafylokokov prostredníctvom zníženej afinity k β-laktámovým antimikrobiálnym látkam (Chambers 1997). Priemerné množstvo kyseliny mliečnej produkovanej stafylokokmi bolo  $1,54 \pm 0,009$  mmol/l. Stafylokoky boli nehemolytické resp. vykazovali γ-hemolýzu. DNáza aktivita bola negatívna. Na kongo agare tieto stafylokoky netvorili biofilm a taktiež ho netvorili pri kvantitatívnom testovaní v mikrotitračných platničkách. Namerané hodnoty pri mikrotitračnej platničkovej metóde sa pohybovali od 0,001 do 0,069, čo podľa klasifikácie znamená negatívne ( $A_{570} < 0,1$ ;;) (Chaieb a kol, 2007). Vo všeobecnosti boli testované stafylokoky väčšinou rezistentné na ATB, ale netvorili biofilm, hemolýzu a DNázu, čo sú determinanty faktorov virulencie. Väčšina metilín rezistentných kmeňov stafylokokov bolo na ATB multirezistentných, a preto boli použité ako indikátorové kmene voči šiestim enterocínom (charakterizovaným v našom laboratóriu). Prekvapivo bol multirezistentný SX19a rezistentný aj na použité enterocíny (Tabuľka 1). Podobne aj kmeň S20a rezistentný na šesť ATB bol rezistentný aj na testované enterocíny. V budúcnosti by sme chceli otestovať tieto kmene stafylokokov aj na prítomnosť génov ATB rezistencie pomocou PCR a rovnako testovať ich citlivosť s použitím ďalších enterocínov.

**Tab. 1. – Citlivosť fekálnych stafylokokov izolovaných z trusu králikov Pannon White voči vybraným enterocínom**

<b>Kmene</b>	<b>EntA</b>	<b>EntM</b>	<b>Ent55</b>	<b>Ent9296</b>	<b>Ent412</b>	<b>Ent4231</b>
<b>SX6b</b>	6400	3200	6400	25600	12800	100
<b>S9a</b>	6400	800	800	25600	6400	200
<b>Sca11A</b>	1600	400	400	1600	800	400
<b>S12B</b>	25600	3200	6400	25600	6400	6400
<b>SX13a</b>	800	0	100	1600	100	0
<b>SX19a</b>	0	0	0	0	0	0
<b>S20a</b>	25600	3200	6400	25600	25600	3200
<b>S20b</b>	0	0	0	0	0	0
<b>SX21b</b>	0	0	0	0	0	0
<b>SX22a</b>	0	0	0	0	0	0
<b>SX22b</b>	12800	3200	200	25600	100	200

*Práca bola podporená projektom VEGA 2/0006/17. Ďakujeme kolegom z Univerzity v Káposváre (András Bónai, Zolt Matics a Melinda Kovács) za poskytnutie vzoriek trusu z králikov Pannon White.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Asi MN, et al. Therapeutic efficacy of linezolid and rifampicin against experimentally induced MRSA mediastinitis in rabbits. *Pak. Vet. J.* 2015; 35:159-162.
- De Vos P, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Dordrecht Heidelberg, London, New York. 2009; 1450.
- Chaieb K, et al. *In vitro* effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical ica-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. *Ann. Microbiol.* 2007; 57:431-437.
- Nes IF, et al. Unmodified peptid-bacteriocins (Class II) produced by lactic acid bacteria. *Dutton CJ, Haxell MA, Mac Arthur HAI, Wax RG (eds). Peptide antibiotics. Marcel Dekker, New York.* 2002; 81-115.
- Thank IP, Jamikorn U. Effect of probiotic supplement (*Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilis*) on feed efficiency, growth performance, and microbial population of weaning rabbits. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 2017; 30, 198-205.

# IDENTIFIKÁCIA *CLADOSPORIUM* SPP. METÓDOU PCR-RFLP

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

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

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo posúdenie vhodnosti použitia metódy PCR-RFLP na identifikáciu zástupcov *Cladosporium* spp. izolovaných z povrchu vaječnej škrupiny a z vaječného obsahu. Kultivačným mikrobiologickým vyšetrením 120 kusov slepačích vajec sa získalo spolu 369 izolátov mikromycét. Na základe makroskopických a mikroskopických znakov bolo 56 izolátov zaradených do rodu *Cladosporium*. PCR metódou boli získané amplikóny ITS regiónov testovaných izolátov, ktoré boli následne podrobené štiepeniu endonukleázami *Bsp1286I* a *HaeIII*. Na základe získaných reštrikčných fragmentov a vzájomného porovnania ich veľkostí boli izoláty identifikované ako *Cladosporium herbarum* (21 izolátov), *Cladosporium sphaerospermum* (19 izolátov), *Cladosporium cladosporioides* (10 izolátov) a *Cladosporium macrocarpum* (6 izolátov).

## ÚVOD

Produkcia bezpečných a zdravotne neškodných potravín patrí medzi hlavné priority celého potravinárskeho sektora na všetkých úrovniach výroby od farmy až na stôl. Cieľom je zamedzenie, prípadne odstránenie kontaminácie potravín spôsobenej fyzikálnymi a chemickými faktormi, ale tiež mikroorganizmami a produktmi ich metabolizmu, ktoré patria medzi hlavných pôvodcov alimentárnych ochorení. Z tohto dôvodu sa sledovanie a identifikácia mikroskopických vláknitých húb (hlavne toxinogénnych) v potravinách stávajú rastúcim objektom záujmu. Skorá identifikácia patogéna je rozhodujúca pre implementáciu nápravných opatrení a predpisov týkajúcich sa kontroly. Bežné metódy sa často opierajú o izoláciu a kultiváciu mikroorganizmov, laboratórnu identifikáciu pomocou morfológických znakov a biochemických testov. Tieto metódy, hoci sú základným kameňom diagnostiky mikroskopických vláknitých húb, môžu viesť k problémom v identifikácii. Kultivácia mikroorganizmov je náročná na čas, nekvantitatívna a náchylná na kontamináciu a chyby. Preto sú nové rýchle metódy žiadané. Jednou z týchto metód je aj PCR-RFLP (Polymerázová reťazová reakcia s reštrikčnou analýzou fragmentov). Jej princíp spočíva v prítomnosti polymorfizmov v sekvencii DNA zapríčiňujúcich rozdielny profil fragmentov DNA, ktoré vznikajú štiepením reštrikčnými endonukleázami (Pastoráková a kol., 2016).

## MATERIÁL A METODIKA

Mikromycéty boli izolované z povrchu škrupiny a z obsahu 120 kusov slepačích 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 sa 5 dní pri teplote 25 °C. Porastené kolónie boli následne preočkované na povrch agarového média s kvasničným extraktom a sacharózou (YES), Czapkovho agarového média s kvasničným extraktom (CYA), zemiakového agarového média s dextrózou (PDA) a Sabouraudovho agarového média s dextrózou (SDA) (Hi-Media, India) a inkubované 7 dní pri teplote 25 °C. Fenotypová identifikácia bola vykonávaná podľa kritérií Bensch a kol. (2015). Makroskopickým a mikroskopickým vyšetrením boli potvrdené charakteristické morfológické znaky zástupcov *Cladosporium* spp..

Z izolátov prvotne identifikovaných ako *Cladosporium* spp. sa izolovala DNA pomocou E.Z.N.A.<sup>®</sup> Fungal DNA Mini Kit (Omega Bio-Tek, USA). Takto získaná DNA

bola podrobená meraniu čistoty a koncentrácie na BioSpec nanometer spektrofotometer (SHIMADZU, Rakúsko).

ITS regióny rDNA izolátov boli amplifikované za použitia univerzálnych fungálnych primerov ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' a ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' a FIREpol® Master Mix (Ecoli s.r.o., Slovensko). PCR produkty boli následne naštípené reštrikčnými endonukleázami *BspI286I* a *HaeIII* podľa Diguta a kol. (2011).

PCR produkty a ich reštrikčné fragmenty boli v množstve 5 µl analyzované v 1,5 % agarózovom géli v TBE (Tris-borát-EDTA) tlmivom roztoku. Do agarózového gélu sa kvôli vizualizácii DNA a fragmentov pridávala Gel™ Red (Biotium Inc., USA). Po nanosení produktov do agarózového gélu prebiehala elektroforéza 90 minút pri 120 V a následne boli jednotlivé produkty vizualizované pomocou readeru Mini Bis Pro® (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael).

Na záver boli zhodnotené rozdiely vo veľkosti PCR produktov a ich reštrikčných fragmentov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kultivačným mykologickým vyšetrením slepačích vajec sa získalo spolu 369 izolátov mikromycét, z ktorých 56 bolo na základe makroskopických a mikroskopických znakov zaradených do rodu *Cladosporium*.

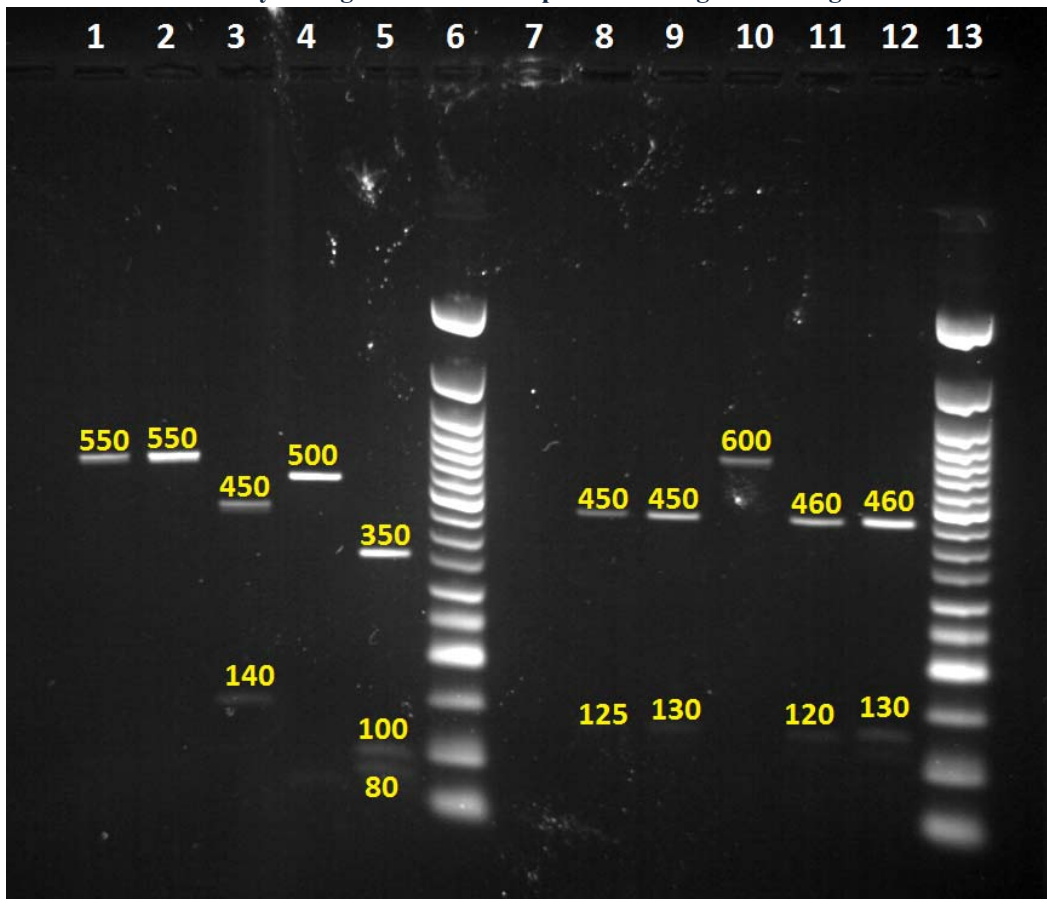
PCR metódou boli získané amplikóny ITS regiónov testovaných izolátov. Veľkosť PCR amplikónov bola u všetkých izolátov rovnaká a zodpovedala 550 bp. Štiepením reštrikčnými endonukleázami *BspI286I* a *HaeIII* vznikli u testovaných izolátov fragmenty rôznej veľkosti. Na základe týchto odlišností bolo identifikovaných ako *Cladosporium herbarum* 21 izolátov, *Cladosporium sphaerospermum* 19 izolátov, *Cladosporium cladosporioides* 10 izolátov a *Cladosporium macrocarpum* 6 izolátov (Tab. 1).

**Tab. 1 Druhá identifikácia a zastúpenie izolátov *Cladosporium* spp. na základe veľkosti PCR amplikónov a reštrikčných fragmentov ich ITS regiónov**

Druh	Počet izolátov	PCR amplikóny (bp)	Reštrikčné fragmenty (bp)	
			<i>BspI286I</i>	<i>HaeIII</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	10	550	125 + 450	550
<i>Cladosporium herbarum</i>	21	550	130 + 450	550
<i>Cladosporium macrocarpum</i>	6	550	120 + 460	500
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	19	550	130 + 460	80 + 100 + 350

Vychádzajúc z výsledkov tejto štúdie môžeme konštatovať, že metóda PCR-RFLP je vhodná na rýchlu identifikáciu mikroskopických vláknitých húb *Cladosporium* spp. Rozdiely vo veľkosti reštrikčných fragmentov boli postačujúce na jednoznačnú identifikáciu testovaných izolátov.

Obr. 1 Vizualizácia reštrikčných fragmentov PCR amplikónov na agarózovom géli



Práca bola podporená grantom VEGA 1/0705/16 a IGA UVLF 01/2017 „Identifikácia toxínogénnych druhov mikromycét izolovaných z vajec“

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bensch K. et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*. *Studies in Mycology*. 2015; 82:23-74.
- Diguta CF et al. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiology*. 2011; 28:1145-1154.
- Pastoráková A, Petrovič R. Molekulárne metódy aktuálne používané v klinickej genetike. Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, 2016. 50 s.
- 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. Bratislava: SÚTN. 2008.
- 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. Bratislava: SÚTN. 2008.



# MORSKÉ BAKTÉRIE RODU *BACILLUS* – PRIRODZENÍ PRODUCENTI LIPOPEPTIDOVÝCH BIOSURFAKTANTOV

Englerová K.<sup>1</sup>, Nemcová R.<sup>1</sup>, Maďar M.<sup>1</sup>, Mucha R.<sup>2</sup>, Styková E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ústav mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Neurobiologický ústav BMC, SAV, Košice

<sup>3</sup>Klinika koní, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Lipopeptidové biosurfaktanty (LP) sú skupinou mikrobiálnych prírodných produktov so schopnosťou znižovať povrchové a medzifázové napätie kvapalín, tuhých látok a plynov. Zástupcovia rodu *Bacillus*, bežne sa vyskytujúci v morskom prostredí, produkujú často tento druh bioaktívnych látok. Zo vzoriek morskej vody, piesku a rias z Jadranského mora boli získané izoláty, z ktorých boli vybraté štyri Grampozitívne, spóru tvoriace kmene. Z výsledkov sekvenácie 16S rRNA bolo zistené, že tri izoláty (3/22, 4/9, 1/6K) boli charakterizované ako *Bacillus amyloliquefaciens* a jeden izolát (2/30) ako *Bacillus subtilis*. Vybrané kmene boli testované na prítomnosť génov kódujúcich biosyntézu surfaktínu, fengycínu a iturínu A. Gény *urfAA* a *urf* kódujúce surfaktín boli zistené u všetkých kmeňov. Gén *fenB* kódujúci fengycín bol prítomný len u kmeňa *B. subtilis* 2/30. U kmeňov *B. amyloliquefaciens* 4/9, *B. amyloliquefaciens* 1/6K a *B. amyloliquefaciens* 3/22 boli nájdené aj gény *fenD* a *ituD*, kódujúci iturín A. Zistené výsledky slúžia ako základ pre výber kmeňov vhodných na produkciu a izoláciu LP.

## ÚVOD

Morská voda z oceánov je významným zdrojom veľkého počtu bioaktívnych zlúčenín, medzi ktoré patria aj BS. Rôzne morské organizmy, rastliny, či sediment preukázali významné prospešné vlastnosti, ako je inhibícia rastu a tvorby biofilmu širokého spektra bakteriálnych patogénov (Narendrakumar a kol., 2018). Zástupcovia rodu *Bacillus* produkujú širokú škálu antimikrobiálnych a fungicídnych látok. Zistil sa u nich potenciál produkovať sekundárne metabolity, hlavne cyklické lipopeptidy, ako je surfaktín, iturín a fengycín. Tie majú veľký potenciál využitia v poľnohospodárskom, farmaceutickom a biotechnologickom priemysle vďaka ich dynamickým povrchovým vlastnostiam (Sarwar a kol., 2018).

Táto štúdia je zameraná na izoláciu a charakterizáciu morských druhov *Bacillus* spp. ako potenciálnych producentov LP.

## MATERIÁL A METODIKA

### Izolácia a identifikácia morských kmeňov *Bacillus* spp.

Na izoláciu potenciálnych LP producentov boli využité vzorky morskej vody, piesku a rias z Jadranského mora. 0,5 g vzorky bolo zhomogenizované (Stomacher Lab Blender 80, Seward Medical Limited, Londýn, UK) v 4,5 ml sterilného fyziologického roztoku a následne boli pripravené jednotlivé riedenia desiatkovým riedením. 0,1 ml z každého riedenia bolo vysiata na Brain Heart Infusion (BHI) agar (HiMedia) a platne boli inkubované 48 h pri 27 °C v aeróbnych podmienkach. Morfologicky odlišné kolónie boli následne kultivované tak, aby boli získané čisté kultúry. Využitím farbenia podľa Grama a Wirtz-Conklin metódy boli z čistých izolátov zhotovené preparáty na mikroskopické vyšetrenie tvaru, farby, veľkosti, usporiadania baktérií a prítomnosti spór. Izoláty boli potom identifikované využitím metódy 16S rRNA. Získané sekvencie boli upravené v softvéri Sequin (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>) a zaslané do databázy GenBank.

### Detekcia LP génov

Genomická DNA z morských baktérií bola izolovaná podľa protokolu High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE). PCR amplifikácie boli uskutočnené v 20 µl reakčnej zmesi obsahujúcej: 7 µl beznukleázovej H<sub>2</sub>O, 10 µl Thermo Scientific DreamTaq Green PCR

Master Mix (2X), 1 µl z každého 10 µM primeru a 1 µl bakteriálnej DNA (10 ng/µl) izolovanej pomocou kitu. PCR amplifikácie boli prevedené pomocou termocykléru GenePro (BIOER). Každý protokol sa skladal z úvodnej aktivácie 3 min. pri 95 °C a amplifikácie zahŕňajúcej 35 cyklov denaturácie 1 min. pri 94 °C, annealing 30 s. pri rôznych teplotách závislých od použitých primerov a kroku extenzie pri 70 °C rôzne dlhú dobu (podľa veľkosti použitých primerov). Na záver bola amplifikácia ukončená extenziou 10 min. pri 70 °C. Referenčný kmeň *B. subtilis* subsp. *subtilis* DSM 3257 s dokázanou tvorbou surfaktínu bol použitý ako pozitívna kontrola. Experiment zahŕňal aj negatívnu kontrolu bez pridania DNA. Výsledný produkt amplifikačnej reakcie bol analyzovaný elektroforézou použitím 1,5% agarózového gélu s 2 µl GoodView™ (Ecoli) a vyhodnotený vizualizáciou pomocou UV žiarenia. Primery génov použitých v PCR amplifikácii boli získané z literatúry a sú zhrnuté v tabuľke 1. Produkty získané z PCR reakcií boli prečistené a osekvenované firmou Microsynth (Microsynth AG Postfach 58 6961 Wolfurt-Bahnhof, Rakúsko). Získané sekvencie boli upravené v softvéri Sequin (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>) a zaslané do databázy GenBank.

**Tab. 1 Primery použité na skríning génov zapojených do syntézy LP (Hsieh a kol., 2004; Mora a kol., 2011; Plaza a kol., 2015)**

	Gén	Sekvencia	Veľkosť PCR produktu [bp]	Annealing teplota [°C]
Surfaktín	<i>sfp</i>	F-5' ATGAAGATTTACGGAATTTA 3' R-5' TTATAAAAAGCTCTTCGTACG 3'	675	50
	<i>srfAA</i>	F-5' TCGGGACAGGAAGACATCAT 3' R-5' CCACTCAAACGGATAATCCTGA 3'	201	60
Fengycín	<i>fenB</i>	F-5' CCTGGAGAAAGAATATACCGTACCY 3' R-5' GCTGGTTCAGTT KGATCACAT 3'	670	57
	<i>fenD</i>	F-5' GGCCCGTTCTCTAAATCCAT 3' F-5' GTCATGCTGACGAGAGCAAA 3'	269	60
Iturín A	<i>ituD</i>	F-5' TTGAAYGTCAGYGCSCCTTT 3' R-5' TGCGMAAATAATGGSGTCTG 3'	482	57

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Morfologická charakterizácia a genetická identifikácia izolátov morských kmeňov *Bacillus* spp.

Zástupcovia rodu *Bacillus* sú významnými producentmi antimikrobiálnych povrchovo aktívnych látok, ako sú LP, ktoré môžu byť úspešne využívané v boji proti patogénnym mikroorganizmom (Banat a kol., 2014). Z vyšetrovaných vzoriek boli vybraté štyri izoláty, 3/22, 2/30, 1/6K a 4/9, ktoré mali morfológiu bunky typickú pre Grampozitívne baktérie tvoriace spóry. Bakteriálna kolónia izolátu 2/30 mala charakteristickú suchú textúru, pričom textúra kolónií izolátov 3/22, 1/6K, 4/9 bola viskózna.

Výsledky sekvencie 16S rRNA preukázali, že vybrané morské izoláty patria do rodu *Bacillus*. Každá sekvencia génov izolátov bola uložená do databázy GenBank a následne schválená a publikovaná s príslušnými prístupovými číslami (tabuľka 2).

### Prítomnosť génov kódujúcich biosyntézu LP

Gény zodpovedné za produkciu surfaktínu, fengycínu a iturínu, najvýznamnejších zástupiteľov LP, boli nájdené v mnohých zástupcoch rodu *Bacillus*. PCR analýza odhalila, že kmeň *B. subtilis* Bbv 57 bol pozitívny na prítomnosť iturínu (*ituD* gén) a surfaktínu (*srfA* gén; *sfp* gén) (Ramyabharathi a kol., 2018). V minulosti bola taktiež opísaná aj súčasná produkcia iturínu a surfaktínu v kmeňoch *Bacillus* spp. Kmene *Bacillus cereus* UASBR3, *B. cereus* UASBR6, *B. subtilis* UASBR5, *Bacillus pumilus* UASBR8, a *B. amyloliquefaciens* UASBR9 sú známe tým, že majú *srfAA* a *ituC* gény (Amruta a kol., 2018). Uvažuje sa, že koprodukcía niekoľkých LP jedným kmeňom môže zvýšiť ich synergický účinok (Habe a kol., 2017).

Na detekciu génov kódujúcich biosyntézu LP surfaktín (*sfp*, *srfAA*), iturín A (*ituD*) a fengycín (*fenB*, *fenD*) bola využitá PCR metóda. Vybrané primery pre zistenie prítomnosti *sfp* génu amplifikujú produkt s veľkosťou 675 bp. Tieto produkty boli detegované u všetkých vybraných izolátov, *B. amyloliquefaciens* 4/9, *B. amyloliquefaciens* 1/6K, *B. amyloliquefaciens* 3/22 a *B. subtilis* 2/30. Intenzita *sfp* fragmentu bola najsilnejšia pri izoláte 2/30. Izoláty boli taktiež testované na prítomnosť fragmentu *srfAA* fragmentu. Rovnako bol u týchto štyroch kmeňov detegovaný aj produkt *srfAA* amplifikácie s veľkosťou 201 bp s rovnakou intenzitou. Gén *fenB* s veľkosťou produktu 670 bp bol zistený len u izolátu 2/30. Produkty *fenD* (269 bp) a *ituD* (482 bp) boli nájdené v troch zo štyroch izolátov: 4/9, 1/6 K a 3/22. Intenzita produktov amplifikácie *fenD* a *ituD* detegované v izoláte 4/9 boli slabšie v porovnaní s izolátmi 1/6K a 3/22. Každá nájdená sekvencia génov týchto izolátov bola uložená do databázy GenBank a následne schválená a publikovaná s príslušnými prístupovými číslami (tabuľka 2).

**Tab. 2 Prístupové čísla 16S rRNA a LP génov morských *Bacillus* spp. v GenBank**

Izolát	Prístupové číslo génu 16S rRNA	Gén	Prístupové číslo
<i>B. amyloliquefaciens</i> 3/22	MN435585	<i>srfAA</i>	MK328493
		<i>sfp</i>	MK328487
		<i>fenD</i>	MK328481
		<i>ituD</i>	MK328484
<i>B. amyloliquefaciens</i> 1/6K	MN435587	<i>srfAA</i>	MK328492
		<i>sfp</i>	MK328488
		<i>fenD</i>	MK328482
		<i>ituD</i>	MK328485
<i>B. subtilis</i> 2/30	MN435586	<i>srfAA</i>	MK328491
		<i>sfp</i>	MK328489
		<i>fenB</i>	MK328479
<i>B. amyloliquefaciens</i> 4/9	MN435584	<i>srfAA</i>	MK328490
		<i>sfp</i>	MK328486
		<i>fenD</i>	MK328480
		<i>ituD</i>	MK328483

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja č. APVV-15-0377 a č. APVV-16-0203 a Vedeckou grantovou agentúrou – projekt VEGA 1/0081/17.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Amruta N, et al. Exploring the potentiality of novel rhizospheric bacterial strains against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Pathol. J.* 2018;34:126–38.
- Banat IM, et al. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front. Microbiol.* 2014;5:1–18.
- Habe H, Taira T, Imura T. Screening of a *Bacillus subtilis* Strain Producing Multiple Types of Cyclic Lipopeptides and Evaluation of Their Surface-tension-lowering Activities. *J. Oleo Sci.* 2017;66:785–90.
- Hsieh FC, et al. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 2004;49:186–91.
- Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. *Int. Microbiol.* 2011;14:213–23.
- Narendrakumar L, et al. Quorum quenching and biofilm inhibition: Alternative imminent strategies to control the disease cholera. *Biotechnol. Appl. Quor. Sens. Inhib.* 2018;63–85.
- Plaza G, et al. Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: Genes and products identification. *J. Appl. Microbiol.* 2015;119:1023–34.
- Ramyabharathi S, et al. Biocontrol of wilt-nematode complex infecting gerbera by *Bacillus subtilis* under protected cultivation. *Egypt. J. Biol. Pest Control* 2018;28.
- Sarwar A, et al. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS One* 2018;13:1–15.

# SLEDOVANIE VYBRANÝCH IMUNOLOGICKÝCH PARAMETROV U MYŠÍ PRI ZÍSKAVANÍ ANIMÁLNEHO GNOMODELU ULCERÓZNEJ KOLITÍDY

Faixová, D., Mudroňová, D., Lauko, S., Gancarčíková, S.

*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach*

## ABSTRAKT

Ulcerózna kolitída patrí medzi idiopatické zápalové črevné ochorenia. Transplantácia fekálnej mikrobioty od zdravého jedinca k pacientovi predstavuje pomerne novú metódu terapie tohto chronického zápalového ochorenia tráviaceho traktu. Cieľom nášho výskumu bolo sledovať vybrané imunologické parametre u myši pri získavaní animálneho gnotomodelu ulceróznej kolitídy, ktorý sa použije v druhej časti pokusu pri štúdiu vplyvu transplantácie mikrobioty zdravých ľudí a cielenej modulácie mikrobioty ľudí s IBD u gnotozvierat asociovaných s humánnou mikrobiotou. Na základe sledovania subpopulácií lymfocytov: CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD49b+CD8+, CD49b+CD8-, pomeru CD4:CD8 a ostatných vyšetrení sme usúdili, že podávanie 5 % - tného DSS (dextranu sulfátu sodného) po dobu piatich kontinuálnych dní je vhodné na navodenie ulceróznej kolitídy pri získavaní animálneho gnotomodelu.

## ÚVOD

Idiopatické zápalové črevné choroby (IBD, inflammatory bowel disease) označujú skupinu chronických zápalových ochorení tráviaceho traktu, medzi ktoré sa zaraďujú najmä Crohnova choroba a ulcerózna kolitída. Každoročný výskyt ulceróznej kolitídy v Spojených štátoch sa uvádza v rozmedzí 9-12 prípadov na 100 000 ľudí. IBD sa častejšie vyskytujú vo vyspelých štátoch západných krajín a ich incidencia rastie so zvyšujúcou sa životnou úrovňou (Talley a kol., 2011). Pre IBD je typické striedanie remisii a relapsov. Cieľom terapie ulceróznej kolitídy je vyvolanie remisie a prevencia relapsov. Príčina vzniku ulceróznej kolitídy nie je doteraz presne objasnená, avšak predpokladá sa interakcia medzi črevnou mikrobiotou a imunitným systémom u jedincov, ktorí majú genetickú predispozíciu k spontánnemu remitujúcejmu zápalovému procesu poškodzujúcemu črevnú stenu. Cielená manipulácia črevnej mikrobioty môže viesť k vývoju nového terapeutického prístupu liečby IBD. Transplantácia fekálnej mikrobioty (FMT, fecal microbiota transplantation) od zdravého jedinca k pacientovi predstavuje pomerne novú metódu modulácie mikrobioty a overovanie jej účinnosti je v súčasnosti predmetom viacerých vedeckých štúdií. V práci uvádzame výsledky z prvej fázy pokusu, ktorej cieľom je získanie animálneho gnotomodelu ulceróznej kolitídy, ktorý sa v druhej fáze pokusu použije na štúdium vplyvu transplantácie mikrobioty zdravých ľudí a cielenej modulácie mikrobioty ľudí s IBD u gnotozvierat asociovaných s humánnou mikrobiotou.

## MATERIÁL A METODIKA

Cieľom práce bolo sledovať vybrané imunologické parametre v slezinách myši pri získavaní animálneho gnotomodelu ulceróznej kolitídy po chemickej indukcii prostredníctvom DSS (dextranu sulfátu sodného). Germ-free myši samičieho pohlavia vo veku 4 týždne línie BALB/c boli získané z chovu Velaz s.r.o., Praha a letecky prepravené v špeciálnych transportných nádobách do akreditovaného zariadenia Laboratória gnotobiológie, Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie, UVLF v Košiciach. Myši boli kŕmené *ad libitum* komplexnou kŕmnom zmesou. Po uplynutí týždennej karantény boli zvieratá rozdelené do troch pokusných a jednej kontrolnej skupiny. Kontrolnej skupine nebol do pitnej vody pridávaný roztok DSS, skupine AM1 bol po dobu piatich dní podávaný 1 % - tný roztok DSS, skupine AM3 bol po dobu piatich dní podávaný 3 % - tný roztok DSS a skupine AM5 bol do pitnej vody päť kontinuálnych dní pridávaný 5 % - tný roztok DSS. Sledovaná bola patogenéza ulceróznej

kolitídy pri rôznych koncentráciách jej chemickej indukcie. Myšiam boli po piatich dňoch aplikácie DSS odobraté sleziny. Po izolácii slezín boli vzorky uložené v endorfkách v Hanksovom roztoku (HBSS) a následne boli izolované splenocyty. Dvakrát sme vzorky centrifugovali, zliali supernatant a premyli v HBSS. Bunky boli počítané v Túrkovom roztoku 1:20 v Bürkerových komôrkach. Jednotlivé diferenciačné znaky lymfocytov boli farbené priamou metódou pomocou fluorescenčne značených monoklonových antitymocytových protilátok v nasledovnej kombinácii: CD4-FITC + CD8-PE + CD49b-APC. Vzorky sa následne inkubovali pri laboratórnej teplote 15 minút. Kontaminujúce erytrocyty boli lyzované použitím komerčného lyzačného roztoku BD FACS™ lysing solution po dobu desiatich minút a následne po premytí boli merané na prietokovom cytometri BD FACS™ Canto. Štatistická analýza bola urobená v štatistickom programe GraphPad Prism pomocou jednocestnej analýzy rozptylu s doplnkovým Turkeyho testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

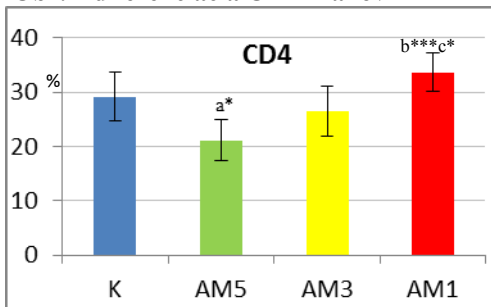
Získavanie animálneho gnotomodelu ulceróznej kolitídy po chemickej indukcii prostredníctvom DSS by malo spĺňať niekoľko podmienok. Navodenie ulceróznej kolitídy podaním chemickej látky nesmie byť sprevádzané úmrtím pokusného zvierat'a a takisto koncentrácia chemickej látky a doba jej podávania musí byť dostatočná na navodenie akútneho zápalu tráviaceho traktu. Sledovali sme vybrané subpopulácie lymfocytov vo vzorkách sleziny. Trom pokusným skupinám bola podávaná rozdielna koncentrácia DSS (1, 3 a 5 %) a sledovaná bola aj kontrolná skupina myší (bez aplikácie DSS). Molekula CD4 je transmembránový glykoproteín a účastní sa na interakcii s HLA-molekulami II. triedy. T<sub>H</sub>-lymfocyty charakterizuje predovšetkým antigén CD4. Skupina AM5, ktorej bol podávaný 5 % - tný DSS vykazovala signifikantné zníženie zastúpenia CD4+ lymfocytov oproti kontrole a naopak u skupiny AM1 (1% DSS) sme zaznamenali signifikantne vyššie zastúpenie tejto subpopulácie lymfocytov oproti skupinám AM5 a AM3 (Obr. 1). Diferenciačný antigén CD8 sa účastní na interakcii s HLA-molekulami I. triedy a je to typický znak pre T<sub>c</sub>-lymfocyty. V AM1 skupine došlo k signifikantnému zníženiu percenta zastúpenia CD8+ lymfocytov oproti kontrole (Obr.2). V skupinách AM1 a AM3 sme sledovali signifikantné zníženie zastúpenia dvojito pozitívnych lymfocytov (CD4+CD8+) oproti kontrolným myšiam (Obr. 4). CD49b+CD8+ predstavujú populáciu NKT buniek, ktoré sa radia medzi bunky získanej imunity. NKT bunky sú T lymfocyty s cytotoxickým účinkom a diferencujú sa najmä pri nádorových a vírusových ochoreniach. Signifikantný rozdiel medzi skupinami v zastúpení týchto lymfocytov sme nezaznamenali (Obr. 5). CD49b+CD8- sú NK bunky, ktoré sa radia medzi bunky prirodzenej imunity. V AM1 skupine sme zaznamenali signifikantne zvýšené zastúpenie týchto lymfocytov oproti kontrole a skupine AM5. V skupine AM3 sme sledovali zvýšené zastúpenie CD49b+CD8- lymfocytov oproti skupine AM5. Nakoľko sme v AM5 skupine zaznamenali zníženie zastúpenia všetkých sledovaných subpopulácií lymfocytov, môžeme usúdiť jej imunopresívny charakter (Obr. 3). Pomer CD4:CD8 je ukazovateľom imunostimulácie. Na základe výsledkov usudzujeme, že v skupine AM1 došlo k stimulácii imunitného systému oproti ostatným skupinám (Obr. 6), teda aplikácia 1 % - tného DSS je slabá koncentrácia pre navodenie ulceróznej kolitídy pri získavaní animálneho gnotomodelu a dokonca pôsobí mierne imunostimulačne.

Na základe imunopresívneho vplyvu na imunitný systém, patologicko-anatomických nálezov, morfológických zmien na čreve, mikrobiologických, hematologických a biochemických parametrov pre indukciu ulceróznej kolitídy bol pre druhú časť pokusu vybraný roztok 5 % - tného DSS.

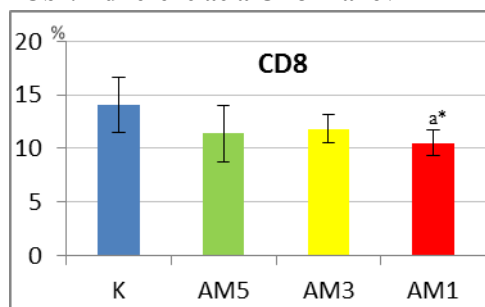
Počas pokusu sme nesledovali žiadne úmrtie pokusného zvierat'a a v druhej časti výskumu, kedy sa bude transplantovať mikrobiota zdravých ľudí a cielene modulovať mikrobiota ľudí

s IBD u gnotozvierat asociovaných s humánnou mikrobiotou sa uvažuje na predĺžení doby podávania DSS z doterajších päť na šesť kontinuálnych dní.

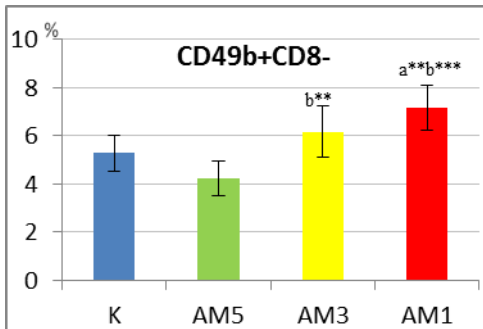
**Obr. 1 diferenciácia CD4 znakov**



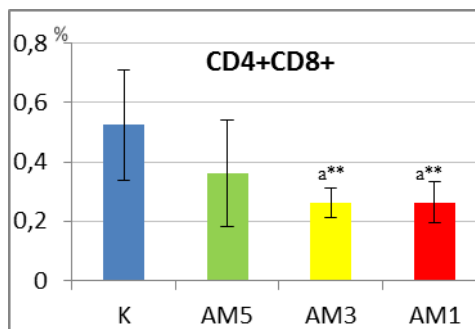
**Obr. 2 diferenciácia CD8 znakov**



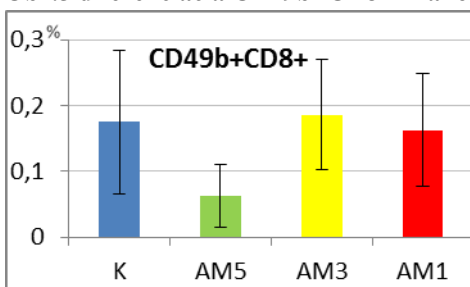
**Obr. 3 diferenciácia CD49b+CD8- znakov**



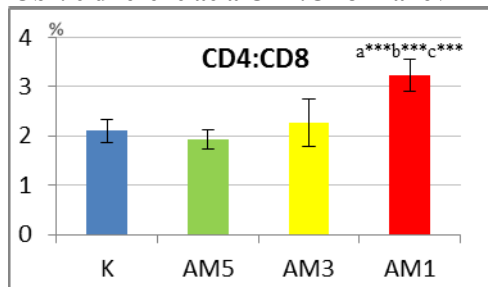
**Obr. 4 diferenciácia CD4+CD8+ znakov**



**Obr. 5 diferenciácia CD49b+CD8+ znakov**



**Obr. 6 diferenciácia CD4:CD8 znakov**



\* p< 0.05

\*\* p< 0.01

\*\*\* p< 0.001

a-sign. rozdiel oproti kontrole

b- sign. rozdiel oproti AM5

c- sign. rozdiel oproti AM3

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Talley NJ, et al. American College of Gastroenterology IBD Task Force. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2011; 106(suppl 1):S2–S25.

# MIERA INHIBÍCIE HYDROXYLOVÉHO RADIKÁLU VYBRANÝMI SULFÓNAMIDMI

Haus M., Vašková J.

Ústav lekárskej a klinickej biochémie UPJŠ LF, Košice

## ABSTRAKT

Chalkóny a ich deriváty prejavujú mnoho biologických aktivít a mnohé z nich sú vďaka týmto vlastnostiam používané ako liečivá. Konjugácia s inými biologicky aktívnymi štruktúrami tieto vlastnosti môže potenciálne zvyšovať. Deriváty sulfónamidov patria medzi najdôležitejšiu triedu liečiv. V práci sme preto sledovali schopnosť piatich vybraných sulfónamidových derivátov chalkónov ovplyvniť koncentráciu hydroxylových radikálov. *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonimid bol jediným derivátom, ktorý vykazoval schopnosť eliminovať hydroxylový radikál pri všetkých testovaných koncentráciách.

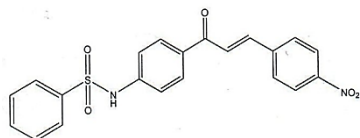
*N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} 2,4-dichlorobenzénsulfonamid naopak jeho tvorbu potencuje.

## ÚVOD

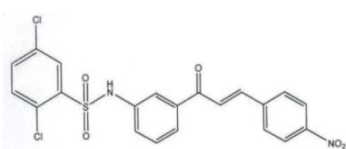
Chalkóny a ich deriváty priťahujú pozornosť vďaka mnohým výživovým a biologickým výhodám. Sú prekurzormi biosyntézy flavonoidov v rastlinách. Syntetizované za laboratórnych podmienok sa používajú na prípravu terapeuticky účinných látok. Naviac v molekule nesú synton, ich štruktúra je modifikovateľná, čo umožňuje navrhnúť rôzne nové heterocykly s dobrým farmaceutickým profilom. Bahekar a kol. (2016) v štúdiu zhrnuli niekoľko pozoruhodných biologických vlastností zlúčenín obsahujúcich benzénsulfonamidové skupiny ako sú inhibícia elastázy, inhibícia karboanhydrázy, inhibícia klostrídium histolytickej kolagenázy, ako aj herbicídne účinky a účinky regulátorov rastu rastlín. U sulfónamidových chalkónov boli zistené silné účinky proti bunkovým líniam rakovinových pečňových buniek človeka (HEPG-2), inhibícia BACE<sub>1</sub> a inhibícia  $\alpha$ -glukozidázy. Nedávno sa dokázalo, že nitro- substituované sulfónamidové chalkóny vykazujú genotoxické, cytotoxické, antigenotoxické aj anticytotoxické účinky (e Silva a kol., 2015). Veľká časť farmakologického potenciálu nových derivátov chalkónov zostáva nezistená a nevyužitá. Preto cieľom tejto práce bolo zistiť mieru ovplyvnenia koncentrácie hydroxylových radikálov vybranými sulfónamidovými derivátmi chalkónov.

## MATERIÁL A METÓDY

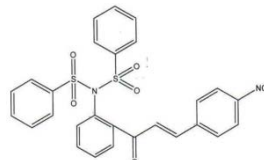
### Obr.1. Syntetické sulfonamidy použité v experimente.



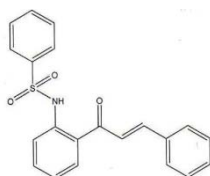
**A87** *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonamid



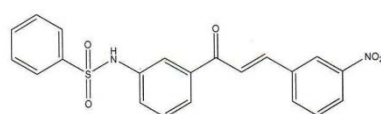
**E1** *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} 2,4-dichlorobenzénsulfonamid



**E3** *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonimid



**E4** *N*-{4-[3-(3-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonamid

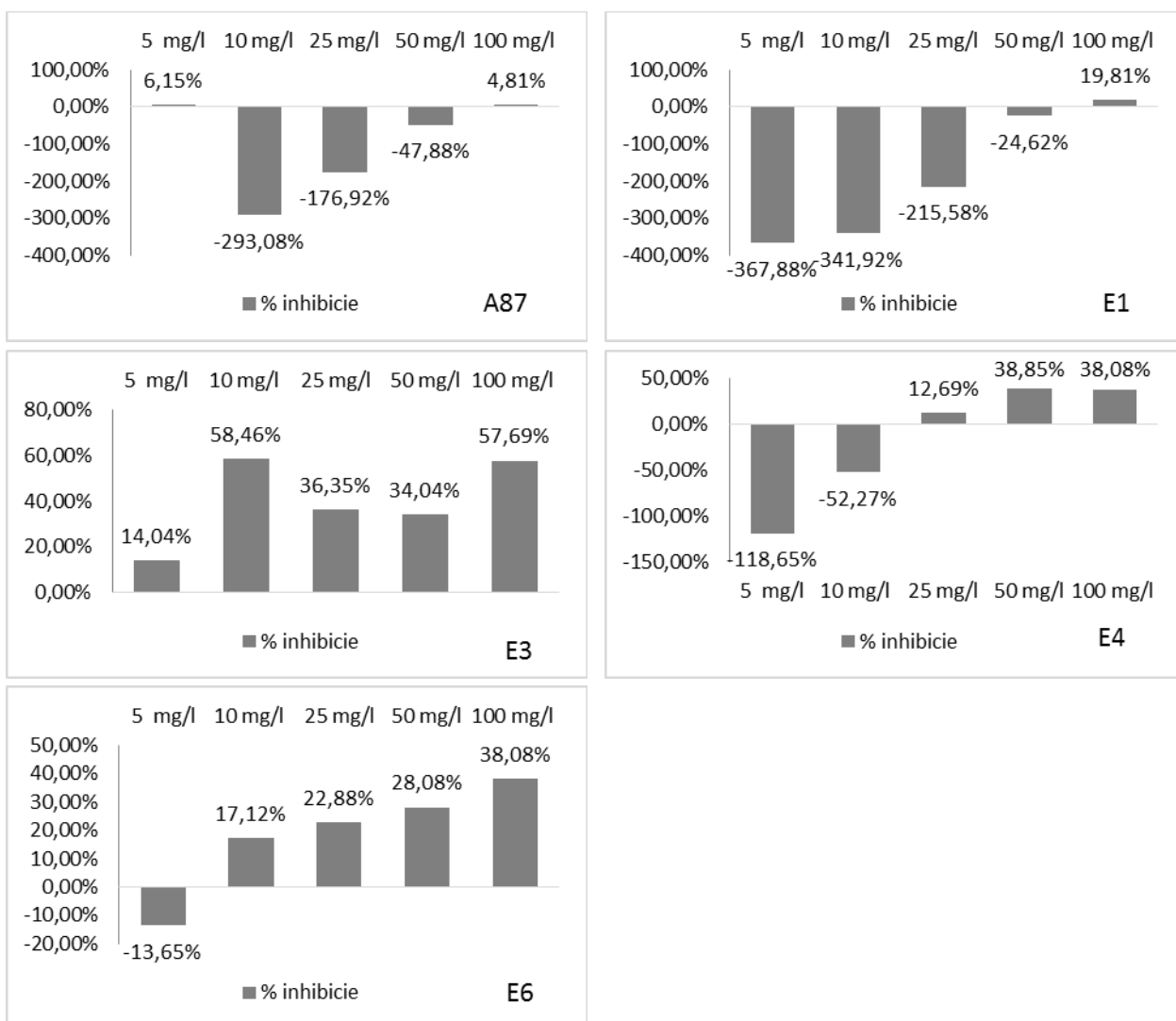


**E6** *N*-{4-[3-(3-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonamid

Testovaných bolo 5 ferocenylových zlúčenín získaných od prof. P. Perjésiho (Univerzita v Pécs, Maďarsko). Deriváty boli syntetizované podľa metódy publikovanej Sohar a kol. (2000, 2003). Štruktúry boli charakterizované infračervenou (IR) spektroskopiou, nukleárnou magnetickou rezonanciou (NMR), ich čistota bola sledovaná pomocou tenkovrstvovej chromatografie. Deriváty boli rozpúšťané v DMSO na 1mM zásobný roztok, ktorý bolo možné uskladňovať po dobu 1 týždňa v tme. Následne bolo možné riediť deriváty vo fosfátovom pufrí, ktorý bol používaný pre dané meranie. Merania boli prevádzané triplicítne pre 5 výsledných koncentrácií derivátov v rozpätí 5 až 100 mg/l. Hydroxylový radikál (HO $\cdot$ ) bol generovaný vo Fentonovej reakcii a schopnosť jeho vychytávania bola meraná deoxyribózovou metódou podľa Halliwella a kol. (1987) pri 532 nm.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Obr. 2. Miera inhibície HO $\cdot$ .**



Voľné radikály sú častice, ktoré vykazujú veľkú biologickú reaktivitu v dôsledku jedného alebo viacerých nespárovaných elektrónov. Nie všetky reaktívne častice sú radikálmi. Dokonca aj tie, ktoré radikálmi nie sú, sú schopné podporovať oxidáciu ďalších substrátov. Samotné oxidované substráty sú pre živé organizmy potenciálne toxické, ich štruktúra je



modifikovaná, čo mení aj ich funkčné vlastnosti (Vašková a kol., 2012). Samotný hydroxylový radikál je vysoko reaktívny a jeho prítomnosť vedie k poškodeniu molekúl lipidov, proteínov a DNA, čo vedie k vzniku onkologických ochorení, ateroskleróze, či autoimunitným ochoreniam. Poškodenie DNA v zárodočných bunkách môže spôsobovať dedičné mutácie, poškodenie DNA v somatických bunkách môže spôsobovať nádorové bujnenie.

Z uvedených grafických znázornení vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou sa zvyšuje schopnosť vychytávať HO<sup>·</sup> v poradí efektívnosti E6 > E4 > E1 > A87. Derivát E3 vykazoval najvyššiu schopnosť eliminácie HO<sup>·</sup> avšak s dvoma maximami a to pri koncentrácii 10 mg/l a 100 mg/l. Prítomnosť derivátu E1 až po koncentráciu 50 mg/l spôsobovala vysokú produkciu HO<sup>·</sup>, pričom výrazne najvyššie spomedzi všetkých derivátov bola pri najnižšej koncentrácii 5 mg/l. Derivát A87 taktiež zapríčiňoval vysokú tvorbu HO<sup>·</sup> v rozpätí 10 – 50 mg/l a derivát E4 iba pri dvoch najnižších použitých koncentráciách.

Skúmané deriváty nie sú jedinými, ktorých účinky na produkciu či zhášanie reaktívnych foriem kyslíka a taktiež na mieru ovplyvnenia vybraných antioxidantných markerov v mitochondriách boli vrámci štúdií na našom ústave realizované (Vašková a Vaško, 2018). Porovnaním vybraných sulfónamidových s aktivitou ferocénových derivátov meraných pri koncentráciách 10 a 100 mg/l (Vašková a kol., 2015) vyplýva, že porovnateľné s vlastnosťami ferocénylových derivátov mali deriváty E3, E6 pri koncentrácii 10 mg/l a E6, E4, E1 pri koncentrácii 100 mg/l.

## ZÁVER

Z výsledkov našich meraní vyplýva, že *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} benzénsulfonimid bol jediným derivátom, ktorý vykazoval schopnosť eliminovať hydroxylový radikál pri všetkých testovaných koncentráciách. Je pravdepodobné, že tento derivát, na rozdiel od *N*-{4-[3-(4-nitrofenyl)-1-oxoprop-2-én-1-yl]fenyl} 2,4-dichlorobenzénsulfonamid nebude prejavovať cytotoxické účinky. Na potvrdenie sú však potrebné ďalšie *in vitro* štúdie.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bahekar SP, et al. Sulfonamide chalcones: Synthesis and *in vitro* exploration for therapeutic potential against *Brugia malayi*. Eur. J. Med. Chem. 2016; 124:262-269.
- E Silva CR, et al. Genotoxic, cytotoxic, antigenotoxic, and anticytotoxic effects of sulfonamide chalcone using the Ames test and the mouse bone marrow micronucleus test. PLoS One 2015; 10:e0137063.
- Halliwell B, et al. The deoxyribose method: A simple „test tube“ assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. Anal. Biochem. 1987; 165:215-219.
- Sohar P, et al. Study on ferrocenes, part 7. E-ferrocenemethylene-1-benzocyclohexanones. Synthesis, stereostructure, NMR, X-ray, and Mössbauer spectroscopic investigation. J. Mol. Struct. 2000; 524:297–304.
- Sohar P, et al. Synthesis and structure of some E-ferrocenemethylenecycloalkanes and their benzylidene analogs. ARKIVOC 2003; 5:114–120.
- Vašková J, Vaško L. Introductory Chapter: Unregulated Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species in Testing the Biological Activity of Compounds, Medicinal Chemistry, Janka Vašková and Ladislav Vaško (Ed.), IntechOpen, 2018; 1-9.
- Vašková J, et al. Oxidative Processes and Antioxidative Metaloenzymes, Antioxidant Enzyme, Mohammed Amr El-Missiry (Ed.), InTech. 2012; 19-40.
- Vašková J, et al. Some ferrocenyl chalcones as useful candidates for cancer treatment. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2015; 51:964–974.

# VPLYV LAKTÁCIE NA MINERÁLNY STATUS VYSOKOPRODUKČNÝCH DOJNÍC.

Holodová M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Centra biovied SAV, Košice*

## ABSTRAKT

V dôsledku narastajúcej mliekovej úžitkovosti dojníc sa zvyšujú nároky na optimálny prísun živín potrebných na syntézu mlieka, preto je primeraný príjem minerálnych látok v krmive počas celého laktačného obdobia nevyhnutný. Cieľom štúdie bolo sledovať vplyv jednotlivých štádií laktácie na koncentráciu makroelementov (Ca, Na, K, Mg, P) a stopových prvkov (Zn, Cu, Fe, Mn) v plazme vysokoprodučných dojníc. Experiment sa uskutočnil na Holštajnsko-frízskych dojniciach s priemernou dennou produkciou 40 kg mlieka. 30 dojníc ustajnených navoľno s voľným prístupom ku krmivu bolo rozdelených do 3 skupín podľa fázy laktácie: 1.sk- skorá fáza (laktácia od 25-100 dní), 2.sk- stredná fáza (laktácie od 101-250 dní) a 3. sk- neskorá fáza (laktácia >250 dní). Kompletnú krmnu zmes pre dojnice tvorilo 71% objemového krmiva (trávová a kukuričná siláž) a 29% jadrového krmiva. Koncentrácie makro a mikroelementov, ani aktivita alkalickéj fosfatázy (ALP) v plazme dojníc neboli ovplyvnené fázou laktácie. Avšak s pribúdajúcim dňom laktácie sa koncentrácia Mg v plazme znižovala, naopak koncentrácie Zn a Fe stúpali. Pokles Mg v priebehu laktácie pripisujeme zníženej schopnosti využitia Mg z krmiva s pribúdajúcim dňom laktácie. Naše výsledky preukázali pozitívnu koreláciu medzi Mg a ostatnými makroelementami (Ca, Na, K) a taktiež medzi plazmatickými hladinami Fe voči Zn, P, ALP. Na základe našich výsledkov môžeme povedať, že zásobovanie makro a mikroelementami vo zvolenej krmnej dávke bolo dostačujúce na udržanie dobrého zdravotného stavu a laktácie počas celého obdobia.

## ÚVOD

Produkcija mlieka a celoživotná úžitkovosť predstavuje dôležitú úlohu pri chove hovädzieho dobytku mliekového typu. Holštajnsko-frízsky mliekový dobytok patrí medzi typický dobytok s vysokou produkciou mlieka. V dôsledku narastajúcej mliekovej úžitkovosti dojníc sa zvyšujú nároky na optimálny prísun živín. Ak sa týmto nárokom nevenuje dostatočná pozornosť, dochádza k vzniku mnohých metabolických porúch, ktoré často vedú k negatívnej energetickej bilancii (Drackley, 1999). V priebehu laktácie, koncentrácia makro prvkov a mikroprvkov v plazme dojníc varíruje, čo súvisí s nielen ich príjmom v krmive, ale predovšetkým so schopnosťou organizmu využiť tieto minerály pre ďalšie metabolické procesy (Baker a kol., 2003). Cieľom nášho experimentu bolo sledovať minerálny status vysokoprodučných dojníc v závislosti od fázy laktácie.

## MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu bolo zaradených 30 vysokoprodučných dojníc mliekového typu plemena Holštajn s produkciou mlieka 40 kg ( $\pm$  9 kg) na deň. Dojnice boli rozdelené do troch skupín v závislosti od dňa laktácie: 1. skupina boli zvieratá od 25 do 100 dňa laktácie (skorá fáza), 2. skupina dojníc bola v laktácii od 101 do 250 dňa laktácie (stredná fáza) a 3. tretia skupina predstavovala dojnice od 250. dňa laktácie (neskorá fáza). Experiment bol prevedený na súkromnej farme v Poľsku, kde boli dojnice ustajnené navoľno a mali voľný prístup k vode a krmivu. Krmivo, ktoré zvieratá na farme prijímali tvorilo 71% objemového krmiva, ktoré pozostávalo z trávovej a kukuričnej siláže a zvyšných 29% krmnej dávky tvorilo jadrové krmivo. Celkový obsah minerálov v sušine krmiva bol nasledovný: Zn 76,56 mg/kg, Fe 374,8 mg/kg, Mn 63,89 mg/kg a Cu 28,96 mg/kg.

Odber krvi u dojníc sa robil z v. *abdominalis superficialis* s objemom 10 ml do heparinizovaných skúmaviek. Následne boli vzorky krvi centrifugované 10 min. pri otáčkach

3000 g.min<sup>-1</sup> pri teplote 4°C a získaná plazma bola uskladnená pri teplote -20 °C. Koncentrácie makroelementov (Ca, Na, K, Mg) a mikroelementov (Zn, Cu, Fe) v plazme boli stanovené atómovou absorpčnou spektrofotometriou, metódou na plameni (FAAS, AAS Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko), P spektrofotometricky (ALIZE) a koncentrácie Mn atómovou absorpčnou spektrofotometriou pomocou elektrotermickej atomizácie (ETAAS), (GFA Shimadzu AA-7000). Aktivita alkalickéj fosfatázy (ALP) bola stanovená spektrofotometricky kitom ALKALINE PHOSPHATASE MEG (Erba Mannheim). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná ANOVA s následným Tukey post testom (GraphPad Prism 5.03, San Diego, CA, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

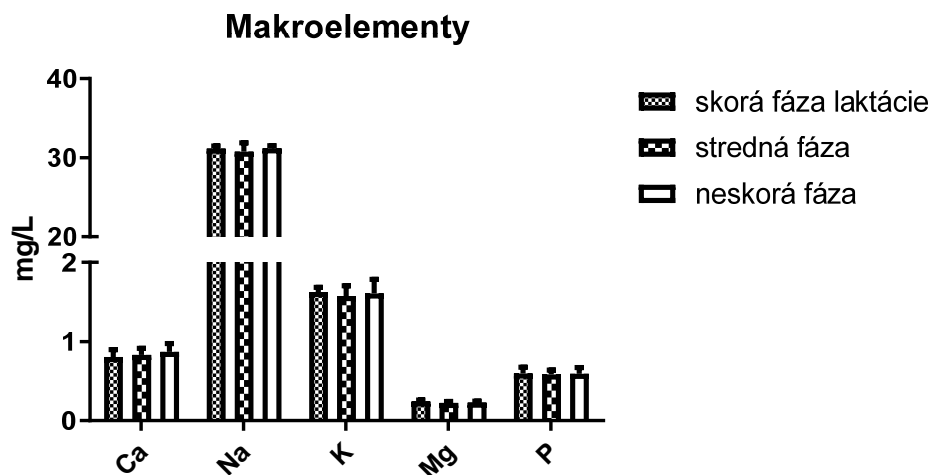
Jednotlivé štádia laktácie nemali vplyv na koncentráciu makroprvkov v plazme dojníc (Obr.1). S narastajúcim dňom laktácie plazmatické koncentrácie Mg klesali, pričom bola zaznamenaná pozitívna korelácia medzi hladinami Mg a ostatnými makroelementami (Ca, Na, K) v plazme dojníc. Pokles horčíka môžeme pripísať fyziologickému stavu, kedy s pribúdajúcim dňom laktácie dojníc klesá aj využiteľnosť Mg z krmiva (Vorman, 2003). V období laktácie sa zvyšujú nároky na optimálny prísun živín, predovšetkým minerálov, pričom ich koncentrácie v plazme varíujú. Minerálny status dojníc závisí nielen od ich obsahu v krmive, ale hlavne od ich biovyužitelnosti. Obdobie po pôrode, predstavuje kritické obdobie pre zachovanie homeostázy jednotlivých makroprvkov (Windisch, 2002). Potreby Ca sú hlavne v začiatkových fázach laktácie zvýšené kvôli syntéze mlieka, kedy dochádza k zvýšenej mobilizácii Ca z kostí a jeho absorpcii z GIT. Naše výsledky nepreukázali vplyv laktácie na plazmatické koncentrácie Ca. Ostatné makroprvky, ako Na a K nevyhnutné pre normálnu činnosť tkanív a udržanie acidobázickej rovnováhy, taktiež neboli v našom experimente vplyvom laktácie ovplyvnené.

Bezprostredne po otelení sa dojnice dostávajú do negatívnej energetickej bilancie vplyvom vysokých nárokov na syntézu mlieka. V tomto období dochádza k zvýšenej lipomobilizácii, čo sa často odzrkadľuje na zmene aminotransferáz v krvi. V našom experimente však nebola aktivita ALP v plazme ovplyvnená fázou laktácie.

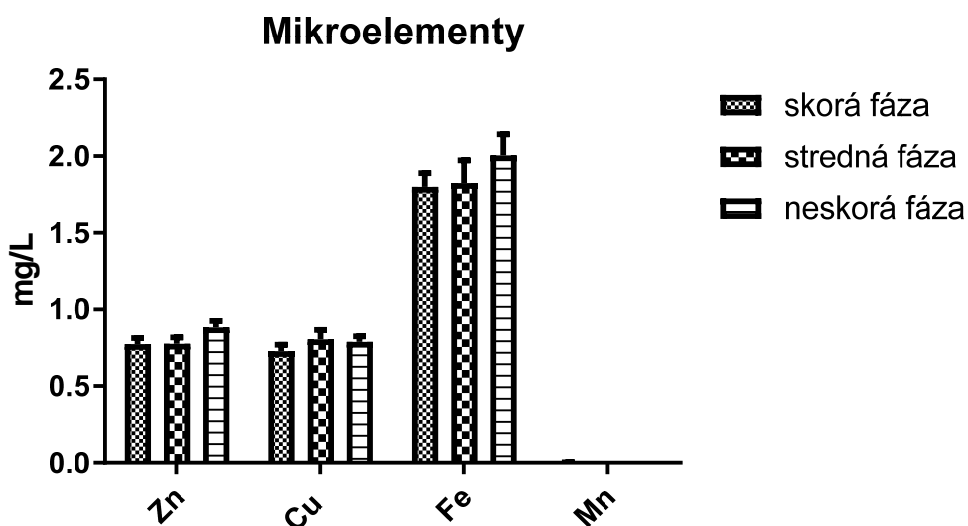
Koncentrácie stopových prvkov v plazme dojníc sa medzi jednotlivými fázami laktácie nelíšili (Obr.2). S pribúdajúcim dňom laktácie sme zaznamenali zvyšujúce sa koncentrácie Zn a Fe. Obdobie pred a po pôrode je najkritickejším z hľadiska poklesu koncentrácií Fe v plazme dojníc, pričom s narastajúcim dňom laktácie dochádza k jeho pozvoľnému zvyšovaniu (Shahzad a kol., 2001). Pokles Zn na začiatku laktácie sa pripisuje jeho zvýšenej potrebe pre syntézu mledziva (House a Bell, 1993). Korelačné analýzy preukázali vplyv dňa laktácie na plazmatické koncentrácie Fe a Zn hlavne u dojníc v poslednej fáze laktácie, a pozitívna korelácia bola zaznamenaná medzi plazmatickými hladinami Fe voči Zn, P, ALP.

Naše výsledky poukázali na rozdielnu potrebu makro a mikroelementov počas laktácie. Na základe našich analýz môžeme povedať, že zásobovanie makro a mikroelementami v kŕmnej dávke bolo dostačujúce na udržanie vysokej laktácie a dobrého zdravotného stavu počas celého obdobia.

Obr.1 Koncentrácia makroprvkov v plazme



Obr.2 Koncentrácia mikroprvkov v plazme



Práca bola podporená grantami VEGA, č. 2/0069/17, COST FA1302, ITMS 26220220204.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baker DS, et al. Trace mineral metabolism in ruminants. Biotechnology in the Feed and Food Industry. Proceedings of Alltech's 19th International Symposium. 2003.
- Drackley JK.. Biology of dairy cows during the transition period. Journal of Dairy Science. 1999; 82: 2259–2273.
- House WA, Bell AW. Mineral accretion in the fetus and adnexa during late gestation in Holstein cows. J. Dairy Sci. 1993; 76:2999-3010.
- Shahzad H. Serum electrolytes in buffaloes during late pregnancy, parturition and postpartum periods. Pakistan Vet. J. 2001; 21: (4) 175-179.
- Vorman J. Magnesium: nutrition and metabolism. Mol. Aspects Med. 2003; 24(1-3): 27-37.
- Windisch W. Interaction of chemical species with biological regulation of the metabolism of essential trace elements. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2002; 372(3): 421-425.

# VPLYV PRODUKTOV KMEŇOVÝCH BUNIEK NA ANGIOGENÉZU CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY

Humeník F.<sup>1</sup>, Maloveská M.<sup>1</sup>, Farbáková J.<sup>2</sup>, Petrovová E.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>4</sup>, Mojžišová Z.<sup>1</sup>, Čížek M.<sup>3</sup>, Čížková D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

<sup>2</sup> Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach

<sup>3</sup> Katedra epizootológie a parazitológie, UVLF v Košiciach

<sup>4</sup> Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

## ABSTRAKT

Táto práca je zameraná na vplyv mezenchýmových kmeňových buniek kostnej drene (BM-MSC) a ich produktov na angiogenézu chorioalantoickej membrány (CAM) kuracieho embrya. Počas štúdie sme izolovali BM-MSC z humeru zdravých psov. Identitu BM-MSC sme potvrdili charakterizáciou vlastností stanovených pre mezenchýmové kmeňové bunky (MSC). Bunky izolovanej populácie vykazovali fibroblastoidný tvar, ktorý je pre MSC typický. Prietoková cytometria BM-MSC potvrdila prítomnosť buniek pozitívnych pre CD29 (98.9% ± 0.8); CD90 (59.1% ± 4.7) ako aj buniek pozitívnych pre obidva povrchové markery: CD29 a CD90 (79% ± 2.4), len 2.0% ± 1.2 buniek bolo CD45+. U týchto buniek sme potvrdili aj ich multiliniový potenciál. Produkty BM-MSC obsiahnuté v kondicionovanom médiu priaznivo ovplyvnili angiogenézu chorioalantoickej membrány. V experimentálnej skupine sme po aplikácii kondicionovaného média zistili nárast počtu ciev o 47.250% ± 9.7 po 72 hodinovej inkubácii. Narozdiel od kontrolnej skupiny, kde došlo k poklesu vaskulárnej denzity o 27.625% ± 7.981.

## ÚVOD

Kmeňové bunky predstavujú špecializované bunky vykazujúce multidiferenciačný potenciál a schopnosť samoobnovy. Hlavným zdrojom mezenchýmových kmeňových buniek je kostná dreň a tukové tkanivo (Neupane a kol. 2008), ale tieto bunky sa nachádzajú aj v tkanivách a orgánoch, ako je koža, kosť, zubná pulpa, pečeň, pupočný povrazec a iné (Kerkis a kol. 2006). Mezenchýmové kmeňové bunky sa môžu diferencovať na bunky mezodermálneho pôvodu, ako sú chondrocyty, osteocyty a adipocyty (Rho a kol. 2015). Produkciou rastových a trofických faktorov ovplyvňujú angiogenézu, revaskularizáciu poškodeného tkaniva ako i regeneráciu nervového tkaniva (Čížková a kol. 2014). Chorioalantická membrána (CAM) predstavuje vaskularizovanú štruktúru nachádzajúcu sa vo vajciach niektorých amniotických druhov živočíchov (Gilbert a kol. 2003). V celkovej štruktúre sú zahrnuté tri rôzne vrstvy: choriový epitel, mezenchým a epitel alantoísu. Medzi epitelovými bunkami choriovej vrstvy sa nachádzajú krvné kapiláry a dutiny, viditeľné voľným okom (Fáncsi a kol. 1979).

## MATERIÁL A METÓDY

### *Izolácie msc z kostnej drene psov*

Kostná dreň pochádzala od čistokrvných psov. Odber kostnej drene sa uskutočnil v celkovej injekčnej anestéze. Ako odberné miesto vyberáme proximálnu časť humeru. Samotný odber sa vykonal 18G injekčnou ihlou a 10 ml injekčnou striekačkou. Po preniknutí do kostnej drene sa kostná dreň odsala 10 ml striekačkou obsahujúcou 3 ml preplachovacieho média. Zloženie preplachovacieho média: DMEM F12, 10% FBS, 1% ATB-ATM a 1% glutamínu. Následne sa aspirát dvakrát centrifugoval 10 minút pri 1500 ot. / min. Bunky boli nasadené na 2 fľaše s obsahom 25cm<sup>2</sup>. Po 48 hodinách inkubácie boli neadherované bunky odstránené.

### CD charakterizácia psích BM-MSC

Vzorky boli analyzované s cieľom zistiť podiel CD29 a CD90-pozitívnych a CD45-negatívnych buniek. Cytometrická analýza sa vykonala na prietokovom cytometri BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Biosciences, USA) vybavenom modrým (488 nm) a červeným (633 nm) laserom a 6 fluorescenčnými detektormi. Percentuálny podiel buniek exprimujúcich jednotlivé CD znaky sa určil bodovým grafom pre príslušnú fluorescenciu. Získané údaje boli analyzované v BD FACS Diva™ analytickom softvéri.

### Príprava kondicovaného média z psích BM-MSC

Pre získanie kondicovaného média (KM) sme použili Minimal Essential Medium w / o phenol red (MEM- $\alpha$ , Thermo-Fisher) s obsahom 2% antibiotika a antimykotika (Bio-West), ktoré bolo aplikované na konfluentnú kultúru psích MSC v množstve 5 ml / T75 fľašu na dobu 24 hodín. Po uplynutí tejto doby sa kondicionované médium odobralo a následne prefiltrovalo pomocou sterilného striekačkového filtra (Millex®, 22  $\mu$ m).

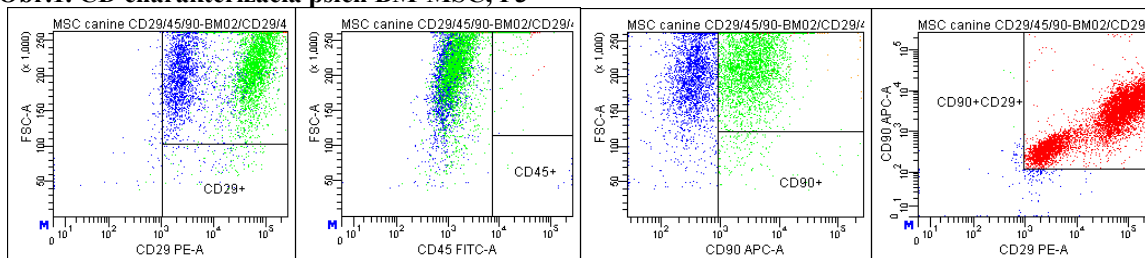
### Aplikácia kondicovaného média na CAM kuracieho embrya

Pre aplikáciu kondicovaného média MSC kostnej drene na CAM sme použili modifikovanú metódu podľa Ribattiho (Ribatti D. 2012). Vajíčka sa inkubovali s tupým koncom nahor, v inkubátore s konštantnou vlhkosťou a teplotou pri 37,5 ° C a 60% a neskôr 70%. Na ED6 bol jemne nanesený sterilný silikónový krúžok (d = 5 mm) na chorioalantoickú membránu pomocou chirurgickej pinzety. V kontrolnej skupine (N = 10) došlo k aplikácii 30  $\mu$ l sterilného média v experimentálnej skupine (N = 10) sa injektovalo do priestoru ohraničeného krúžkom 30  $\mu$ l kondicionovaného média. Fotodokumentácia vaskulárnej hustoty bola vykonaná v okamihu aplikácie a 72 hodín po aplikácii.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Použitím vyššie uvedeného protokolu sme boli schopní izolovať a kultivovať homogénnu populáciu psích MSC kostnej drene, ktoré vykazovali fibroblastoidný tvar. CD charakterizácia psích BM-MSC z prvej pasáže (P1) poukázala na fakt, že v tejto populácii sa nachádzalo 98.9%  $\pm$  0.8 buniek CD29 +, 59.1%  $\pm$  4.7 CD90 + a 79%  $\pm$  2.4 CD29 a CD90 +. Len 2.0%  $\pm$  1.2 buniek bolo CD45 pozitívnych.

**Obr.1. CD charakterizácia psích BM-MSC, P3**



Pre získanie výsledkov štatistickej analýzy sme použili Graph Pad InStat software. Na začiatku aplikácie (stĺpec CTR0h/EXP0h) bola hustota ciev u kontrolnej skupiny 35,125  $\pm$  5,463 a 32,875  $\pm$  7,298 u experimentálnej skupiny. Na konci experimentu (stĺpec CTR72h/EXP72h) predstavovala hustota ciev 27,625  $\pm$  7,981 u kontrolnej skupiny a 47,250  $\pm$  9,706 u experimentálnej skupiny. Stredná hodnota medzi jednotlivými skupinami bola porovnaná použitím jedнокrokového ANOVA a Tukey-ho post hoc testu. Štatisticky významné odchýlky (P < 0.05) sme zistili porovnaním hodnôt CTR0h vs EXP72h (\*P hodnota < 0.05); EXP0h vs EXP72h (\*\*P hodnota < 0.01) and CTR72h vs EXP72h (\*\*P < 0.001).

Použitie chorioalantoickej membrány na sledovanie angiogenézy predstavuje relatívne novú metódu. Dôvod, prečo sme sa rozhodli pre model CAM na štúdium angiogenézy je, že má

mnoho výhod v porovnaní s ostatnými modelmi *in vivo*, ako je vysoká reprodukovateľnosť, jednoduchosť a nízka cena a nakoniec model CAM možno charakterizovať ako uzavretý systém, ktorý je veľmi podobný dospelému organizmu (Lokman a kol. 2012). V našej štúdií sme pozorovali vplyv KM získaného z BM-MSC na angiogézu CAM. Ako kontrolné médium sme zvolili kultivačné médium MEM- $\alpha$  použité na získanie sekretómu. Výsledky podporili našu hypotézu, že MSC produkujú trofické faktory, ktoré stimulujú revaskularizáciu a angiogézu v poškodenom tkanive (Watt a kol. 2013). V kontrolnej skupine po aplikácii MEM- $\alpha$  a následnom pozorovaní po 72 hodinách sme zistili pokles vaskulárnej hustoty ( $27.625 \pm 7.98$ ) v porovnaní s experimentálnou skupinou, kde sme BM-MSC inkubovali v KM sme zaznamenali nárast denzity ciev ( $47.250 \pm 9.7$ ).

*IGA UVLF 06/2018: „Ovplyvnenie regeneračnej kapacity nervového tkaniva v in vitro podmienkach prostredníctvom produktov dospelých kmeňových buniek“.*

*IGA 02/2019: “Stratifikácia pacientov s kanínnou kognitívnou dysfunkciou, využitie inovatívnej bunkovej terapie.”; APVV-15-0613, VEGA1/0571/17, VEGA 1/0050/19*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cizkova D, et al. Modulation properties of factors released by bone marrow stromal cells on activated microglia: An in vitro study. *Sci Rep.*, 2014; 7514.
- Fáncsi T, Fehér G. Ultrastructural studies of chicken embryo chorioallantoic membrane during incubation. *Anat Histol Embryol.* 1979; 8 (2):151–9.
- Gilbert Scott F. *Developmental biology*. Sunderland, Mass: Sinauer Associates. ISBN 0-87893-258-5(2003).
- Kerkis I, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues Organs.* 2006; 3-4:148.
- Lokman NA, et al. Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay as *In Vivo* Model to Study of Newly Identified Molecules on Ovarian Cancer Invasion and Methastasis. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(8): 9959–9970.
- Neupane M, et al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells *Tissue Eng.*, 2008.
- Rho GJ, Subbarao RB, Ullah I. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective *BioSci Rep.* 2015; 35.
- Ribatti D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. *Methods Mol Biol.*; 2012;843:47-57
- Watt SM, et al. The angiogenic properties of mesenchymal/stromal stem cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull.*; 2013;108(1): 25–53.

# VYUŽITIE KINEMATICKEJ ANALÝZY U PSOV S DYSPLÁZIOU LAKŤOVÉHO KĹBU

Huňáková K., Hluchý M., Ševčík K., Kuricová M., Ledecký V.

*Klinika malých zvierat – OCHORR, UVLF Košice*

## ABSTRAKT

Kinematická analýza pohybu je objektívnym hodnotením, ktorého výsledkom sú priestorové a časové parametre. Je to štúdium pohybu bez ohľadu na generované sily a hmotnosť. Kinematickú analýzu využívame pri hodnotení chôdze u ortopedických, neurologických pacientov alebo pri hodnotení výsledkov chirurgických intervencií, farmaceutík a rôznych rehabilitačných metód. V rámci našej štúdie sme využili kinematickú analýzu u ortopedických pacientov s dyspláziou lakťového kľbu.

## ÚVOD

Analýza chôdze je vyšetrenie pohybu, ktoré zahŕňa priestorové a časové parametre, pričom sily pôsobiace na končatinu môžu byť kvantifikované a interpretované. Techniky analýzy chôdze sa pohybujú od základnej škály vizuálneho hodnotenia až po komplexné zariadenia na detekciu pohybu pomocou počítača.

Parametre získané z analýzy chôdze môžeme použiť pri hodnotení zaťažovania jednotlivých končatín, ataxie, síl pôsobiacich na kĺby a rôznych abnormalít. Takto získané parametre vieme využiť pri hodnotení výsledkov chirurgických intervencií, farmaceutík a iných ortopedických a neurologických ošetrení (Torres a kol., 2014; Waxman a kol., 2008).

Dve hlavné kategórie analýzy chôdze sú kinetická a kinematická analýza. V rámci každej fázy chôdze je možné pomocou kinetických a kinematických techník získať rôzne sily a priestorové dáta. Kinetická analýza chôdze sa zaoberá meraním síl pôsobiacich na končatinu počas pohybu, pričom kinematická analýza opisuje pohyb v priestore bez ohľadu na hmotnosť a sily. Kinematika umožňuje posúdiť polohy, uhly, rýchlosti a zrýchlenie častí tela a kĺbov počas pohybu. Zber kinematických údajov sa môže uskutočniť dvojrozmerné alebo trojrozmerné (Gordon-Evans a kol., 2009; Quinn a kol., 2007). Vo veterinárnej medicíne sa najčastejšie využíva analýza pohybu na základe dvojrozmerného systému. Tento typ analýzy je vhodnou metódou pri hodnotení rozsahu pohybu v kĺboch.

Dvojrozmerné systémy vyžadujú minimálne vybavenie, pričom na zachytenie kinematických údajov v jednej rovine pohybu je potrebná iba jedna videokamera. Trojrozmerné systémy si však vyžadujú viaceré špecializované videokamery. V týchto systémoch musí byť každý marker vždy zachytený aspoň dvoma kamerami, aby bol schopný určiť polohu značky v trojrozmernom priestore. Vo všeobecnosti zvýšenie počtu kamier v trojrozmernom kinematickom systéme zlepšuje schopnosť sledovať použité markery. To môže výrazne zlepšiť kvalitu získaných kinematických údajov a skrátiť čas potrebný na získanie týchto údajov. Pre väčšinu dynamických štúdií chôdze pomocou trojrozmerného kinematického systému je ideálnych minimálne šesť kamier. Markery používané v moderných kinematických systémoch sú tzv. pasívne alebo aktívne a to na základe ich vlastností (Tobias a kol., 2012; Fanchon a kol., 2007; Evans a kol., 2005).

Spoločnou stratégiou, ktorá sa používa pri výbere umiestnenia markerov, je umiestniť ich pokiaľ je to možné, nad orientačné kostné body. Táto stratégia má dve hlavné výhody ; poskytuje ľahko identifikovateľné a opakovateľné miesto pre umiestňovanie markerov a poskytuje umiestnenie markerov na miesta s minimálnym podkožným mäkkým tkanivom, čo môže výrazne znížiť artefakt pohybov kože (Torres a kol., 2014; Torres a kol., 2013; Torres a kol., 2010).



## MATERIÁL A METODIKA

Na zaznamenanie chôdze psov sme použili kamerový systém dodávaný spoločnosťou Simi, ktorý obsahoval 6 videokamier. Na vyhodnotenie pohybu jednotlivých psov sme použili počítač, ktorý bol tiež dodaný spoločnosťou Simi, kde je nainštalovaný software a hardware od spoločnosti Simi Reality Motion Systems, version 9.1.1 build 354, Nemecko. Kinematický záznam chôdze u nami vybranej skupiny psov sme zhotovovali v miestnosti vyhradenej na kinematickú analýzu pohybu s dĺžkou 8,33 m a šírkou 4,11 m. Kinematickú analýzu chôdze sme vykonali u 5 psov plemena labradorský retríver s obojstrannou dyspláziou lakt'ových kĺbov. Hodnotením lakt'ového kĺbu sme získali maximálnu extenziu lakt'ového kĺbu, maximálnu flexiu lakt'ového kĺbu a parameter ROM (range of motion), ktorý je výsledkom rozdielu maximálnej extenzie a maximálnej flexie. Umiestnenie markerov bolo nad orientačné kostné body, v prípade hrudníkovej končatiny boli markery umiestnené nasledovne; 1. marker je v mieste dorzálnej strany lopatky, pri distálnom konci spina scapulae, 2. marker je v mieste veľkého tuberkulu ramennej kosti, 3. marker je umiestnený v oblasti laterálneho epikondylu ramennej kosti, 4. marker je v mieste distálnej epifýzy ulny, 5. marker je umiestnený na distálnom konci V. metakarpálnej kosti.

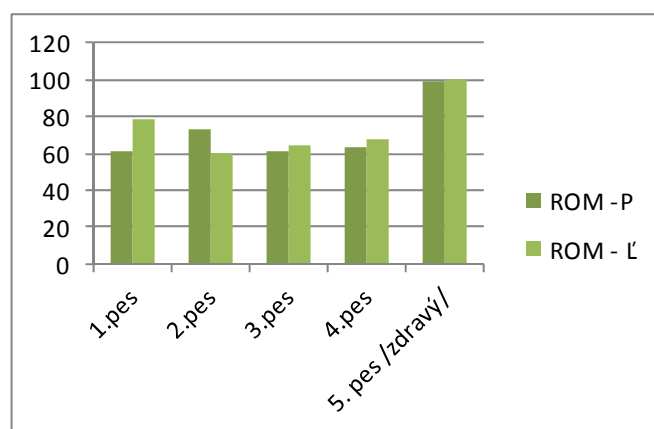
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotenie pohybu a chôdze u 5 psov plemena labradorský retríver sme vykonali na základe kinematickej analýzy. Výsledkom tejto analýzy sú nasledovné parametre; maximálna flexia, maximálna extenzia a parameter ROM. V rámci tejto analýzy sa zúčastnili štyria psy s obojstrannou dyspláziou lakt'ového kĺbu a jeden pes bez dysplázie lakt'ového kĺbu.

	Lakt'ový kĺb		Uhol /st./	ROM /st./
1.pes	P	flexia	88,85	61,11
		extenzia	149,96	
	Ľ	flexia	72,86	78,28
		extenzia	151,14	
2.pes	P	flexia	76,16	72,74
		extenzia	148,90	
	Ľ	flexia	83,11	<u>60,09</u>
		extenzia	143,20	
3.pes	P	flexia	93,25	61,64
		extenzia	154,89	
	Ľ	flexia	89,48	64,26
		extenzia	153,74	
4.pes	P	flexia	91,65	63,56
		extenzia	155,21	
	Ľ	flexia	94,32	67,31
		extenzia	161,63	
5. pes (zdravý pes)	P	flexia	69,13	99,12
		extenzia	168,25	
	Ľ	flexia	66,74	<u>100,58</u>
		extenzia	167,32	

U jednotlivých psov sú v tabuľke č. 1 uvedené nasledovné parametre; maximálna flexia, maximálna extenzia a parameter ROM. Najmenší rozsah pohybu (60,09) bol prítomný u 2. psa v ľavom lakt'ovom kĺbe, pričom najväčší rozsah pohybu (100,58) bol u 5. psa v ľavom lakt'ovom kĺbe. Parameter ROM bol v porovnaní so zdravým psom nižší u všetkých psov s dyspláziou lakt'ového kĺbu.

Graf 1.



Tab.1

Kinematická analýza chôdze sa využíva pre objektivizáciu hodnotenia chôdze. Táto analýza je často využívaná pri hodnotení výsledkov chirurgických intervencií, ortopedických alebo neurologických operácií, ďalej pri hodnotení účinnosti farmaceutík alebo rehabilitačných metód (Miqueletoa a kol., 2013; Preston a kol., 2018).

*Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 05/2018 „Klinické využitie extracelulárnych produktov adultných alogénnych mezenchymálnych buniek získaných z tukového tkaniva v ortopédii psov“.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Evans R, Horstman C, Conzemius. Accuracy and optimization of force platform gait analysis in Labradors with cranial cruciate disease evaluated at a walking gait. *Vet Surg.* 2005; 34:445.
- Fanchon L, Grandjean D. Accuracy of asymmetry in dices of ground reaction forces for diagnosis of hind limb lameness in dogs. *Am J Vet Res.* 2007; 68:1089.
- Gordon-Evans WJ, Evans RB, Conzemius MG. Accuracy of spatio temporal variables in gait analysis of neurologic dogs. *J Neuro trauma.*2009; 26:1055.
- Miqueletoa NSML, a kol. Kinematic analysis in healthy and hip-dysplastic German Shepherd dogs *The Veterinary Journal.* 2013; 195, 210-215
- Preston T, Wills AP. A single hydrotherapy session increases range of motion and stride length in Labrador retrievers diagnosed with elbow dysplasia, *The Veterinary Journal.* 2018; 234, 105-110
- Quinn MM, Keuler NS, Lu Y. Evaluation of agreement between numerical rating scales, visual analogue scoring scales, and force plate gait analysis in dogs. *VetSurg.* 2007; 36:360.
- Tobias MK, Johnston AS. *Veterinary Surgery: Small Animal.* 2012; Vol 1: 700-702. ISBN 978-1-4377-0746-5.
- Torres BT, Gilbert, PJ, Reynolds, LR. The effect of examiner variability on multiple canine stifle kinematic gait collections in a 3-dimensional model, *VetSurg.* 2014; 44, s. 581-587 .
- Torres BT, Moens, NM, Al Nadaf S. Comparison of overground and treadmill-based gaits of dogs *Am J VetRes.* 2013; 74, s. 535-541.
- Torres BT, Punke, JP, Fu YC. Comparison of canine stifle kinematic data collected with three different targeting models, *VetSurg.* 2010; 39, s. 504-512.
- Waxman AS, Robinson DA, Evans RB. Relationship between objective and subjective assessment of limb function in normal dogs with an experimentally induced lameness. *VetSurg.* 2008; 37:241.

# INTESTINÁLNE PARAZITY HLODAVCOV V CHOVOCH A PREDAJNIACH SO ZVIERATAMI NA SLOVENSKU

Jarošová J., Antolová D.  
*Parazitologický ústav, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť výskyt intestinálnych parazitov u drobných hlodavcov v predajniach so zvieratami a v chovateľských kluboch na Slovensku. Získané výsledky potvrdili, že napriek dobrému klinickému stavu drobných hlodavcov je výskyt parazitóz u týchto zvierat pomerne častý. Prítomnosť vajíčok parazitov bola zistená v trusoch zo 65 (48.9%) klieťok so zvieratami. Najčastejšie detegovanými nematódami boli druhy *Aspicularis tetraptera* a *Syphacia muris*, ktoré boli identifikované u všetkých druhov hlodavcov zaradených do prieskumu. Závažný je hlavne nález vajíčok pásomnice *Hymenolepis nana*, ktoré boli detegované v celkovo (18.8%) vyšetrených chovných klieťok. Pôvodca infekcie bol následne potvrdený aj molekulárnymi metódami. Hlodavce určené na chov a predaj by preto mali byť pravidelne testované na prítomnosť parazitov a v prípade pozitívneho nálezu účinne dehelmintizované.

## ÚVOD

Chov drobných hlodavcov ako spoločenských zvierat si za posledné roky získava čoraz väčšiu popularitu. Jeho výhodou je hlavne časová a finančná nenáročnosť, no napriek týmto benefitom by mal zahŕňať aj dostatočnú starostlivosť o zdravotný stav jedincov, ktoré môžu trpieť celou škálou ochorení, vrátane parazitárnych nákaz. Zatiaľ čo sa prítomnosť ektoparazitov prejavuje viac, či menej výraznými príznakmi ako je škrabanie, strata srsti a kožné zmeny, prítomnosť črevných parazitov sa nemusí prejavovať vôbec. Najbežnejšie črevné helminty domácich a laboratórných hlodavcov patria do čeľade Oxyuridae (Robles a Navone, 2007; Abdel-Gaber, 2016). Okrem ich negatívneho vplyvu na zdravie zvierat, bol u dvoch druhov, *Syphacia muris* a *Syphacia obvelata*, potvrdený ich zoonózný potenciál (Riley, 1919; Kofoid a White, 1919; Stone a Manwell, 1966; Mahmoud a kol., 2009; Taylor a kol., 2010). Uvádza sa, že hlodavce sú pomerne často nakazené aj pásomnicami, konkrétne zástupcami rodu *Hymenolepis* (Jurášek a Dubinský, 1993), napriek tomu je však v odbornej literatúre publikovaných len málo prieskumov o ich prevalencii. Cieľom práce bolo zistiť výskyt črevných parazitov u drobných hlodavcov v predajniach so zvieratami a v chovateľských kluboch na Slovensku.

## MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie bolo zaradených spolu 586 hlodavcov. Vzorky trusu boli odobrané u 228 myší, 165 potkanov, 119 škrečkov, 25 pieskomilov mongolských a u 49 morčiat. Trus bol odobraný v 12 predajniach so zvieratami a v 3 chovateľských kluboch v období od decembra 2016 do mája 2018 v Banskej Bystrici, Prešove, Poprade Michalovciach, Bardejove, a v Košiciach. Zvieratá boli ustajnené v 133 samostatných klieťkach pričom sa ich počet v jednej klieťke pohyboval v rozmedzí od jedného po 26. Zmesné vzorky trusu boli odobrané z podstielky jednotlivých klieťok a vyšetrené pomocou Faustovej flotačnej metódy. Vajíčka parazitov boli identifikované na základe morfológických znakov. Z organizačných dôvodov (potreba dlhodobiejšieho oddelenia a chovu každého zvieratá v samostatnej klieťke) nebolo možné vyšetriť jednotlivé zvieratá samostatne a tak nebolo možné úplne presne stanoviť počet pozitívnych zvierat. Preto bola prevalencia pásomnice hodnotená podľa dvoch kritérií. Jedným bola pozitivita zmesných vzoriek trusu získaných z jednotlivých klieťok s hlodavcami. Druhým bolo stanovenie počtu zvierat chovaných v klieťkach s pozitívnym nálezom parazitárnych vajíčok, teda počet všetkých potenciálne infikovaných zvierat.

Pásomnica *Hymenolepis nana* bola navyše potvrdená molekulárnou analýzou u všetkých pozitívnych druhov hlodavcov, myší, potkanov a škrečkov. Izolované vajíčka pásomnice boli identifikované pomocou PCR amplifikácie 28S rRNA génu, ITS1 génu a génu pre paramyosin a ich následným sekvenovaním.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zvieratá sledované v prieskume boli chované celkovo v 133 kliečkach a prítomnosť vajíčok parazitov bola zistená v trusoch zo 65 (48,9 %) kliečok, pričom u zvierat bola potvrdená infekcia pásomnicou *Hymenolepis nana*, obľými červami rodu *Syphacia* spp., *Aspiculuris tetraptera* a *Paraspidodera uncinata* (Tab. 1). Vďaka koprofágii a priamemu vývinovému cyklu parazitov zaznamenaných vo vzorkách trusu sa dá predpokladať, že väčšina zvierat žijúcich v tej istej kliečke je nakazená rovnakými parazitmi (Tab. 2).

**Tab. 1 Parazitárny nález u drobných hlodavcov v chovateľských kluboch a predajniach so zvieratami**

Druh	n	Počet kliečok	<i>Syphacia muris</i>	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	<i>Paraspidodera uncinata</i>	<i>Hymenolepis nana</i>
			Počet pozitívnych boxov/%	Počet pozitívnych boxov/%	Počet pozitívnych boxov/%	Počet pozitívnych boxov/%	Počet pozitívnych boxov/%
Potkany	165	31	6/19,3%	1/3,2%	4/12,9%	0/0%	6/19,35%
Myši	228	30	10/33,3%	8/26,6%	21/70,0%	0/0%	11/36,6%
Škrečky	119	37	8/21,6%	0/0%	2/5,4%	0/0%	8/21,62%
Pieskomily	25	8	6/75,0%	2/25,0%	1/12,5%	0/0%	0/0%
Morčatá	49	27	1/3,7%	0/0%	2/7,4%	1/3,7%	0/0%
<b>Spolu</b>	<b>586</b>	<b>133</b>	<b>31/23,3%</b>	<b>11/8,3%</b>	<b>30/22,5%</b>	<b>1/0,7</b>	<b>25/18,8%</b>

n – celkový počet zvierat

**Tab. 2 Počet drobných hlodavcov držaných v kliečkach s pozitívnym nálezom parazitov.**

n – celkový počet zvierat

Druh	n	Počet kliečok	<i>Syphacia muris</i>	<i>Syphacia obvelata</i>	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	<i>Paraspidodera uncinata</i>	<i>Hymenolepis nana</i>
			Počet zvierat v poz. boxoch/%	Počet zvierat v poz. boxoch/%	Počet zvierat v poz. boxoch/%	Počet zvierat v poz. boxoch/%	Počet zvierat v poz. boxoch/%
Potkany	165	31	38/23,0%	1/0,6%	22/13,3%	0/0%	40/24,2%
Myši	228	30	78/34,2%	81/35,5%	161/70,6%	0/0%	80/35,0%
Škrečky	119	37	37/31,1%	0/0%	4/3,4%	0/0%	48/40,3%
Pieskomily	25	8	21/84,0%	7/28,0%	3/12,0%	0/0%	0/0%
Morčatá	49	27	2/4,1%	0/0%	5/10,2%	2/4,1%	0/0%
<b>Spolu</b>	<b>586</b>	<b>133</b>	<b>176/30,0%</b>	<b>89/15,2%</b>	<b>195/33,3</b>	<b>2/0,3%</b>	<b>168/28,6%</b>

Väčšina druhov črevných parazitov detegovaných v prieskume patrí do čeľade Oxyuridae. Vývoj týchto helmintov je priamy a vďaka pomerne krátkej prepatentnej perióde môžu byť ľahko prenášané medzi hlodavcami chovanými v tej istej kliečke (Sürsal a kol., 2014). Najčastejšie detegovanými nematódami boli druhy *Aspiculuris tetraptera* a *Syphacia muris*, ktoré boli identifikované vo vzorkách trusu všetkých druhov hlodavcov zaradených do prieskumu. Počet boxov v ktorých bol zistený *A. tetraptera* sa pohyboval od 5,4% pozitívnych kliečok u škrečkov po 70,0% pozitívnych kliečok u myší. Pri silnej intenzite nákazy spôsobenej týmto parazitom môže u zvierat dôjsť ku katarálnej enteritíde a niekedy aj k penetrácii steny čreva (Jurášek a Dubinský, 1993). Prevalencia druhu *Syphacia muris* bola

najvyššia u pieskomilov, kde bolo pozitívnych až 75,0% klieťok. U zvierat môže spôsobiť iritáciu perianálnej oblasti, prípadne až prolaps rekta. Na rozdiel od predchádzajúceho druhu bola infekcia spôsobená helmintom *Syphacia obvelata* zaznamenaná menej často, avšak jeho typické podlhovasté vajíčka sa našli až u troch druhov hlodavcov, myší (26,6%), pieskomilov (25,0%) a potkanov (3,2%). U oboch spomínaných parazitov rodu *Syphacia* bol potvrdený aj zoonózný potenciál (Riley, 1919; Kofoid a White, 1919; Stone a Manwell, 1966; Mahmoud a kol., 2009; Taylor a kol., 2010). Helmint *Paraspidodera uncinata*, ktorý bol detegovaný v jednej klieťke s dvoma morčatami parazituje v hrubom čreve týchto hlodavcov a pokladá sa za málo patogénny druh. Za závažný však môžeme považovať nález vajíčok *Hymenolepis nana* u troch druhov hlodavcov v celkovo (18,8%) vyšetrených chovných klieťok. Najvyššia prevalencia ochorenia bola zaznamenaná u škrečkov (40,3%), nižšia u myší (35,1%) a potkanov (24,2%). Definitívnymi hosťiteľmi pásomnice sú aj ľudia, pričom ochorenie, ktoré spôsobuje je považované za najrozšírenejšiu humánnu cestodózu na svete. *H. nana* nepotrebuje medzihosťiteľa a jej vývinový cyklus môže byť priamy, čo je zdá sa, limitujúcim faktorom jej vysokej prevalencie v chovoch hlodavcov. Patologické zmeny pri infekcii *H. nana* závisia od imunitného stavu hosťiteľa a od intenzity nákazy. Pri silnej infekcii môže dôjsť až k lokálnej nekróze sliznice, nastáva porucha trávenia proteínov a zvyšuje sa aktivita črevnej fosfolipázy a enterokinázy. Fixácia dospelých pásomníc na stenu čreva a vývoj cysticerkoidov v sliznici môže spôsobiť poruchy trávenia a dysfunkciu žľových ciest (Jurášek a Dubinský, 1993). Pásomnica *Hymenolepis nana* bola potvrdená aj molekulárnou analýzou u všetkých pozitívnych druhov hlodavcov, myší (KY994576), potkanov (MK874332) a škrečkov (MK879522). Získané výsledky potvrdili, že napriek dobrému klinickému stavu vyšetrených zvierat je v predajniach so zvieratami a v chovateľských kluboch výskyt črevných parazitov u drobných hlodavcov pomerne častý a tieto zvieratá navyše predstavujú riziko šírenia parazitárnych infekcií na ľudí. Chované hlodavce by preto mali byť pravidelne vyšetované na prítomnosť parazitov a následne dehelmintizované.

*Táto práca bola podporovaná projektom „Ochrana životného prostredia pred parazitozoonózami pod vplyvom globálnych klimatických a sociálnych zmien (kód ITMS 26220220116), na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abdel-Gaber R. *Syphacia obvelata* (Nematode, Oxyuridae) infecting laboratory mice *Mus musculus* (Rodentia, Muridae): phylogeny and host-parasite relationship. *Parasitol Res.* 2016; 115:975-85.
- Jurášek V, et al. *Veterinary Parasitology*. 1<sup>st</sup> ed. Bratislava: Príroda; 1993, 382 p.
- Kofoid CA, White AW. A new nematode infection of man. *JAMA.* 1919; 72:567-79.
- Mahmoud AE, et al. Oxyurid nematodes detected by colonoscopy in patients with unexplained abdominal pain. *Parasitol Unit.* 2009; 2:93-102.
- Riley WA. A Mouse Oxyurid, *Syphacia obvelata*, as a parasite of man. *J Parasitol.* 1919; 6:89-93.
- Robles MR, Navone GT. A new species of *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae) from *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae) in Argentina. *Parasitol Res.* 2007; 101:1069-75.
- Stone WB, Manwell RD. Potential helminth infections in humans from pet or laboratory mice and hamsters. *Public Health Rep.* 1966; 81:647-53.
- Sürsal N, Gökpınar S, Yıldız K. Prevalence of intestinal parasites in hamsters and rabbits in some pet shops of Turkey. *Turkiye Parazitoloj Derg.* 2014; 38: 102-105.
- Taylor MA. *Parazitologia veterinária*. 3rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

# SPOLOČENSTVÁ CHVOSTOSKOKOV (COLLEMBOLA) POZDĽŽ MIKROKLIMATICKY INVERZNÉHO SUTINOVÉHO SVAHU ZÁDIELSKEJ TIESŇAVY

Jureková N.

*Ústav biologických a ekologických vied, Katedra zoológie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach*

## ABSTRAKT

Biologický výskum jaskýň a podpovrchových subteránnych habitatov v poslednom období odhalil prítomnosť širokého spektra reliktných foriem článkonožcov (Arthropoda) na území Západných Karpát. Chvostoskoky (Collembola) patria medzi dominantné skupiny článkonožcov týchto habitatov. Taxonómia, fylogenéza a ekológia mnohých reliktov, vrátane obligátnych jaskynných druhov Collembola nie je doposiaľ podrobne preštudovaná. Cieľom tejto štúdie je objasniť ekológiu, porovnať vertikálnu stratifikáciu spoločenstiev Collembola na dvoch stanovištiach mikroklimaticky inverzného sutinového svahu zaujímavej lokality na území Slovenského krasu – Zádielskej tiesňavy a tiež posúdiť vplyv environmentálnych faktorov prostredia ako je pôdna mikroklima, obsah organického uhlíka či pH na subteránne spoločenstvá chvostoskokov.

## ÚVOD

Podpovrchové subteránne habitaty (SSH – *Shallow Subterranean Habitats*) predstavujú prechodovú zónu medzi pôdou a hlbokými podzemnými biotopmi (jaskyňami). Vznikajú zvyčajne v oblastiach sutí na základni vápencových útesov. Systém puklín v skalnom masíve a voľných priestorov medzi kameňmi v skalnej suti na povrchu vytvára mikrohabitaty predstavujúce významné refúgiá pre spoločenstvá pôdnej a subteránnej fauny (Mammola a kol., 2016). Medzi druhovo (druhová diverzita) i početnosťou (abundancia) najbohatšiu skupinu pôdnych saprofágov v týchto jedinečných habitatoch patrí práve skupina Collembola (Deharveng 2004). Spoločenstvá týchto organizmov sa môžu značne líšiť pozdĺž hĺbkového gradientu aj na rôznych stanovištiach v rámci jedného sutinového svahu a ich štruktúra sa môže meniť v závislosti od abiotických faktorov prostredia v gradiente, ako je pôdna mikroklima, obsah organického uhlíka a pH. Predošlé štúdie uvádzajú, že množstvo uhlíka spolu s mikroklimou pôdneho profilu majú značný vplyv na aktivitu a diverzitu obzvlášť eutroglofilných a troglobiontných druhov, tzn. druhy v rôznej miere adaptované (morfológicky, fyziologicky, behaviorálne) na život v podzemných a jaskynných biotopoch (Rendoš a kol., 2016). Jedinečnosť lokality, Zádielskej tiesňavy spočíva vo vegetačnej a teplotnej inverzii, vďaka tak heterogénnemu krasovému prostrediu sú pôdne spoločenstvá článkonožcov diverznejšie (Raschmanová a kol., 2008, 2016). Lokalita je predovšetkým známa výskytom vzácnych endemických a reliktných druhov bezstavovcov, preto je našim hlavným cieľom analyzovať vertikálnu distribúciu spoločenstiev chvostoskokov sutinového svahu tejto lokality a tak prispieť k poznaniu ďalších zaujímavých taxónov z hľadiska ochrany biodiverzity aj takýchto subteránnych habitatov.

## MATERIÁL A METODIKA

Od júna 2017 sú v Zádielskej tiesňave inštalované subteránne pasce na dvoch stanovištiach sutinového svahu – (1) na dne tiesňavy, v blízkosti turistického chodníka a Blatnického potoka a (2) v hornej časti sutiny v blízkosti krasovej planiny. Na analýzu druhovej diverzity, hĺbkovej distribúcie a aktivity subteránnych spoločenstiev Collembola sme uskutočnili odchyt jedincov počas mesiacov apríl – október 2018. Na každom stanovišti bolo do pôdy zakopaných päť pascí v hĺbkach 5, 15, 25 – 95 cm umiestnených vo vzdialenosti 50 cm od seba. Všetky sondy boli naplnené 50 ml fixačného činidla – propylénglykol. Následne po vybratí pascí boli jedince Collembola montované do trvalých preparátov, identifikované pomocou fázovo-kontrastného mikroskopu (Leica DM2500) a determinované do druhov. Počas spomínaných mesiacov bola meraná teplota v hĺbkach 5, 35, 65 a 95 cm, na oboch stanovištiach svahu nepretržite v 4 hodinových intervaloch za použitia data-loggerov (iButton DS1921G), ktoré sú súčasťou pascí. Z nameraných hodnôt za dané obdobie pre každé stanovište boli vypočítané priemerné denné teploty ako aj priemerná teplota za dané obdobie. Pôdno-chemické parametre (pH<sub>H<sub>2</sub>O</sub> a obsah organického uhlíka C<sub>org</sub>) boli jednorázovo stanovené z pôdnych vzoriek z hĺbok 5, 35, 65 a 95 cm. pH pôdy sa meralo potenciometricky a obsah uhlíka bol analyzovaný

pomocou dynamického spaľovania. Pôdna vlhkosť bola stanovená gravimetricky a následne z troch opakovaní pre každú hĺbku bola vypočítaná priemerná hodnota vlhkosti.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Medzi dvoma stanovišťami boli značné rozdiely; líšili sa samotnými charakteristikami sutín (topografia, vegetácia, rozsah zazemnenia), mikroklimatickými a pôdno-chemickými faktormi pozdĺž celého vertikálneho profilu (Tab. 1).

Na jednej strane išlo o zalesnené dno rokliny,

ktoré bolo charakterizované hustým vegetačným pokryvom, pomerne vysokým obsahom

vlhkosti, nízkou teplotou pôdy (priemerná denná teplota od  $-0,1$  do  $+12,0$  °C) a vysokým obsahom uhlíka pozdĺž hĺbkového profilu. Naopak, teplejšia horná časť svahu predstavovala menej zalesnenú sutinu s riedkym pokryvom a výrazne vyššími teplotami priemerná denná teplota od  $+9,1$  do  $+23,0$  °C) a mierne nižším obsahom uhlíka pozdĺž profilu. Na oboch stanovištiach teplota klesala s narastajúcou hĺbkou sutín, čo je v súlade s charakteristickou závislosťou

teploty a hĺbky v pôde (Begon a kol., 1997), podobne bol pozorovaný aj postupný pokles vlhkosti pozdĺž gradientu sutín. Celkový počet

14662 jedincov prislúchajúci k 39 druhom bol doposiaľ determinovaný z 8 subteránnych pascí (4 z dna tiesňavy, 4 z vrchu tiesňavy). Druhovú diverzitu a aktivitu chvostoskokov pozitívne koreluje so značným obsahom vlhkosti (Raschmanová a kol., 2008), a obzvlášť sa odvíja aj od obsahu uhlíka v hĺbkovom gradiente (Rendoš a kol., 2016). Zdá sa, že mikroklima spolu s obsahom organického uhlíka mali vplyv na celkovú abundanciu a druhové bohatstvo Collembola v rámci študovaných sutín. Celkovo vyšší obsah uhlíka pozdĺž hĺbkového gradientu, priaznivejšia, vlhká a chladnejšia mikroklima stanovištia v blízkosti Blatnického potoka viedli k vyššej aktivite (11198 jedincov) a druhovej diverzite chvostoskokov (30 druhov), zahrňujúc vyšší počet eutroglofilných druhov v porovnaní s mikroklimaticky vlhkým ale teplejším stanovišťom v blízkosti krasovej planiny (3464 jedincov a 27 druhov). Gers (1998) uvádza, že druhové bohatstvo a abundancia Arthropoda s narastajúcou hĺbkou klesá. Tento spomínaný pattern druhovej diverzity a aktivity Collembola sme pozorovali viac-menej len v zazemnenej sutine na vrchu tiesňavy kde povrchové horizonty (obzvlášť vrstvy 5 až 35 cm) mali vyššie hodnoty oboch parametrov v porovnaní so spodnými vrstvami hĺbkového profilu. Na dne tiesňavy tento pattern nebol tak výrazný, hodnoty počtu druhov a jedincov boli vysoké nielen v povrchových, ale aj v značných hĺbkach profilu sutiny (55 až 95 cm) (Obr. 1). Väčšina z predchádzajúcich štúdií ako napr. Juberthie (2000), Pipan, Culver (2012) udáva, že podpovrchové habitaty, sú obývané spleťou troglóxiénov (tzn. druhy neasociované s jaskynným prostredím), sub- a eutroglofilných (tzn. druhy menej alebo viac asociované s jaskynnými habitatmi) a troglobiontných druhov (tzn. druhy výlučne vyskytujúce sa v jaskyniach).

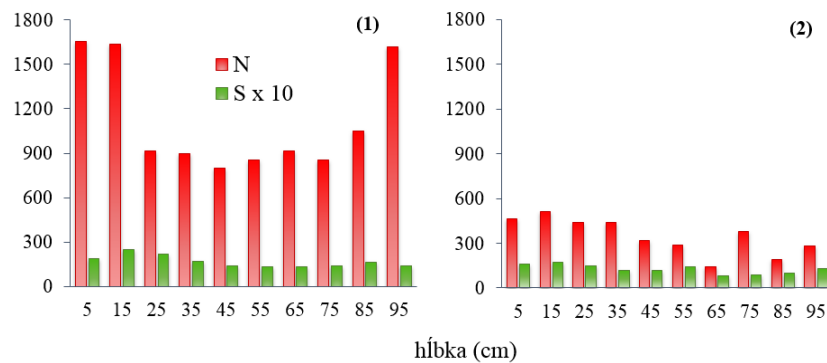
V našej štúdií patrila väčšina druhov k subtroglofilom, ktoré preferovali povrchové a stredné horizonty pôdneho profilu oboch sutinových svahov. Menej zastúpené boli troglóxiény, preferujúce povrchové horizonty profilu a eutroglofilné druhy, z ktorých bola väčšina zastúpená pozdĺž celého hĺbkového gradientu.

**Tab. 1 Mikroklimatické a pôdno-chemické charakteristiky dvoch stanovišť zalesnenej sutiny**

Stanovište	(1)	(2)	(1)	(2)
<b>T (°C)</b>			<b>pH<sub>H2O</sub></b>	
5 cm	8.9 ± 1.9	16.5 ± 3.1	5 cm	6.9 7.2
35 cm	6.2 ± 2.2	16.7 ± 2.3	35 cm	7.7 7.3
65 cm	5.8 ± 2.2	16.7 ± 2.1	65 cm	7.7 7.7
95 cm	6.0 ± 1.8	16.6 ± 2.1	95 cm	7.6 7.0
<b>W (%)</b>			<b>C<sub>org</sub> (%)</b>	
5 cm	75.6 ± 2.9	71.1 ± 13.0	5 cm	52.5 47.0
35 cm	53.8 ± 4.3	68.4 ± 3.4	35 cm	31.3 46.0
65 cm	47.1 ± 2.8	65.4 ± 8.5	65 cm	28.6 24.3
95 cm	54.2 ± 10.3	21.0 ± 3.1	95 cm	29.4 13.8

T – priemerná teplota (apríl – október 2018), W – priemerná vlhkosť (7.6.2017), C<sub>org</sub> – obsah organického uhlíka, Kurzíva – smerodajná odchýlka

**Obr. 1 Vertikálna distribúcia Collembola pozdĺž hĺbkového profilu na dvoch stanovištiach (N – počet jedincov, S – počet druhov, pre označenie sutín pozri Materiál a Metodika)**



Zaujímavým nálezom v tejto štúdií je troglobiontný druh *Neelus koseli* (Kováč a Papáč 2010) zachytený prevažne v stredných a hlbších vrstvách pôdneho profilu, exkluzívne na vrchnom stanovišti sutiny. Tento druh bol doposiaľ nájdený len v jaskyniach východnejších častí Slovenska ako je pohorie Čierna hora, Volovské vrchy až po Jasovskú jaskyňu v Medzevskej pahorkatine (Kováč a Papáč 2010), preto je tento nález pre SSH habitaty v Zádielskej tiesňave unikátny. Na oboch stanovištiach bol zaznamenaný Karpatský endemit, chladnomilný (eutroglofilný) druh *Plutomurus carpathicus* (Rusek a Weiner, 1978), ktorý celkovo patril k vysoko abundantným druhom pozdĺž oboch hĺbkových gradientov. Celkovo vyššia aktivita chladnomilných druhov bola pozorovaná pozdĺž hĺbkového profilu chladného a vlhkého dna tiesňavy. Zaznamenali sme tu abundantný eutroglofilný druh *Ceratophysella granulata* (Stach, 1949) a menej hojné druhy ako *Pygmarrhopalites principalis* Stach, 1945 a *Tetrodontophora bielanensis* (Waga, 1842). Na základe zachyteného zaujímavého druhového spektra chvostoskokov môžeme posúdiť, že štúdiá naozaj dokazuje prepojenie SSH habitatov so subteránnym (jaskynným) prostredím. Na lepšie pochopenie toho, ako reagujú miestne spoločenstvá fauny na teplotné a vlhkosťné zmeny v pôde, sú potrebné dlhodobé pozorovania klimatických zmien. Aby sa zmiernili potenciálne vplyvy zmeny klímy na mikroklimatické gradienty v reliéfoch a ich pridruženej biote je potrebné aby boli tieto biotopy ústrednou prioritou ochrany.

Práca bola podporená projektami VEGA 1/0346/18, APVV-17-0477 a vvg-s-pf-2018-780.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Begon M, Harper JL, Townsend CR. Ekologie: jedinci, populace a spoločenstva. Vydavateľstvo univerzity Palackého, Olomouc, 1997; 1-949.
- Deharveng L. Recent advances in Collembola systematics. *Pedobiologia*. 2004; 48: 415-433.
- Gers, C. Diversity of energy fluxes and interactions between arthropod communities: from soil to cave, *Acta Oecol*. 1998; 19: 205-213.
- Jakál J. Krasová krajina, jej vlastnosti a odolnosť voči antropickým vplyvom. *Geografický časopis*. 2002; 54: 381-392.
- Juberthie C. The diversity of the karstic and pseudokarstic hypogean habitats in the world. Elsevier Press. 2000; 17-39.
- Kováč L, Papáč V. Revision of the genus *Neelus* Folsom, 1896 (Collembola, Neelida) with the description of two new troglobiotic species from Europe. *Zootaxa*. 2010; 2663.1: 36-52.
- Mammola S, et al. Ecology and sampling techniques of an understudied subterranean habitat: the Milieu Souterrain Superficiel (MSS). *Sci Nat*. 2016; 103: 88.
- Pipan T, Culver D.C. Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment, *Biol J Linn Soc*. 2012; 107: 1-14.
- Raschmanová N, Kováč L, Miklisová D. The effect of mesoclimate on Collembola diversity in the Zádiel Valley, Slovak Karst (Slovakia). *Eur J Soil Biol*. 2008; 44:463-472.
- Raschmanová N, Miklisová D, Kováč L. Dynamics of soil Collembola communities (Hexapoda: Collembola) along the mesoclimatic gradient in a deep karst valley. *Biologia*. 2016; 71: 184-193.



# PREPOJENIE TUBOVÝCH SCREENINGOVÝCH TESTOV A ELISA METÓDY PRI STANOVENÍ REZÍDUIÍ KOKCIDIOSTATÍK V TKANIVÁCH HYDINY

Juščáková D., Kožárová I.

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

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo overiť a potvrdiť prítomnosť rezíduí kokcidiostatík v tkanivách brojlerových kurčiat (svalovina, srdce, pečeň, žalúdok, obličky, pľúca, slezina, koža, tuk) bez a po skrmovaní kŕmnej zmesi s prídavkom kokcidiostatika. K stanoveniu rezíduí boli použité dve mikrobiologické tubové screeningové metódy, Premi<sup>®</sup>Test a Explorer 2.0 test a kompetitívny enzýmový imunotest Ionophore EIA.

## ÚVOD

Zvieratá určené na produkciu potravín sú úzko prepojené s verejným zdravím. V súčasnosti je povolené použitie kokcidiostatík, ako kŕmnych doplnkových látok, na prevenciu kokcidiózy u kurčiat, moriek, bažantov, perličiek, prepelíc, jarabíc a králikov ([https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03\\_annex2.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03_annex2.pdf)). Za účelom zaistenia bezpečnosti potravín a ochrany verejného zdravia boli stanovené maximálne limity rezíduí (MRL) pre niektoré kokcidiostatiká v živočíšnych produktoch zvierat určených na výrobu potravín (NARIADENIE KOMISIE (EÚ) č. 37/2010). Z tohto hľadiska bolo potrebné zaviesť spoľahlivé a efektívne spôsoby kontroly obsahu kokcidiostatík v krmivách a ich rezíduí v živočíšnych produktoch.

Pre prvotný screening rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách potravinových zvierat je príslušným orgánom Slovenskej republiky schválená ako úradná metóda laboratórnej diagnostiky potravín liekovková metóda Premi<sup>®</sup>Test (R – 26, 2006). Medzi ďalšie testy odporúčané na účely kontroly rezíduí vo svete patrí Explorer 2.0 test. Kvalitatívne mikrobiologické metódy screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok ponúkajú obmedzené informácie o identifikácii a koncentrácii látky vo vyšetrovanej vzorke. S enzýmom-spojené imunosorpčné stanovenie (ELISA) je rýchla, jednoduchá, vysoko špecifická a ekonomicky výhodná screeningová metóda, ktorá ponúka riešenia pre relevantné a presné stanovenie rezíduí mnohých antimikrobiálnych látok v potravinách. Súčasná ELISA umožňuje screening kokcidiostatík a ich rezíduí v rôznych potravinových matriciach a v krmive, a preto je aj predmetom riešenia našej práce pri post-screeningu rezíduí kokcidiostatík v potravinových matriciach a v krmivách. Vzhľadom k tomu, že tubové screeningové metódy predstavujú prvý stupeň v kontrole rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu, uvedené metódy v spojení s ELISA metódou boli použité na ucelený dvojstupňový screening rezíduí kokcidiostatík v tkanivách hydiny.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité brojlerové kurčatá hybrid COBB 500. Kurčatá boli kŕmené komerčnými kŕmnymi zmesami (KKZ) BR1, BR2 a BR3 (DeHeus, ČR). KKZ BR1 obsahovala prídavok nikarbazínu v množstve 101 mg.kg<sup>-1</sup> a KKZ BR2 prídavok salinomycínu sodného v množstve 70 mg.kg<sup>-1</sup>. KKZ BR3 bola bez prídavku kokcidiostatika v krmive. Počas celého obdobia výkrmu mali kurčatá prístup k vode a ku krmivu *ad libitum*. Na 35. deň veku brojlerové kurčatá kŕmené KKZ BR2 a na 40. deň veku brojlerové kurčatá kŕmené KKZ BR3 boli usmrtené povoleným spôsobom a tkanivá boli zabalené, označené a skladované pri teplote -20 °C do analýzy. Na analýzu bolo použitých 12 tkanív (ľavá prsná svalovina (PSĽ), ľavá horná a dolná stehenná svalovina (SSHĽ, SSDĽ), srdce, pečeň, žalúdok, obličky, pľúca,

slezina, koža a svalovina z krídla, tuk) zo skupín brojlerových kurčiat kŕmených KKZ BR2 a BR3.

Premi<sup>®</sup>Test (R-Biopharm AG, GER) a Explorer 2.0 (Zeu-Inmunotec, ESP) sú širokospektrálne agarové difúzne testy v liekovkách s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Na prípravu vzoriek krmív na kvalitatívnu analýzu sme použili postup deklarovaný výrobcami oboch testov. Supernatant sme získali centrifugáciou krmiva rozpusteného v sterilnej demineralizovanej vode. Pomocou mikropipety sme aplikovali 100 µl supernatantu do testovacích liekoviek. Liekovky boli najskôr preinkubované pri teplote 80 °C po dobu 10 min. a následne inkubované pri teplote 65 °C po dobu 3 hod.

Ionophore EIA (EuroProxima, **R-Biopharm NL, B.V.**) je mikrotitračný kit pozostávajúci z 12 prúžkov, z ktorých každý obsahuje 8 jamiek potiahnutých králičou protilátkou proti ovčím IgG. Na prípravu vzoriek na ELISA analýzu bol použitý postup deklarovaný výrobcou testu. Supernatant získaný centrifugáciou vzorky rozpustenej v metanole sme odparili do sucha použitím mierneho prúdu dusíka pri teplote 50°C. Získaný odparok bol najskôr rozpustený v metanole, následne sme pridali PBS roztok a opätovne centrifugovali. Získaný supernatant bol použitý na analýzu. Štandardy, vzorky, protilátky a konjugát sa pridali do vopred potiahnutých jamiek. Protilátky sú viazané imobilizovanými králičími anti-ovčiami protilátkami a súčasne salinomycín-hrp a salinomycín prítomný v štandardoch alebo salinomycín a alebo narazín prítomný vo vzorkách súťažia o naviazanie na anti-salinomycínovú protilátku. Po inkubácii počas jednej hodiny sa nenaviazané činidlá odstránili v nasledujúcom kroku premývania. Množstvo naviazaného salinomycínu-HRP sa vizualizuje pridaním chromogénu. Počas inkubácie sa bezfarebný chromogén enzýmom premieňa na modrý reakčný produkt. Táto modrá farba je nepriamo úmerná množstvu naviazaného salinomycínu. Čím viac salinomycínu a/alebo narazínu je prítomných vo vzorke, tým menej sa reakčný produkt vyfarbí.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Premi<sup>®</sup>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 kokcidiostatík vo vyšetrovanej vzorke, ktorých množstvo je nad úrovňou (pozitívna vzorka), resp. na úrovni (dubiózna vzorka) detegovateľnosti testov. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných krmivách pomocou metódy Premi<sup>®</sup>Testu a Explorer 2.0 testu sú prezentované v Tabuľke 1.

Ionophore EIA: Výsledky boli stanovené na základe intenzity farby reakčného produktu. Vývoj farby sa zastaví pridaním konečného roztoku. Ihneď po jeho pridaní sa fotometrickým meraním pri 450 nm odčítajú výsledky. Výsledky post-screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných krmivách stanovené pomocou Ionophore EIA testu sú prezentované v Tabuľke 2.

**Tab. 1. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných matriciach pomocou tubových screeningových testov, Premi<sup>®</sup>Test a Explorer 2.0**

Krmivo	BR2 + SAL												
Matrica	PSĽ	SSLH	SSLĐ	SRDCE	PEČEŇ	ŽALÚDOK	OBLIČKY	PLÚCA	SLEZINA	KOŽA KRÍDLA	KOŽA SVAL	TUK	
Premi <sup>®</sup> Test	±	-	-	±	-	-	-	-	-	-	±	+	
Explorer	+	-	-	±	±	-	-	-	±	-	±	-	
Krmivo	BR3												
Matrica	PSĽ	SSLH	SSLĐ	SRDCE	PEČEŇ	ŽALÚDOK	OBLIČKY	PLÚCA	SLEZINA	KOŽA KRÍDLA	KOŽA SVAL	TUK	
Premi <sup>®</sup> Test	-	-	-	+	±	+	-	±	±	-	±	+	
Explorer	±	±	+	+	+	+	±	+	+	+	±	+	

Legenda: + pozitívna vzorka; - negatívna vzorka; ± dubiózna vzorka

Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR2+SAL sme Premi<sup>®</sup>Testom detegovali pozitívny výsledok pri jednej matrici (tuk) a dubióznu prítomnosť rezíduí pri troch matriciach (PSL, srdce, koža/sval). Explorer 2.0. testom sme v tejto skupine tkanív zachytili prítomnosť rezíduí tiež pri jednej matrici (PSL) a dubióznu prítomnosť rezíduí pri štyroch matriciach (srdce, pečeň, slezina koža/sval). Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR3 sme Premi<sup>®</sup>Testom zachytili prítomnosť rezíduí pri troch matriciach (srdce, žalúdok, tuk), ostatné tkanivá vykazovali negatívny, resp. dubiózny výsledok. Explorer 2.0 testom sme zachytili prítomnosť rezíduí pri ôsmich matriciach (PSL, srdce, pečeň, žalúdok, pľúca, slezina, koža krídla a tuk), ostatné tkanivá vykazovali negatívny, resp. dubiózny výsledok.

**Tab. 2. Výsledky stanovenia screeningu rezíduí kokcidiostatík vo vyšetrovaných matriciach pomocou Ionophore EIA**

Krmivo	BR2 + SAL											
Matrica	PSL	SSLH	SSLD	SRDCE	PEČEŇ	ŽALÚDOK	OBLIČKY	PLÚCA	SLEZINA	KOŽA KRÍDLA	KOŽA SVĽAL	TUK
ELISA (mg.kg <sup>-1</sup> )	0,030	0,044	0,046	0,045	0,163	0,059	0,079	0,045	0,157	0,125	0,191	-
Krmivo	BR3											
Matrica	PSL	SSLH	SSLD	SRDCE	PEČEŇ	ŽALÚDOK	OBLIČKY	PLÚCA	SLEZINA	KOŽA KRÍDLA	KOŽA SVĽAL	TUK
ELISA (mg.kg <sup>-1</sup> )	0,032	0,046	0,038	0,042	0,041	0,038	0,049	0,045	0,051	0,044	0,046	0,032

Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR2+SAL sme ELISA metódou zachytili prítomnosť rezíduí salinomycínu vo všetkých vyšetrovaných matriciach s výnimkou tuku. Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR3 sme ELISA metódou zachytili prítomnosť rezíduí salinomycínu pri všetkých vyšetrovaných matriciach. Vyšetrením tkanív kurčiat tubovými screeningovými testami v spojení s ELISA metódou sme potvrdili, že v skupine kurčiat kŕmených KKZ BR3 bez deklarovanej prítomnosti kokcidiostatika v krmive sme aj napriek tomu detegovali pozitívne a dubiózne výsledky, čo môže byť pravdepodobne spôsobené nedodržaním ochranej lehoty pred zabitím, zámenou krmiva, resp. krížovou kontamináciou krmiva podávaného počas ochranej lehoty.

Prepojenie tubových screeningových testov a metódy ELISA predstavuje účinný nástroj na stanovenie rezíduí kokcidiostatík v tkanivách hydiny a potvrdenie vhodnosti použitých tubových testov s preferenciou Explorer 2.0 testu na relevantný screening kokcidiostatík a ich rezíduí v rámci prvotného screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách potravinových zvierat.

*Spracovanie príspevku bolo podporené projektmi VEGA MŠVVaŠ SR a SAV č. 1/0576/17.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

[https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm\\_register\\_feed\\_additives\\_1831-03\\_annex2.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03_annex2.pdf)

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%2026%20PREMi%20test.pdf)

<http://europroxima.com/wp-content/uploads/5111IONO511.16.pdf>

# ŠTÚDIUM KULTIVOVATEĽNEJ MIKROBIOCENÓZY ZUBNÝCH BIOFILMOV U PSOV

Kačírová J.<sup>1</sup>, Maďari A.<sup>2</sup>, Nemcová R.<sup>1</sup>, Maďar M.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Klinika malých zvierat, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Nakoľko sú orálne streptokoky dominantnými baktériami v zubných biofilmoch u ľudí, cieľom našej štúdie bolo identifikovať aké streptokoky sa vyskytujú v zubnom biofilme u psov. Vzorky zubného biofilmu boli odobrané od psov malých plemien a kultivované za aeróbných a anaeróbných podmienok. Na kultiváciu bol použitý Mitis Salivarius agar a krvný agar. Pomnožené vyselektované bakteriálne kolónie boli identifikované pomocou PCR s univerzálnymi primermi (27F a 1492R) a porovnaním sekvencie 16S rRNA génu so sekvenciami dostupnými v databáze GenBank pomocou BLASTn analýzy. Na základe výsledkov identifikácie a vzájomným porovnaním sekvencií jednotlivých izolátov bol vytvorený fylogenetický strom. Z výsledkov našej štúdie vyplynulo, že na Mitis Salivarius agare sme zachytili a identifikovali *Streptococcus minor*, *Streptococcus fryi*, *Streptococcus tigurinus*, *Frederiksenia canicola*, *Rothia mucilaginosa* a *Globicatella* sp. Na krvnom agare sme zachytili a identifikovali iba jeden druh z rodu *Streptococcus* a to *Streptococcus minor*. Podarilo sa nám však zachytiť široké spektrum baktérií, konkrétne *Actinomyces coleocanis*, *Actinomyces funkei*, *Actinomyces hordeovulneris*, *Actinomyces* sp., *Arcobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Corynebacterium canis*, *Corynebacterium freiburgense*, *Globicatella* sp., *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Kingella potus*, *Neisseria animaloris*, *Neisseria dumasiana*, *Neisseria shayegani*, *Pasteurella canis*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas macacae*, *Schaalia canis* a *Staphylococcus pseudintermedius*. Výsledky preukázali prítomnosť rozmanitých kultivovateľných baktérií a bolo preukázané, že streptokoky majú svoje zastúpenie v prostredí zubných biofilmov nielen u ľudí, ale aj u psov. Štúdiu je potrebné doplniť o preskúmanie celkovej mikrobiocenózy, vrátane nekultivovateľných baktérií, a určiť pomerné zastúpenia jednotlivých skupín baktérií. Pre tento účel bude využitá metóda amplikonového sekvenovania.

## ÚVOD

Primárnymi kolonizátormi pri tvorbe zubného biofilmu u ľudí sú streptokoky, ktoré tvoria viac ako 80% skorého zubného biofilmu (Kreth a kol., 2009). Pri vývoji biofilmu dochádza k proporcionálnemu posunu a množstvo streptokokov klesá (Huang a kol., 2011). V zubnom biofilme psov sa streptokoky vyskytujú vo výrazne nižšom množstve, čo môže byť spôsobené odlišným prostredím v ústnej dutine psa. Hodnota pH slín psov je zásaditejšia ako ľudských slín, takže je menej priaznivá pre acidogénne streptokoky (Holcombe a kol., 2014). Ústna dutina psov napriek tomu skrýva bohaté a rôznorodé bakteriálne spoločenstvo. Zo slín sú najčastejšie izolované rody *Actinomyces*, *Streptococcus* a *Granulicatella* a zo zubného plaku rody *Porphyromonas*, *Actinomyces* a *Neisseria* (Elliott a kol., 2005). Pri tvorbe zubného biofilmu streptokoky súťažia o voľné väzobné miesta na povrchu zubov a sú schopné produkovať antimikrobiálne zlúčeniny, ako sú bakteriocíny a peroxid vodíka (Kreth a kol., 2008). *Streptococcus oralis* a *Streptococcus uberis* sa používajú ako orálne probiotiká aj u psov, pretože inhibujú rast parodontálnych patogénov produkciou peroxidu vodíka (Chatterjee a kol., 2011). Väčšina orálnych streptokokov sú komenzálne nepatogénne baktérie. Dva druhy zo skupiny mutans streptokokov, *Streptococcus mutans* a *Streptococcus sobrinus*, sú u ľudí považované za pôvodcov zubného kazu (Abranches a kol., 2018). U psov je zubný kaz zriedkavý, najčastejšie sa vyskytuje kaz u veľkých plemien psov ako sú labradorský retriever a nemecký ovčiak (Hale 2009). Napriek tomu, že zvieratá trpia ekvivalentnými ochoreniami ústnej dutiny ako ľudia, znalosti o zložení orálnej

mikrobiocenózy zvierat sú pomerne obmedzené (Di Bello a kol., 2014). Z tohto dôvodu je potrebné túto mikrobiocenózu detailnejšie študovať.

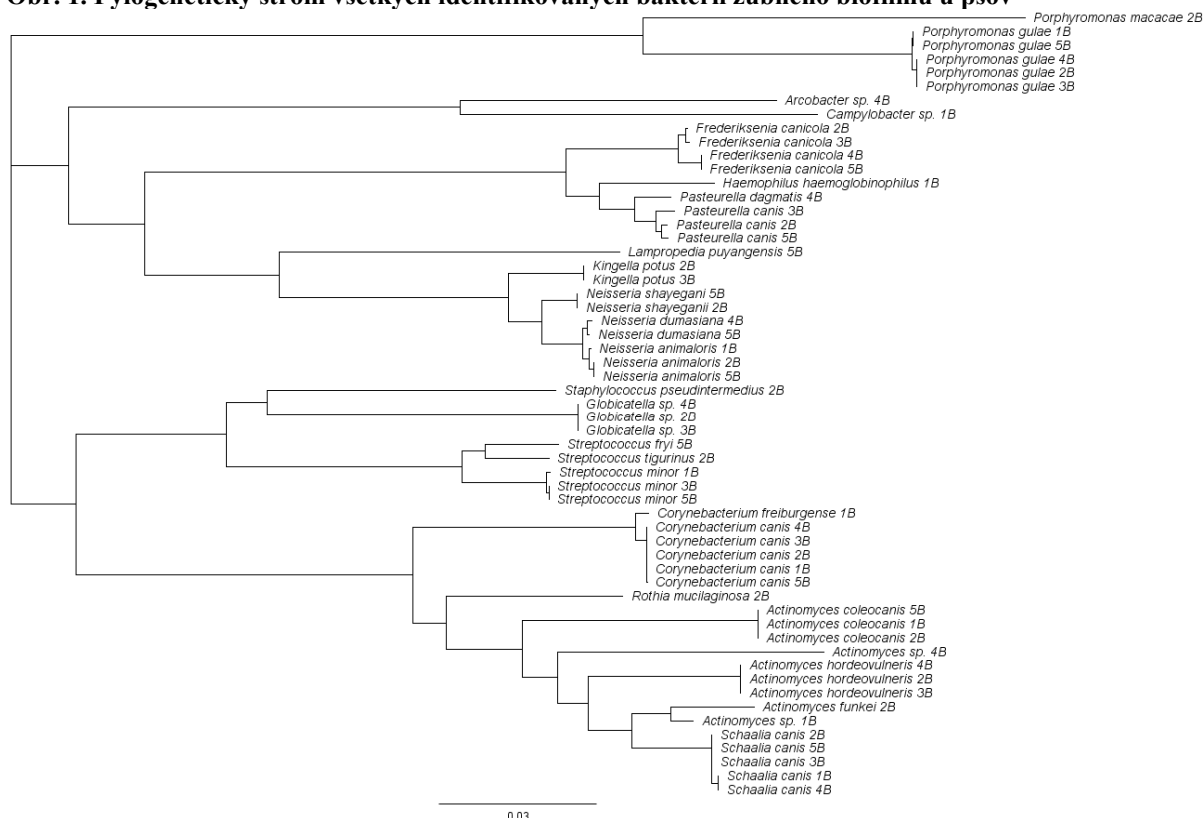
## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky zubného biofilmu boli získané od piatich psov malých plemien vo veku 1,5 až 13 rokov. Z bukálnych povrchov špičiakov a horných premolárov boli odobrané pomocou sterilnej injekčnej ihly do sterilnej Eppendorfovej skúmavky obsahujúcej 500 µl sterilného PBS. Vzorky boli homogenizované pomocou vortexu a riedené v PBS. Následne bol objem 25 µl nanosený na krvný agar (KA) obsahujúci 5% baranej krvi so základom TSA (Carl Roth GmbH, Nemecko) a Mitis Salivarius agar (MSA, Difco, USA). Vzorky boli kultivované za aeróbnych (KA, MSA) a anaeróbnych (KA) podmienok pri 37 °C. Na zabezpečenie anaeróbnej kultivácie bol použitý BBL GasPak™ Plus (Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA). Po 2 dňoch aeróbnej kultivácie a po 3 a 7 dňoch anaeróbnej kultivácie boli preočkované jednotlivé solitárne kolónie za účelom získania čistých bakteriálnych kultúr. Zo solitárnych kolónií bola izolovaná DNA s použitím DNAzol direct (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) podľa pokynov výrobcu. Gény 16S rRNA z izolátov boli amplifikované pomocou PCR na termocykléri (TProfessional Basic, Biometra GmbH, Göttingen, Nemecko) s použitím primerov 27F (5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3) a 1492R (5- CGGYTACCTTGTTACGACTT-3). Podmienky reakcie boli 5 min pri 94 °C, 30x [1 min pri 94 °C, 1 min pri 55 °C a 3 min pri 72 °C] a 10 min pri 72 °C. Alikvótne produkty PCR sa separovali pomocou horizontálnej elektroforézy v 3% agarózovom géli s pufrom Tris-acetát-EDTA (pH 7,8) a vizualizovali sa pomocou GelRed (Biotium, Inc., Hayward, CA, USA) pod UV svetlom. Produkty amplifikácie boli poslané na purifikáciu a sekvenovanie s použitím primeru 1492R (Microsynth, Rakúsko). Získané chromatogramy sekvencií s dĺžkou približne 1100 báz boli validované pomocou programu Geneious 8.0.5 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland). Následne sekvencie génov 16S rRNA boli porovnané so sekvenciami dostupnými v databáze GenBank pomocou programu NCBI Basic Local Alignment Search Tools, nucleotide (BLASTn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Po identifikácii všetkých izolátov bol vytvorený fylogenetický strom vzájomným porovnaním sekvencií jednotlivých izolátov s dĺžkou 920 báz pomocou programu Geneious 8.0.5 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na MSA kultivovanom za aeróbnych podmienok boli identifikované baktérie: *Streptococcus fryi*, *Streptococcus minor*, *Streptococcus tigurinus*, *Frederiksenia canicola*, *Rothia mucilaginosa* a *Globicatella* sp. Na KA kultivovanom za aeróbnych podmienok sme zachytili baktérie: *Streptococcus minor*, *Actinomyces coleocanis*, *Actinomyces hordeovulneris*, *Corynebacterium canis*, *Frederiksenia canicola*, *Haemophilus haemoglobinophilus*, *Lampropedia puyangensis*, *Neisseria animaloris*, *Neisseria dumasiana*, *Neisseria shayegani*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Schaalia canis* a *Staphylococcus pseudintermedius*. Na KA kultivovanom za anaeróbnych podmienok: *Actinomyces funkei*, *Actinomyces hordeovulneris*, *Actinomyces* sp., *Arcobacter* sp., *Campylobacter* sp., *Corynebacterium canis*, *Corynebacterium freiburgense*, *Globicatella* sp., *Kingella potus*, *Neisseria animaloris*, *Neisseria shayegani*, *Pasteurella canis*, *Porphyromonas gulae*, *Porphyromonas macacae*, *Schaalia canis* a *Staphylococcus pseudintermedius*. Vo všetkých vzorkách psích zubných biofilmov boli identifikované druhy *Corynebacterium canis*, *Porphyromonas gulae*, *Schaalia canis* a zástupcovia rodu *Actinomyces*. Vo väčšine vzoriek bol prítomný druh *Frederiksenia canicola* a zástupcovia rodov *Neisseria*, *Pasteurella* a *Streptococcus*. Všetky identifikované baktérie, zatriedené do skupín na základe podobnosti 16S rRNA génu, sú znázornené pomocou fylogenetického stromu (**obr. 1**).

**Obr. 1. Fylogenetický strom všetkých identifikovaných baktérií zubného biofilmu u psov**



Niektoré literárne zdroje (Sanguansermsri a kol., 2017) tvrdia, že streptokoky sa v zubných biofilmoch u psov nenachádzajú. V našich vzorkách zubného biofilmu sme identifikovali niekoľko streptokokov, konkrétne *Streptococcus minor*, *Streptococcus fryi* a *Streptococcus tigurinus*. Zistili sme, že pre štúdium streptokokov je vhodnejší MSA ako KA.

*Táto práca bola podporená v rámci riešenia projektu VEGA 1/0788/19.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abranches, J, et al. Biology of Oral Streptococci. *Microbiol Spectr.* 2018; 6(5).
- Di Bello A, et al. Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. *J Small Anim Pract.* 2014; 55(3): 160-3.
- Elliott DR, et al. Cultivable oral microbiota of domestic dogs. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11): 5470-6.
- Hale FA. Dental caries in the dog. *Can Vet J.* 2009; 50(12): 1301-4.
- Holcombe, L.J. et al. Early canine plaque biofilms: characterization of key bacterial interactions involved in initial colonization of enamel. *PLoS One.* 2014; 9(12): e113744.
- Huang R, et al. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; 2(5): 435-44.
- Chatterjee, A. et al. Probiotics in periodontal health and disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15(1): 23-8.
- Kreth J, et al. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol.* 2009;28(8): 397-403.
- Kreth J, et al. Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2008; 190(13): 4632-40.
- Sanguansermsri P, et al. Exploring difference in subgingival microbial communities in dog and human periodontal diseases using DGGE technique. *Thai J Vet Med.* 2017; 47(1): 7-14.

# CHARAKTERIZÁCIA *ESCHERICHIA COLI* IZOLOVANÝCH Z HNAČKUJÚCICH TELIAT

Karahutová L., Kmeť V.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Hnačky patria k najzávažnejším chorobám novonarodených teliat. Cieľom štúdie bola fenotypová a genotypová charakterizácia *E.coli* z rektálnych výterov hnačkových teliat a ich fylogenetické zatriedenie medzi patogénne a komenzálne kmene. Väčšina kmeňov sa klasifikovala do skupiny B1 t.j. komenzály (13/31), pričom obsahovali intimín *eaeA* v kombinácii CNF1, CNF2 a *papC*. Detegovali sme aj nekrotoxigénne kmene *E.coli* (NTEC) s génmi CNF1, CNF2 a *papC*, ktoré patrili do skupiny A (komezály) a skupiny C, ktorá sa zaraďuje skôr ku enviromentálnemu zdroju. Zaznamenali sme výskyt kmeňov s génmi verotoxínu *vt2*, STI (termo-stabilným toxínom) v kombinácii s *eaeA* a *papC*. Patogénne kmene (8/31) zaradené do skupiny D a B2 vykazovali vyššiu rezistenciu na antimikrobiálne látky na rozdiel od komenzálnych skupín s prevládajúcou rezistenciou na ampicilín, ampicilín + sulbaktám a tetracyklín. Taktiež sa u všetkých týchto kmeňoch detegoval integrón *int1* a transpozóm *tn3*, ktoré sa zaraďujú k mobilným genetickým elementom spájanými s antimikrobiálnou rezistenciou u *E.coli*. Zaujímavým faktom pri tejto skupine bola detekcia kmeňov len s génom *papC*, ktorý je typický pre aviárne kmene *E.coli* (APEC). Výsledky poukazujú na fakt, že pri hnačkách teliat sa môžu vyskytovať kmene s rôznymi neobvyklými kombináciami génov virulencie. Práca je príspevkom k zlepšeniu diagnostiky patogénnych *E.coli*.

## ÚVOD

Najviac úhynov v dôsledku hnačky sa vyskytuje počas prvých dvoch týždňoch života a ich infekčnou príčinou sú hlavne *E.coli*, koronavírusy, rotavírusy či kryptosporídie (Lorenz a kol., 2011). Hnačky teliat sú spájané s viacerými patotypmi *E. coli*. Najčastejšie sú to enterotoxigénne *E. coli* (ETEC) (Franck a kol., 1998), ktoré produkujú termostabilné a/alebo termolabilné toxíny. Tie sa adherujú na enterocyty tenkého čreva čo vedie k deregulácii mechanizmov iónového transportu a zmene osmotického gradientu výsledkom ktorých je profúzna vodnatá hnačka. Enteropatogénne (EPEC) a enterohemoragické (EHEC) *E.coli* sú tiež bežné, ale nie sú pre hovädzí dobytok (HD) tak patogénne. V skupine EHEC sú veľmi dôležité kmene produkujúce verotoxíny (VTEC), ktoré spôsobujú závažné ochorenie u ľudí a HD slúži ako rezervoár týchto kmeňov. VTEC sa izolovali z teliat s hnačkou (10% z hnačkových teliat mladších ako 2 týždne), ale detegujú sa aj u teliat bez nej (16%) (Kang a kol., 2004). Ďalšie patotypy, ktoré sa detegovali v súvislosti s hnačkou teliat boli enteroinvazívne (EIEC), enteroadherentné (EAEC) či nekrotoxigénne (NTEC) kmene *E. coli*.

## MATERIÁL A METODIKA

Z 31 rektálnych výterov teliat bolo vyizolovaných 31 kmeňov *E. coli*. Fylogenetické zatriedenie do patogénov a komenzálov sa určilo na základe metodiky Clermont a kol., (2013). Testovanie antimikrobiálnej citlivosti sa vykonalo s použitím komerčného kitu firmy Bel-MIDITECH, Bratislava a vyhodnotilo na základe EUCASTu (EUCAST, 2019). V antibiotickom paneli boli použité antimikrobiálne látky: ampicilín (AMP); ampicilín + sulbaktám (SAM); piperacilín + tazobaktám (TZP); cefuroxim (CXM); cefotaxim (CTX); cefotaxim + klavulanát (CTC); ceftazidín (CAZ); ceftazidím + klavulanát (CAC); cefoper + sulbaktám (SPZ); cefepim (FEP); ertapeném (ETP); meropeném (MEM); gentamicín (GEN); tobramycín (TOB); amikacín (AMI); tigecyklín (TGC); ciprofloxacín (CIP); tetracyklín (TET); kolistín (COL) a trimetoprim + sulfónamid (COT). Skríning génov rezistencie pozostával z génov kódujúcich rezistenciu na kolistín (*mcr1*, *mcr2*; Wang a kol., 2019); tetracyklín (*tetA*, *tetB*; Guillaume a kol., 2000); ampicilínázovú rezistenciu (CIT- Pérez-Pérez a kol., 2002) a gény kódujúce integrón (*int1*; Mazel a kol., 2000) a transpozóm (*tn3*; Weill a kol., 2004). Detekcia génov virulencie (Pass a kol., 2000) obsahoval termo-labilné (LTI, LTII) a tepelne termo -stabilné (STI, STII) enterotoxíny; verotoxíny 1, 2 (VT1, VT2); cytotoxické nekrotizujúce faktory (CNF1, CNF2); intimín (*eaeA*); enteroagregačné mechanizmy (*Eagg*); enteroinvazívne mechanizmy (*EinV*) a gén pre P fimbrie - *papC* (Le Bouguéneć a kol., 1992).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Tab.č.1. Prevalencia génov virulence, rezistencie a fenotypovej antimikrobiálnej rezistencie s hodnotami MIC (mg/L) u získaných izolátov *E.coli* pochádzajúcich z hnačkujúcich teliat.**

Kmene	Fylo.sk.	Gény virulence a rezistencie	ATB rezistencia
010319 EC 5A	A	eaeA/papC	citl
270219 EC 12	A	cnf1/cnf2/papC	citl
270219 EC 21	B1	vt2	citl
010319 EC 1B	B1		citl
270219 EC 20	B1	eaeA/papC	citl
270219 EC 27	B1	eaeA/papC	AMP (32), TET (16), COT (4)
270219 EC 24	B1	eaeA/papC	AMP (16), TET (16), COL (8), CTX (8) ESBL CTX-M
010319 EC 2B	B1	cnf1/cnf2	TET, COL (2)
010319 EC 4B	B1	cnf1/cnf2/eaeA	citl
010319 EC 5B	B1	cnf1/cnf2/eaeA	citl
270219 EC 16	B1	cnf1/cnf2/eaeA	citl
270219 EC 13	B1	cnf1/cnf2/vt2	citl
270219 EC 10	B1	cnf1/cnf2/papC	COL (8)
270219 EC 14	B1	cnf1/cnf2/papC/eaeA	TET (16)
270219 EC 15	B1	cnf1/cnf2/papC/vt2	TET (16)
270219 EC 11	C		citl
010319 EC 1A	C		citl
010319 EC 3B	C	cnf1/cnf2	TET, COL (2)
010319 EC 4A	C	cnf1/cnf2	TET
010319 EC 2A	C	cnf1/papC	TET
010319 EC 3A	C	cnf1/papC/eaeA	TET
270219 EC 19	B2	papC	AMP (32), SAM (8), TET (16)
270219 EC 23	D	papC	AMP (32), SAM (8), TZP (32)
270219 EC 17	D	papC	AMP (32), SAM (32), CXM (32), CTX (4), CTC (16), CAZ (0,25), CAC (0,25), TET (16), COT (4)
270219 EC 18	D	papC	AMP (2), TET (16)
270219 EC 30	D	papC	AMP (32), SAM (16), TZP (6), CTX (4)
270219 EC 25	D	papC/eaeA	AMP (32), TET (16), COT (4)
270219 EC 29	D	papC/eaeA/st1	citl
270219 EC 26	D	papC/eaeA/st1	COL (8)
270219 EC 32	E	papC	citl
270219 EC 31	E	papC/eaeA/vt2	AMP (16), TET (8) COT (4)

Zhrnutie kompletných výsledkov práce prezentuje tabuľka č. 1 (tab.č.1). Najčastejšie sa kmene *E.coli* získané z hnačkujúcich a zdravých teliat zaraďujú do fylogenetickej skupiny B1 (34 – 50%), čo sa potvrdilo aj pri našich izolátoch (B1 - 13/31; 42%), kým pri extraintestinálnych infekciách sa skôr detegujú patogénne skupiny D a B2 (Carlos a kol., 2010). Podobné výsledky sa potvrdili aj pri iných štúdiách (Ishii kol., 2007; Mora a kol., 2012). Antimikrobiálna rezistencia sa prejavila skôr u kmeňov patriacich do patogénnych skupín *E.coli* (B2/D), kde sa vyskytli kmene aj s multirezistenciou (rezistencia na 3 a viac skupín antimikrobiálnych látok) a u všetkých bol prítomný gén kódujúci integrón (*int1*) a transpozóm (*tn3*). Najčastejšia rezistencia izolátov bola na tetracyklín (13/31) a ampicilín (9/31), čo je porovnateľné s inými štúdiami (Kmeť a Bujňáková, 2018) a súvisí predovšetkým s cenovou dostupnosťou liekov. U dvoch kmeňov sme zachytili fenotypovú rezistenciu na kolistín, avšak génovo potvrdená nebola. Celkovo sme detegovali 13 kmeňov citlivých na všetkých 20 testovaných látok, čo je pozitívne zistenie. U väčšiny kmeňov sa detegoval intimín *eae*, ktorý má súvis s deštrukciou mikrovillov a následnou nedostatočnou absorpciou v čreve, ktorá vedie k hnačke. Pri kmeňoch sme zaznamenali kombinácie génu *eaeA* s CNF1/CNF2, či dokonca v kombinácii s génom *papC* a *vtx*. NTEC produkujú CNF1/CNF2 a spôsobujú infekcie močového traktu, septikémiu a hnačky u zvierat a ľudí (Orden a kol., 2002). Gén CNF1 je asociovaný s ostrovom patogenity, ktorý kóduje klaster génov *pap*, zvlášť gén *papC*. Podobne ako u nás, Van Bost a kol., 2003, izolovali kmene s génom *papC* aj u CNF2, resp. CNF1/CNF2 súčasne. Zaujímavým výsledkom bola detekcia kmeňov len s génom *papC*, ktorý súvisí s aviárnymi kmeňmi (APEC) a zaraďuje sa k extraintestinálnym EC. Kmene s týmto génom sa izolovali ako zo zdravých tak aj hnačkujúcich teliat (Bertin a kol., 1998) a spolu s výskytom génu CNF predstavujú riziko pre humánnu populáciu ako pôvodcovia uropatogénnych infekcií (UPEC). Mnohé štúdie demonštrujú asociáciu medzi prítomnosťou verotoxínu a intestinálnym ochorením prežúvavcov (Kang a kol., 2004). Vyššia prevalencia kmeňov pozitívnych pre *eae* a *vt1* sa zisťuje u hnačkujúcich teliat (Osek a kol., 2000), kým *vt2* pozitívne a *eae* negatívne u zdravých (Gyles a Fairbrother; 2004) avšak nie je to pravidlom. Analýza dát odhaľuje fakt, že prítomnosť *vt1/vt2* + *eaeA* varíruje v závislosti od skupín teliat a ich veku. V našom prípade hnačkujúcich teliat sme našli práve *vt2* pozitívne kmene so zaujímavou kombináciou s CNF1/CNF2. ETEC sa zaraďujú k hlavným príčinám hnačky u novonarodených teliat



(Franck a kol., 1998). U novonarodených teliat sa zvyčajne častejšie deteguje termostabilný enterotoxín ST1 s nízkou molekulárnou hmotnosťou (Naylor, 2002), ktorý sme detegovali aj my, ale len u dvoch kmeňv. Obe boli pozitívne pre intimín *eaeA*. Tieto výsledky poukazujú na fakt, že pri hnačkách teliat sa môžu vyskytovať kmene s rôznymi neobvyklými kombináciami génov virulencie, ktoré sa následne môžu prejavíť v súvislosti s neinfekčnými príčinami.

*Táto práca bola podporená slovenským grantom VEGA 2/0085/18 a APVV-16-0171. Autori ďakujú MVDr. Zuzane Besson za poskytnutie vzoriek.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bertin Y, et al. Contrepolis, M. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. FEMS Microbiol. Lett. 1998;162:235–239.
- Carlos C, et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiol. 2010; 10:161.
- Clermont O, et al. The Clermont *Escherichia coli* Phylo Typing Method Revisited: Improvement of Specificity and Detection of New Phylo-Groups. Environ. Microbiol. Reports 2013, 5, 58–65. DOI:10.1111/1758-2229.12019.
- Franck, SM, Bosworth, BT, Moon, HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from calves. J Clin Mic, 1998; 36 (6): 1795-1797.
- Guillaume G, et al. PCR Typing of Tetracycline Resist Ance Determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* Serotype Hadar and in the Microbial Community of Activated Sludges from Hospital and Urban Wastewater Treatment Facilities in Belgium. FEMS Microbiol. Ecol. 2000; 32:77–85.
- Gyles CL. & Fairbrother, J.M. *Escherichia coli*. In: Gyles CL et al (eds) Pathogenesis of bacterial infections in animals, 3rd edn. 2004, Wiley, New York.
- Ishii S, Meyer KP, Sadowsky MJ. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 5703–5710.
- Kang SJ, et al. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. Veterinary Microbiology. 2004; 98(3–4):323–328.
- Kmeť V, Bujňáková D. Antimicrobial resistance *Escherichia coli* isolated from calves. J Microbiol Biotech Food Sci. 2018; 7(4): 412-415.
- Le Bouguéneć 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. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(5):1189–1193.
- Lorenz I, Fagan J, More SJ. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhea in pre-weaned calves. Irish Vet J. 2011; 64(1): 9.
- Mazel D, et al. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel aad Gene. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44:1568–1574.
- Mora A, et al. Seropathotypes, phylogroups, stx subtypes, and intimin types of wildlife-carried, shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains with the same characteristics as human-pathogenic isolates. Appl Environ Microbiol. 2012; 78: 2578–85.
- Naylor JM. Neonatal ruminal diarrhea .In: Smith, B.P .Large Animal Internal Medicine. 2002; 3:352-366.
- Orden JA, et al. Verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and necrotoxicogenic *E. coli* (NTEC) isolated from healthy cattle in Spain. J. Appl. Microbiol. 2000; 93: 29-35.
- Osek J, Gallien P, Protz D. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from calves in Poland. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2000; 23:267–276
- Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence Genes. Journal of Clinical Microbiology. 2000; 38 (5):2001-2004.
- Pérez-Pérez PJ. Hanson, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC beta-Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 2002; 40: 2153–2162.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>
- Van Bost S, et al. Multiplex PCRs for identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41: 4480-4482.
- Wang X, et al. Emergence of Colistin Resistance Gene mcr-8 and Its Variant in *Raoultella ornithinolytica*. Front. Microbiol. 2019; 10:228.
- Weill FW, et al. Extended-Spectrum-beta-Lactamase (TEM-52) Producing Strains of *Salmonella enterica* of Various Serotypes Isolated in France. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(3): 3359–3362.

# PALMÁRNA SUBLUXÁCIA KORUNKOVÉHO KLĽBU U ŽRIEBÄT

Koľvek F.<sup>1</sup>, Žert Z.<sup>1</sup>, Nosál S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika koní, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Súkromný veterinárny lekár, Baška

## ABSTRAKT

Subluxácia korunkového kĺbu je stav, ktorý môže postihovať mladé aj staršie kone a prezentovať sa v dorzálnom alebo palmárnom/plantárnom smere. Subluxácia je dôsledkom zlyhania palmárných resp. plantárných štruktúr. Artrodézia proximálneho interfalangeálneho kĺbu predstavuje niekedy jediné riešenie indikované v prípadoch osteoartritídy, subluxácie alebo fraktúr u koní. Na našej klinike sme hospitalizovali dve žriebäta s klinickými príznakmi poukazujúcimi na patológiu v korunkovom kĺbe. Röntgenologickým vyšetrením bola v oboch prípadoch potvrdená subluxácia korunkového kĺbu. Chirurgické riešenie stavu bolo prevedené v jednom prípade, v druhom sme sa pokúsili o konzervatívny spôsob. Chirurgický zákrok predstavoval použitie troch 4,5 mm kortikálnych ťažných skrutiek. Dve skrutky boli umiestnené abaxiálnym smerom štandardným transartikulárnym spôsobom z dorzálnej časti sponkovej kosti do palmárnej časti korunkovej kosti. Tretia transartikulárna ťažná skrutka smerovala z dorzálnej časti korunkovej kosti do palmárnej časti sponkovej kosti. Žriebä bolo schopné po zákroku stáť a pohybovať sa bez závažných komplikácií. V druhom prípade sme stav riešili konzervatívne vzhľadom na finančné limity majiteľa, čo však trvalo pomerne dlho a v konečnom dôsledku bola pozorovaná mierna subluxácia. Z nášho pohľadu sa stabilizácia korunkovej a sponkovej kosti artrodéziou použitím troch skrúžených transartikulárných ťažných skrutiek javí ako jednoduchá a užitočná metóda pre dosiahnutie dobrej stability a budúcej atletickej výkonnosti u žriebät resp. mladých koní.

## ÚVOD

Proximálny interfalangeálny kĺb (*articulatio interphalangea proximalis manus*) u koní je sedlový kĺb, málo pohyblivý ("low motion"), diartrodialny kĺb s obmedzeným rotačným a bočným pohybom, ktorý je adaptovaný na znášanie silnej tlakovej záťaže pri dopade končatiny na zem, kedy slúži spoločne so sponkovým kĺbom k tlmeniu energie dopadu. (Keiner, 2002). Luxácia proximálneho interfalangeálneho kĺbu (korunkový kĺb, PIPJ) je zriedkavý stav vyskytujúci sa v mediálnom/laterálnom alebo palmárnom/plantárnom smere. Palmárna/plantárna luxácia vzniká pri závažnom traumatickom poškodení mäkkých štruktúr, ako je kompletne roztrhnutie priameho sezamského väzu, vetiev SDFT alebo kombinácia týchto poranení (Baxter, 2011). Výskyt subluxácie PIPJ je častejší a orientuje sa v dorzálnom alebo palmárnom/plantárnom smere. Dorzálna subluxácia ("Thoroughbred ringbone"; krúžok teplokrvníkov) je výsledkom porušenia medzikostného svalu a jeho terminálnych extenzorových vetiev, to je príležitostne spôsobené kontraktúrou distálnych sezamských väzov. Subluxácia je dôsledkom zlyhania palmárneho/plantárneho podporného spojivového tkaniva ako sú distálne sezamské väzy, *scutum medium* a úpon SDFT. Tento stav sa prejavuje výraznou hyperextenziou PIPJ a značným opuchom spojeným s prerušením mäkkých tkanív (Auer a kol., 2019). Klinické príznaky spojené s dorzálnou a palmárnou/plantárnou subluxáciou zahŕňajú najprv akútne krívanie, dorzálny opuch pri dorzálnej subluxácii, hyperextenziu korunkovej oblasti a pokles sponkového kĺbu pri palmárnej/plantárnej subluxácii. Na potvrdenie diagnózy je nutné vykonať röntgenologické vyšetrenie (Auer a kol., 2019). Terapeutickými možnosťami riešenia tohto problému je konzervatívny spôsob alebo chirurgická intervencia predstavujúca použitie špeciálnych kostných implantátov.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Výber pacientov*

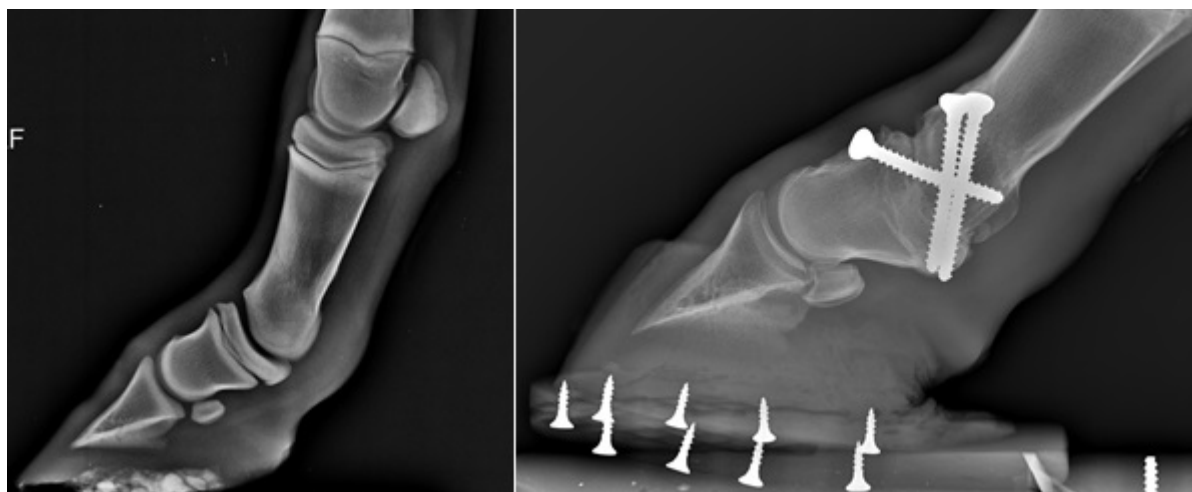
V predmetnom článku popisujeme klinické prípady postihnutia korunkového kĺbu riešené konzervatívne a chirurgicky. Na Klinike koní boli v rokoch 2017-2018 hospitalizovaní dvaja pacienti s palmárnou subluxáciou v korunkovom kĺbe, ktorí boli referovaní súkromným veterinárnym lekárom. Chirurgický zákrok bol vykonaný u 3-mesačnej kobyly plemena Slovenský teplokrvník s hyperextenziou korunkovej oblasti a poklesom sponkového kĺbu ľavej hrudníkovej končatiny (Obr. č. 1). U druhého pacienta, 5-mesačnej kobyly Slovenského teplokrvníka s palmárnou subluxáciou v korunkovom kĺbe pravej hrudníkovej končatiny, sme vzhľadom na finančné limity majiteľa pristúpili ku konzervatívnej liečbe.

### *Chirurgický postup*

Operácia bola vykonaná v celkovej anestézii v laterálnej polohe. Po aseptickej príprave operačného poľa bola v tvare obráteného písmena „V“ približne 2 cm proximálne od korunkového okraja incidovaná koža, podkožie a šľacha spoločného ňahovača prsta pre sprístupnenie PIPJ. Následnou transekciou mediálneho a laterálneho kolaterálneho väzu došlo k disartikulácii PIPJ, kyretáž kĺbovej chrupavky sponkovej a korunkovej kosti nasledovaná osteostixiou subchondrálnej kosti zabezpečili prístup vaskulárnych a celulárnych elementov podporujúcich hojenie kosti. Po reponovaní kostí v neutrálnej polohe nasledovala fixácia sponkovej a korunkovej kosti 2 abaxiálnymi ťažnými 4,5 mm kortikálnymi skrutkami umiestnenými dorzoproximálnym - palmarodistálnym smerom a jednou axiálne aplikovanou 4,5 mm skrutkou dorzodistálne - proximopalmárne z korunkovej do sponkovej kosti. Uzatvorenie jednotlivých vrstiev (šľacha, koža) vykonané štandardným spôsobom. Distálna časť končatiny bola fixovaná fixačným obvazom-kastom s podložením pätkovej oblasti. Postoperačná starostlivosť spočívala v aplikácii antibiotík a nesteroidných antiflogistík po dobu niekoľkých dní, odstránení fixačného obväzu po 14 dňoch od operácie a röntgenologickom posúdení integrity implantátov (Obr. č. 1). Nasledujúce dni bol vykonávaný previaz končatiny 2-vrstvovou bandážou v pravidelných intervaloch. Pre dosiahnutie palmárnej extenzie sme nasadili na chodidlovú plochu kopyta Dallmerovu podkovu a po 2 mesiacoch hospitalizácie bolo žriebä prepustené.

U druhého pacienta nebolo ani po 4 mesiacoch konzervatívnej liečby pozorované výrazné zlepšenie, keďže na kontrolnom röntgenologickom vyšetrení sme pozorovali mierny stupeň palmárnej subluxácie.

**Obr. 1** Vľavo - palmárna subluxácia PIPJ u 3-mesačnej kobyly, vpravo – artrodézia PIPJ tromi ťažnými skrutkami v skríženom smere.



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vykonanie nami popísanej metódy artrodézie, chirurgického zákroku spočívajúceho vo fúzii dvoch kĺbových plôch použitím dvoch abaxiálnych a jednej skríženej skrutky sa ukázalo ako spoľahlivá metóda liečby sublúxie PIPJ. U obidvoch žriebät potvrdilo röntgenologické vyšetrenie v lateromediálnej polohe palmárnu sublúxiu PIPJ hrudníkových končatín. V prvom prípade po vykonaní chirurgického zákroku žriebä úplne zaťažovalo končatinu ale mierne krívalo. Po 14 dňoch bol fixačný obväz odstránený a stabilita konštrukcie posúdená klinicky a röntgenologickým vyšetrením. Distálna časť končatiny bola mierne opuchnutá, na palmárnej ploche sponky prítomná tlaková nekróza kože, mierny pokles sponkového kĺbu s eleváciou hrotu kopyta. Tento stav bol riešený či už lokálne použitými antibiotikami v prípade otlaku tak aj aplikovaním Dallmerovej podkovy na chodidlovú plochu pre zabezpečenie potrebnej extenzie. Kompletná fúzia kĺbu bolo potvrdená röntgenologicky 7 týždňov po operácii, kedy bol pacient prepustený, avšak chirurgické implantáty boli ponechané.

U druhého pacienta nebolo ani po 4 mesiacoch konzervatívnej liečby pozorované výrazné zlepšenie, keďže na kontrolnom röntgenologickom vyšetrení sme pozorovali mierny stupeň palmárnej sublúxie.

Vykonanie artrodézie PIPJ u žriebät resp. mladých koní je otázne v súvislosti s nepredpovedateľným výsledkom alebo návratom do pôvodného stavu. Avšak prvý prípad poukazuje na pozitívny dlhotrvajúci výsledok artrodézie vykonanej v mladom veku. Uvedomujúc si radikálnosť tejto metódy, je možné týmto spôsobom aj vzhľadom na pohyblivosť PIPJ zabezpečiť plnohodnotný návrat do atletickej výkonnosti. Chirurgický prístup v tvare invertovaného „V“ cez kožu a šľachu v porovnaní so štandardným prístupom v tvare „T“ (Auer a kol., 2006), ktorý bol prvý krát prezentovaný Žertom a kol. (2013) dáva predpoklady na lepšie hojenie chirurgickej rany v oblasti korunkového okraja. Takisto aplikácia dvoch abaxiálnych a jednej skríženej skrutky predstavuje dostatočne pevnú konštrukciu a kompresný efekt. Naproti tomu použitie kostných platničiek v mladom veku predstavuje robustnú konštrukciu a možnú kompresiu resp. iritáciu dôležitých štruktúr v dorzálnnej oblasti.

Použitie rovnakej metódy artrodézie u dospelých koní by sa mohlo uplatniť, avšak existujú limitácie v podobe proximálneho korunkového okraja a rohového puzdra, ktoré by znemožnili umiestnenie axiálnej skrutky. Z tohto hľadiska by bolo zaujímavé experimentálne a röntgenologicky nájsť vekové obmedzenie pre použitie tohto chirurgického zákroku u starších koní.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Auer JA, et al. (ed.): Equine surgery. 5th ed., W.B. Saunders Co., 2019
- Auer JA, Stick J. A.: Arthrodesis techniques. Equine Surgery. 3rd ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2006, 1073–1086.
- Baxter Gary M. (ed.). Adams and Stashak's lameness in horses. 6th ed., John Wiley & Sons, 2011, ss. 953-993.
- Keiner RA. Functional anatomy of equine locomotor organs. In: Ed. Stashak, T. S. Ed.: Adam's Lameness in the Horses. 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2002, ss. 1-73
- Zert Z, et al. Pastern joint arthrodesis using two paraaxial and one axial crossed lag screws: a case report. Veterinarni Medicina, 2013, 58.6: 322-326

# BIO-MECHANOCHEMICKÁ SYNTÉZA STRIEBORNÝCH NANOČASTÍC POMOCOU RASTLÍN A ICH ANTIBAKTERIÁLNA AKTIVITA

Kováčová M.<sup>1</sup>, Daneu N.<sup>2</sup>, Tkáčiková L.<sup>3</sup>, Baláž M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav geotechniky, SAV, Košice

<sup>2</sup> Oddelenie moderných materiálov, Ústav Jožefa Stefana, Lubľana

<sup>3</sup> Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Kombinácia mechanochemie a biologickej syntézy na báze rastlín bola využitá na prípravu strieborných nanočastíc (Ag NPs). Dusičnan strieborný ( $\text{AgNO}_3$ ) plnil funkciu strieborného prekursora a rastliny dúška tymianová (*Thymus vulgaris* L., TYM), dúška materina (*Thymus serpyllum* L., SER) a baza čierna (*Sambucus nigra* L., SAM) slúžili ako redukčné činidlá. Experimenty sa realizovali v planetárnom mlyne pri rozdielnych hmotnostných pomeroch  $\text{AgNO}_3$ :rastlina (1:1, 1:10, 1:50 a 1:100). Úspešná syntéza Ag NPs bola potvrdená röntgenovou difrakčnou analýzou (RTG). Získané prášky boli následne premývané s cieľom zastavenia spätnej transformácie  $\text{Ag}^0$  na  $\text{AgNO}_3$ . Analýza pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM) ukázala tvorbu častíc prevažne s guľovitým tvarom o dvoch rôznych veľkostiach- väčšie mali veľkosť asi 40 nm a menšie do 10 nm. Antibakteriálne vlastnosti vzoriek boli sledované pomocou platňovej agarovej difúznej metódy na dvoch vybraných bakteriálnych druhoch. Antibakteriálna aktivita sa potvrdila pre všetky študované vzorky s pomerom  $\text{AgNO}_3$ :rastlina 1:1, pričom najvyššia bola pre NPs pripravené pomocou SER.

## ÚVOD

Na syntézu strieborných nanočastíc sa v súčasnosti využíva viacero metód. Najviac pozornosti sa venuje biologickým alebo inak nazývaným zeleným metódam, kde prírodné materiály (väčšinou rastlinné extrakty) plnia funkciu redukčných činidiel. Týmto spôsobom bola použitá aj dúška tymianová (*Thymus vulgaris* L., Jafari a kol., 2015). Na rozdiel od nej, príbuzné rastliny dúška materina (*Thymus serpyllum* L.) a baza čierna (*Sambucus nigra* L.) sú pri príprave strieborných nanočastíc využívané menej. Tuhofázový prístup s využitím mechanochemie predstavuje zaujímavú alternatívu, pretože je možné pripraviť stabilné nanočastice aj pri laboratórnych podmienkach a vyšších východiskových koncentráciách dusičnanu vedúcich k výbornej antibakteriálnej aktivite (Baláž a kol., 2017), čo je ťažko dosiahnuteľné pri klasickej zelenej syntéze.

## MATERIÁL A METODIKA

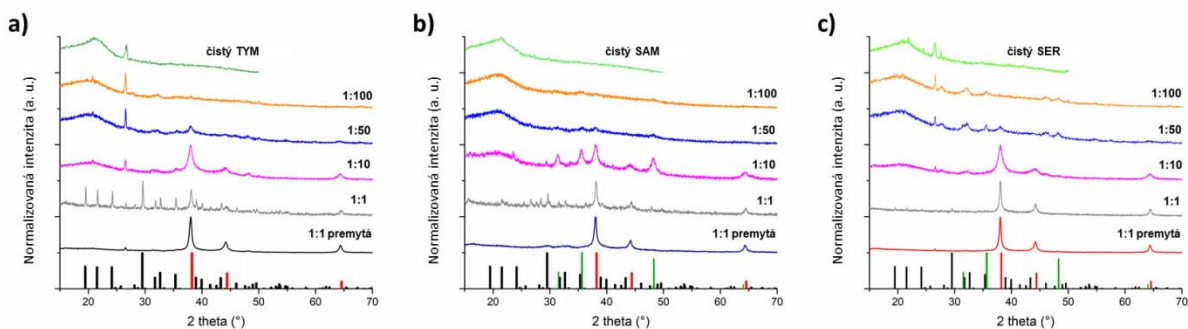
Na syntézu bol použitý dusičnan strieborný (Centralchem, Slovensko) a vysušené rastliny zo záhrady liečivých rastlín v areáli UVLF. Na bio-mechanochemickú syntézu bol použitý planetárny mlyn Pulverisette 7 premium line (Fritsch, Nemecko) pri nasledovných podmienkach: mlecí čas 2 hodiny, rýchlosť mletia 500 otáčok/min., hmotnostný pomer guľôčok voči prášku 37, 15 ks WC guľôčok s priemerom 10 mm, mlecia komora z WC s objemom 45 ml, atmosféra vzduch. Pri mletí sa použili rôzne pomery  $\text{AgNO}_3$ :rastlina (1:1, 1:10, 1:50 a 1:100), celková hmotnosť vzorky bola 3 g. Jeden gram mletím získaných vzoriek bol premývaný 100 ml destilovanej vody s cieľom odstránenia nadbytočného  $\text{AgNO}_3$ . Produkty boli charakterizované röntgenovou difrakčnou analýzou difraktometrom D8 Advance (Bruker, Nemecko) a transmisnou elektrónovou mikroskopiou s využitím 200 kV mikroskopu JEM 2100 (JEOL, Japonsko). Pre výpočet veľkostí častíc bol využitý softvér Fityk (Wojdyr, 2010) a Scherrerova rovnica. Testovanie antibakteriálnych vlastností bolo vykonané platňovou agarovou difúznou metódou s malou obmenou postupu uvedeného v zdroji (Rojas a kol., 2006). Vzorky boli inokulované vo forme suspenzií (20 mg vzorky do 1 ml destilovanej vody), ako pozitívna kontrola bol použitý gentamycín (30  $\mu\text{g/l}$ ). Testované

baktérie *Staphylococcus aureus* CCM 4223 a *Escherichia coli* CCM 3988 boli získané z Českej zbierky mikroorganizmov (CCM), Brno.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

RTG analýza bola využitá pri sledovaní vzniku Ag NPs pri rôznych hmotnostných pomeroch  $\text{AgNO}_3$ :rastlina. Získané RTG záznamy sú na Obr. 1 spolu so záznamami rastlín. V prípade vzorky Ag:TYM 1:1 sú viditeľné píky pre  $\text{AgNO}_3$  aj pre elementárne striebro. Zo všetkých analyzovaných vzoriek sú píky  $\text{AgNO}_3$  najintenzívnejšie a najpočetnejšie pre túto vzorku, čo znamená, že reakcia nie je úplne ukončená ani po dvoch hodinách mletia. Vo vzorke Ag:SAM 1:1 sú prítomné píky zodpovedajúce  $\text{AgNO}_3$ , ktoré sú ale podstatne nižšie ako vo vzorke Ag:TYM 1:1. Vo vzorke Ag:SER 1:1 sú píky  $\text{AgNO}_3$  ťažko detekovateľné, ale píky pre striebro najvyššie, čo znamená, že syntéza pomocou tejto rastliny prebehla najlepšie. V prípade vzoriek Ag:TYM/SAM/SER 1:10 už nie sú píky  $\text{AgNO}_3$  viditeľné a dominujú signály pre kubické elementárne striebro. Vo vzorkách s vyšším množstvom rastlinného materiálu sú prítomné aj píky zodpovedajúce rastlinnému matrixu. V prípade vzoriek Ag:SAM 1:10, Ag:SER 1:50 a 1:100 sú v RTG záznamoch prítomné aj ďalšie signály pri  $31,4^\circ$ ,  $35,5^\circ$  a  $48,1^\circ$ , ktoré prislúchajú karbidu volfrámu prítomnému v dôsledku oteru z mlecích guľôčok a komory.

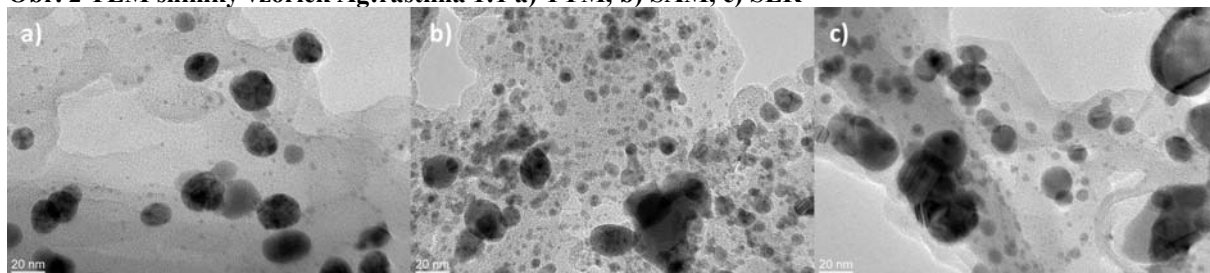
Obr. 1 RTG záznamy mletých zmesí a samotných rastlín a)  $\text{AgNO}_3$ :TYM, b)  $\text{AgNO}_3$ :SAM, c)  $\text{AgNO}_3$ :SER



Po čase sme RTG meranie zopakovali a zistili sme, že vo vzorkách Ag:TYM/SAM/SER 1:1 dochádza k spätnej transformácii  $\text{Ag}^0$  na  $\text{AgNO}_3$ . Aby sme tomuto javu zabránili, rozhodli sme sa vzorky premyť a odstrániť tak nadbytočný  $\text{AgNO}_3$ . Po premytí už RTG záznamy vzoriek neobsahovali difrakcie zodpovedajúce  $\text{AgNO}_3$  a zostali prítomné iba tie, ktoré zodpovedajú  $\text{Ag}^0$  a k spätnej transformácii už nedochádzalo. RTG záznamy pre vzorky s pomerom 1:1 po premytí boli analyzované pomocou softvéru Fityk a následne bola pre ne pomocou Scherrerovej rovnice vypočítaná približná veľkosť častíc. Pre Ag:TYM bola stanovená na 32 nm, pre Ag:SAM 30 nm a pre Ag:SER 35 nm.

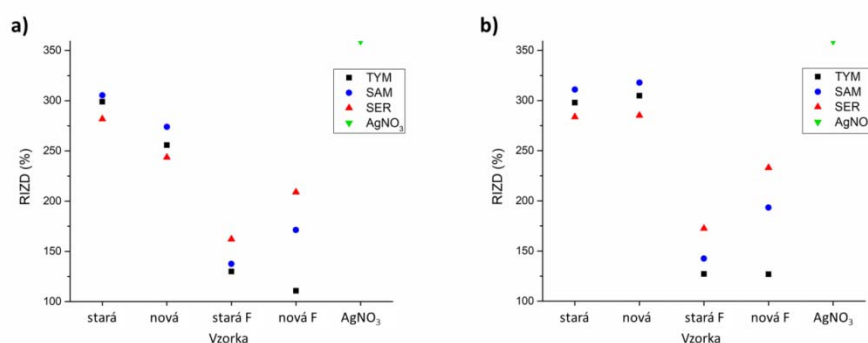
Pomocou transmisnej elektrónovej mikroskopie (TEM) sme pozorovali morfológiu pripravených nanočastíc, ktoré boli prevažne guľovitého tvaru (Obr. 2). Vo všetkých vzorkách Ag:TYM/SAM/SER 1:1 sme pozorovali dve skupiny Ag NPs. Väčšie z nich mali veľkosť asi 40 nm a menšie do 10 nm. Získané výsledky sú približne v zhode s výsledkami z RTG analýzy. V práci (Jafari a kol., 2015) boli nanočastice pripravené pomocou dúšky tymianovej tiež guľovitého tvaru a porovnateľnej veľkosti (50 nm). Výsledky SEM a TEM analýz v práci (Heidari a kol., 2018) potvrdili guľovitý tvar nanočastíc pripravených pomocou dúšky tymianovej a veľkosť 30 nm.

Obr. 2 TEM snímky vzoriek Ag:rastlina 1:1 a) TYM, b) SAM, c) SER



Antibakteriálna aktivita bola testovaná na dvoch bakteriálnych kmeňoch, jednom gram-negatívnom (*Escherichia coli*) a jednom gram-positívnom (*Staphylococcus aureus*) (Obr. 3). Zo 4 študovaných hmotnostných pomerov boli antibakteriálne aktívne len vzorky Ag:TYM/SAM/SER 1:1. Najvyššiu aktivitu mala vzorka Ag:SER 1:1, po nej nasledovala vzorka Ag:SAM 1:1 a najmenej efektívna bola vzorka Ag:TYM 1:1. Vyššia aktivita bola pozorovaná u nepremytých vzoriek kvôli prítomnosti nezreagovaného  $\text{AgNO}_3$ . Po premytí bola aktivita vyššia pre čerstvé vzorky, t.j. premyté hneď po mletí, a to v dôsledku prítomnosti väčšieho množstva stabilizovaných Ag NPs.

Obr. 3 Antibakteriálna aktivita premytých a nepremytých vzoriek Ag:rastlina 1:1 na a) *E. coli*, b) *S. aureus*



Táto práca vznikla na základe finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja (projekt č. APVV-18-0357) a Slovenskej grantovej agentúry VEGA (projekt č. 2/0044/18).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baláž M, et al. Bio-mechanochemical synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. *Adv. Powder Technol.* 2017; 28:3307-3312.
- Heidari Z, et al. Anti-cancer and anti-oxidant properties of ethanolic leaf extract of *Thymus vulgaris* and its bio-functionalized silver nanoparticles. *3 Biotech.* 2018;8(3):177.
- Jafari A, et al. Biological synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial and antifungal properties of silver and copper nanoparticles. *Turk. J. Biol.* 2015; 39: 556-561.
- Rojas JJ, et al. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6:2.
- Wojdyr M. Fityk: a general-purpose peak fitting program. *J. Appl. Cryst.* 2010; 43:1126-1128.

# VPLYV SEZÓNNOСТИ AKO HLAVNÉHO FAKTORA PÔSOBIACEHO NA KVALITU SUROVÉHO KRAVSKÉHO MLIKA

Kováčová M., Dudriková E., Maľová J., Vataščinová T.

*Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Obsah jednotlivých mliečnych zložiek v mlieku má veľký význam tak ako z ekonomického hľadiska pre výrobcov a spracovateľov mlieka, tak aj z nutričného hľadiska pre spotrebiteľov. Práca sa zaoberá vplyvom zmeny ročného obdobia: leto, jeseň, zima, jar na obsah základných zložiek mlieka (bielkoviny, tuk, BTS, laktóza), počtu somatických buniek a vybraných fyzikálno-chemických vlastností (bod mrznutia, pH). Každý štvrtrok bolo vyšetrených dvadsať vzoriek mlieka. Celkovo bolo vyšetrených 80 individuálnych vzoriek surového kravského mlieka. Výsledky práce ukazujú signifikantné ( $p \leq 0,001$ ) a ( $p \leq 0,05$ ) zmeny v obsahu jednotlivých zložiek mlieka, a taktiež vo vybraných fyzikálno-chemických vlastnostiach surového kravského mlieka.

## ÚVOD

Kvalita mlieka je ovplyvňovaná mnohými faktormi. Sezónnosť patrí medzi jeden z hlavných vonkajších vplyvov pôsobiacich na zloženie mlieka. Mlieko sa skladá prevažne z vody 87,3% a sušiny 12,7% (Dudriková a kol. 2014). Existuje negatívna korelácia medzi teplotou prostredia a množstvom mliečneho tuku a bielkovín. So stúpajúcou sa teplotou prostredia dochádza k poklesu množstva tuku a bielkovín v mlieku. Tento pokles je ovplyvňovaný jednak zložením krmiva, ktoré sa líši v zimnom a letnom období, ale aj poklesom príjmu krmiva v letných mesiacoch. Vo všeobecnosti, najväčšie percentuálne zastúpenie obsahu tuku a bielkovín sú dosiahnuté v jeseni a zime (Yasmin a kol., 2012). Ďalším veľmi významným vplyvom pôsobiacim na zmenu zloženia jednotlivých mliečnych zložiek v surovom kravskom mlieku je pomer medzi svetlom a tmou. V skutočnosti vysoký pomer svetlo-tma vedie k zníženiu obsahu tuku a bielkovín v mlieku pravdepodobne v dôsledku väčšej sekrécie prolaktínu, ktorého koncentrácia v plazme je vyššia v lete než v zime (Ozrenk a Inci, 2008). Sezónnosť neovplyvňuje len obsah mliečnych zložiek ale aj počet somatických buniek (PSB), ktoré slúžia ako jedno z hlavných kritérií určujúcich kvalitu surového kravského mlieka a sú indikátorom zdravotného stavu mliečnej žľazy. Počas zimného obdobia je PSB pomerne stabilný, pričom v zdravej mliečnej žľaze je ich počet nižší ako 100 000 v  $1\text{cm}^3$  mlieka. K zvyšovaniu PSB dochádza od začiatku jari až do konca leta (Grimley a kol., 2009, Pavel a kol., 2011). Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 stanovuje maximálny PSB v surovom kravskom mlieku najviac 400 000 v  $1\text{cm}^3$ . Cieľom práce bolo zistiť zmeny v obsahu bielkovín, tuku, beztukovej sušiny (BTS), laktózy a bodu tuhnutia v individuálnych vzorkách surového kravského mlieka v rámci zmeny ročných období.

## MATERIÁL A METODIKA

Individuálne vzorky surového kravského mlieka boli odobrané počas ranného dojenia, ktoré sa uskutočnilo vo vybranom produkčnom hospodárstve v oblasti východného Slovenska. Vzorky boli odobrané v roku 2018 a 2019. Odber bol vykonaný pravidelne štvrtročne počas každého ročného obdobia: leto, jeseň, zima a jar. Celkovo bolo vyšetrených  $n=80$  individuálnych vzoriek mlieka; z toho 20 vzoriek bolo vyšetrených v júli, 20 vzoriek v septembri, 20 vzoriek v novembri a 20 vzoriek v apríli. Po vykonaní odberu boli vzorky mlieka okamžite odoslané do laboratória na analýzu. Z vyšetovaných vzoriek mlieka boli zisťované vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti. Analýza základných zložiek mlieka: bielkovín, tuku, laktózy a beztukovej sušiny (BTS) sa stanovila pomocou analytického ultrazvukového prístroja na meranie zložiek mlieka Lactoscan MCCW. Teplota mrznutia (FrP) bola stanovená použitím automatického kryoskopu CryoStarI. Na detekciu počtu



somatických buniek bolo 100  $\mu$ l vzorky mlieka odobratého do mikroskúmavky obsahujúcej lyofilizované farbivo Sofia Green. Po opakujúcom sa miešaní vzorky bolo následne 8  $\mu$ l vzorky prenesených na povrch LACTOCHIPUx4. Počet somatických buniek bol detegovaný fluorescenčným mikroskopom s nízkym zväčšením so softvérom na rýchle zaostrenie a počítanie buniek Lactoscan SCC. Štatistická analýza bola vykonaná v programe Excel 2016 použitím Studentovho t-testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

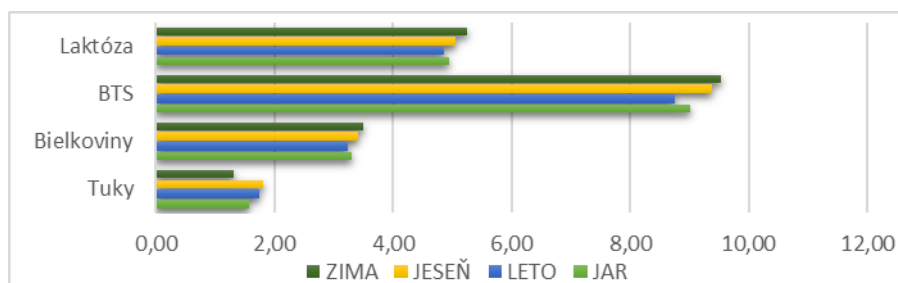
Výsledky práce ukázali štatisticky významné rozdiely ( $p \leq 0,05$ ) a ( $p \leq 0,001$ ) v obsahu základných mliečnych zložiek, ktoré boli spôsobené vplyvom sezónnosti (Tabuľka 1). Obsah tuku sa štatisticky výrazne zmenil ( $p \leq 0,05$ ), a to znížením z  $1,75 \pm 0,55$  g/100g (letné obdobie) na  $1,31 \pm 0,51$  g/100g (zimné obdobie), a tiež z  $1,81 \pm 0,65$  g/100g (jeseň) na  $1,31 \pm 0,51$  g/100g (zima). V obsahu mliečnych bielkovín došlo k štatisticky veľmi významným zmenám ( $p \leq 0,001$ ), a to zvýšením obsahu bielkovín z leta  $3,24 \pm 0,14$  g/100g na  $3,50 \pm 0,13$  g/100g v zimnom období a z jari  $1,58 \pm 0,62$  g/100g na zimu. Štatisticky významný pokles ( $p \leq 0,05$ ) bol pozorovaný pri porovnaní bielkovín v lete ( $1,75 \pm 0,55$  g/100g) a v jeseni ( $1,81 \pm 0,65$  g/100g). Zmena ročných období veľmi výrazne ( $p \leq 0,001$ ) ovplyvnila obsah BTS v mlieku, a to pri porovnaní obsahu zloženia BTS v mlieku v letnom ročnom období ( $8,76 \pm 0,33$  g/100g) so zimným ročným obdobím ( $9,53 \pm 0,36$  g/100g), letným obdobím s jesenným ( $9,38 \pm 0,34$  g/100g), a taktiež z jari  $9,02 \pm 0,48$  g/100g na zimu  $9,53 \pm 0,36$  g/100g. Významná zmena v obsahu BTS ( $p \leq 0,05$ ) nastala z jari  $9,02 \pm 0,48$  g/100g na jeseň  $9,38 \pm 0,34$  g/100g. Množstvo laktózy v mlieku taktiež nebolo konštantné počas celého roka. Výsledky ukázali veľmi významné štatistické zmeny ( $p \leq 0,001$ ) v obsahu laktózy, a to medzi jarným ( $4,96 \pm 0,27$  g/100g) a zimným obdobím ( $5,26 \pm 0,18$  g/100g), letným ( $4,86 \pm 0,22$  g/100g) a jesenným obdobím ( $5,05 \pm 0,18$  g/100g), letným a zimným obdobím, zimným a jesenným obdobím. V ostatných prípadoch nebola zistená štatistická významnosť v zmenách obsahu základných zložiek mlieka (Graf 1).

Tab. 1. Priemerné hodnoty obsahu základných zložiek mlieka vyjadrené v g/100g

	Tuk	Bielkoviny	BTS	Laktóza
JAR	$1,58 \pm 0,62$	$3,31 \pm 0,18$	$9,02 \pm 0,48$	$4,96 \pm 0,27$
LETO	$1,75 \pm 0,55$	$3,24 \pm 0,14$	$8,76 \pm 0,33$	$4,86 \pm 0,22$
JESEŇ	$1,81 \pm 0,65$	$3,42 \pm 0,26$	$9,38 \pm 0,34$	$5,05 \pm 0,18$
ZIMA	$1,31 \pm 0,51$	$3,50 \pm 0,13$	$9,53 \pm 0,36$	$5,26 \pm 0,18$

BTS-beztuková sušina

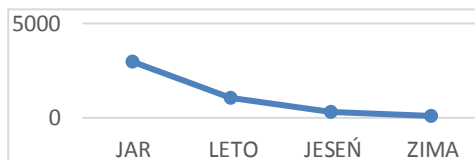
Graf 1 Porovnanie zmien v obsahu jednotlivých mliečnych zložiek



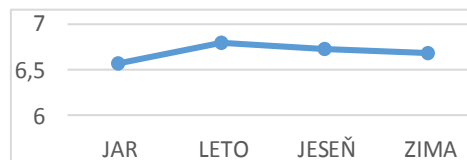
Na základe počtu somatických buniek bolo zistené zníženie ich množstva vo vzorkách mlieka od jari, kde bolo ich množstvo najvyššie až po zimu, kde bol stanovený najnižší obsah PSB v mlieku. Priemerný obsah PSB v 1 ml mlieka na jar bol  $2952 \times 10^3$  v  $1 \text{ cm}^3$ , v lete  $1026 \times 10^3$ , na jeseň  $274 \times 10^3$  a v zime  $86 \times 10^3$  (Graf 2). Veľmi vysoký štatistický význam ( $p \leq 0,001$ ) v PSB

mlieka bol zistený medzi obdobím jar-jeseň a jar-zima. Štatistický význam ( $p \leq 0,05$ ) bol pozorovaný pri porovnaní obdobia jar-letno a leto-zima.

**Graf 2 Pokles hodnôt PSB v závislosti na sezónnosti**



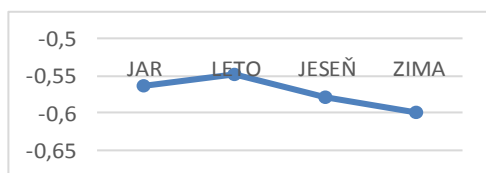
**Graf 3 Zmeny aktívnej kyslosti spôsobené sezónnosťou**



Zmeny v hodnotách aktívnej kyslosti sú zobrazené v Grafe 3. Priemerná hodnota pH vo vyšetovaných vzorkách mlieka bola stanovená na jar  $6,56 \pm 0,44$ , v lete  $6,79 \pm 0,13$ , na jeseň  $6,72 \pm 0,06$  a v zime  $6,6 \pm 0,04$ . Veľmi významná signifikantná zmena ( $p \leq 0,001$ ) bola zistená pri porovnaní pH mlieka v lete a zime. Významná signifikantná zmena ( $p \leq 0,05$ ) bola zistená pri porovnaní pH mlieka v jari s letom, letom s jeseňou a jeseňou so zimou.

Priemerná hodnota bodu mrznutia počas jari bola  $-0,5645 \pm 0,03$  °C, v lete  $-0,5483 \pm 0,02$  °C, v jeseni  $0,5786 \pm 0,02$  °C a v zime  $-0,598$  °C. Veľmi vysoká štatistická významnosť ( $p \leq 0,001$ ) bola pri korelácií FrP jari so zimou, leta s jeseňou a leta so zimou. Vysoká štatistická významnosť ( $p \leq 0,05$ ) bola medzi jeseňou a zimou (Graf 4).

**Graf 4 Vplyv sezónnosti na bod mrznutia.**



Výsledky práce potvrdili vplyv sezónnosti, na kvalitu surového kravského mlieka. Boli zistené výrazné štatistické rozdiely v obsahu jednotlivých zložiek mlieka a vybraných fyzikálno-chemických vlastností. Poznaním týchto a ďalších faktorov nám umožňuje optimalizovať nutričnú hodnotu mlieka.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dudriková E, et al. Technológia výroby, bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov pre magistrov, Košice, 2014. s.14-58.
- Grimley H, Grandison A, Lewis M. Changes in milk composition and processing properties during the spring flush period, Dairy Sci. Technol., 2009. 89, 405416.
- Pavel ER, Gava C. Seasonal Changes in Bulk Tank Milk Composition of Dairy Cows, Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies, 2011. 44 (2).
- Yasmin A, et al. Seasonal variation in milk vitamin contents available for processing in Punjab, Pakistan, Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, Volume 11, Issue 2, June 2012, Pages 99-105.
- Ozrenk E, Inci S. S. The Effect of Seasonal Variation on the Composition of Cow Milk in Van Province, Pakistan Journal of Nutrition 7 (1): 161-164, 2008, ISSN 1680-5194.
- Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 z 29. apríla 2004. Dostupné na internete [9.1.2019] <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/ALL/?uri=CELEX%3A02004R0853-20141117>>.

# ODLIŠNÁ ODPOVEĎ MYŠACÍCH EMBRYÍ POCHÁDZAJÚCICH Z MATIEK S ROZLIČNOU TELESNOU KONDÍCIOU NA INZULÍN *IN VITRO*

Kšišňanová M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Embryá, ktoré sa vyvíjajú v tele obéznych matiek, sú zvyčajne vystavené zvýšeným koncentráciám inzulínu. Cieľom našej štúdie bolo overiť hypotézu, či by inzulín mohol byť mediátorom potvrdených negatívnych účinkov obezity matky na včasný embryonálny vývin a kvalitu blastocýst. V experimente sme využili dvojgeneračný dietetický model odchovu myší, výsledkom čoho je produkcia obéznych a kontrolných samíc. Dvoj bunkové embryá izolované z prirodzene oplodnených kontrolných a obéznych samíc sme kultivovali 72 h *in vitro* s rôznymi koncentraciami inzulínu (0, 1, 10 ng/ml).

Výsledky stereomikroskopickej analýzy ukázali, že vystavenie embryí fyziologickej a zvýšenej koncentrácii inzulínu neovplyvnilo ich vývinový potenciál v žiadnej skupine. Morfológická analýza pomocou fluorescenčnej mikroskopie ukázala, že v podskupine expandovaných blastocýst pochádzajúcich z kontrolných matiek inzulín (10 ng/ml) zvýšil priemerný počet buniek na blastocystu a znížil podiel mŕtvych buniek v blastocystách. V kontrolnej skupine blastocýst sme zaznamenali aj pozitívny vplyv inzulínu na diferenciáciu buniek (1 ng/ml). U blastocýst pochádzajúcich z obéznych samíc sme nepozorovali vplyv inzulínu na žiaden zo sledovaných parametrov.

Naše výsledky nepotvrdili negatívny vplyv testovaných koncentrácií inzulínu na vývin embryí *in vitro*. Na druhej strane preukázali rozdielnú senzitivitu na inzulín medzi preimplantačnými embryami pochádzajúcimi z kontrolných a obéznych myší, čo by sa dalo vysvetliť rôznymi procesmi adaptácie pri vývoji zárodočných alebo embryonálnych buniek na zmeny v materskom prostredí.

## ÚVOD

Prevalencia obezity sa od 80. rokov vo svete zdvojnásobila, zatiaľ čo miera pôrodnosti výrazne klesla. Obezita sa u žien často spája s infertilitou a poruchami reprodukčného systému. Mechanizmy negatívneho vplyvu obezity však doposiaľ nie sú dostatočne preštudované. Hormonálna nerovnováha u žien trpiacich obezitou je často spojená s dysfunkciou dvoch hormónov – leptínu a inzulínu. Zvýšenie koncentrácií týchto hormónov môže viesť k narušeniu hypotalamo – hypofýzo – gonádovej osi alebo priamo negatívne pôsobiť na reprodukčné orgány (periférny vplyv).

Štúdie *in vivo* a *in vitro*, klinické aj na zvieracích modeloch potvrdili, že inzulín dokáže priamo ovplyvňovať fyziológiu reprodukčného systému (Harvey a Kaye, 1990; Zhang a Armstrong, 1990; Herrler a kol., 1998; Augustin a kol., 2003; Hu a kol., 2011; Firmiaty a kol., 2014). V našich predchádzajúcich štúdiách sme zaznamenali negatívny vplyv materskej obezity na niektoré vývinové parametre preimplantačných embryí. U obéznych myší sme zaznamenali vyššie množstvá nezrelých oocytov, znížené množstvo neutrálnych lipidov v cytoplazme zrelej oocytov, spomalený vývin blastocýst a vyššie priemerné množstvo apoptotických buniek v blastocystách (Kubandová a kol., 2014a; Kubandová a kol., 2014b; Fabian a kol., 2015).

Cieľom našej štúdie bolo overiť hypotézu, či by inzulín mohol byť mediátorom v minulosti preukázaných negatívnych účinkov obezity matky na včasný embryonálny vývin a kvalitu blastocýst.

## MATERIÁL A METODIKA

Experimenty sme vykonávali na outbrednom kmeni CD-1 myši (Velaz, Praha, ČR). Na produkciu obéznych myši sme využili dvojgeneračný dietetický model, ktorý bol štandardizovaný na našom pracovisku v minulých rokoch (Kubandová a kol., 2014b). Model spočíval v prekrmovaní experimentálnych samíc myši v období gravidity a období laktácie vysokoenergetickým produktom Ensure Plus, zatiaľ čo v kontrolnej skupine boli samice kŕmene iba štandardnou peletovou diétou. U odchovaných samíc sme na 30. deň veku za pomoci MRI (Echo MRI, Whole body composition Analyser, Houston, Texas) stanovili množstvo telesného tuku. Následne sme v experimentálnej skupine vyselektovali obézne myši (Ob, telesný tuk nad 11%) a v kontrolnej skupine myši s fyziologickým objemom telesného tuku (C, telesný tuk 7-8%). Obézne a kontrolné myši boli hormonálne synchronizované, prirodzene oplodnené samcami a použité pre izoláciu embryí *post mortem*. Vyizolované dvojbunkové embryá sme kultivovali v štandardných podmienkach od D2 do D5 v kultivačnom médiu s prídavkom ľudského rekombinantného inzulínu v dvoch koncentráciách (1ng/ml a 10 ng/ml) a bez inzulínu.

Stereomikroskopickým pozorovaním (Nikon SMZ 745T) sme embryá klasifikovali do nasledujúcich skupín: degenerované embryá (embryá s fragmentáciou cytoplazmy), embryá so zastaveným rastom (2-bunkové), pomaly vyvíjajúce sa embryá (3 až 16-bunkové embryá), moruly (embryá s viac ako 32 bunkami) a blastocysty (embryá s blastocélovou dutinou). Blastocysty boli podrobené morfolologickej fluorescenčnej analýze a klasifikované do dvoch podskupín - skoré ( $\leq 65$  buniek na blastocystu) a expandované ( $> 65$  buniek na blastocystu) na základe hodnoty mediánu priemerného počtu buniek na blastocystu ( $65 \pm 3$ ). V blastocystách sme sledovali bunkovú proliferáciu, bunkovú diferenciáciu a bunkovú smrť (apoptózu). Na vizualizáciu celkového počtu blastomér na blastocystu sme využili DNA farbenie Hoechst 33342. Bunkové línie trofoektoderm (TE) a vnútornú masu buniek (ICM) sme diferencovali na základe imunohistochemickej vizualizácie Cdx2 proteínu v ICM. Mŕtve bunky sme identifikovali pomocou značenia špecifických DNA fragmentov (TUNEL assay). Blastocysty sme pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom pri 400-násobnom zväčšení (BX50, Olympus).

Po odobratí embryí z kultivačných médií v posledný deň kultivácie sme média použili na meranie koncentrácií inzulínu. Zostatkové koncentrácie inzulínu v médiách a koncentrácie plazmatického inzulínu boli vyšetrené pomocou ELISA kitov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zaznamenali sme významné rozdiely v telesnej váhe ako aj v telesnom tuku medzi obéznych samicami pochádzajúcich z prekrmovaných matiek a kontrolnými samicami pochádzajúcimi z matiek kŕmených štandardnou peletovou diétou. Koncentrácia inzulínu v krvi bola mierne zvýšená u obéznych myši, ale rozdiel nebol štatisticky významný výsledok. Degradáciu inzulínu v kultivačnom médiu sme vylúčili potvrdením prítomnosti inzulínu v médiu aj po 72 h kultivácií.

Schopnosť embryí dosiahnuť štádium blastocysty bola vo všetkých skupinách viac ako 90%. Inzulín nemal vplyv na vývinový potenciál embryí pochádzajúcich z obéznych ani kontrolných matiek. Tieto výsledky sú v rozpore so štúdiou, v ktorej vysoká koncentrácia inzulínu v médiu (0,25  $\mu\text{g/ml}$ ) stimulovala vývinový potenciál myšacích embryí (Shao a kol., 2007).

V podskupine skorých blastocýst sme nezaznamenali vplyv inzulínu na priemerný počet buniek na blastocystu. Naopak v podskupine expandovaných blastocýst inzulín (10 ng/ml) zvyšoval priemerný počet buniek na blastocystu v skupine embryí pochádzajúcich z matiek s fyziologickými hodnotami telesnej váhy a tuku ( $P < 0,001$ ).

Potvrdili sme vplyv inzulínu na diferenciáciu buniek v kontrolnej skupine embryí (1ng/ml), u embryí z obéznych samíc sme nepozorovali vplyv inzulínu na sledovaný parameter. V podskupine skorých blastocyst prídavok inzulínu v kultivačnom médiu (1ng/ml) signifikantne zvyšoval proliferáciu podiel buniek v ICM ( $P < 0,05$ ). Vyššia koncentrácia inzulínu v kultivačnom médiu (10ng/ml) taktiež mierne zvyšovala množstvo buniek v ICM, rozdiel však nebol štatisticky významný ( $P > 0,05$ ). Podobne, v podskupine expandovaných blastocyst inzulín (1ng/ml) zvyšoval podiel buniek na strane ICM. K podobným výsledkom dospeli už v minulosti Harvey a Kaye (1990), ktorí zaznamenali zvýšenie proliferácie buniek v ICM myšacích blastocyst vplyvom inzulínu počas kultivácie *in vitro*.

Viac ako 91% blastocyst obsahovalo minimálne jednu apoptotickú bunku a incidencia mŕtvych buniek v blastocystách sa vo väčšine skupín pohybovala okolo 5 až 6%. Podobne ako v predchádzajúcich sledovaných parametroch, inzulín neovplyvnil tento parameter v skupine blastocyst pochádzajúcich z obéznych samíc. U blastocyst pochádzajúcich z kontrolných samíc vyššia koncentrácia inzulínu (10ng/ml) znížila priemerné množstvo mŕtvych buniek v podskupine expandovaných blastocyst.

Záverom môžeme zhrnúť, že sme zaznamenali rozdielnu odpoveď na inzulín medzi embryami pochádzajúcimi z kontrolných a obéznych myší. Embryá pochádzajúce z kontrolných samíc preukázali vyššiu senzitivitu na inzulín v niektorých sledovaných parametroch. Rozdiel by mohol byť vysvetlený rôznymi adaptačnými procesmi pri vývoji zárodočných alebo embryonálnych buniek voči zmenám v materskom prostredí.

*Práca bola podporená grantmi APVV-18-0389 a VEGA 2/0001/14.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Augustin R, et al. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. *Reproduction*. 2003; 126 (1): 91–99.
- Fabian D, et al. The effect of maternal body condition on *in vivo* production of zygotes and behavior of delivered offspring in mice. *Theriogenology*. 2015; 83(4): 577–589. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.025>
- Firmiatty S, et al. Effect of Insulin Transferin Selenium ( ITS ) on oocyte maturation *in vitro* in Indonesian goats. 2014; 4(7): 113–117.
- Harvey MB, Kaye PL. Insulin increases the cell number of the inner cell mass and stimulates morphological development of mouse blastocysts *in vitro*. *Development (Cambridge, England)*. 1990; 110: 963–967.
- Herrler, Krusche C, Beier HM. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction*. 1998; 59(6): 1302–1310. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1302>
- Hu J, et al. Insulin-transferrin-selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes *in vitro*. *Zygote*. 2011; 19(3): 191–197. <https://doi.org/10.1017/S0967199410000663>
- Kubandová J, et al. Amount of maternal body fat significantly affected the quality of isolated mouse preimplantation embryos and slowed down their development. *Theriogenology*. 2014a; Vol. 81: 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.014>
- Kubandová J, et al. Two-generation diet-induced obesity model producing mice with increased amount of body fat in early adulthood. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2014b; 63: 103–113. <https://doi.org/932547>
- Shao WJ, et al. Exposure of preimplantation embryos to insulin alters expression of imprinted genes. *Comparative Medicine*. 2007; 57(5): 482–486.
- Zhang X, Armstrong DT. Presence of Amino Acids and Insulin in a Chemically Defined Medium Improves Development of 8-Cell Rat Embryos *in Vitro* and Subsequent Implantation *in Vivo*. *Biology of Reproduction*. 1990; 42(4): 662–668.

# ANTIOXIDAČNÉ ÚČINKY MEDICINÁLNYCH RASTLÍN U JAHNIAT EXPERIMENTÁLNE NAKAZENÝCH ENDOPARAZITÓZOU

Kucková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Centra biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Medicinálne rastliny s vysokým obsahom flavonoidov, sekundárnych metabolitov, majú pozitívne biologické a antioxidačné vlastnosti. Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv endoparazitózy spôsobenej gastrointestinálnym parazitom *Haemonchus contortus* na antioxidačný status oviec suplementovaných zmesou sušených medicínálnych rastlín. Jahňatá boli počas 70 dňového experimentu rozdelené do štyroch skupín; kontrolná nenakazená skupina (C), nakazené zvieratá (I), nakazené zvieratá suplementované Herbmixom 1 (I+Hmix 1) a nakazené zvieratá suplementované Herbmixom 2 (I+Hmix 2). Odpoveď zvierat na parazitárnu infekciu sa hodnotila stanovením aktivity vybraných antioxidačných enzýmov a celkovej antioxidačnej kapacity séra, a taktiež sme zisťovali lipidovú peroxidáciu vo vzorkách séra a svaloviny. Výsledky merania antioxidačných parametrov v sére naznačujú oxidačný stres spôsobený endoparazitózou. Príjem medicínálnych rastlín obsahujúcich bioaktívne zložky s antioxidačnými vlastnosťami môže zlepšovať oxidačnú stabilitu svaloviny, redukovať negatívne účinky infekcie na antioxidačný status oviec a tým podporovať odolnosť zvierat voči infekcii GIT nematódami.

## ÚVOD

Odpoveď hostiteľa na prítomnosť parazitárnej infekcie sa prejavuje tvorbou reaktívnych voľných radikálov, ako obranný mechanizmus, ktorého úlohou je zneškodniť parazity, čím však zároveň dochádza k oxidačnému stresu a tým k poškodeniu okolitých buniek a tkanív. Je známe, že reaktívne radikály môžu byť neutralizované dokonalým antioxidačným obranným systémom (Pivoto a kol., 2015). Tieto vlastnosti majú aj antioxidačné enzýmy superoxidodismutáza (SOD), glutatión peroxidáza (GPx) a glutatión reduktáza (GR) a iné (Lykkesfeldt a Svendsen, 2007). Medicínálne rastliny sa používajú v alternatívnej liečbe kvôli ich zdraviu pozitívnym vlastnostiam. Flavonoidy sú produktmi sekundárneho metabolizmu rastlín. Majú rôzne biologické účinky, medzi ktoré patria napríklad antioxidačné, antivírusové, antibakteriálne, protizápalové, vazodilatačné či protirakovinové účinky (Procházková a kol., 2011).

## MATERIÁL A METODIKA

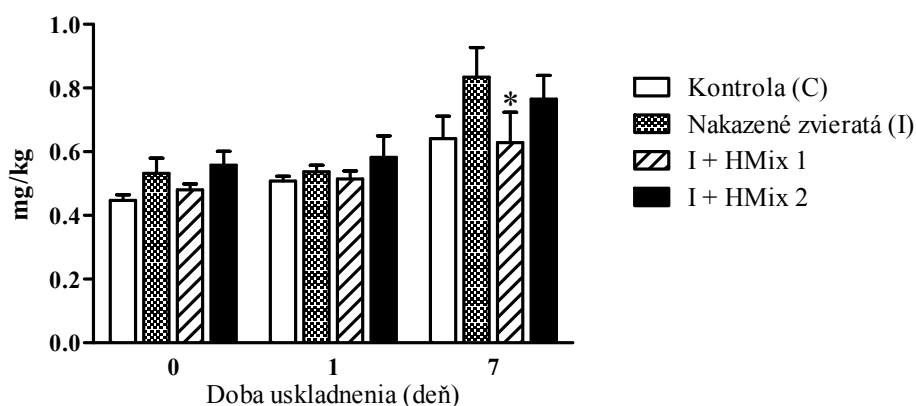
Dvadsaťštyri jahniat (Zošľachtená Valaška) bolo rozdelených do štyroch experimentálnych skupín: kontrolná nenakazená skupina (C), nakazené zvieratá (I), nakazené zvieratá suplementované Herbmixom 1 (I+Hmix 1) a nakazené zvieratá suplementované Herbmixom 2 (I+Hmix 2). Zmesi rastlín obsahovali rovnaký základ: 1% *Artemisia absinthium* a 13,42% *Matricaria chamomilla*, *Fumaria officinalis* a *Malva sylvestris*. Herbmix 1 okrem základu obsahoval 5% *Foeniculum vulgare* a 13,42% *Hyssopus officinalis*, *Melissa officinalis*, *Plantago lanceolata* a *Solidago virgaurea*. Herbmix 2 obsahoval okrem základu 12,38% *Achillea millefolium*, *Calendula officinalis*, *Cichorium intybus*, *Hypericum perforatum* a *Urtica dioica*. Herbmix 1 a 2 (100 g sušiny/deň) boli pridávané do bazálnej diéty, ktorá pozostávala zo sena (*ad libitum*) a komerčného koncentráta (350 g sušiny/deň) pre každé zviera. Nakazené jedince boli perorálne infikované asi 5000 larvami tretieho štádia (L3) gastrointestinálnym parazitom *Haemonchus contortus*. Počas 70 dňového experimentu boli zvieratám odoberané vzorky krvi v 22., 37., 51. a 71. deň po infikovaní. Po ukončení experimentu boli zvieratá usmrtené a boli im odoberané vzorky ľavého svalu *m. longissimus dorsi*. Vo vzorkách séra bola stanovovaná aktivita antioxidačných enzýmov. Superoxidodismutáza (SOD) bola stanovovaná spektrofotometrickou metódou podľa Marklund

a Marklund (1974) v tkanive a kitom RANSOD (Randox, UK) v sére. Aktivitu glutatiónereduktázy (GR) sme stanovovali kitom (Glutathione Reductase Assay Kit, Sigma-Aldrich) a aktivitu glutatióneroxidázy (GPx) podľa Paglia a Valentine (1967). Lipidová peroxidácia v sére a svalovine uskladnenej v chladničke po dobu 0, 1 a 7 dní, bola stanovovaná spektrofluorometrickou metódou podľa Jo a Ahn (1998) meraním koncentrácie malondialdehydu (MDA). Celková antioxidačná kapacita (TAC) vzoriek séra a rastlín sa stanovovala metódou FRAP podľa Benzie a Strain (1996). Pre stanovenie celkovej koncentrácie fenolov vodných extraktov medicínálnych rastlín Herbmixu 1 a 2 pripravených modifikovanou metódou podľa Tupec a kol. (2017), sme použili Folin-Ciocalteu metódu (Proestos a kol., 2013). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov a zhodnotenie vplyvu diéty, času a/alebo ich vzájomnej interakcie, boli dáta analyzované použitím dvojcestnej analýzy variancie (ANOVA) s Bonferroni post-testom pre zistenie štatistického rozdielu medzi infikovanou skupinou (I) a ostatnými skupinami (C, I+Hmix 1, I+Hmix 2).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Antioxidačné účinky flavonoidov sa môžu prejavovať odlišne *in vitro* a *in vivo* podmienkach. Výsledky štúdií poukazujú, že flavonoidy počas metabolizmu najmä v tenkom čreve podliehajú štruktúrnym a funkčným zmenám, čo ovplyvňuje ich antioxidačné vlastnosti. Mechanizmus ich antioxidačného účinku spočíva v schopnosti priamo vychytávať reaktívne kyslíkové radikály, aktivovať antioxidačné enzýmy, inhibovať oxidázy, zvyšovať antioxidačné vlastnosti nízkomolekulových antioxidantov a chelatovať kovy (Prochádzková a kol. 2011; Tsao a Li, 2012). Kvantitatívnou analýzou bioaktívnych látok v použitých zmesiach pomocou ultra-vysoko-účinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC/MS/MS) sa zistilo 57,3 mg/g fenolových kyselín a 41,5 mg/g flavonoidov v Hmixe 1 a 22,2 mg/g fenolových kyselín a 29,5 mg/g flavonoidov v Hmixe 2. Výsledky ukázali pozitívnu koreláciu ( $R^2=0,744$ ) medzi antioxidačnou kapacitou a celkovým obsahom fenolov v extraktoch rastlín obsiahnutých v oboch herbmixoch. Vyššie hodnoty celkových fenolov a TAC boli zaznamenané v Hmixe 1 v porovnaní s Hmixom 2. Výsledky merania antioxidačných parametrov v sére jahniat preukázali vplyv diéty ( $P<0,001$ ) na TAC séra a aktivitu SOD a GPx. Aktivita SOD ( $P<0,05$ ) a GPx ( $P<0,001$ ) bola taktiež ovplyvnená časom. Aktivita GR bola ovplyvnená príjmom experimentálnych diét, čo sa prejavilo signifikantne vyššími hodnotami v skupinách suplementovaných Hmixom 1 a Hmixom 2 v porovnaní s infikovanými ovcami na 37., 51. a 70. deň po infikovaní.

Obr.1. Koncentrácia MDA (mg/kg) v svalovine (MLD) počas skladovania 0, 1 alebo 7 dní pri 4°C, n=6.



Lipidová peroxidácia v sére bola ovplyvnená časom ( $P < 0,001$ ) so signifikantne vyššími hodnotami na konci experimentu (70. deň) u infikovanej skupiny v porovnaní so zdravou skupinou zvierat.

V našom experimente podávanie Hmixov nemalo prospešný vplyv na všetky sledované antioxidačné parametre v sére. Antioxidačný potenciál rastlín alebo ich bioaktívnych látok mohol byť *in vivo* ovplyvnený niekoľkými faktormi, ako je ich absorpcia v GIT, metabolizmus a biovyužitelnosť ako aj prítomnosťou iných antioxidantov a iónov prechodných kovov (Kasote a kol., 2015). Koncentrácia MDA v svalovine (Obr.1) bola ovplyvnená príjmom experimentálnych diét ako aj časom uskladnenia, čo sa prejavilo zvyšovaním koncentrácie MDA a dokazuje, že počas skladovania sa hromadili sekundárne metabolity oxidácie lipidov. Pridanie Hmixu 1 do diéty infikovaných jahniat malo antioxidačný potenciál, čo naznačuje pokles oxidácie lipidov v mäse znížením hladiny MDA v 7. deň skladovania v porovnaní s infikovanými zvieratami. Naše výsledky naznačujú, že príjem medicínálnych rastlín má priaznivé účinky na antioxidačný status jahniat a môže zlepšovať odolnosť malých prežúvavcov voči parazitárnym infekciám.

*Práca bola podporená grantmi Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-17-0297 a APVV 18-0131.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996; 239:70-76.
- Jo C, Ahn DU. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry Science*. 1998; 77:475-480.
- Kasote DM, et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic application. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11:982-991
- Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The veterinary journal*. 2007; 173:502-511.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*. 1974; 47:469-474.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967; 70:158-169.
- Pivoto FL, et al. Oxidative stress by *Haemonchus contortus* in lambs: influence of treatment with zinc edetate. *Research in veterinary science*. 2015; 102:22-24.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 2011; 82:513-523.
- Proestos C, et al. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*. 2013; 2:11-22.
- Tsao R, Li H. Antioxidant properties in vitro and in vivo: realistic assessments of efficacy of plant extracts. *Plant Sciences Reviews*. 2012; 7:11-13.
- Tupec M, et al. Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Bioscience*. 2017. 20:43-50.



# ANIMÁLNY MODEL GNOTOBIOTICKÝCH MYŠÍ BALB/C V ŠTÚDII ULCERÓZNEJ KOLITÍDY

Lauko S.<sup>1</sup>, Gancarčíková S.<sup>1</sup>, Hrčková G.<sup>2</sup>, Hajdučková V.<sup>1</sup>, Kačírová J.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>,  
Maďar M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Laboratórium gnotobiológie, UVLF  
Košice

<sup>2</sup>Parazitologický ústav SAV, Košice

## ABSTRAKT

V sledovanej štúdii boli SPF myši línie BALB/c v počte 126 ks rozdelené do 3 pokusných skupín DSS1, DSS3, DSS5 a jednej kontrolnej skupiny K, ktorým sa v I. fáze postupu aplikovali na dekontamináciu selektívne antibiotiká (amoxicilín, ciprofloxacín), a v II. fáze sa chemicky indukovala ulcerózna kolitída prostredníctvom dextran sulfátu sodného (DSS) v 1, 3 a 5% koncentrácii. Cieľom našej štúdie bolo získanie animálneho gnotomodelu ulcerózneho kolitídy po chemickej indukcií prostredníctvom DSS. Na základe dekontaminácie selektívnymi antibiotikami a sledovanej patogenézy ulcerózneho kolitídy pri rôznych koncentráciách jej chemickej indukcie sme získali optimálny animálny gnotomodel ulcerózneho kolitídy, manifestujúci sa atrofickými zmenami na sliznici kaudálneho úseku čreva, s infiltráciou leukocytov v čreve, sprevádzané úbytkom hmotnosti, dehydratáciou a miernym krvácaním z rekta.

## ÚVOD

Idiopatické zápalové črevné ochorenia (inflammatory bowel disease, IBD) označujú skupinu chronických zápalových chorôb tráviaceho traktu so striedajúcimi sa obdobiami relapsu a remisie. Crohnova choroba (Crohn's disease, CD) a ulcerózna kolitída (ulcerative colitis, UC) predstavujú dve hlavné manifestácie IBD. Tieto dve formy IBD sa odlišujú hlavne lokalizáciou zápalových ložísk v tráviacom trakte a rozsahom histopatologických zmien v črevnej stene. Vysoká morbidita, závažné včasné a neskoré komplikácie ochorenia s potenciálnou invalidizáciou, skrátením života pacienta a výrazným znížením jeho kvality života, sú dôvodom hľadania nových možností prevencie, racionálnej diagnostiky a liečby IBD. Experimentálne navodenie modelu IBD na gnotobiotických zvieratách umožňuje systematickú manipuláciu s premennými faktormi na overenie alebo vyvrátenie predpokladaných hypotéz (Ramos a Papadaki, 2019). Cieľom našej štúdie bolo získanie animálneho gnotomodelu ulcerózneho kolitídy po chemickej indukcií prostredníctvom DSS (dextran sulfátu sodného).

## MATERIÁL A METODIKA

Do *in vivo* experimentu, ktorého protokol č. 4073/18-221/3 bol schválený ŠVPS SR a bol v súlade s pokynmi stanovenými príslušnou Etickou komisiou UVLF Košice, boli použité SPF myši samičieho pohlavia, línie BALB/c z chovu Velaz s.r.o. (Praha) v počte 126 ks. Preprava bola uskutočnená leteckou cestou v špeciálnych transportných nádobách do akreditovaného zariadenia Laboratória gnotobiológie, Ústavu mikrobiológie a gnotobiológie, UVLF Košice (SK U 16016). Po dôkladnej povrchovej dezinfekcii nádob kyselinou peroctovou boli vložené do gnotobiotického izolátora pre chov laboratórnych hlodavcov typ THF 3271IE 101/97 a odchovňového izolátora typu CBC (CBC, Ltd, Madison, Wisconsin). Laboratórne zvieratá boli kŕmené *ad libitum* kompletnou kŕmnom zmesou pre myši v bariérových chovoch ST-1, s nepretržitým prístupom k autoklávovanej vode v sklenených fľašiach. SPF myši boli po ukončení karantény rozdelené do 3 pokusných skupín DSS1, DSS3, DSS5 (111ks) a jednej kontrolnej skupiny K (15ks), ktorým sa v I. fáze postupu aplikovali na dekontamináciu selektívne antibiotiká (amoxicilín, ciprofloxacín), a v II. fáze sa chemicky indukovala ulcerózna kolitída prostredníctvom DSS (dextran sulfátu sodného) podľa nasledovnej aplikačnej schémy (**Tab.1**).

**Tab.1 Aplikačná schéma postupu**

Skupina	Aplikácia antibiotík (každých 12 hodín po dobu 5 dní)	Rekonvalescencia	Indukcia IBD (chemicky DSS)
<b>K (n=15)</b>	bez aplikácie ATB	bez rekonvalescencie	-
<b>DSS/1 (n=37)</b>	<b>Amoxicilín</b> potencovaný klavulanátom draselným v dávke 0,2 ml <i>per os</i> (s koncentráciou účinnej látky 387,11 mg/kg/myš) + <b>Ciprofloxacín</b> v dávke 0,1ml <i>s.c.</i> (s koncentráciou účinnej látky 19,60 mg/kg/myš)	10 dní v mikrobiologicky kontrolovanom prostredí gnotobiotického izolátora	DSS 1% (vo vode v 1% koncentrácii po dobu 5 dní)
<b>DSS/3 (n=37)</b>			DSS 3% (vo vode v 3% koncentrácii po dobu 5 dní)
<b>DSS/5 (n=37)</b>			DSS 5% (vo vode v 5% koncentrácii po dobu 5 dní)

Zdravotný stav zvierat a konzistencia trusu sa denne sledovali a zaznamenávali. Vzorky trusu boli v I. fáze postupu odoberané pred aplikáciou ATB, a na 1., 2., 5. a 15. deň po dekontaminácii. V II. fáze postupu boli vzorky trusu odoberané na 0. deň pred chemickou indukciou ulceróznej kolitídy, a na 1., 3., a 5. deň po indukcii UC. Zvieratá boli v čase aplikácie DSS denne vážené a straty na hmotnosti boli do záznamov udávané v %. V rámci odberov na mikrobiologické, biochemické a histologické parametre boli gnotobiotické myši z jednotlivých skupín humánne usmrtené prípravkom na eutanáziu sodium pentobarbital v dávke (86 mg/kg ž.hm.), s následnou cervikálnou dislokáciou na 0., 5., 15. a 20. deň postupu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prvé štúdie, ktoré sa venovali dekontaminácii tráviaceho traktu použitím ATB sledovali úspešnosť takejto dekontaminácie na odstránenie mikroorganizmov z tráviaceho traktu zvierat. Tieto výsledky dokazovali, že dekontaminácia myši s perorálnymi antibiotikami bola uskutočniteľná (Van der Waaij a Sturm, 1968). Tieto štúdie však nesledovali účinok ATB na zdravotný stav zvierat. Sterilizácia čreva prostredníctvom podávania antibiotík *per os* uľahčuje štúdium fyziológie nutrične významných vzťahov medzi črevnou mikroflórou a hostiteľom. V I. etape postupu sme dekontaminovali tráviaci trakt SPF myši línie BALB/c selektívnymi ATB podľa našej predchádzajúcej štúdie (Gancarčíková a kol., 2018) tak, aby nebol zdravotný stav takto získaných zvierat alterovaný. Na dekontamináciu myši sme použili perorálne aplikovaný amoxicilín v dávke 387,11 mg/kg v prípravku Amoksiklav (Sandoz, Slovinsko) a subkutánne aplikovaný ciprofloxacín v dávke 19,60 mg/kg v prípravku Ciloxan (Alcon, Španielsko), pričom sme zvieratá odchovali v presne definovanom prostredí gnotobiotických izolátorov. Existuje málo rešeršných štúdií porovnávajúcich dekontamináciu ATB selektovanými na základe kultivácie oproti zaužívaným kombináciám ATB. V našej štúdií sme zvolili dekontamináciu ATB selektovanými na základe kultivácie ako to doporučuje aj Johnson a kol. (2004), vzhľadom na vylúčenie ATB s výrazným negatívnym dopadom na zdravotný stav zvierat. Po 10-dňovej rekonvalescencii sme kultivačne zo vzoriek trusu a obsahu céka získali kolónie, a z nich sme biochemickými testami a sekvenáciou 16S rDNA identifikovali *E. coli* a *Enterococcus* species. Puhl a kol. (2012) identifikovali po 21-dňovej aplikácii ATB a 14-dňovej rekonvalescencii prostredníctvom sekvenácie limitovaný počet klostrídiám podobných baktérií a *Bacteroides* species. V štúdií Ubedu a kol. (2010) bolo pozorované zvýšenie koncentrácie baktérií po 7-dňovej aplikácii ampicilínu, vankomycínu alebo kombinácie metronidazolu, neomycínu a vankomycínu (MNV). Mikroflóra zvierat bola po tomto zásahu zmenená, so zníženými počtami baktérií patriacich do kmeňa *Bacteroidetes* a čeľade *Lactobacillaceae*, a zvýšenými počtami baktérií patriacich do rodov *Clostridium* a *Enterococcus* a čeľade *Enterobacteriaceae*. My sme v našom postupe zaznamenali po 24 hodinách od začiatku aplikácie antibiotík pokles v kultivácii mikroorganizmov na platni o 4 logaritmy po aeróbnej, a o 3-4 logaritmy anaeróbnej kultivácii. Organické kyseliny sú hlavnými metabolitmi črevnej fermentácie a výška ich koncentrácie v obsahu tráviaceho traktu odráža úroveň črevnej fermentácie. Najvýraznejší pokles v produkcii organických kyselín, predovšetkým kyseliny octovej, mliečnej a propiónovej v truse v období dekontaminácie všetkých sledovaných skupín zaznamenávame už po 24. hodinách od začiatku aplikácie antibiotík, čo koreluje u týchto skupín s poklesom počtov mikroorganizmov o 4 log pri aeróbnej

kultivácii a o 3-4 log pri anaeróbnej kultivácii. Avšak už na 15. deň postupu je fermentačná aktivita čreva obnovená, a produkcia organických kyselín sa dostala na podobnú úroveň, ako v období pred aplikáciou ATB. Rekonvalescencia dekontaminovaných zvierat v gnotobiotických podmienkach po dobu 10 dní zabránila obnove druhej pestrosti mikroflóry myši a postačila na navrátenie metabolických hodnôt do fyziologického rozmedzia. Takto sme získali model s redukovanou a kontrolovanou mikroflórou bez alterácie celkového zdravotného stavu zvierat.

**Tab. 2** Selektívne morfológické parametre kolónu

Skupina	Rezná plocha kľkov ( $\mu\text{m}^2$ )	Obvod kľkov ( $\mu\text{m}$ )	Výška kľkov ( $\mu\text{m}$ )	Hĺbka krýpt ( $\mu\text{m}$ )
Kontrola	121300 $\pm$ 4089	1165 $\pm$ 27,1	430,5 $\pm$ 10,27	120,2 $\pm$ 2,46
DSS/1	93450 $\pm$ 997	1124 $\pm$ 22,06	406,6 $\pm$ 6,26	111,1 $\pm$ 1,303
DSS/3	92620 $\pm$ 1091	1080 $\pm$ 23,84	371,9 $\pm$ 7,67	103,3 $\pm$ 1,186
DSS/5	79840 $\pm$ 1091 ***DSS1, **DSS3	811,8 $\pm$ 32,2 ***DSS1, DSS3	307,7 $\pm$ 11,26 ***DSS1, DSS3	70,90 $\pm$ 2,028 ***DSS1, DSS3

V II. etape postupu bola sledovaná patogenéza ulceróznej kolitídy pri rôznych koncentráciách jej chemickej indukcie prostredníctvom DSS. Klinické hodnotenie zápalu zahŕňalo denné sledovanie telesnej hmotnosti a celkového zdravotného stavu. V predloženej štúdiu sme zaznamenali u skupiny zvierat s 5% aplikáciou DSS najnižšiu celkovú hmotnosť na 5. deň po indukcii UC, s významne nižšou hmotnosťou ( $p < 0,01$ ) na 4. deň, v porovnaní s 2. dňom aplikácie DSS. V sledovanej skupine (DSS 5) boli potvrdené aj najvyššie straty celkovej hmotnosti, pohybujúce sa v rozsahu 5-14%. Zápalové skóre resp. stupeň zápalu bol charakterizovaný sledovaním skóre konzistencie trusu, rektálneho krvácania a straty celkovej hmotnosti. Zápalové skóre sa u skupiny DSS 5 postupne zvyšovalo v závislosti od pokročilosti zápalu, a najvyššie skóre v 10 bodovej stupnici na úrovni 5-6, poukazuje na mierny až stredný zápal črevnej sliznice kaudálneho úseku tráviaceho traktu (kolónu). Svetelnou mikroskopiou (Tab. 2) sme pri porovnaní veľkosti reznej plochy kľkov kolóna sledovaných skupín zaznamenali, že skupina zvierat s 5% aplikáciou DSS (DSS 5) mala túto reznú plochu významne najmenšiu ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ), v porovnaní so skupinami zvierat s 3 a 1% aplikáciou DSS. Zároveň sme v rovnakom úseku čreva skupiny (DSS 5) pozorovali aj najmenší, štatisticky významný obvod kľkov, výšku kľkov, ako aj najnižšiu hĺbku krýpt ( $p < 0,001$ ). Histopatologickou analýzou boli potvrdené zmeny, ktoré sa prejavovali prítomnosťou edému v submukóze, edematóznymi zmenami v *lamina propria*, rozrušením architektúry krýpt, miernou eróziou alebo ulceráciou epitelu, infiltráciou polymorfonukleárných leukocytov do submukózy a *lamina propria*. Na základe dekontaminácie selektívnymi antibiotikami a sledovanej patogenézy ulceróznej kolitídy pri rôznych koncentráciách jej chemickej indukcie sme získali optimálny animálny gnotomodel ulceróznej kolitídy, manifestujúci sa atrofickými zmenami na sliznici kaudálneho úseku čreva, s infiltráciou leukocytov v čreve, sprevádzané úbytkom hmotnosti, dehydratáciou a miernym krvácaním z rekta. Optimálna 5% koncentrácia chemickej indukcie UC pomocou DSS bude následne použitá v postupoch s transplantáciou fekálnej mikrobioty pacientov s IBD gnotobiotickým myšiam.

*Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu APVV-16-0176.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ramos GP, Papadakis KA. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin Proc.* 2019; 94:155-165.
- Van der Waaij D, Sturm C. A. Antibiotic decontamination of the digestive tract of mice. *Technical procedures. Lab Anim Care.* 1968; 18:1-10.
- Johnson SA, Nicolson SW, Jackson S. The effect of different oral antibiotics on the gastrointestinal microflora of a wild rodent (*Aethomys namaquensis*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2004; 138:475-483.
- Puhl NJ, et al. Antibiotics conspicuously affect community profiles and richness, but not the density of bacterial cells associated with mucosa in the large and small intestines of mice. *Anaerobe.* 2012; 18:67-75.
- Ubeda C, et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest.* 2010; 120:4332-4341.
- Gancarcíková S, et al. Antibiotic-Treated SPF Mice as a Gnotobiotic Model. *InTech.* 2018; 45-83.

# POHLAVNÝ DIMORFIZMUS V METABOLIZME LIPIDOV: DÔLEŽITÝ FAKTOR KLINICKEJ PRAXE

Leškaničová A.<sup>1</sup>, Chovancová O.<sup>2</sup>, Babinčák M.<sup>1</sup>, Maceková D.<sup>2</sup>, Kostolný J.<sup>2</sup>, Šmajda B.<sup>1</sup>,  
Kisková T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied,  
Šrobárova 2, 041 80 Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup>Žilinská univerzita, Fakulta riadenia a informatiky, Katedra Informatiky, Univerzitná 8215/1, 010 26 Žilina,  
Slovenská republika

## ABSTRAKT

Krvná plazma je jedným z najbežnejšie používaných biologických materiálov na identifikáciu biomarkerov rôznych ochorení. Odber krvi je minimálne invazívny zákrok a zároveň sa v krvi nachádzajú temer všetky produkty metabolizmu. Klinické aj predklinické výskumy často analyzujú len metabolity mužskej krvi, pričom nerešpektujú výraznú odlišnosť medzi oboma pohlaviami. Cieľom nášho experimentu bolo popísať rodové rozdiely v hladinách vybraných lipidových metabolitov zdravých dospelých samíc a samcov potkanov kmeňa Wistar vo veku 90 postnatálnych dní. Sledovali sme zmeny v troch lipidových skupinách metabolitov krvi – fosfatidylcholíny, lyzofosfatidylcholíny a sfingomyelíny. Vo všetkých troch skupinách sme zaznamenali významné rodové rozdiely. Fosfatidylcholíny a lyzofosfatidylcholíny mali vyššie hladiny v krvnej plazme samíc v porovnaní so samcami. Až 90% rodovo závislých sfingomyelínov malo vyššie hladiny u samíc v porovnaní so samcami. Podľa VIP skóre bol najvýznamnejší metabolit fosfatidylcholín PC aa C38:4. Táto štúdia poskytuje dôkaz, že v metabolizme lipidov existuje silný pohlavný dimorfizmus. Identifikácia rodových rozdielov krvných metabolitov môže ďalej hrať kľúčovú úlohu v klinickej praxi.

## ÚVOD

Medzi pohlaviami existujú dôležité rozdiely, ktoré sa odzrkadľujú vo výskyte, prevalencii, veku nástupu, príznakoch či v riziku a závažnosti niektorých ochorení. Preto by sa rodové rozdiely mali študovať na všetkých úrovniach živého organizmu a vo všetkých oblastiach života (Wizemann a kol., 2001; Zakiniaez, a kol., 2016). V klinickom aj predklinickom výskume sa však využívajú viac muži/samce, ako ženy/samice a preto cieľom naďalej ostáva implementácia tohto pohlavia do výskumu ochorení a ich potenciálneho individuálneho liečebného prístupu. Okrem toho môžu *in vivo* výsledky s použitím zvieracích modelov predikovať a urýchliť vývoj nových potenciálnych liečiv s ohľadom na individuálny prístup (Campesi a kol., 2017; Legato, 2016). Molekulárne štúdie identifikujú patologické procesy nastávajúce pri rôznych ochoreniach rovnako ako farmakokinetiku, a keďže existujú ochorenia silne závislé od pohlavia, ako napríklad kardiovaskulárne ochorenia a *diabetes mellitus*, rozdiely v patológii medzi pohlaviami by sa mali stanoviť ako základ kvalitnej zdravotnej starostlivosti (Liu a kol., 2012).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili 10 zdravých samcov a 10 zdravých samíc kmeňa Wistar, ktorým bola vo veku 60 dní odobratá krvná plazma z *vena saphena*, v celkovom objeme 100 µl. Krv bola odobratá do heparínových mikroskúmaviek. Miesto odberu bolo vopred oholené a očistené dezinfekčným prostriedkom. Krvná plazma bola po odbere uskladnená pri -80°C. Plazma bola následne analyzovaná pomocou kitu AbsoluteIDQ p180 v laboratóriu BIOCRATES Life Science AG v Innsbrucku (Rakúsko). Vo vzorkách plazmy sme pomocou metódy hmotnostnej spektrometrie (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) analyzovali vybrané metabolity. Celkovo sme kvantifikovali skupinu 104 lipidových metabolitov z tried fosfatidylcholínov, lyzofosfatidylcholínov a sfingomyelínov. Kvantifikácia koncentrácií metabolitov a hodnotenie kvality sa uskutočnilo pomocou softvérového balíka MetIQ (BIOCRATES Life Science AG, Innsbruck, Rakúsko). Ostatné štatistické analýzy boli robené pomocou programu GraphPad 6.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) a programovacieho jazyka R (verzia 3.6.0) so štandardnými knižnicami

a knižnicou ggplot2 (verzia 3.1.1), ggpubr (verzia 0.2), psych (verzia 1.8.12) a GGally (verzia 1.4.0).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Metabolomika je užitočným nástrojom na analýzu veľkého počtu metabolitov a preto sa používa na stanovenie biomarkerov pre diagnostikovanie rôznych druhov reakcií na liekovú toxicitu (Seijo et al., 2013; Vouk et al., 2012). Používajú sa rôzne prístupy vrátane lipidomiky, keďže lipidové metabolity nie sú len zložkami bunkových membrán, ale podieľajú sa aj na signálnej transdukcii. Okrem toho je mozog druhou najväčšou zásobárňou tukov (po tukovom tkanive), preto je sledovanie ich metabolizmu pri neurodegeneratívnych ochoreniach kľúčové (Serhan, Chiang, & Van Dyke, 2008). Existujú zásadné genetické a fyziologické rozdiely medzi pohlaviami, vďaka čomu sú aj výskyt chorôb, ich prevalencia a príznaky u oboch pohlaví odlišné (Sparvero et al., 2010). V tejto štúdii uvádzame prehľad pohlavného dimorfizmu v metabolizme vybraných lipidov v krvi zdravých potkanov. Zistili sme, že zo 104 lipidových metabolitov je 66% štatisticky významne odlišných u oboch pohlaví. Zo skupiny lyzofosfatidylcholínov bolo 8 zo 14 (57%) metabolitov rodovo špecifických. Viac ako polovica z nich mala vyššie hladiny u samíc (lysoPC a C18:0, lysoPC a C28:0, lysoPC a C17:0, lysoPC a C20:4, and lysoPC a C26:1). Na druhej strane, samice mali v porovnaní so samcami signifikantne nižšie koncentrácie v metabolitoch lysoPC a C20:3, lysoPC a C18:2, a lysoPC a C16:1. V skupine fosfatidylcholínov sme z krvnej plazmy samíc zistili vyššie koncentrácie 10 fosfatidylcholínov s diacylovými zvyškami a 18 fosfatidylcholínov s acyl-alkylovými zvyškami. 19 fosfatidylcholínových metabolitov bolo výrazne znížených u samíc v porovnaní so samcami. Najkonzistentnejšie výsledky sme zistili v skupine sfingomyelínov, kde až 73% (11/15) hodnotených metabolitov sa významne líšilo, pričom až 91%, čo predstavuje 10 z 11 zmenených metabolitov bolo výrazne zvýšených u samíc v porovnaní so samcami. Z výsledkov je zrejmé, že existuje veľa rodových rozdielov v metabolizme lipidov, a že metabolomika spolu s inými tzv. „omics“ prístupmi môžu pomôcť pri odhaľovaní rodových znakov v patofyziológii chorôb.

*Práca bola podporená grantami VVGS-2019-1071, VVGS-PF-2019-1040 a VVGS-PF-2019-1054.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Campesi I, et al. Sex-gender-related therapeutic approaches for cardiovascular complications associated with diabetes. *Pharmacol Res.* 2017; *119*:195-207.
- Legato MJ. Gender-specific medicine in the genomic era. *Clin Sci (Lond).* 2016; *130*(1): 1-7.
- Liu LY, et al. Sex differences in disease risk from reported genome-wide association study findings. *Hum Genet.* 2012; *131*(3): 353-364.
- Seijo S, et al. Metabolomics discloses potential biomarkers for the noninvasive diagnosis of idiopathic portal hypertension. *Am J Gastroenterol.* 2013; *108*(6):926-932.
- Serhan CN, et al. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* 2008; *8*(5):349-361.
- Sparvero LJ, et al. Mass-spectrometry based oxidative lipidomics and lipid imaging: applications in traumatic brain injury. *J Neurochem.* 2010; *115*(6):1322-1336.
- Vouk K., et al. Discovery of phosphatidylcholines and sphingomyelins as biomarkers for ovarian endometriosis. *Hum Reprod.* 2012; *27*(10):2955-2965.
- Wizemann MT, et al. Exploring the Biological Contributions to Human Health. Does Sex Matter? Washington (DC): National Academies Press (US). 2001
- Zakinaeiz Y, et al. Balance of the Sexes: Addressing Sex Differences in Preclinical Research. *The Yale journal of biology and medicine*, 2016; *89*(2): 255-259.

# IZOLÁCIA *TREPONEMA* SPP. Z KOŽE POSTIHNUTEJ DIGITÁLNOU DERMATITÍDOU U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Marčeková P.<sup>1</sup>, Maďar M.<sup>2</sup>, Mudroň P.<sup>1</sup>, Styková E.<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach, Košice

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

<sup>3</sup>Klinika koní, UVLF v Košiciach, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zistiť prítomnosť baktérií rodu *Treponema* spp. v kožných léziách hovädzieho dobytká s digitálnou dermatitídou. Vyšetrených bolo 24 vzoriek pomocou PCR s využitím primerov charakteristických pre nasledovné druhy treponém-*Treponema pedis*, *Treponema brenaborensis* a skupinu treponém *Treponema denticola* do ktorej spadajú druhy *Treponema vincentii*, *Treponema medium* spp. *bovis*, *Treponema phagedenis* ssp. *vaccae* a *Treponema denticola*. V 10 vzorkách sa zistila prítomnosť DNA druhu zo skupiny *Treponema denticola*, pričom ďalších 6 vzoriek bolo tiež suspektne pozitívnych, avšak reakcia pri elektroforéze v agarózovom géli nebola natoľko výrazná a neboli preto ani posielané na sekvenovanie. DNA druhu *Treponema pedis* bola detegovaná v 4 vzorkách a suspektne pozitívna bola ďalšia 1 vzorka. *Treponema brenaborensis* bola detegovaná len v 1 vzorke v ktorej už predtým bola detegovaná aj *Treponema pedis*. Z celkového počtu odobratých vzoriek bolo teda pozitívnych na *Treponema* spp. 12 vzoriek (50%), ak počítame aj suspektne pozitívne vzorky tak 18 čo predstavuje 75%. *Fusobacterium necrophorum* nebol detegovaný. Z našich výsledkov je možné konštatovať prítomnosť *Treponema* spp. v léziách u hovädzieho dobytká postihnutého digitálnou dermatitídou a vhodnosť PCR ako metódy ich detekcie.

## ÚVOD

Digitálna dermatitída je infekčné, zápalové ochorenie paznechtov. Prezentuje sa bolestivými ulceratívnymi alebo proliferatívnymi zmenami, ktoré vedú ku krívaniam a narúšajú tým welfare zvierat, ale aj ekonomickú efektívnosť chovu. Etiologický agens doteraz nebol s istotou potvrdený, avšak je všeobecne akceptovaný multifaktoriálny vplyv so významným zastúpením baktérií rodu *Treponema*. Niektoré zdroje uvádzajú aj možnosť spolupôsobenia *F. necrophorum*. Cieľom našej práce bolo detegovať prítomnosť týchto baktérií v léziách paznechtov u hovädzieho dobytká postihnutého digitálnou dermatitídou pomocou PCR.

## MATERIÁL A METODIKA

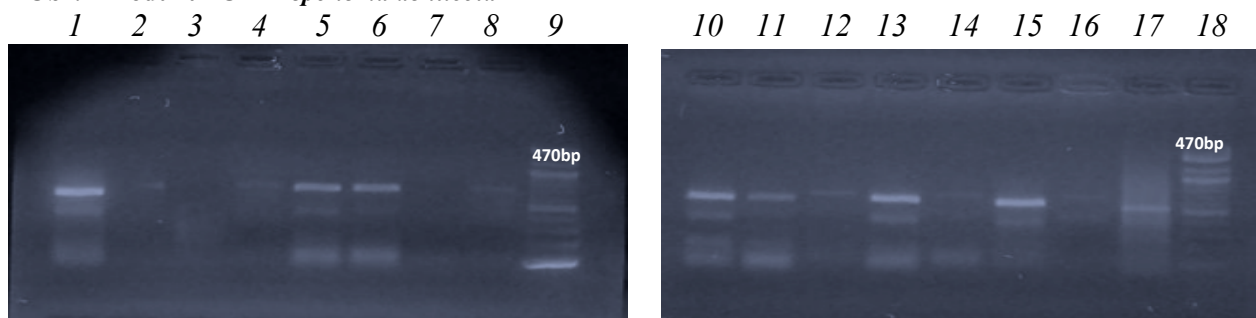
Z kožných lézií bolo odobratých 24 vzoriek z fariem hovädzieho dobytká na Východnom Slovensku. Odoberala sa časť postihnutého tkaniva po mechanickom odstránení nečistôt u zvierat prejavujúcich klinické príznaky digitálnej dermatitídy. Vzorky boli do vyšetrenia metódou PCR uskladnené pri teplote - 20°C. Na izoláciu DNA bola vybraná metóda s použitím DNAzol. Podmienky následnej detekcie treponém sú uvedené v tabuľke 1.

**Tab. 1. Podmienky detekcie treponém**

Detekovaný druh,marker	Primery	PCR protokol	Očakávaný produkt
<i>Treponema pedis</i> , <i>flaB2</i>	TPed32f: 50 - cttacttacaggaaactacggac-3' ;  Tped-500r: 50 - gcaatgtaattcctacaaccgtaag-3'	94°C 5min 35x [94°C 30sec, 61°C 30sec,72°C 40sec] 72°C 5min	424bp
<i>Treponema brennaborensis</i> , 16SrRNA	TBrenn-418f: 50 - gacagcgtggtgacagtagg-3' ;  TBrenn-1080r: 50 - cttgctgtaactggcagtagg-3'	94°C 5min 35x [94°C 30sec, 61°C 30sec,72°C 40sec] 72°C 5min	663bp
Skupina <i>Treponema denticola</i> , <i>flaB2</i>	TMult-2f: 5- acggyatttcyttattcaagttgc-3;  TMult-472r: 5- cgagtctgtytggtatgcacc-3	94°C 5min, 45x [94 °C 30sec, 63°C 30sec, 72°C,40sec] 72 °C 40sec	470bp

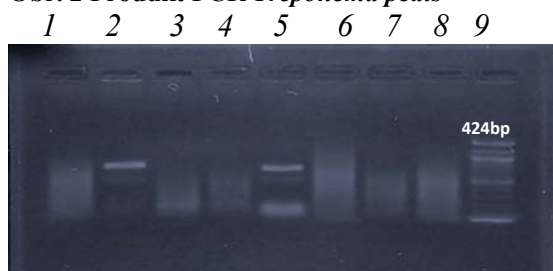
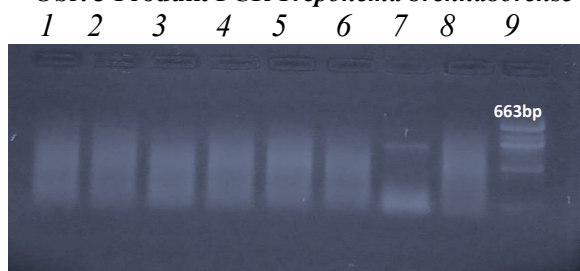
**VÝSLEDKY A DISKUSIA**

Najčastejšími detegovanými boli treponémy skupiny *Treponema denticola*. Ich prítomnosť sa potvrdila v 10 vzorkách a suspektne pozitívnych bolo ďalších 6 vzoriek. U týchto suspektne pozitívnych vzoriek bol síce pozorovaný produkt v očakávanej oblasti agarózového gélu, avšak bol signifikantne slabší ako u vzoriek, ktoré sme označili ako jednoznačne pozitívne.

**Obr.1 Produkt PCR *Treponema denticola***

Stĺpce 1-8 a 10-17 vzorky, stĺpce 9 a 18 marker. Pozitívne vzorky: 1,5,6,10,11,13,15,16,17 Suspektne pozitívne vzorky: 2, 4, 8,12, 14,

*Treponema pedis* bola detegovaná v 5 vzorkách a suspektne v ďalšej jednej. Na *Treponema brennaborensis* bola pozitívna len jedna vzorka .

**Obr. 2 Produkt PCR *Treponema pedis*****Obr. 3 Produkt PCR *Treponema brennaborensis***

Celkovo bolo na *Treponema* spp. pozitívnych 12 vzoriek čo predstavuje 50%, v prípade že sa zohľadnia aj suspektne pozitívne tak 18 (75%).

Treponémy sú už dlhšie akceptované ako predominantný bakteriálny druh nachádzajúci sa v aktívnych dermatitídnych léziách (Demirkan a kol.2018). Sú veľmi náročné na kultiváciu, a preto sa ich detekcia pomocou PCR spolu s histologickým vyšetrením, považuje za najlepšiu metódu na ich diagnostiku. Rovnako ako Brandt a kol.(2011) sme v našej štúdií amplifikovali špecifický fragment génu 16S rRNA pre detekciu *Treponema brennaborensis* a gén kódujúci flagelín flaB2 pre detekciu *Treponema denticola* a *Treponema pedis*. V ich štúdií sa pozitívny nález treponém objavil až v 38 vzorkách zo 45 a po použití citlivejšej kvalitatívnej PCR až v 42 vzorkách, čo predstavuje 93,3%. 2 z 3 lézií s negatívnym nálezom predstavovali chronickú formu digitálnej dermatitídy. Najčastejšou sa vyskytujúcou bola v tejto štúdií *Treponema pedis* objavená v 51% vzoriek, naproti tomu u nás najčastejšie sa vyskytujúcou bola skupina treponém *Treponema denticola* (41,7% /66,7%). Ďalším rozdielom v našich nálezoch bolo objavenie 1 pozitívnej vzorky na *Treponema brennaborensis*, ktorú v tejto štúdií nedetegovali v žiadnej vzorke. Wilson-Welder a kol.(2015) taktiež udávajú jej menej častý výskyt v léziách. Rasmussen a kol. (2012) uvádza vo svojej štúdií možnosť spolupôsobenia *F. necrophorum* pri vzniku digitálnej dermatitídy, nakoľko bol tento anaerób zachytený v bioptátoch z dvoch lézií tohto ochorenia. Beninger a kol.(2018) popisujú signifikantne vyššie množstvo prítomných treponém v aktívnych, ulceratívnych léziách ako v hojacich sa a chronických.

Záverom je možné konštatovať, že pomocou metódy PCR sa podarilo zistiť prítomnosť *Treponema* spp.v léziách u hovädzieho dobytku postihnutého digitálnou.

*Práca vznikla za podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-16-0203.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brandt S, et al. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Vet Microbiol.* 2011;148(2-4):161-7
- Rasmussen M, et al. Bovine digital dermatitis: Possible pathogenic consortium consisting of *Dichelobacter nodosus* and multiple *Treponema* species. *Vet Microbiology* 2012; 160:151–161.
- Beninger C, et al. Associations between digital dermatitis lesion grades in dairy cattle and the quantities of four *Treponema* species. *Veterinary Research.* 2018;49:111.
- Demirkan I, et al. Isolation and identification of *Treponema pedis* and *Treponema phagedenis*-like organisms from bovine digital dermatitis lesions found in dairy cattle in Turkey. *J dairy Sci.*2018;101(11):10317-10326.
- Wilson-Welder J, et al. Digital Dermatitis in Cattle: Current Bacterial and Immunological Findings.2015;5(4):1114-1135.



# CHALKÓNY AKO INHIBÍTORY RASTU NÁDOROVÝCH BUNIEK PRSNÍKA

Michalková R.<sup>1</sup>, Takáč P.<sup>2</sup>, Kello M.<sup>1</sup>, Kudličková Z.<sup>3</sup>, Mojžiš J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach, Košice

<sup>2</sup>Ústav humánnej a klinickej farmakológie, UVLF v Košiciach, Košice

<sup>3</sup>Ústav farmaceutickej chémie, UVLF v Košiciach, Košice

## ABSTRAKT

K trendom súčasného výskumu patrí štúdium prírodných látok, ktoré by bolo možné využiť v chemoprevenii a/alebo terapii nádorových ochorení. Mnohé *in vitro* a *in vivo* štúdie upriamujú pozornosť na chalkóny. Doteraz boli dokázané antiproliferatívne, antiflogistické, antimikrobiálne, antiprotozoárne a i. účinky prírodných a syntetických chalkónov. V našej práci sme sa zamerali na antiproliferatívny účinok syntetických derivátov chalkónov na nádorové bunky mliečnej žľazy (MDA-MB-231 a MCF-7). Z testovaných chalkónov preukázal ZKCH11a najväčšiu antiproliferatívnu aktivitu s najnižšími hodnotami IC<sub>50</sub> 21,11 ± 3,94 μmol/l (MDA-MB-231) a 20,07 ± 7,95 μmol/l (MCF-7). Vybraný chalkón inhiboval rast a formovanie kolónií oboch línií. Na cytomorfologickej úrovni sme pozorovali zmršťovanie a zaguľacovanie buniek a stratu ich adhérencie. Pomocou prietokovej cytometrie sme ďalej analyzovali aktiváciu efektorových kaspáz 3 (MDA-MB-231) a 7 (MCF-7) a prítomnosť štiepnej formy PARP. Pozorovali sme významné zvýšenie aktivácie kaspáz exekučnej fázy apoptózy a nárast štiepnej formy PARP. Tiež sme analyzovali bunkový cyklus a pozorovali zmeny mitochondriálnych funkcií, externalizáciu fosfatidylserínu a uvoľnenie cytochrómu *c*. Tieto výsledky naznačujú, že študovaný chalkón spôsobil zastavenie bunkového cyklu a indukoval mitochondriálnu dráhu apoptózy.

## ÚVOD

Maligne nádory mliečnej žľazy patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce onkologické ochorenia u žien na celom svete a sú druhou najčastejšou príčinou úmrtia po nádoroch pľúc. Incidencia malígnych ochorení prsníka stúpa s vekom a predpokladá sa jej ďalší nárast v súvislosti so zvyšujúcou sa priemernou dĺžkou života, preberaním západného životného štýlu a vyšším výskytom obezity (Feng a kol., 2018). Preto sa mnohé štúdie zaoberajú možným uplatnením prírodných látok v prevencii a terapii mamárnych nádorov. K takým prírodným látkam patria polyfenoly (flavonoidy, flavolignány, izokyanidíny, protoantokyanidíny) a im príbuzné chalkóny. Týmto substanciam boli dokázané antiproliferatívne, antimetastatické a antiangiogénne účinky (Li a kol., 2017). Chalkóny, ktoré patria ku sekundárnym metabolitom mnohých rastlín a sú dôležitými prekurzormi pri syntéze flavonoidov. Pre svoju chemickú štruktúru, relatívne jednoduchý spôsob syntézy a širokú možnosť modifikácie sa stali objektmi odborníkov (Dao a kol., 2011). K známym chalkónom s biologickou aktivitou patria flavokawainy, buteín, xantohumul, likochalkón A, isoliquiritigenín a iné (Cho a kol., 2014; Jandial, 2014).

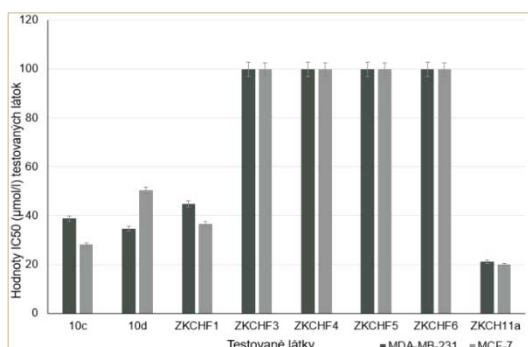
## MATERIÁL A METODIKA

Testované látky: ZKCH10c, ZKCH10d, ZKCHF1, ZKCHF3-F6, ZKCH11a  
Nádorové bunkové línie: MDA-MB-231 (ER-, PR-, HER2-), MCF-7 (ER+, PR+, HER2-)  
Metódy stanovenia antiproliferatívnej aktivity *in vitro*: MTS test  
Metódy štúdia mechanizmu antiproliferatívneho účinku: mikroskopia s fázovým kontrastom, analýza klonogénneho rastu, analýzy prietokovej cytometrie (detekcia aktivity kaspáz 3 a 7, detekcia štiepenia PARP, analýza bunkového cyklu, detekcia externalizácie fosfatidylserínu, detekcia zníženia mitochondriálneho membránového potenciálu, detekcia uvoľnenia cytochrómu *c*).

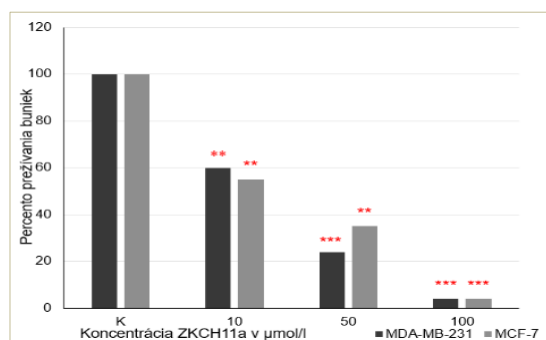
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na stanovenie antiproliferatívnej aktivity testovaných chalkónov na nádorových bunkových líniiach MDA-MB-231 a MCF-7 sme použili MTS test. Hodnoty  $IC_{50}$  študovaných chalkónov sú znázornené v Grafe č. 1. Ako látka s najnižšou inhibičnou koncentráciou sa preukázal chalkón ZKCH11a s  $IC_{50}$   $21,11 \pm 3,94 \mu\text{mol/l}$  (MDA-MB-231) a  $20,07 \pm 7,95 \mu\text{mol/l}$  (MCF-7) (Graf č. 2). Apoptóza je okrem biochemických zmien na úrovni buniek charakterizovaná aj radom morfológických zmien, počnúc zmršťovaním buniek až po vznik apoptotických teliesok. Charakteristické cytomorfologické odlišnosti buniek ako dôsledok apoptózy vplyvom látky ZKCH11a sme analyzovali využitím mikroskopie s fázovým kontrastom. S chalkónom inkubované bunky (MDA-MB-231 aj MCF-7) sa na morfológickej úrovni odlišovali od buniek kontroly (zmršťovanie a zaguľacovanie buniek a strata ich adherentnej schopnosti) s maximálnym efektom po 72 h inkubácii (Obr. č. 1). Schopnosť buniek MDA-MB-231 a MCF-7 prežívať vplyvom ZKCH11a sme analyzovali použitím analýzy klonogénneho rastu. Ako vyplýva z Obr. č. 2 testovaná látka v koncentrácii 30  $\mu\text{mol/l}$  po 10 dňovej inkubácii preukázateľne potláčala tvorbu kolónií obidvoch nádorových bunkových línii MDA-MB-231 aj MCF-7, pričom tento efekt mal stúpajúcu tendenciu v závislosti od času s maximom po 48 inkubácii. Pomocou uvedenej metódy je možné hodnotiť schopnosť malého počtu nádorových buniek proliferovať a formovať nové kolónie počas niekoľkodňovej inkubácie. Aj syntetický chalkón DK143 významne inhiboval tvorbu kolónií nádorových buniek MDA-MB-231 a MCF-7 (Lee a kol., 2016). Pretože apoptotický proces je sprostredkovaný kaspázami, v ďalšej analýze sme sledovali vplyv látky ZKCH11a na aktiváciu efektorových kaspáz 3 a 7. Chalkón ZKCH11a indukoval aktiváciu kaspázy 3 resp. 7 (MDA-MB-231 resp. MCF-7) po 24 h inkubácii viac ako dvojnásobne v porovnaní s neovplyvnenými bunkami (kontrola) (Graf č. 3 a 4). Tento efekt pretrvával v prípade obidvoch bunkových línii aj po 48 h a 72 h. Pri bunkovej línii MCF-7 je možné detegovať len aktivitu kaspázy 7, pretože u tejto línie nedochádza k expresii exekučnej kaspázy 3. Počas apoptotického procesu dochádza pomocou aktivovaných kaspáz k štiepeniu enzýmu PARP (poly(ADP-ribóza)polymeráza), ktorý sa podieľa na opravách poškodenej DNA. Dôsledkom toho je propagácia apoptotického procesu s charakteristickými zmenami na biochemickej aj morfológickej úrovni. Detekcia štiepenej formy tohto enzýmu teda slúži ako dôkaz aktivácie bunkovej smrti. Ako vyplýva z našich analýz (Graf č. 5), vplyvom chalkónu ZKCH11a došlo k významnému štiepeniu PARP vo všetkých časových intervaloch (24 h, 48 h, 72 h) na nádorovej bunkovej línii MDA-MB-231 aj MCF-7. Výsledkom je zabránenie opravy DNA s nezvratnou smrťou buniek. Gao et al. (2016) dospeli k podobným záverom vo svojej štúdií, v ktorej potvrdzujú schopnosť prenylovaného chalkónu paratokarpínu E indukovať apoptózu buniek MCF-7 spojenú s aktiváciou kaspáz -8, -9 a štiepením PARP. Výsledky tejto analýzy potvrdzujú aktiváciu apoptotických mechanizmov vplyvom derivátu ZKCH11a. Tiež sme analyzovali bunkový cyklus a pozorovali zmeny mitochondriálnych funkcií, externalizáciu fosfatidylserínu a uvoľnenie cytochrómu *c*. Tieto výsledky naznačujú, že študovaný chalkón spôsobil zastavenie bunkového cyklu a indukoval mitochondriálnu dráhu apoptózy (údaje nezverejnené).

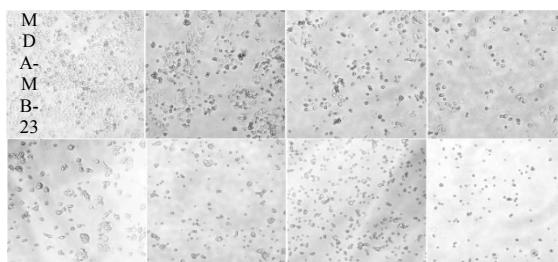
Graf č. 1 Hodnoty  $IC_{50}$  ( $\mu\text{mol/l}$ ) testovaných látok



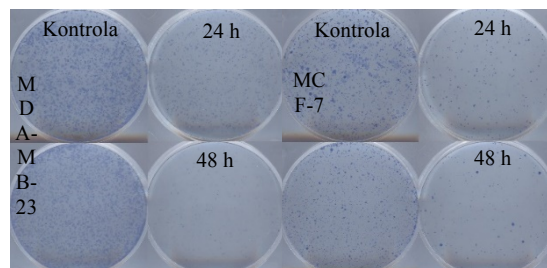
Graf č. 2 Percento prežívania buniek MDA-MB-231 a MCF-7



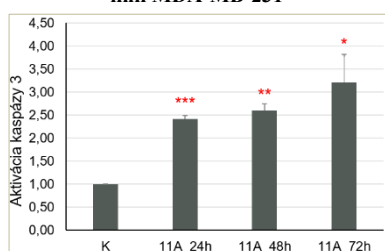
**Obr. č. 1 Mikroskopické zobrazenie buniek MDA-MB-231 nádorovej a línie MCF-7**



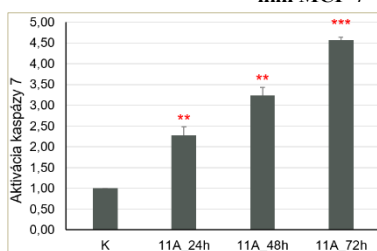
**Obr. č. 2 Analýza klonogénneho rastu MDA-MB-231 a MCF-7**



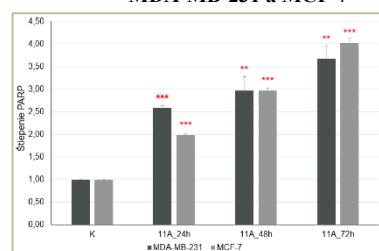
**Graf č. 3 Aktivácia kaspázy 3 pri bunkovej línii MDA-MB-231**



**Graf č. 4 Aktivácia kaspázy 7 pri bunkovej línii MCF-7**



**Graf č. 5 Štiepenie PARP línií MDA-MB-231 a MCF-7**



Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0018/16, 1/0753/17, VEGA 1/0653/19) a Agentúry na podporu výskumu a vývoja (APVV-16-0446).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dao TT., Linthorst HJ., Verepoorte R. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. *Phytochemistry reviews* : proceedings of the Phytochemical Society of Europe. 2011;10(3):397 – 412.
- Feng T, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*. I. 2018; 5(2):77 – 106.
- Gao S, et al. Growth inhibitory effect of paratocarpin E, a prenylated chalcone isolated from *Euphorbia humifusa* Wild., by induction of autophagy and apoptosis in human breast cancer cells. *Bioorganic chemistry*. 2016; 69(1):121 – 128.
- Cho SG, Woo SM, Ko SG. Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species. In *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR. 33(51):1 – 11.
- Jandial DD, et al. Molecular Targeted Approaches to Cancer Therapy and Prevention Using Chalcones. *Current cancer drug targets*. 2014; 14(2):181 – 200.
- Lee DY, et al. A synthetic chalcone derivative, 2-hydroxy-3',5,5'-trimethoxychalcone (DK-139), suppresses the TNF $\alpha$ -induced invasive capability of MDA-MB-231 human breast cancer cells by inhibiting NF- $\kappa$ B-mediated GRO $\alpha$  expression. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016; 26(1):203 – 208.
- Li Y, et al. Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Breast Cancer. *Nutrients*. 2017; 9(7):1 – 38.

## KAZUISTIKA: KVANTOVÁ FYZIKA V DIAGNOSTIKE A TERAPII MALÝCH ZVIERAT

Micháľová A., Fialkovičová M., Takáčová M.

*Klinika malých zvierat – Oddelenie vnútorných chorôb, UVLF, Košice*

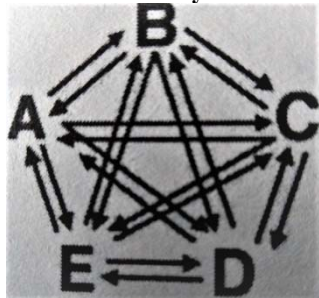
### ÚVOD

Frekvenčná terapia je v medicíne aplikovaná prostredníctvom biorezonancie, ktorá je biofyzikálnou diagnostickou a terapeutickou metódou. Jej základným princípom je spojenie kvantovej fyziky a tradičnej čínskej medicíny. Výhodou tejto metódy je neinvazívny zásah do organizmu, ktorý prostredníctvom kvantovej fyziky a poznatkom tradičnej čínskej medicíny zabezpečuje hĺbkový účinok na biologické regulačné systémy organizmu, ktorý je v dnešnej dobe vystavený mnohým záťažiam, ako sú napr. plesne, alergény, konzervačné látky, čím môže dôjsť k tomu, že jeho regulačná schopnosť bude spomalená, alebo zablokovaná. Podstatou celej tejto techniky je vzájomná komunikácia medzi bunkami na princípe kvantovej fyziky, t.j. kvantového modelu, ktorý sa v medicíne využíval už pred našim letopočtom. V klasickej medicíne sme zvyknutí rozmýšľať lineárnym spôsobom. To znamená, že jedna akcia vyvolá reakciu (A), ktorá vyvolá ďalšiu reakciu (B) a tá vyvolá ďalšiu reakciu (C) atď., čiže jedna akcia spustí celú reťaz lineárne nasledujúcich reakcií (Lipton, 2005).

**A → B → C → D → E**

Z perspektívy kvantovej medicíny je potrebné si uvedomiť, že ak v organizme nastane porucha jedného orgánu (A), organizmus na danú dysfunkciu bude reagovať ako celok a zmeny sa objavia na všetkých orgánových sústavách súčasne (B,C,D,E), (Lipton, 2005). Tento kvantový prístup v terapii vníma pacienta ako celok. To znamená, že ak by došlo k nejakej zmene v pečeni, neovplyvnilo by to iba činnosť srdca, ale prostredníctvom orgánových energetických dráh by zmeny v pečeni zásadne ovplyvnili taktiež funkciu sleziny, pľúc a obličiek.

**Obr.1** Kvantový model vzajomnej interakcie



Zdroj: Lipton str.109

Treba si uvedomiť, že akékoľvek zmeny sa na orgánových sústavách nemusia prejavovať hneď na úrovni biochemického vyšetrenia krvi alebo nemusia byť klinicky evidentné, pretože všetky zmeny prebiehajú najprv na energetickej úrovni, a až neskôr sa manifestujú do klinickej formy (Li-Ling, 2003). Podľa poznatkov kvantovej fyziky je hmota vlastne energia a všetky substancie vrátane jednotlivých častí tela, vírusov, toxínov, peľov, baktérií, atď. majú svoje elektromagnetické vyžarovanie. Tým, že orgány a bunky medzi sebou vzájomne komunikujú, akákoľvek biologická dysfunkcia môže byť dôsledkom chybnej komunikácie v ktorejkoľvek vetve celého informačného toku. V zdravom organizme prebieha táto medzibunková komunikácia plynule, avšak zásahom akéhokoľvek žiarenia, alebo záťaže v podobe patogénu, toxínu, atď. môže byť táto medzibunková komunikácia narušená. Dôsledkom tejto narušenej komunikácie buniek môže byť chronická únava, slabosť, depresia, stres a následne orgánové zmeny (Zhang a kol., 2005). Každá takáto dysfunkcia môže byť zaznamenaná a následne korigovaná prostredníctvom biorezonancie (frekvenčnej terapie),

ktorá je založená na princípe kvantovej fyziky a tradičnej čínskej medicíny (TCM). Výhodou tejto metódy je, že lekári nemusia študovať samostatne TCM, ale prostredníctvom špeciálnych testovacích sád, ktoré sú dostupné k prístroju, dokážu pacienta diagnostikovať aj z hľadiska tradičnej medicíny. Diagnostika a terapia je zložená z viacerých krokov, ktorými sú bioenergetické testovanie, zistenie záťaží a následné stanovenie terapie.

## PRÍPADOVÁ ŠTÚDIA

Sledovaným pacientom bola osemročná suka plemena Anglický buldog „Zuza“, ktorá trpela vypadávaním srsti, vznikom svrbivých kožných zmien na laterálnej a ventrálnej oblasti brucha, hnačkami a popraskanou kožou na planum nasale. Pacientke bola už v mladosti stanovená diagnóza hypersenzitivita na krmivo. Z uvedených dôvodov mala odporúčanú varenú stravu bez kuracieho mäsa. Zvieru bolo kŕmené bravčovým mäsom, hrtanmi ku ktorým majiteľ pridával cestoviny. Na túto kŕmnu zmes reagovala suka hnačkou, vomitom, pruritom a kožnými problémami. Dermatologické lézie boli lokalizované v okolí očí a nosa, v axilách, laterálnej a ventrálnej strane brucha.

Po základnom klinickom vyšetrení boli všetky triasové hodnoty v norme, avšak jazyk bol červený a suchý. Koža bola suchá a srst matná. Mikroskopické vyšetrenie nepreukázalo prítomnosť ektoparazitov. Kultivačné vyšetrenie nepotvrdilo ani prítomnosť plesní. Z pohľadu tradičnej čínskej medicíny môžeme tvrdiť, že suka bola vo zvýšenej energetickej hladine, mala viaceré energetické blokády a zvieru bolo potrebné detoxikovať. Odstránenie energetických blokády je v tomto prípade možné urobiť prostredníctvom akupunktúry, alebo frekvenčnej terapie (biorezonancie) a detoxikáciu organizmu môžeme urobiť prostredníctvom správnej diéty, fytoterapie, alebo tiež biorezonancie. V našom prípade sme si v oboch smeroch zvolili biorezonančnú terapiu, ktorú sme začali tým, že všetky typy krmív a potravín, ktoré boli doposiaľ podávané pacientke sme vytestovali prostredníctvom biorezonancie, ktorá nám na základe biorezonančných frekvencií potvrdila, ktoré typy krmiva, sú pre suku vhodnými a ktoré jej škodia. Po vytestovaní sme diétu zvieratú upravili na mieru, prostredníctvom konkrétne vytestovaných jedál (ryža, zemiaky, karfiol, brokolica). Vzhľadom k tomu, že žiadne varené mäso, ktoré majiteľ priniesol nebolo vhodné na kŕmenie, otestovali sme ešte ryby, jahňacie a králičie mäso. Uvedené mäso majiteľ mohol podávať z praktických dôvodov vo forme granúl, ktoré sa po otestovaní prejavili ako vhodné a nealergizujúce. Z týchto pozitívne vytestovaných typov hypoalergénnych krmív sme zvieratú zostavili individuálny diétny plán. Následne sme pokračovali frekvenčnou terapiou (biorezonanciou), ktorá pozostávala zo základného programu, ktorý upravuje stav pacienta na klasickom princípe TCM. Keďže bol pacient v stave energetického nadbytku, pomocou základného programu sme jeho energetický nadbytok znížili. Neskôr sme pokračovali s elimináciou blokády pacienta, ktoré spôsobujú nekomplexné energetické prúdenie energie v organizme a následne sme pokračovali detoxikačnými programami, v tomto prípade to boli frekvencie na detoxikáciu pečene, obličiek a lymfy. Počas terapií sme pacientovi aplikovali tiež antipruritické frekvencie. Pre zvieru sme vybrali vhodné typy prírodných prípravkov ako doplnkovú terapiu, ktorých vhodnosť sme si tiež potvrdili, prostredníctvom biorezonancie. Po troch terapiách, ktoré prebehli počas dvoch mesiacov bol stav zvieratá výrazne upravený. Vomitus a hnačka sa viac neobjavili a postupne ustal aj pruritus na hlave a na tele.

## ZÁVER

Potravinové alergie a pruritus sú problémom mnohých zvierat. Nie sú to ochorenia, ktoré by akútne ohrozovali život, ale vyžadujú veľmi dôslednú diagnostiku a terapiu. Keďže kožné problémy bývajú riešené hlavne symptomatologicky, tak vo väčšine prípadov bývajú prvou a najrýchlejšou terapeutickou voľbou kortikoidy (Svoboda a kol., 2000) a inhibítory Janus kinázy, ktoré môžu zastaviť pruritus, ale neriešia príčinu. V prípade potravinovej alergie je

potrebné upraviť diétu podľa potreby pacienta, a všetky alergizujúce potraviny bezpodmienečne vylúčiť a zvierat'u nepodávať (Wagner, 2014). Je však potrebné pripomenúť, že diéta sa u psa môže časom meniť podľa aktuálneho zdravotného stavu, čo je samozrejme možné znova vytestovať prostredníctvom frekvencií. Na základe viacerých štúdií, ktoré boli vykonávané u pacientov trpiacich alergiou a pruritom bolo preukázané, že asi 63% alergických pacientov bolo frekvenčnou terapiou vyliečených úplne, u 20,5% pacientov bolo zaznamenané výrazné zlepšenie po terapii, u 10,2% pacientov došlo k miernemu zlepšeniu a u 6,3% pacientov bol stav po terapii bez zmeny (Hennecke, 1994). Okrem biorezonančnej terapie, ktorá stav alergických pacientov vo väčšine prípadov zlepšuje, je tiež dôležitá eliminácia patogénneho faktoru (Schoen, 1994). Existuje niekoľko vedeckých štúdií v oblasti biofyziky, ktoré dokazujú, že sily z elektromagnetického spektra majú hlboký účinok na biologické regulačné systémy. Vzniklo aj početné množstvo prípadových štúdií, získaných skúsenosťami, správami, zdokumentovaných observačných štúdií a štúdií o spôsobe účinku tejto biofyzikálnej diagnostickej a terapeuticko-terapeutickej metódy (Shuiming a kol, 2005). Biorezonančná metóda je vo svojej podstate neinvazívnou, komplementárnou metódou, fungujúcou na princípe biofyziky, ktorá dokáže ochorenia diagnostikovať a zároveň liečiť. Taktiež dokáže pre každého pacienta samostatne vytestovať vhodné lieky, výživové doplnky a potraviny priamo na mieru. Svojim individuálnym diagnostickým a terapeutickým prístupom sa každým dňom stáva vyhladávanejšou diagnostickou a terapeutickou metódou medzi pacientmi.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hennecke J.: Energetic Allergy Therapy – Possibilities and Experiences with Bicom Bioresonance Therapy; Medical Journal of Naturopathy 35 (1994) 427432.
- Li-Ling J. The Jing-Mai connections of the heart. International Journal of Cardiology. 2003;89(1):1–11.
- Lipton B., 2005. Biológia presvedčenia. Slovenské vydanie, Eugenika Pbl. 2011, Bratislava 2011: 105-111. ISBN 978-80-8100-286-1.
- Shuiming Huang, Sun Zhangping, Fang Yucui: Clinical observation of the treatment of allergies and bronchial asthma in children with the bioresonance therapy device; Zhejiang Medical Journal (official translation), Edition 6/Volume 27/2005.
- Schoen, AM.(1994). Veterinary acupuncture: Ancient art to modern medicine [1st ed] : 50- 245. Edit for SCHOEN A.M. Saint-Louis : MOSBY.
- Svoboda M. et al: Choroby psa a mačky. 1. Diel, Brno, 2000: 336, ISBN: 80-902595-2-9.
- Wagner C., 2014. Dostupné na internete: <http://hawthornevet.com/wp-content/uploads/2014/09/Food-Therapy-Lecture1.pdf>.
- Zhang Xinlian, Wang Wenjie, Liu Qiang: Clinical observation of 54 cases treated for nettle rash using the BICOM bioresonance therapy device: China Scientific and Technical Journal, China Academic Journal (official translation). 2005; 21(8).

# VPLYV ENDOPARAZITÓZY A NUTRACEUTÍK NA BACHOROVÝ MIKROBIÓM JAHNIAT

Mravčáková D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť účinok zmesí medicínálnych rastlín (Mix1 a Mix2) na bachorovú mikrobiálnu populáciu jahniat experimentálne infikovaných gastro-intestinálnym (GI) parazitom *Haemonchus contortus*. Zmesi Mix1 a Mix2 obsahovali identifikované rastlinné bioaktívne látky a boli jahňatám podávané v krmive ako nutraceutiká. Dvadsaťštyri jahniat bolo rozdelených do štyroch experimentálnych skupín: 1. zdravé zvieratá (Kontrola, K), 2. infikované zvieratá (I), 3. infikované zvieratá suplementované s Mix1 (I+Mix1) a infikované zvieratá suplementované s Mix2 (I+Mix2). Mikrobióm bachorovej tekutiny jahniat bol analyzovaný v podmienkach *in vivo* a *in vitro*. V porovnaní s K bol signifikantne vyšší počet celkových baktérii vo všetkých infikovaných skupinách *in vivo* aj *in vitro* ( $p < 0,01$ ). Bola zaznamenaná zmena diverzity bakteriálnych druhov pravdepodobne vplyvom parazitárnej infekcie. Súčasne so zvýšením počtu baktérii došlo k poklesu počtu bachorových metanogénov v infikovaných skupinách ( $p < 0,01$ ) *in vitro*, čo ale nebolo potvrdené v pokuse *in vivo* ( $p > 0,05$ ). Výsledky ukázali, že rastlinné nutraceutiká podávané 70 dní nakazeným jahňatám nedokázali ovplyvniť zmeny v bachorovej mikrobiálnej populácii spôsobené endoparazitárnou infekciou.

## ÚVOD

Gastrointestinálny (GI) trakt sa vyznačuje najhustejšou a najrozmanitejšou mikroflórou, kde parazity a mikroorganizmy zdieľajú spoločné prostredie a navzájom sa ovplyvňujú. *Haemonchus contortus* patrí k jedným z najpatogénnejších GI parazitov malých prežúvavcov. Dospelé jedince tohto parazita žijú v sleze, kde sa živia krvou a spôsobujú infekčné ochorenie nazývané hemonchóza (Besier a kol., 2016). *H. contortus* manipuluje mikrobiómom hostiteľského zvieratá, čo uľahčuje jeho prežitie, napomáha reprodukciu a zabraňuje jeho obmedzeniu v GI trakte (El-Ashram a kol., 2017). Nutraceutiká vo forme liečivých rastlín obsahujú množstvo rastlinných sekundárnych metabolitov (PSM) s rozmanitými biologickými aktivitami (Spiegler a kol., 2017), ktoré dokážu ovplyvniť zdravotný stav zvierat (Váradyová a kol., 2018). Navyše majú schopnosť inhibovať alebo podporovať rast niektorých mikroorganizmov v GI trakte, a preto cieľom nášho experimentu bolo zistiť vplyv podávania rastlinných nutraceutík na zloženie bachorového mikrobiómu pri hemonchóze jahniat.

## MATERIÁL A METODIKA

Dvadsaťštyri jahniat vo veku 3 mesiacov bolo rozdelených do 4 skupín: 1. zdravé (Kontrola, K), 2. infikované (I), 3. infikované s Mix1 (I+Mix1) a infikované s Mix2 (I+Mix2). Zvieratá boli perorálne nakazené s približne 5 000 L3 larvami kmeňa *H. contortus* citlivého na antihelmintiká (MHco1). Jahňatá boli kŕmené lúčnym senom (600 g sušiny/deň) a koncentrátom (350 g sušiny/deň). Zmesi sušených rastlín, Mix1 a Mix2, boli podávané denne v množstve 100 g sušiny/deň/zviera po dobu 70 dní. V zmesiach Mix1 a Mix2 bolo 9 rastlinných druhov s obsahom bioaktívnych látok (Mravčáková a kol., 2019). Po 70 dňoch boli zvieratá usmrtené a bachorová tekutina bola použitá na stanovenie počtu baktérii a metanogénov v pokusoch *in vivo* aj *in vitro*. Počet metanogénov bol stanovený prostredníctvom fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (Jozefiak a kol., 2013). Z bachorovej tekutiny bola izolovaná DNA (Yu a Morrison, 2004). Jednotlivé druhy baktérii boli stanovené prostredníctvom real-time PCR. V bachorovej tekutine bola stanovená chromatograficky koncentrácia metánu, unikavých mastných kyselín (UMK) a počet prvokov.



## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z Tab. 1 je zrejmé, že počet celkových baktérii v *in vitro* experimente bol vyšší v I skupine v porovnaní s ostatnými skupinami ( $p < 0,01$ ). Prítomnosť Mix1 a Mix2 pravdepodobne spôsobila zníženie počtov bachorových baktérii v I+Mix1 a I+Mix2, pretože PSM dokážu inhibovať rast celulolytických a proteolytických baktérii v bachore (McSweeney a kol., 2001). Pravdepodobne vplyvom infekcie zároveň došlo aj k zmene mikrobiálnej diverzity jednotlivých druhov baktérii a súčasnému poklesu metanogénov (Archaea) u infikovaných jahniat ( $p < 0,01$ ). Infekcia parazitom *H. contortus* môže zvyšovať početnosť bakteriálnej populácie a zároveň znižovať početnosť Archaei v sleze, avšak nemusí ovplyvniť mikrobiálnu diverzitu bachora (Li a kol., 2016). Zmeny v mikrobiálnej populácii boli pravdepodobne spôsobené znížením pH vo všetkých infikovaných skupinách ( $p < 0,01$ ). V *in vitro* pokuse došlo v infikovaných a v kontrolných skupinách s rastlinami k zvýšeniu UMK s rozvetveným reťazcom (izo-butykrát, izo-valerát a n-valerát), čo tiež mohlo ovplyvniť množstvo baktérii, pretože tieto masné kyseliny sú potrebné pre rast celulolytických baktérii.

Tab. 1 Vplyv zmesí Mix1 a Mix2 na počet bachorových baktérii *in vitro* (n=9)

Parameter (10 <sup>8</sup> /mL)	Kontrola		Mix1		Mix2		<i>p</i> – hodnota	
	N-inf.	Inf.	N-inf.	Inf.	N-inf.	Inf.	Inf.	Sk.
<i>R. albus</i>	1,29 <sup>a</sup>	11,63 <sup>b</sup>	1,00 <sup>a</sup>	0,64 <sup>a</sup>	0,25 <sup>a</sup>	-	0,008	0,120
<i>R. flavefaciens</i>	0,09	0,03	-	-	0,03	-	0,480	0,430
<i>F. succinogenes</i>	0,58 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>	0,50 <sup>a</sup>	1,70 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>a</sup>	1,38 <sup>a</sup>	0,001	0,160
<i>B. proteoclasticus</i>	0,79 <sup>a</sup>	2,93 <sup>b</sup>	0,05 <sup>a</sup>	8,87 <sup>c</sup>	0,13 <sup>a</sup>	4,26 <sup>b</sup>	<0,01	<0,01
<i>B. fibrisolvens</i>	2,26 <sup>b</sup>	1,19 <sup>ab</sup>	0,19 <sup>ab</sup>	4,07 <sup>c</sup>	0,50 <sup>ab</sup>	4,54 <sup>c</sup>	0,61	0,540
Celkové baktérie	0,13 <sup>a</sup>	1,31 <sup>b</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,17 <sup>a</sup>	0,05	0,010
Archaea (10 <sup>7</sup> /mL)	1,07 <sup>c</sup>	0,88 <sup>b</sup>	0,56 <sup>a</sup>	0,86 <sup>bc</sup>	0,61 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,05	<0,01

*R. Ruminococcus*; *F. Fibrobacter*; *B. Butyrivibrio*

Sk, skupina

<sup>a</sup> $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> $p < 0,01$ ; <sup>c</sup> $p < 0,001$

Z Tab. 2 je zrejmé, že počet celkových baktérii v *in vivo* experimente bol vyšší v skupinách I, I+Mix1 a I+Mix2 v porovnaní s K ( $p < 0,01$ ). Pri infekcii spôsobenej parazitom *H. contortus* dochádza k zväčšeniu anaeróbnej mikrobiálnej masy v bachore a súčasne k znižovaniu počtu metanogénov z Archaea (Li a kol., 2016). Zníženie počtu metanogénov *in vivo* nebolo v porovnaní s *in vitro* štatisticky potvrdené. Počet prvokov zo skupiny Holotricha bol vyšší v skupine I v porovnaní s K, I+Mix1 a I+Mix2 ( $p < 0,01$ ), pravdepodobne vplyvom PSM rastlín, ako sú napríklad saponíny, ktoré vytvárajú komplexy so sterolmi v bunkovej stene prvokov, čím ich poškodzujú a následne eliminujú (Francis a kol., 2002). Približne 25% prvokov žije v spojení s metanogénmi, ich eliminácia v bachore vedie taktiež k redukcii počtu metanogénov (Jayanegara a kol., 2014).

Hemonchóza oviec zvýšila počet celkových bachorových baktérii *in vitro* a *in vivo* súčasne so zmenou diverzity jednotlivých analyzovaných bakteriálnych druhov. Zmena v mikrobiálnej populácii ovplyvnila aj koncové produkty trávenia (t.j., UMK). Doplnenie Mix1 a Mix2 do krmiva jahniat nedokázalo ovplyvniť zmeny v mikrobiálnej populácii a koncových produktoch trávenia, ktoré boli spôsobené parazitom *H. contortus*.



**Tab. 2** Vplyv Mix1 a Mix2 na počet bachorových baktérií a protozoí *in vivo* (n=6)

Skupina	K	I	I + Mix1	I + Mix2	SEM	p
Celkové baktérie (10 <sup>8</sup> /mL)	4,65 <sup>a</sup>	5,95 <sup>b</sup>	6,06 <sup>b</sup>	5,98 <sup>b</sup>	0,20	<0,01
Archaea (10 <sup>7</sup> /mL)	1,03	0,96	0,70	0,94	0,07	0,96
<i>B. fibrisolvens</i> (10 <sup>8</sup> /mL)	0,03	0,02	0,01	0,06	0,01	0,08
<i>B. proteoclasticus</i> (10 <sup>8</sup> /mL)	0,06 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	0,07	<0,01
<i>R. albus</i> (10 <sup>8</sup> /mL)	0,02	0,03	0,05	0,05	0,01	0,10
<i>F. succinogenes</i> (10 <sup>8</sup> /mL)	0,20	0,40	0,45	0,33	0,07	0,64
Celkové Protozoa (10 <sup>3</sup> /mL)	45,7	40,2	66,5	71,0	5,00	0,07
Entodiniomorpha (10 <sup>3</sup> /mL)	45,3	39,7	66,2	70,6	5,01	0,07
Holotricha (10 <sup>3</sup> /mL)	0,34 <sup>a</sup>	0,51 <sup>b</sup>	0,29 <sup>a</sup>	0,32 <sup>a</sup>	0,02	0,00

*R. Ruminococcus*, *F. Fibrobacter*, *B. Butyrivibrio*

<sup>a</sup>*p*<0,05; <sup>b</sup>*p*<0,01

*Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 14-0169 a 18-0131).*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Besier R, et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus*. Adv. Parasitol. 2016; 93: 95-143.
- El-Ashram S, et al. Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. Vet. Res. Commun. 2017; 41:263-277.
- Francis G, et al.. The biological action of saponins in animal systems: a review. Br. J. Nutr. 2002; 88:587-605.
- Jayanegara A, Wina E, Takahashi J. Meta-analysis on methane mitigating properties of saponin-rich sources in the rumen: influence of addition levels and plant sources. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 2014; 27:1426-1435.
- Jozefiak D, et al. Dietary nisin modulates the gastrointestinal microbial ecology and enhances growth performance of the broiler chicken. PLoS ONE. 2013; 8:12.
- Li RW, et al. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. Sci. Rep. 2016; 6:1-10.
- McSweeney CS, et al. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. J. Appl. Microbiol. 2001; 90:78-88.
- Mravčáková D, et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. BMC Vet. Res. 2019; 15:302.
- 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, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. BMC Vet. Res. 2018; 14:78.
- Yu Z, Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques. 2004; 36: 808-812.

# ZMENY BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ TRIBEČ VÍRUSU V ZÁVISLOSTI OD EX VIVO HOSTITEĽSKÉHO SYSTÉMU

Peňazziová K.<sup>1</sup>, Csank T.<sup>1</sup>, Pistl J.<sup>2</sup>

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Tribeč vírus (TRBV) je kliešťami prenášaný orbivírus (*Reoviridae*). Genóm TRBV pozostáva z 10 dsRNA segmentov a kóduje 13 proteínov. Cieľom našej práce je sledovanie fenotypových vlastností kmeňa TRBV16.C/16Dúbrava/PO izolovaného z kliešťa *Ixodes ricinus* na bunkových kultúrach opičieho (Vero E6), hlodavčieho (BHK 21) a humánneho (A549) pôvodu prostredníctvom plakformačného testu. Pomer počtu buniek, objem inokula a čas inkubácie (3 dni) boli počas jednotlivých pasáží (25p) zachované. Plaky z vybraných pasáží sme merali v mm<sup>2</sup>. Na štatistickú analýzu veľkosti plakov sme použili jedнокrokovú ANOVU a Tukeyho test. Množstvo vírusu vo všetkých pasážach je vyjadrené prostredníctvom výpočtu PFU/ml. Najnižší titer bol dosiahnutý v p10 A549 ( $5.8 \times 10^1$  PFU/ml) a najvyšší v p10 BHK 21 ( $3.5 \times 10^5$  PFU/ml). Na všetkých bunkových líniiach sme mohli pozorovať 3 veľkostné skupiny plakov, ktoré môžu znamenať vytvorenie aspoň trojice mutantov z pôvodného rodičovského vírusu. Veľkosť plakov sa pohybovala v rozmedzí od 0.03-2.97mm<sup>2</sup> na VeroE6, 0.26-5.93mm<sup>2</sup> na BHK 21 a 0.005-0.678mm<sup>2</sup> na A549 bunkách.

## ÚVOD

Tribeč vírus (TRBV) je orbivírus (*Reoviridae*) prenášaný najmä kliešťami druhu *Ixodes ricinus* (Hubálek a kol., 2012). V súčasnej dobe je na základe sérologických a genetických vlastností klasifikovaný ako sérotyp vírusu Great Island. Genóm TRBV pozostáva z 10 segmentov dsRNA kódujúcich 13 vírusových proteínov, z ktorých je 8 štruktúrnych a 5 je neštruktúrnych. Vo väčšine prípadov každý segment genómu kóduje jeden proteín z jedného otvoreného čítacieho rámca. Výnimky predstavujú 9 a 10 segment. V prípade koinfekcie segmentovaný genóm umožňuje genetické preskupenie TRBV s iným kompatibilným vírusom (vyhovujúci sérotyp). Proces genetického preskupovania môže spôsobiť zásadné zmeny vo fenotypových vlastnostiach vírusu. Napríklad koinfekcia buniek patogénnym a nepatogénnym kmeňom môže viesť k zvýšeniu virulencie a patogenity predtým avirulentného a nepatogénneho kmeňa (a naopak). Tento scenár má význam pri vývoji a účinnosti vakcín. V prirodzených podmienkach môže dôjsť k preskupeniu medzi vakcinačným a divokým kmeňom, čím môže vzniknúť nežiaduci fenotyp mutantu. U človeka, ktorý je náhodným hostiteľom TRBV príležitostne spôsobuje horúčkovité ochorenia a aseptickú meningitídu. Neutralizačné protilátky voči TRBV boli nájdené aj u pacientov s neurologickými ochoreniami (Hubálek a kol., 2012; Libíková a kol., 1978).

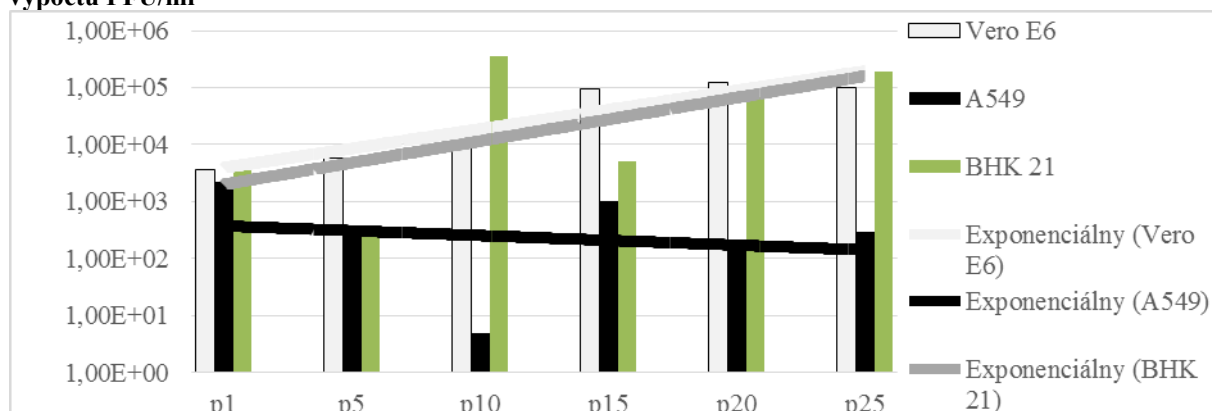
## MATERIÁL A METÓDY

V našej štúdií sme sa sústredili na sledovanie fenotypových zmien kmeňa TRBV 16.C/16 Dúbrava/PO izolovaného z kliešťa *I. ricinus* prostredníctvom plakformačného testu. Na infekciu sme použili bunkové línie opičieho (Vero E6), hlodavčieho (BHK 21) a humánneho (A549) pôvodu. Pomer počtu buniek (Vero E6 40000 b/cm<sup>2</sup>; A549 50000 b/cm<sup>2</sup>; BHK 21 75000 b/cm<sup>2</sup>), objem inokula (500μ) a čas inkubácie (3 dni) boli počas jednotlivých pasáží zachované. Ako postinfekčné médium bola využitá 2% CMC. Jednotlivé jamky boli po inkubácii fixované 10% formalínom a farbené 0.1% kryštálovou violetou. Plaky z vybraných pasáží sme merali v mm<sup>2</sup> prostredníctvom programu KODAK 1.6. Všetky plaky sme rozdelili na 3 veľkostné kategórie: malé (S), stredné (M) a veľké (L). Rozdiel medzi kategóriami je 30% (Shaw a kol., 2012). Na štatistickú analýzu veľkosti plakov sme použili jedнокrokovú ANOVU a Tukeyho test. Ďalej sme skúmali veľkosť dosiahnutého titra vo všetkých pasážach. Titer je vyjadrený prostredníctvom výpočtu PFU.

## VÝSLEDKY

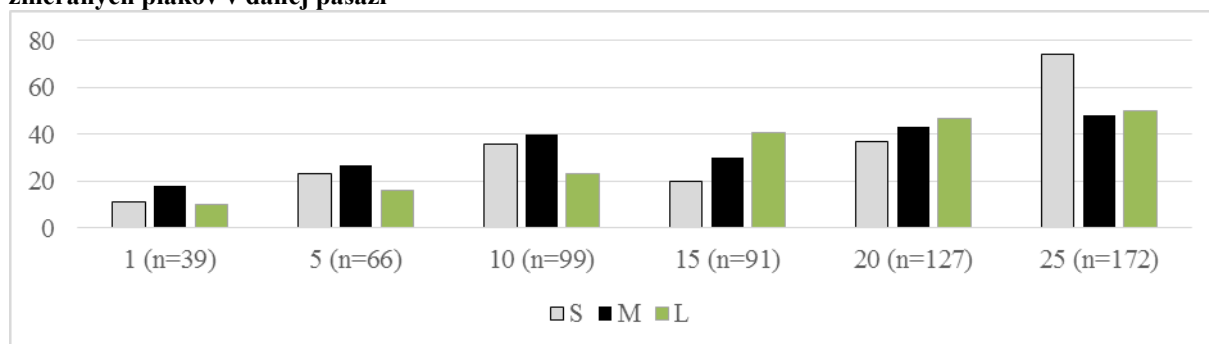
Celkovo bolo odtitrovaných 25 pasáží TRBV 16.C/16 Dúbrava/PO na Vero E6, BHK 21 a A549 bunkách. Titer vo všetkých pasáž bol určený prostredníctvom výpočtu PFU/ml. Na Vero E6 bol najnižší titer dosiahnutý v p3 ( $1.4 \times 10^2$  PFU/ml) a najvyšší v p24 ( $3.2 \times 10^5$  PFU/ml). Na BHK 21 bol najnižší titer dosiahnutý v p5 ( $3.2 \times 10^2$  PFU/ml) a najvyšší v p10 ( $3.5 \times 10^5$  PFU/ml). V prípade A549 bol najnižší titer dosiahnutý v p10 ( $5.8 \times 10^1$  PFU/ml) a najvyšší v p1 ( $2.21 \times 10^3$  PFU/ml). V posledných 5 pasážach došlo k pomernému ustáleniu titra vo všetkých troch bunkových líniah (Vero E6:  $1.0 \times 10^5$ - $3.2 \times 10^5$  PFU/ml; BHK 21:  $6.8 \times 10^4$ - $1.9 \times 10^5$  PFU/ml; A549:  $1.52 \times 10^2$ - $2.88 \times 10^2$  PFU/ml) (Obr. 1).

**Obr. č. 1. Porovnanie množstva vírusu vo vybraných pasážach Vero E6, BHK 21 a A549 prostredníctvom výpočtu PFU/ml**

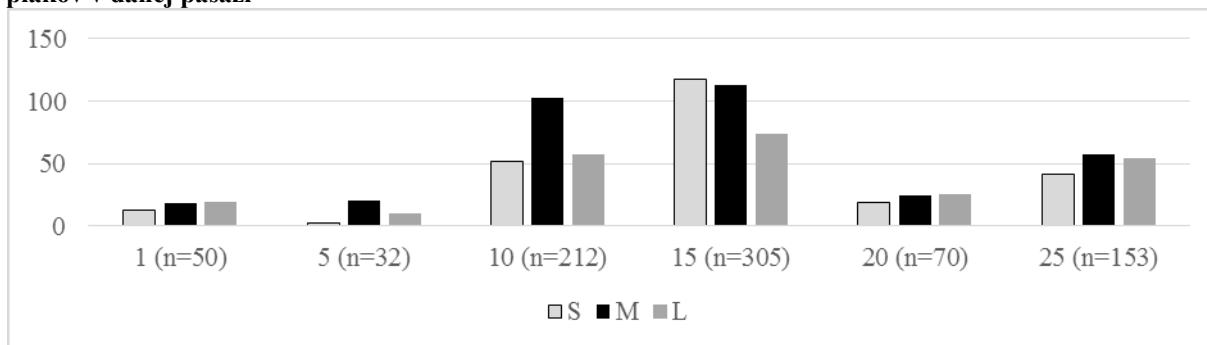


Na meranie plakov boli použité pasáže p1, p5, p10, p15, p20 a p25. Veľkosť plakov sa pohybovala na Vero E6 v rozmedzí od 0.03-2.97 mm<sup>2</sup> (Obr. 2), na BHK 21 v rozmedzí od 0.26-5,93mm<sup>2</sup> (Obr. 3) a na A549 v rozmedzí od 0.005-0.678mm<sup>2</sup> (Obr. 4). Štatistická analýza ukázala významnú signifikantnosť pri porovnávaní plakov z jednotlivých kategórii S v M; S v L; M v L ( $p < 0,001$ ).

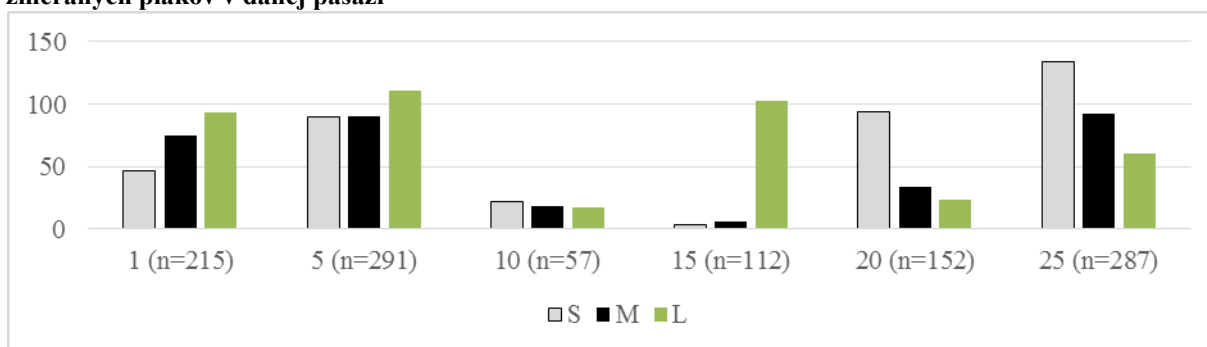
**Obr. 2. Proporcionálne zastúpenie plakov z každej veľkostnej kategórie (S=0.03-0.55mm<sup>2</sup>, M=0.56-1.21mm<sup>2</sup>, L=1.24-2.97mm<sup>2</sup>) vo vybraných pasážach na Vero E6 bunkách, n predstavuje množstvo zmeraných plakov v danej pasáži**



**Obr. 3. Proporcionálne zastúpenie plakov z každej veľkostnej kategórie (S=0.26-1.25 mm<sup>2</sup>, M=1.26-2.16 mm<sup>2</sup>, L=2.17-5.93 mm<sup>2</sup>) vo vybraných pasážach na BHK 21 bunkách, n predstavuje množstvo zmeraných plakov v danej pasáži**



**Obr. 4. Proporcionálne zastúpenie plakov z každej veľkostnej kategórie (S=0.005-0.052mm<sup>2</sup>, M=0.057-0.100mm<sup>2</sup>, L=0.104-0.678mm<sup>2</sup>) vo vybraných pasážach na A459 bunkách, n predstavuje množstvo zmeraných plakov v danej pasáži**



Zatiaľ čo, zastúpenie plakov z jednotlivých veľkostných kategórii na Vero E6 a BHK 21 ostávalo v priebehu pasážovania približne rovnaké, na A549 došlo k významnému nárastu populácie malých plakov (p1: 22%; p25: 47%).

## DISKUSIA

Dosiahnuté výsledky poukazujú na adaptáciu kmeňa TRBV 16.C/16 Dúbrava/PO pôvodne izolovaného z člankonožca na cicavčie hostiteľské systémy. V priebehu pasážovania vírusu na Vero E6 a BHK 21 bunkách došlo k zvyšovaniu titra. Na A549 bunkách došlo k opačnému trendu a titer vírusu sa s pribúdajúcimi pasážami znižoval. Zvýšený, resp. znížený titer môže súvisieť s adaptáciou vírusu na hostiteľský organizmus alebo so zmenou fenotypových vlastností vírusu vplyvom genetického preskupenia. Výsledky z merania plakov určili až 3 veľkostné kategórie, čo môže znamenať vytvorenie aspoň trojice mutantov z pôvodných rodičovských vírusov. Sledovanie fenotypových vlastností vírusov so segmentovaným genómom je dôležité pre určenie skríženej protektivity vakcín.

*Táto práca vznikla vďaka finančnej podpore z grantového projektu VEGA č. 1/0729/16.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hubálek Z. and Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*. 2012; 111(1):9-36.
- Libíková H, et al. Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Medical Microbiology and Immunology*. 1978; 166(1-4):255-263.
- Shaw A, et al. Reassortment between Two Serologically Unrelated Bluetongue Virus Strains Is Flexible and Can Involve any Genome Segment. *Journal of Virology*. 2012; 87(1):543-557.

# VPLYV PALINY (*ARTEMISIA ABSINTHIUM* L.), RUMANČEKA (*MATRICARIA CHAMOMILLA* L.), ZEMEDYMU (*FUMARIA OFFICINALIS* L.) A SLEZU (*MALVAE SYLVESTRIS* L.) NA ANTIOXIDAČNÉ A FERMENTAČNÉ PARAMETRE OVIEC *IN VITRO*

Petrič D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť účinok zmesi vybraných sušených medicínálnych rastlín a krmivových substrátov na bachorové antioxidačné a fermentačné parametre oviec *in vitro*. Pokus pozostával z 24 hod fermentácií: 1) zmesi 4 tradičných liečivých rastlín (PL), 2) lúčneho sena a jačmeňa (MH:B) a 3) zmesi liečivých rastlín, lúčneho sena a jačmeňa (PL:MH:B). V experimente sme použili fermentačnú *in vitro* plyn produkujúcu techniku (IVGPT). Inkubácia substrátov ovplyvnila všetky sledované fermentačné parametre aj protozoálnu populáciu *in vitro* ( $p < 0,001$ ). Hodnoty amoniakálneho N, propionátu a metánu pri fermentácii substrátu PL:MH:B boli nižšie v porovnaní s fermentáciou ostatných substrátov ( $p < 0,001$ ). Celková antioxidačná kapacita bachorovej tekutiny a celkový obsah polyfenolov v rastlinách boli v korelácii ( $R^2 = 0,778$ ,  $Sy.x = 0,065$ ). Celkový počet prvokov bol najvyšší v PL:MH:B. Výsledky naznačujú, že krmivové substráty obohatené o zmes paliny, rumančeka, zemedymu a slezu mali silnú antioxidačnú aktivitu a potenciál znižovať produkciu metánu a koncentráciu amoniakálneho dusíka v bachore *in vitro* bez negatívnych účinkov na fermentačné parametre a bachorovú protozoálnu populáciu.

## ÚVOD

Liečivé rastliny boli využívané v etno-veterinárnej praxi už v minulosti, pretože obsahujú rôzne rastlinné sekundárne metabolity (PSM) s antimikrobiálnou, antiparazitickou, antioxidačnou alebo protizápalovou aktivitou (Spiegler a kol., 2017). PSM rastlín majú potenciál ovplyvniť produkciu metánu, lipolýzu a biohydrogenáciu v bachore, vylepšiť bachorovú fermentáciu a celkový metabolizmus zvierat (Cieslak a kol., 2016). Mnoho liečivých rastlín má antioxidačný potenciál *in vitro* a preto je dôležité testovať tieto rastliny z pohľadu ich antioxidačnej aktivity (Kasote a kol., 2015). Na základe našich predchádzajúcich výsledkov sme pre náš experiment vybrali 4 druhy tradičných medicínálnych rastlín s významným antiparazitickým účinkom (Varádyová a kol., 2018). Cieľom experimentu bolo zistiť účinok zmesi týchto 4 vybraných sušených medicínálnych rastlín (t.j. *Artemisia absinthium* L., *Matricaria chamomilla* L., *Fumaria officinalis* L., *Malva sylvestris* L.) ako doplnkov krmiva na bachorové fermentačné parametre, celkovú antioxidačnú kapacitu a protozoálnu populáciu oviec v *in vitro* podmienkach.

## MATERIÁL A METODIKA

Medicínálne rastliny (AGROKARPATY, Plavnica, Slovak Republic) boli testované *in vitro* plyn produkujúcou technikou (IVGPT), ktorá využíva fermentáciu substrátov (250 mg) vo fermentačných nádobách v bachorovej tekutine oviec (35 ml) pri teplote 39°C počas 24 hod. Fermentácie troch diét: zmesi tradičných liečivých rastlín (PL), lúčneho sena a jačmeňa (MH:B) a zmesi liečivých rastlín, lúčneho sena a jačmeňa (PL:MH:B) prebiehali trikrát v priebehu troch po sebe nasledujúcich dní ( $n = 3 \times 3$ ). Celkové množstvo unikavých mastných kyselín (UMK) a metánu boli stanovené podľa Wencelovej a kol. (2016). Celková antioxidačná kapacita (TAC) bola stanovená metódou FRAP (Ferric reducing antioxidant power) podľa Wencelovej a kol. (2016). Vzorky bachorovej tekutiny boli fixované 8% roztokom formaldehydu a protozoá boli počítané mikroskopicky (Williams a Coleman, 1992).

Štatistické analýzy boli urobené analýzou variancie (ANOVA) a rozdiely boli stanovené pomocou Tukeyho *post*-testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

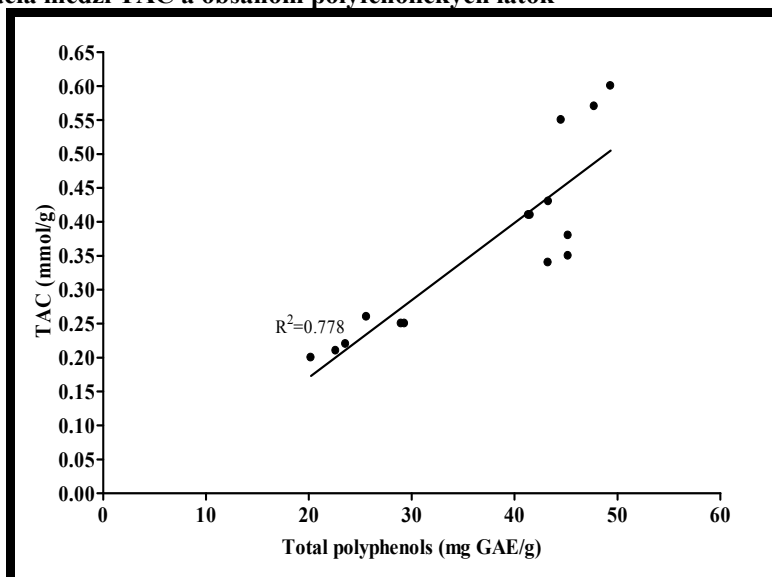
Všetky sledované fermentačné parametre (Tabuľka č. 1) boli významne ovplyvnené použitými substrátmi ( $p < 0,001$ ). Hodnoty produkcie  $\text{NH}_3\text{-N}$  a metánu v substráte PL:MH:B boli nižšie v porovnaní s ostatnými testovanými substrátmi. Podobné zistenia popisuje Cieslak a kol. (2014, 2016), ktorí potvrdili potenciál znižovať koncentrácie metánu a  $\text{NH}_3\text{-N}$  prostredníctvom bioaktívnych zlúčenín rastlín *Quercus spp.*, *Vaccinium vitis-idaea* a *Sanguisorba officinalis*. Na obrázku č. 1 vidíme koreláciu medzi TAC bachorovej tekutiny a celkovým obsahom polyfenolických látok v použitých medicínálnych rastlinách ( $R^2 = 0.778$ ,  $Sy.x = 0.065$ ). Koreláciu medzi celkovými polyfenolmi rastlín a TAC popisujú aj Tupec a kol. (2017).

Tab. 1. Vplyv krmivových substrátov na fermentačné parametre *in vitro* (n=9)

Substrát	UMK mM	A mol%	P mol%	B mol%	$\text{NH}_3\text{-N}$ mg/L	$\text{CH}_4$ mM
PL	49,8 <sup>c</sup>	69,1 <sup>b</sup>	14,0 <sup>c</sup>	10,7 <sup>a</sup>	151 <sup>c</sup>	6,60 <sup>c</sup>
MH:B	41,8 <sup>a</sup>	67,6 <sup>a</sup>	13,2 <sup>b</sup>	12,4 <sup>b</sup>	118 <sup>b</sup>	6,11 <sup>b</sup>
PL:MH:B	43,8 <sup>b</sup>	67,5 <sup>a</sup>	12,9 <sup>a</sup>	13,2 <sup>c</sup>	108 <sup>a</sup>	5,85 <sup>a</sup>
SEM	0,642	0,220	0,270	0,078	4,31	0,219
<i>p</i> -value	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

UMK, celkové unikavé masné kyseliny; A, acetát; P, propionát; B, butyrát; PL, zmes medicínálnych rastlín; MH, lúčne seno; B, jačmeň; <sup>a,b,c</sup> Rozdielne hodnoty v rámci stĺpca pri  $p < 0,05$ .

Obr. 1. Korelácia medzi TAC a obsahom polyfenolických látok

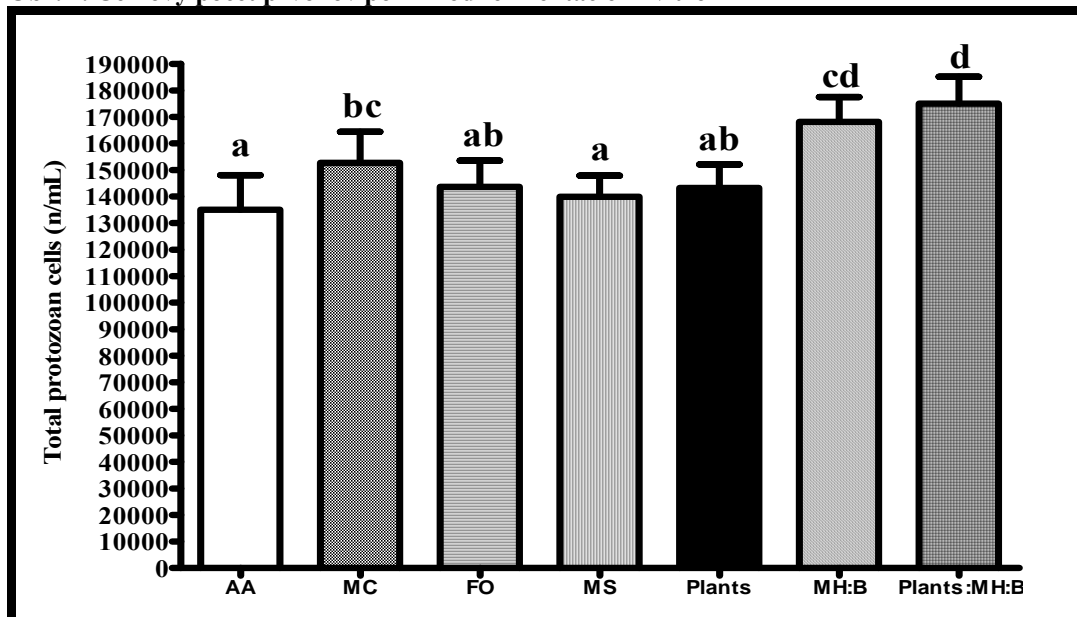


Ako vidno na obrázku č. 2, v našom experimente nebol zaznamenaný nepriaznivý vplyvu na bachorovú protozoálnu populáciu.

Záverom, výsledky ukázali, že krmivé substráty obohatené o zmes paliny, rumančeka, zemedymu a slezu mali silnú antioxidačnú aktivitu a potenciál znižovať produkciu metánu a

koncentráciu amoniakálneho dusíka v bachore *in vitro* bez negatívnych účinkov na fermentačné parametre a bachorovú protozoálnu populáciu.

Obr. 2. Celkový počet prvokov po 24 hod fermentácie *in vitro*



Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 18-0131 a 17-0297).

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cieslak A, et al. Effects of two sources of tannins (*Quercus* L. and *Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation: an *in vitro* study. *Ital. J. Anim. Sci.* 2014; 13:290-294.
- Cieslak A, et al. Tannins from *Sanguisorba officinalis* affect *in vitro* rumen methane production and fermentation. *J. Anim. Plant Sci.* 2016; 26:54-62.
- Kasote DM, et al. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic application. *Int. J. Biol. Sci.* 2015; 11:982-991.
- 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.
- Tupec M, et al. Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Biosci.* 2017; 20: 43-50.
- Váradyová Z, et al. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 2018; 195:71-77.
- Wencelová M, et al. Effects of diet supplementation with herbal blend and sunflower seeds on fermentation parameters, microbial population, and fatty acid profile in rumen of sheep. *Czech J. Anim. Sci.* 2016; 61:551-559.
- Williams AG, Coleman GS. *The rumen protozoa*. 1992. Springer-Verlag, New York.

# ÚČINOK HUMÍNOVÝCH KYSELÍN NA POSTMORTÁLNE PROCESY VO 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 vplyvom humínových kyselín na zrecie procesy vo svalovine brojlerov. Do experimentu boli zahrnuté brojlerové kurčatá plemena Cobb 500. Kontrolná skupina bola křímená komerčnými křímnymi zmesami (KKZ) Br1, Br2, Br3. V experimentálnej skupine boli ku KKZ pridávané humínové kyseliny v koncentrácii 0,8%. Fyzikálno – chemické parametre boli stanovené vo vzorkách prsnej a stehennej svaloviny v 1., 3., 7. deň po usmrtení. Práca poukazuje na pozitívny vplyv humínových kyselín na koncentrácie kyseliny mliečnej, fosfátov a hodnoty pH.

## ÚVOD

V súčasnosti sa na zlepšenie kvality mäsa vyvíjajú rôzne aditívne látky, ktoré by urýchlili rast hospodárskych zvierat, zabezpečili lepšie využitie krmiva, zlepšili zdravotný stav zvierat či priaznivo ovplyvnili nutričné či technologické vlastnosti mäsa (Ceylan a kol., 2003). Medzi takéto látky patria humínové kyseliny, ktoré sú najdôležitejšou časťou humusu (Barrett, 2015). Humínové kyseliny spolu s fulvo kyselinami a nerozpustným zvyškom – humínom, patria medzi humínové látky. Humínové látky sú prírodné zlúčeniny, ktoré vznikajú rozkladom organickej hmoty, či už rastlinného alebo živočíšneho pôvodu a enzymatickou činnosťou mikroorganizmov. Prirodzene sa nachádzajú v zemine, rašeline, sedimentoch či v hnedom uhlí. Tieto látky okrem iného ovplyvňujú postmortálne procesy, kedy mäso získava typické senzorické vlastnosti (Černíková, 2010).

## MATERIÁL A METODIKA

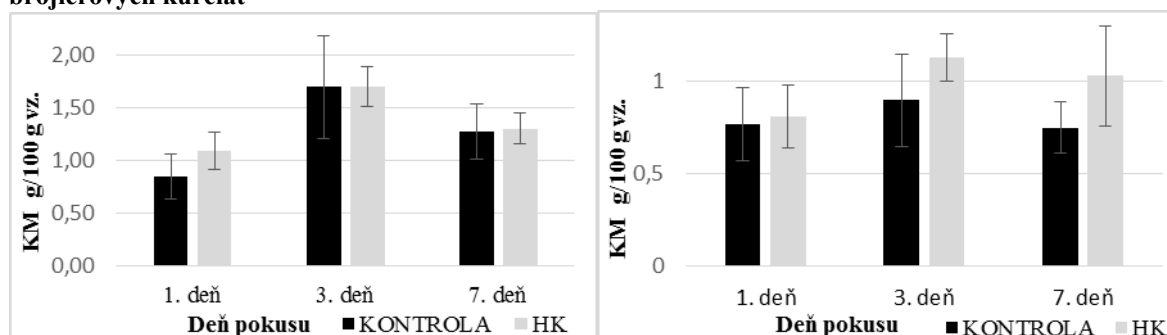
Do pokusu boli zaradených 50 brojlerových kurčiat - hybrid Cobb 500 (Hydina Slovensko s.r.o.), ktoré boli rozdelené do 2 skupín – kontrolnej a pokusnej. Kurčatá boli chované na hlbokkej podstielke. Prístup ku krmivu a vode mali *ad libitum*. Kontrolná skupina (K) bola křímená komerčnými křímnymi zmesami (KKZ): BR1 do 20. dňa, BR2 do 30. dňa a BR3 do 39. dňa. Pokusná skupina bola křímená KKZ a ako prídavok im boli pridávané humínové kyseliny v koncentrácii 0,8% od firmy HUMAC NATUR. Na 40. deň pokusu boli kurčatá po omráčení usmrtené, vykvrvené a jatočne opracované. Odoberaté boli vzorky prsnej (10) a stehennej (10) svaloviny, ktoré boli uskladnené pri 4°C. Fyzikálno – chemické analýzy sa vykonali 24 h po usmrtení a na 3. a 7. deň zrenia. Na stanovenie kyseliny mliečnej a fosfátov sa využila metóda elektroforetickej analýzy, používaná na kontrolu zrenia mäsa u rôznych druhov zvierat (Koréneková a kol., 2014). 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  $\mu$ A a v analytickej kolóne (dĺžka 160 mm) 50  $\mu$ A. Použitý bol vodiaci elektrolyt: 10 mmol HCl +  $\beta$ -alanín + 0,1% m-HEC a zakončujúci elektrolytu: 5 mmol kyselina kaprónová + 5 mmol TRIS. Analýzy boli vyhodnotené programom ITP Pro 32 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

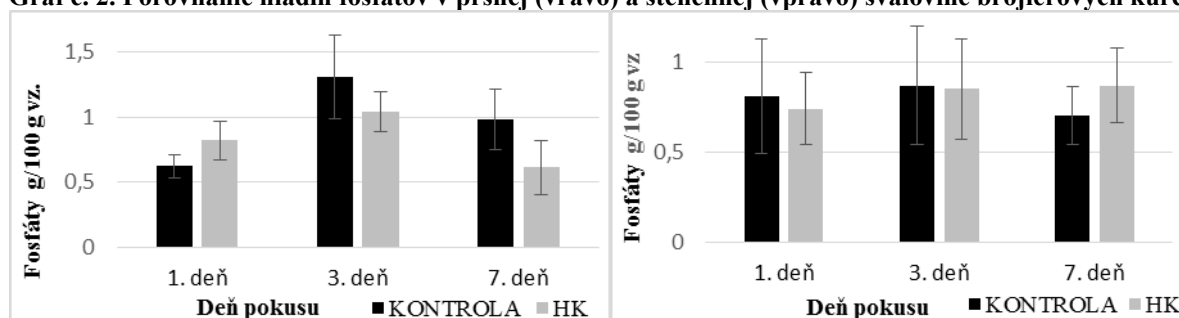
V pokusnej skupine (PS) počas celého sledovaného obdobia boli namerané vyššie koncentrácie kyseliny mliečnej (KM) ako v kontrolnej skupine (KS) v oboch typoch svalovín. V prsnej svalovine u oboch skupín bol zistený signifikantný nárast ( $p \leq 0,001$ ) na 3. deň (KS:  $1,69 \pm 0,49$  g/100 g vzorky, PS:  $1,70 \pm 0,19$  g/100 g vzorky), oproti začiatku pokusu (KS:  $0,84 \pm 0,21$  g/100 g vzorky, PS:  $0,09 \pm 0,18$  g/100 g vzorky). Na 7. deň bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,05$ , PS:  $p \leq 0,001$ ) pokles (KS:  $1,27 \pm 0,26$  g/100 g vzorky, PS:  $1,30 \pm 0,15$  g/100 g vzorky) v porovnaní s 3. dňom pokusu. V stehennej svalovine u oboch skupín sa počas prvých 3 dní zrecieho procesu hladina KM signifikantne zvýšila ( $p \leq 0,001$ ), (KS:  $0,9 \pm 0,25$  g/100 g vzorky, PS:  $0,13 \pm 0,13$  g/100 g vzorky), na 7. deň sa signifikantne znížila ( $p \leq 0,05$ ), (KS:  $0,75 \pm 0,14$  g/100 g vzorky, PS:  $0,03 \pm 0,27$  g/100 g vzorky) (Graf č.1). Dynamika kyseliny mliečnej v celom časovom intervale zrecieho procesu v mäse odráža kvantitatívnu premenu glykogénu na kyselinu mliečnu. V počiatočnej fáze je jej nárast najvýraznejší (Kopřiva a Steinhauer, 1992).

**Graf č. 1. Porovnanie hladín kyseliny mliečnej v prsnej (vľavo) a stehennej (vpravo) svalovine brojlerových kurčiat**



Koncentrácia fosfátov bola v prsnej svalovine z pokusnej skupiny vyššia iba v 1. deň zrenia, 3. a 7. deň zrenia už bola nižšia oproti kontrole. V stehennej svalovine mala experimentálna skupina namerané vyššie koncentrácie fosfátov až na 7. deň zrenia.

**Graf č. 2. Porovnanie hladín fosfátov v prsnej (vľavo) a stehennej (vpravo) svalovine brojlerových kurčiat**

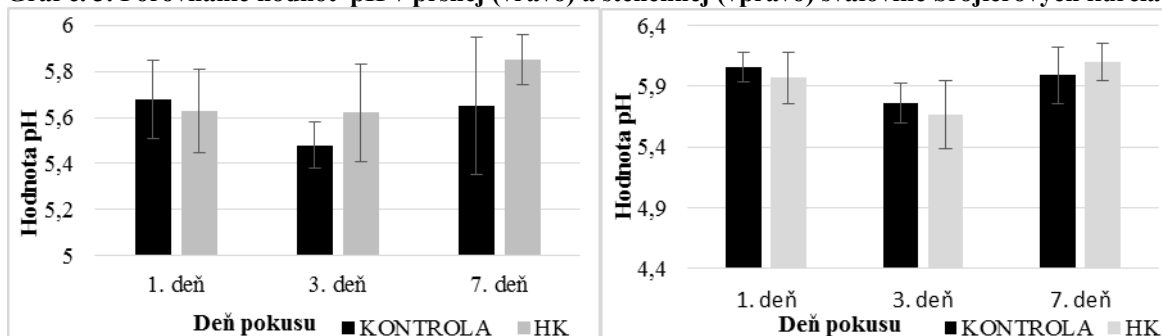


Pri hodnotení dynamiky zmien fosfátov (Graf č. 2) v prsnej svalovine z kontrolnej skupiny bol zistený jej signifikantný nárast ( $p \leq 0,001$ ) na 3. deň ( $1,31 \pm 0,32$  g/100 g vzorky), oproti začiatku pokusu ( $0,62 \pm 0,09$  g/100 g vzorky). Na 7. deň bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,05$ ) pokles ( $0,98 \pm 0,23$  g/100 g vzorky) v porovnaní s 3. dňom pokusu. U experimentálnej skupiny bol zistený signifikantný nárast ( $p \leq 0,01$ ) na 3. deň ( $1,04 \pm 0,15$  g/100 g vzorky), oproti začiatku pokusu ( $0,82 \pm 0,15$  g/100 g vzorky). Na 7. deň bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,001$ ) pokles ( $0,61 \pm 0,21$  g/100 g vzorky) v porovnaní s 3. dňom pokusu. V stehennej svalovine u oboch skupín neboli zaznamenané signifikantné hodnoty.

Hodnota pH závisí najmä od množstva kyseliny mliečnej v svalovine vznikajúcej pri anaeróbnej glykogenolyze a glykolýze. Hodnota pH <sub>24</sub> klesá *post mortem* na 5,4 – 5,7

(Maltin, a kol., 2003). V našom experimente bol v prsnej svalovine z kontrolnej skupiny pozorovaný signifikantný pokles ( $p \leq 0,01$ ) hodnôt pH na 3. deň. U experimentálnej skupiny bol na 7. deň zistený signifikantný ( $p \leq 0,01$ ) nárast pH oproti 3. dňu. V stehennej svalovine z kontrolnej skupiny bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,001$ ) pokles hodnôt pH na 3. deň. Na 7. deň bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,05$ ) vzostup pH oproti 3. dňu. U experimentálnej skupiny bol pozorovaný signifikantný pokles ( $p \leq 0,05$ ) na 3. deň a na 7. deň bol zistený signifikantný ( $p \leq 0,01$ ) nárast pH oproti 3. dňu.

**Graf č. 3. Porovnanie hodnôt pH v prsnej (vľavo) a stehennej (vpravo) svalovine brojlerových kurčiat**



V chovoch brojlerov, kde boli aplikované humínové kyseliny do krmnej dávky boli zaznamenané vyššie denné prírastky. Tým, že zvyšujú vstrebávanie živín z krmiva, zabezpečujú zvýšenie hmotnosti zvierat bez toho, aby museli prijímať väčšie množstvo krmiva, takže tieto látky aj pozitívne ovplyvňujú jatočnú výťažnosť. Chovy sú viac vyrovnané, brojlery majú lepšiu kondíciu, tým pádom sa znižuje úhyn. Dá sa povedať, že humínové kyseliny zvyšujú efektívnosť výkrmu (Černíková, 2010).

*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

- Barrett KD. Fulvic and humic acids: chemical composition, soil applications and ecological effects. New York: Nova Publishers. Agriculture issues and policies series. 2015, ISBN 163482413x. pp. 160.
- Černíková D. O humínových kyselinách. In Spravodajca, Bioveta SK, 2010, vol 1.
- Ceylan N, Cliftei I, Ilhan Z. The effects of some alternative feed additives for antibiotic growth promoters on the performance and gut microflora of broiler chicks. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 2003. Vol. 27, s. 727-733.
- Kopřiva V, Steinhäuser L. Průběh zrání vakuově baleného masa. Prům. Potr. 1, 1992, 13-14.
- Koréneková B, et al. 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.
- Maltin C, Balcerzk D, Tilley R, Delday M. Determinants of meat quality: tenderness. Proceedings of the Nutrition Society, 2003, 62, pp. 337-347.

# GENOMICKÝ POHĽAD NA ADAPTÁCIU *ACINETOBACTER LWOFFII* K1 NA EXTRÉMNE PODMIENKY PROSTREDIA

Petrová N.<sup>1</sup>, Pristaš P.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav biologických a ekologických vied UPJŠ, Košice

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

## ABSTRAKT

Bakteriálny izolát *Acinetobacter lwoffii* K1 dokáže prežiť v extrémnych podmienkach prostredia, ktoré vytvára odpadový kal z výroby hliníka. Kal je charakteristický nielen zvýšenou koncentráciou ťažkých kovov ale aj vysoko alkalickým pH. Prítomnosť extrachromozomálnych cirkulárnych molekúl DNA, plazmidov, je u mnohých bakteriálnych druhov spojená s ich adaptáciou na extrémne podmienky prostredia. Sekvenovaním novej generácie sme u izolátu K1 potvrdili prítomnosť génov, ktoré sa u rôznych druhov baktérií podieľajú na rezistencii voči kadmii, kobaltu, zinku, medi a chrómu. Tieto gény sú pravdepodobne kódované plazmidovo a hodnoty minimálnej inhibičnej koncentrácie týchto kovov ukazujú, že sú aj funkčne aktívne.

## ÚVOD

Produkcia hliníka pri Žiari nad Hronom v rokoch 1957 – 1997 viedla k tvorbe hnedého kalu, ktorý vzniká spekačou metódou výroby. V čase odberu vzoriek bol tento kal charakteristický alkalickým pH 11,6 a zároveň aj zvýšenou koncentráciou viacerých ťažkých kovov Hg (10 mg.kg<sup>-1</sup>), Cu (220 mg.kg<sup>-1</sup>), Cr (400 mg.kg<sup>-1</sup>), Pb (150 mg.kg<sup>-1</sup>), As (800 mg.kg<sup>-1</sup>) (Kopcakova a kol., 2014). Aj keď sa kombinácia týchto extrémnych vplyvov podpísala na množstve kultivovateľných baktérií (3 500 cfu/g), ktorý bol nižší než napríklad v prípade skládky lúženca po výrobe niklu v Seredi (32 000 cfu/g), napriek tomu v tejto lokalite nezabránila rastu extrémotolerantných druhov baktérií (Pristas a kol., 2015). Kultivačnými metódami bol z hnedého kalu získaný izolát K1. Pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie bol identifikovaný ako druh *Acinetobacter lwoffii*, čo bolo následne potvrdené aj sekvenovaním génu pre 16S rRNA (Kopcakova a kol., 2014). Extrémotolerantné baktérie sú značne študované za účelom ich využitia v bioremediačných metódach. Pri biosorpcii kovov na povrch bunkovej steny mŕtvej biomasy baktérií nedochádza k intracelulárnej interakcii s kovmi a teda hovoríme o metabolicky pasívnom procese. Bioakumulácia kovov, prípadne iné intracelulárne interakcie s kovmi sú výsledkom metabolicky aktívnych procesov. Jednotlivé interakcie sú umožnené iba za prítomnosti konkrétnych proteínov kódovaných príslušnými génmi. Rôzne operónové jednotky sú teda zodpovedné za rezistenciu baktérií voči ťažkým kovom (Hansda a kol., 2016). Štúdium kompletých genómov extrémotolerantných baktérií umožňuje detailnejší pohľad do genetického pozadia týchto procesov.

## MATERIAL A METODIKA

Bakteriálny izolát *A. lwoffii* K1 bol kultivovaný na tuhom TSA médiu a následne v tekutom LB médiu pri teplote 25°C. Totálna DNA bola izolovaná prostredníctvom Kitu E.Z.N.A.® Bacterial DNA Kit (Omega Bio-tek, USA). Kvalita DNA bola najskôr kontrolovaná prostredníctvom 1% agarózového gélu, ktorý bol zafarbený etídium bromidom (0.5 µg/ml) a vizualizovaný pod UV svetlom pomocou dokumentačného zariadenia Gel Logic 212 PRO Imaging System (Carestream, Health Inc., Rochester, NY, USA). DNA bola prezrážaná 96% etanolom. Ku totálnej DNA bola pridaná 1/10 objemu octanu sodného (pH = 6) a 2,5 násobok objemu 96% etanolu. Po 10 minútovej inkubácii pri teplote -70°C nasledovala 30 minútová centrifugácia pri 4°C. Supernatant bol odstránený a premytý 70% etanolom. Po 15 minútovej centrifugácii, odsatí supernatantu a vysušení peletu DNA bola táto DNA následne rozpúšťaná

v roztoku 10 mM Tris-HCl pri pH=8. Čistota DNA bola stanovená spektrofotometriky. Sekvenovanie novej generácie (NGS) bolo zabezpečené firmou GATC Biotech AG (Nemecko). Pre potvrdenie zaradenia do druhu *A. lwoffii* bol genóm K1 porovnaný v genóme *A. lwoffii* ZS07 (GenBank ID: CP019143.1) pomocou programu ANI (Average nucleotide identity, <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>). Genóm izolátu K1 bol analyzovaný pomocou serveru RAST, ktorý je dostupný na <http://rast.nmpdr.org>. Jednotlivé kontigy DNA boli porovnávané s databázou nukleotidových (blastn) a proteínových (blastx) sekvencií baktérií dostupných v databáze NCBI (Altschul a kol., 1997). Konzervované domény boli hľadané na <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Izolát K1 vykazuje zvýšenú rezistenciu voči viacerým ťažkým kovom (Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Cr) a dokáže rásť pri maximálnom pH rastového média 9 (Šipošová a kol., 2017). Veľkosť genómu *A. lwoffii* K1 je 3 357 932 bp. Izoláciou plazmidovej DNA bolo zistené, že izolát K1, ako jediný zo zástupcov rodu *Acinetobacter* z tohto prostredia, obsahuje viacero plazmidov. Izoláty *A. calcoaceticus* tieto mobilné génové elementy neobsahujú. Podobná skutočnosť bola pozorovaná aj u izolátov rodu *Acinetobacter* získaných zo skládky lúženca po výrobe niklu v Seredi. Prítomnosť plazmidov bola detegovaná v prípade druhu *A. johnsonii* NHL11, ale nie u kmeňov *A. calcoaceticus* (Šipošová a kol., 2017). Štúdia Midlina s kolektívom poukázala na podobný jav. Analýzou kompletných genómov druhov *A. lwoffii* a *A. baumannii* zistili, že práve druh *A. lwoffii* má tendenciu obsahovať väčší počet plazmidov než *A. baumannii* (Midlin a kol., 2016). Porovnávaním jednotlivých kontigov genómu K1 s databázou nukleotidových sekvencií NCBI sme zistili, že niektoré z nich vykazujú zhody s plazmidmi druhu *A. lwoffii* alebo iných druhov rodu *Acinetobacter*. Celková veľkosť pravdepodobne plazmidových kontigov je 278 796 bp, čo predstavuje 5,98% z celého genómu izolátu K1. Pomocou serveru RAST a hľadaním konzervovaných domén sme zistili, že genóm kóduje viaceré gény zapojené do mechanizmov rezistencie voči ťažkým kovom a metaloidom, ktoré sú súčasťou operónov *cop*, *czc*, *czt*, *chr*, *mer*, *ars*. Kontig 33 s veľkosťou 31 431 bp kóduje Cu-ATPázu, proteín CopB, CopC, CopD a CopZ, ktoré sú súčasťou *cop* operónu zabezpečujúceho rezistenciu voči medi a zároveň kóduje proteíny ChrA/B, ktoré sa zúčastňujú rezistencie voči chrómu. Ďalší operón je lokalizovaný v rámci kontigu 52 (8 733 bp), ktorý kóduje proteíny CzcA, CzcB, CzcC a CzcD *czc* operónu, ktorý zabezpečuje rezistenciu voči kobaltu, zinku a kadmiu u rôznych druhov baktérií. Na druhej strane, senzitivita voči ortuti u tohto bakteriálneho kmeňa je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobená neprítomnosťou hlavných génov *mer* operónu - *merTPA*. Genóm kóduje iba regulačný proteín MerR (v troch kópiách), ktorý za normálnych okolností reguluje funkciu príslušných štruktúrnych génov (Silver a Phung, 1996). Ďalším detegovaným proteínom bol enzým ArsC, ktorý katalyzuje redukciu arzeničnanu na arzenitan vo vnútri bunky. Arzenitan je za bežných okolností následne transportovaný do extracelulárneho prostredia napríklad pomocou proteínu ArsB (Silver a Phung, 1996). Na kontigu 48 (12 045 bp) sme pred proteínom ArsC detegovali konzervovanú doménu *acr3*, ktorá by sa daného procesu mohla zúčastňovať. Rezistencia voči arzénu však u izolátu K1 nebola pozorovaná. Tento jav môže byť opäť spôsobený neprítomnosťou ďalších génov, ktoré sú obvykle súčasťou *ars* operónu. Našou prácou sme teda potvrdili známy fakt, že mnohé gény umožňujúce adaptáciu baktérií na rôzne podmienky prostredia sú často kódované plazmidovo (Li a kol., 2015). Nekompletné operóny zároveň spôsobujú senzitivitu baktérií. Izolát K1 aj napriek tomu, že neobsahuje kompletný *mer* operón prežíva v odpadovom kale, ktorý je charakteristický zvýšenou koncentráciou ortuti. Táto skutočnosť môže byť zapríčinená tým, že izolát žije v bakteriocénóze, v ktorej iné druhy disponujú mechanizmami, prostredníctvom ktorých detoxifikujú toxickú ortuť a tým umožňujú prežitie senzitívnych kmeňov.

**Tab. 1 Korelácia medzi rezistenciou izolátu *Acinetobacter lwoffii* K1 voči ťažkým kovom a prítomnosťou príslušných operónov zabezpečujúcich rezistenciu voči nim**

Kov/metaloid	Rezistencia	Detegovaný operón	Lokalizácia operónu v genóme	Blastn analýza
meď	+	<i>cop</i>	plazmid	<i>A. schindleri</i> ACE p1AsACE / 179 461 bp* CP015616.1** 97,76%***
kobalt	+	<i>czc</i>	plazmid	<i>A. lwoffii</i> VS15 pALWVS1.1 / 134 767 bp* KX426232.1** 98,53%***
zinok	+			
kadmium	+			
chróm	+	<i>chr</i>	plazmid	<i>A. schindleri</i> ACE p1AsACE / 179 461 bp* CP015616.1** 97,76%***
ortuť	-	nekompletný <i>mer</i>	plazmid	<i>A. lwoffii</i> VS15 pALWVS1.1 / 134 767 bp* KX426232.1** 98,53%***
				<i>A. lwoffii</i> ZS207 pmZS / 198 391 bp* CP019144.1** 99,26%***
				<i>A. lwoffii</i> ED45-23 pALWED2.1 / 190 039 bp* KX426229.1** 99,22%***
arzén	-	nekompletný <i>ars</i>	plazmid	<i>A. lwoffii</i> ED9-5a, pALWED3.1 / 138 027 bp* KX528687.1** 99,49%***

\*plazmid, s ktorým daný kontig vykazuje najväčšiu zhodu / jeho veľkosť; \*\*GenBank ID; \*\*\*zhoda nukleotidov

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altschul SF, et al. Grapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 1997; 25: 3389-3402.
- Hansda A, Kumar V, Anshumali. A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World J Microbiol Biotechnol*. 2016; 32: 170
- Kopcakova A, et al. Need for database extension for reliable identification of bacteria from extreme environments using MALDI TOF mass spectrometry. *Chem. pap.* 2014; 68 (11): 1435-1442.
- Li AD, Li LG, Zhang T. Exploring antibiotic resistance genes and metal resistance genes in plasmid metagenomes from wastewater treatment plants. *Front. Microbiol*. 2015; 6: 1025.
- Midlin S, et al. Resistance of permafrost and modern *Acinetobacter lwoffii* strains to heavy metals and arsenic revealed by genome analysis. *BioMed Res. Int*. 2016; ID 3970831.
- Pristas P, et al. Non-ferrous metal industry waste disposal sites as a source of poly-extremotolerant bacteria. *Nova Biotechnol. Chim*. 2015; 14 (1): 62-68.
- Silver S, Phung LT. Bacterial heavy metal resistance: New Surprises. *Annu. Rev. Microbiol*. 1996; 50:753-789
- Šipošová N, et al. Genetic diversity of *Acinetobacter* spp. adapted to heavy metal polluted environments. *Nova Biotechnol. Chim*. 2017; 16 (1): 42-47.

# EFEROCYTÓZA V MYŠACOM PREIMPLATAČNOM EMBRYU

Pisko J.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo kvantifikovať schopnosť embryonálnych apoptotických buniek exprimovať signál pre fagocytózu (realizovať fosfatidylserínový flip) a schopnosť embryonálnych neprofesionálnych fagocytov vykonávať eferocytózu (fagocytovať apoptotické bunky).

Naše predchádzajúce experimenty ukázali, že priemerný počet apoptotických buniek v myšacích blastocystách sa pohybuje okolo 5,18 na blastocystu (vyšetrovacia metóda: TUNEL assay). Aktuálne experimenty ukázali, že priemerne iba 0,22 embryonálnych buniek na blastocystu exprimuje na svojom povrchu fosfatidylserín (značenie bolo realizované pomocou fluorescenčného farbenia Annexin V). Napriek nízkej expresii „eat me“ signálu bol podiel apoptotických buniek fagocytovaných susednými embryonálnymi bunkami pomerne vysoký. Fagocytárnu aktivitu neprofesionálnych embryonálnych fagocytov sme vyšetrovali dvoma spôsobmi. Prvý spôsob bol založený na značení kyslých organel (Lysotracker test). Test ukázal 95,80% kolokalizáciu apoptotických buniek a kyslých organel. Špecifickosť Lysotracker testu však pravdepodobne nie je dostatočne vysoká, nakoľko môže farbiť aj kyslé organely v nefagocytovaných apoptotických bunkách. Druhý spôsob pre dôkaz fagocytárnej aktivity bol založený na značení cytoplazmatických membrán. Značenie cytoplazmatickej membrány F-aktínom ukázalo, že minimálne 26,21% apoptotických buniek bolo fagocytovaných (tzn. bolo lokalizovaných v cytoplazme susedných buniek). Degradácia F-aktínu v membráne apoptotických buniek však neumožnila presne určiť lokalizáciu všetkých apoptotických buniek. Presnejšie kvantifikovať počet fagocytovaných apoptotických buniek sme sa preto pokúsili zavedením alternatívnych metód vizualizácie cytoplazmatickej membrány: imunohistochemickým značením E-kadherínu a Na/K-ATPázy a lipofilným farbením membrán s karbocyanínom.

Výsledky našich experimentov ukazujú, že objektívne zhodnotiť schopnosť embryonálnych neprofesionálnych fagocytov vykonávať eferocytózu bude možné až po porovnaní výstupov minimálne troch rôznych metodologických prístupov.

## ÚVOD

Pokiaľ je nám známe, eferocytóze, respektíve fagocytóze apoptotických buniek v skorých štádiách vývinu embrya doposiaľ neboli venované žiadne cielené štúdie. Nekrotické deciduálne bunky boli pozorované vo fagozomálnych vakuolách v ľudskom cytotrofoblaste v skorom štádiu gestácie, t.j. približne 7-9 dní po oplodnení (Hata a kol. 1981). Výskyt fagocytovaného materiálu apoptotického pôvodu bol popísaný aj v bunkách myšacích, prasacích a ľudských blastocýst (Hardy, 1999; Fabian a kol., 2005), t.j. približne 4-6 dní po oplodnení. Fyziologickému pozadiu procesu v tomto období však doposiaľ nebola venovaná významná pozornosť.

Proces fagocytózy pozostáva z rozoznávania a ingescie častíc väčších ako 0,5  $\mu\text{m}$ , ktoré sa stávajú súčasťou vezikul derivovaných z plazmatickej membrány, známych ako fagozomy. Aby došlo k pohlteniu a následne k eliminácii častíc, musia mať fagocyty schopnosť rozoznávať rôzne druhy patogénov, resp. apoptotické bunky. Signálom apoptotických buniek pre iniciáciu fagocytózy je expresia fosfatidylserínu (PS) na povrchu. Kaskáda fagocytózy začína rozoznávaním častíc, nasleduje tzv. internalizácia častíc, výsledkom ktorej je zahájenie formácie fagozómu. Finálnym krokom je maturácia fagozozómu, v ktorom prebiehajú všetky recyklačné a degradačné procesy (Gordon, 2016).

Cieľom našej práce bolo kvantifikovať schopnosť embryonálnych apoptotických buniek exprimovať signál pre fagocytózu a schopnosť embryonálnych neprofesionálnych fagocytov vykonávať eferocytózu.

## MATERIÁL A METODIKA

Expandované blastocysty boli získané z hormonálne stimulovaných a prirodzene fertilizovaných samíc CD-1 myši na 4. deň gravidity (120 hodín po hormonálnom ošetrení hCG). Incidencia apoptotických buniek, resp. fagocytovaných apoptotických buniek bola vyhodnotená pomocou morfológicko-fluorescenčných farbení a konfokálnej mikroskopie.

Dôkaz PS flipu na povrchu apoptotických buniek: vitálne farbenie annexin V / propidium jodid kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením

Dôkaz fagocytárnej aktivity neprofesionálnych fagocytov:

1. Lysotracker test kombinovaný s Hoechst 33342 DNA farbením a TUNEL assay
2. farbenie membránového F-aktínu (pomocou phalloidin-T) kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a TUNEL assay
3. imunocytochemické farbenie membránového E-cadherínu kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a TUNEL assay
4. imunocytochemické farbenie membránovej Na/K-ATPázy
5. lipofilné farbenie membrán s karbocianínom (Vybrant DiD) kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a YO-PRO assay

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Dôkaz PS flipu na povrchu apoptotických buniek:

Farbením annexin V / propidium jodid / Hoechst 33342 bolo vyšetrených 141 blastocýst. Celkový počet embryonálnych buniek exprimujúcich PS bol 31, čo v priemere predstavuje 0,22 AV+ embryonálnych buniek na blastocystu. V rámci tejto skupiny boli bližšie diferencované dve podskupiny: 1. AV+ sekundárne nekrotické bunky, ktorých bolo celkovo 26, t.j. v priemere 0,19 na blastocystu. 2. AV+ apoptotické bunky, ktorých bolo celkovo 5, t.j. v priemere 0,04 na blastocystu.

Pri porovnaní s predchádzajúcimi výsledkami sme zaznamenali vysoký nepomer medzi incidenciou apoptotických buniek so špecificky fragmentovanou DNA (TUNEL assay) a incidenciou apoptotických buniek vysielajúci tzv. „eat me“ signál (PS flip). Tento nepomer je možné vysvetliť dvoma teóriami: 1. embryonálne apoptotické bunky buď majú nižšiu schopnosť vykonať PS flip než somatické bunky (napr. z dôvodu vysokého výskytu tesných medzibunkových spojení) (Hardy 1999); alebo 2. nie sme schopní zachytiť exprimáciu PS, lebo väčšina identifikovaných embryonálnych buniek je už fagocytovaná (Davies a kol. 2018).

### Dôkaz fagocytárnej aktivity neprofesionálnych fagocytov:

Schopnosť embryonálnych buniek vykonávať eferocytózu bola vyšetrovaná dvoma prístupmi: 1. značením kyslých organel (Lysotracker test), 2. značením cytoplazmatickej membrány (F-aktín, E-cadherín, atď.).

Lysotracker testom bolo vyšetrených 56 expandovaných blastocýst. Test ukázal, že 95,80 % apoptotických buniek (TUNEL+ bunky) vykazuje kolokalizáciu s kyslými organelami. Špecifickosť Lysotracker testu však pravdepodobne nie je dostatočne vysoká, nakoľko môže farbiť aj kyslé organely v nefagocytovaných apoptotických bunkách.

Farbením, ktoré bolo založené na značení cytoplazmatického F-aktínu, bolo vyšetrených 56 expandovaných blastocýst. Diferencovali sme tri skupiny apoptotických buniek. Prvá skupina

s incidenciou 26,21% predstavovala fagocytované apoptotické bunky (tzn. TUNEL+ bunky lokalizované v cytoplazme susedných buniek). Druhá skupina s najvyššou incidenciou 43,45% predstavovala nefagocytované bunky. Tretia skupina s incidenciou 30,34% reprezentovala neklasifikované apoptotické bunky. Tieto bunky nebolo možné klasifikovať z dôvodu degradácie F-aktínu v ich membráne.

Nakoľko vyhodnotením testov vznikol markantný rozdiel, kedy 4,20% (Lyotracker test) resp. 43,45% (F-aktín) apoptotických buniek nebolo fagocytovaných, rozšírili sme portfólio testov na vyšetrenie eferocytózy embyonálnych buniek štandardizáciou ďalších testov.

Farbenie cytoplazmatického E-kadherínu kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a TUNEL assay: Princíp farbenia bol založený na imunocytochemickom značení kadherínov. Kadheríny predstavujú adhezívne molekuly, ktoré sa podieľajú na spojení buniek. Výsledkom farbenia bol analyzovateľný signál. Kvantifikácia incidencie eferocytózy je predmetom aktuálnych experimentov.

Imunocytochemické farbenie cytoplazmatickej Na/K-ATPázy: Enzým Na/K-ATPáza by mal byť prítomný v cytoplazme väčšiny živočíšnych buniek. Zistili sme, že táto metodika nie je vhodná pre značenie cytoplazmatických membrán v embryu, nakoľko pozitívny signál bol iba vo vonkajšej membráne trofoektodermálnych buniek (alpha-1 subjednotka ATPázy pravdepodobne nie prítomná v membránach embryoplastu). Imunocytochemické farbenie bolo realizované súčasne s pozitívnou kontrolou (enterocyty).

Lipofilné farbenie membrán s karbocianínom (Vybrant DiD) kombinované s Hoechst 33342 DNA farbením a YO-PRO assay: Ide o vitálne farbenie, pričom karbocianín farbí lipofilné štruktúry v cytoplazmatickej membráne embyonálnych buniek. Výsledkom farbenia bol slabý a rozptýlený signál, tým pádom metodika nie je vhodná pre kvantifikáciu eferocytózy v blastocystách.

*Práca bola podporená grantom APVV-18-0389.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Davies SP, Reynolds GM, Stamatakis Z. Clearance of Apoptotic cells by tissue epithelia: a putative role for hepatocytes in liver efferocytosis. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:1-10
- Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. 2005; 64: 221-231
- Gordon S. Phagocytosis: An immunobiologic process. In *Immunity*. 2016; 44: 463-475
- Hata T, et al. Phagocytosis of human cytotrophoblast cell invading into decidual tissue in early stage of gestation. *Acta Obstet Gynaecol Jpn*. 1981; 33: 537-544
- Hardy K.. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction*. 1999; 4:125-134



# POROVNANIE IRITAČNÉHO POTENCIÁLU JEDU MEDZI AFRICKÝM A ÁZIJSKÝM DRUHOM „PĽUVAJÚCICH“ KOBIER POUŽITÍM METODIKY HET-CAM A HODNOTIACEHO SYSTÉMU PODĽA LUEPKÉHO

Polláková M., Petrovová E., Petrilla V., Sopková D.

*Katedra anatómie, histológie a fyziológie, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR*

## ABSTRAKT

Spomedzi jedovatých hadov sa niektoré kobry čeľade Elapidae vyznačujú osobitou schopnosťou sebaobrany. Proteroglyfný jedový aparát týchto hadov je usporiadaný tak, aby v prípade potreby umožnil „vypudenie“ jedu z jedových zubov, čím dochádza k vystreknutiu dvoch prúdov jedu a vytvoreniu aerosólu. Pri styku s neporušenou kožou väčšinou nedochádza k žiadnym výrazným reakciám avšak po kontakte s povrchom oka vyvolávajú jedy „pľuvajúcich“ kobier oftalmiu až dočasnú, a v niektorých prípadoch trvalú, slepotu. Pomocou HET-CAM testu (Hen's Egg Test – Chorioallantoic membrane) sme sledovali vazoaktívny efekt a následne vyhodnotili iritačný potenciál jednotlivých koncentrácií jedu hadov *Naja ashei* a *Naja siamensis*. V prípade všetkých koncentrácií oboch testovaných jedov možno na základe zisteného kumulatívneho skóre klasifikovať iritačný potenciál podľa Luepkého hodnotiaceho systému ako silný.

## ÚVOD

„Pľuvajúce“ kobry predstavujú špecifickú skupinu jedovatých hadov, ktorým charakteristická stavba jedového aparátu umožňuje rozstrekať kvapôčky jedu až do niekoľkometrovej vzdialenosti. Tento reflexný mechanizmus slúži ako obrana pred potenciálnymi predátormi. Výskumy poukazujú na schopnosť týchto hadov zameriavať sa na oblasť tváre, čo výrazne zvyšuje šancu, že sa jed dostane do kontaktu s povrchom očí. Cytotoxíny prítomné v jedy „pľuvajúcich kobier“ vyvolávajú v zasiahnutom oku eróziu rohovky a konjunktívnu chemózu, pričom miera účinku je závislá najmä na dĺžke kontaktu jedu s okom. Medzi charakteristické sprievodné znaky patrí bolesť, oftalmia, blefarospazmus, zhoršené videnie až dočasná slepota, ktorá môže byť bez včasnej a adekvátnej terapie trvalá (Sharma a Baranwal, 2015).

V minulosti sa na hodnotenie akútnej očnej dráždivosti využíval Draizov očný test, ktorý spočíval aplikácii testovanej substancie do konjunktiválneho vaku oka albino králikov. Kritika najmä etického hľadiska tohto spôsobu testovania viedla a i naďalej navádza k neustálemu hľadaniu a zdokonaľovaniu alternatívnych diagnostických postupov, ktoré by umožnili získavať výsledky rovnocenné výsledkom Draizovho testu. Jednu z navrhovaných alternatív predstavuje metodika HET-CAM, ktorá na vizualizáciu a hodnotenie iritačného efektu testovaných substancií využíva cievy chorioalantoickej membrány slepačích vajec. Jedná sa o relatívne nenáročný postup umožňujúci klasifikáciu iritačného potenciálu testovaných substancií do štyroch kategórií (silný, mierny, nepatrný, zanedbateľný) na základe konkrétneho typu vazoaktívneho efektu (hyperémia, hemorágie, zrážanie) v závislosti od časového úseku, ktorý uplynie od aplikácie testovanej substancie na povrch CAM po objavenie sa prvých účinkov (Luepke a Kemper, 1986).

Cieľom tejto práce bolo sledovanie, hodnotenie a porovnanie vazoaktívnych účinkov a iritačného potenciálu jedov dvoch druhov pľuvajúcich kobier (*Naja ashei*, *Naja siamensis*) použitím metodiky HET-CAM podľa Luepkého.

## MATERIÁL A METODIKA

Oplozené kuracie vajcia boli dovezené z liaharenského podniku Párovské háje (Nitra).

Dovoz a skladovanie vajec pred inkubáciou pri teplote 15°C. Metodický postup je na základe fáz embryonálneho vývinu rozdelený do troch častí.

### 0. ED (Embryonálny deň): Naloženie vajec do inkubátora

Pred naložením do inkubátora je vajcia potrebné očistiť 70% etanolom. Inkubácia prebieha pri teplote 37,5°C a vlhkosti 60 %.

### 3. ED: Odber bielka

Vhodnými nožnicami sa vytvorí malý otvor na ostrom konci každého vajca, čo umožní odber 2 ml bielka použitím sterilnej ihly a striekačky. Následne sú otvory uzatvorené pomocou tekutého parafínu a vajcia sú uložené späť do inkubátora tak, aby ostrý koniec s uzatvoreným otvorom smeroval vždy nadol.

### 9. ED: Aplikácia jedu

Vajcia sú postupne vyberané z inkubátora a za pomoci nožníc sa z každého vajca odstráni škrupina vrchnej časti tupého konca v takej miere, aby vzniknutý otvor umožňoval aplikáciu jedu na CAM a sledovanie jeho účinkov. V tejto fáze sú neoplodnené vajcia vyradené. Vhodnou pinzetou sa z vrchnej časti CAM odstráni papierová blana, čím sa odhalia cievy. Jed sa aplikuje v množstve 50 µl/vajce priamo na cievy CAM. Pred samotnou aplikáciou je potrebné jed nariediť fyziologickým roztokom na požadované koncentrácie.

Tab. 1. Testované koncentrácie jedov

Hadí jed	Koncentrácia (mg/ml)		
	E-1	E-2	E-3
<i>Naja ashei</i>	202	20,2	2,02
<i>Naja siamensis</i>	192	19,2	1,92

Po aplikácii sa sleduje a fotograficky zaznamenáva vazoaktívny efekt jedu v intervaloch 0, 30, 120 a 240 sekúnd. V kontrolnej skupine sa namiesto jedu aplikuje na CAM fyziologický roztok. Po ukončení experimentu nasledovalo vyhodnotenie získaných výsledkov a výpočet iritačného potenciálu pre jednotlivé koncentrácie jedov použitím Luepkého hodnotiaceho systému (HET-CAM test).

Tab. 2. Bodovací systém pre hodnotenie iritačného potenciálu podľa Luepkého

Čas potrebný na prejavenie dráždivého účinku	Body		
	Hyperémia	Hemorágie	Zrážanie
<0,5 min	5	7	9
0,5-2 min	3	5	7
2-5 min	1	3	5

Tab. 3. Klasifikácia iritačného potenciálu na základe kumulatívneho skóre

Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
<1,0	Zanedbateľný
1,0-4,9	Nepatrný
5,0-8,9	Mierny
9,0-21,0	Silný

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z chemického hľadiska možno hadí jed vo všeobecnosti charakterizovať ako rôznorodú zmes proteínov. Jed hadov druhu *Naja ashei* je zložený predovšetkým z Three-finger toxínov (69 %) a Fosfolipáz A<sub>2</sub> (27 %). Ostatné menej zastúpené zložky zahŕňajú metaloproteinázy hadieho jedu (2,1 %), nervový rastový faktor (1 %), proteíny bohaté na cysteín (0,7 %), Cobra venom faktor (0,12 %) a 5'-nukleotidázu (0,014 %). Jed hadov druhu *Naja siamensis* obsahuje rovnako ako jed hadov druhu *Naja ashei* prevažne proteíny zo skupín Three-finger toxínov (75 %) a Fosfolipáz A<sub>2</sub> (15 %) (Hus a kol., 2018). Zároveň bola dokázaná prítomnosť

malých množstiev proteínov ďalších skupín ako sú sekrečné proteíny bohaté na cysteín, metaloproteinázy hadieho jedu, nervový rastový faktor, 5'-nukleotidáza, Cobra venom faktor, ohanin/vespryn, L-aminokyselinové oxidázy a fosfodiesteráza (Liu a kol., 2017).

I napriek podobnému zloženiu testovaných jedov, ktoré je podmienené fylogenetickou príbuznosťou daných druhov jedovatých hadov sa ich vazoaktívny efekt líšil. Na základe stanoveného kumulatívneho skóre možno iritačný potenciál všetkých troch koncentrácií oboch testovaných jedov klasifikovať podľa Luepkého hodnotiaceho systému ako silný. Najnižšie kumulatívne skóre bolo zaznamenané pri koncentrácii E-1 jedu hadov druhu *Naja siamensis*. So zvyšujúcim sa riedením bol vazoaktívny efekt výraznejší a kumulatívne skóre koncentrácií E-2 a E-3 vyššie než pri koncentrácii E-1. Tento jav bol pravdepodobne dôsledkom veľmi výraznej vazokonstrikcie, ktorá prerušila prítok krvi do oblasti CAM, na ktorú bol jed s koncentraciou E-1 aplikovaný. Nižšie koncentrácie daného jedu nevyvolali vazokonstrikciu, čo umožnilo sledovať zmeny v podobe hyperémie, hemorágií a vznikajúcich krvných zrazením. V prípade jedu hadov druhu *Naja ashei* sa znižujúcou koncentraciou jedu znížilo aj kumulatívne skóre čo naznačuje určitú závislosť miery efektu od veľkosti dávky. Všetky zistené výsledky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

**Tab. 4. Prehľad stanovených výsledkov**

Jed	c	Hyperémia	Hemorágie	Zrážanie	Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
Kontrola	N/a	0	0	0	0	0
<i>Naja ashei</i>	E-1	5	7	7	19	Silný
	E-2	5	7	7	19	Silný
	E-3	3.5	5.5	4.75	13.75	Silný
<i>Naja siamensis</i>	E-1	3.25	6	0	9.25	Silný
	E-2	4.5	6.5	5.25	16.25	Silný
	E-3	3.5	5.5	4.25	13.25	Silný

Ďakujem kolegom doc. MVDr. Eve Petrovovej, PhD. a MVDr. Vladimírovi Petrillovi, PhD. za pomoc pri realizovaní tejto práce.

Práca bola súčasťou grantových úloh VEGA 1/024/18, APVV-17-0017 a VEGA 1/0050/19 riešených na Ústave fyziológie a Ústave anatómie Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hus KK, et al. First Look at the Venom of *Naja ashei*. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2018; 23(3):609.
- Liu CC, et al.. Analysis of the efficacy of Taiwanese freeze-dried neurotoxic antivenom against *Naja kaouthia*, *Naja siamensis* and *Ophiophagus hannah* through proteomics and animal model approaches. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(12).
- Luepke NP, Kemper FH. The HET-CAM test: An alternative to the draize eye test. *Food and Chemical Toxicology*. 1986; 24(6–7):495-496. ISSN 0278-6915.
- Sharma VK, Baranwal VK. Snake venom ophthalmia. *Medical journal, Armed Forces India*. 2015; 71(1):197–198.

# VPLYV VYBRANÝCH RASTLINNÝCH SILÍC NA TVORBU EXTRACELULÁRNEJ FOSFOLIPÁZY KVASINKOU *Candida albicans*

Proškovcová M., Čonková E., Váczi P.

Ústav farmakológie, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Kvasinka *Candida albicans* je významným oportúnnym patogénom, ktorý je príčinou rôznych dermatologických infekcií. Jej virulencia závisí od viacerých faktorov, ku ktorým zaradíme aj tvorbu extracelulárnej fosfolipázy (PL). V našom experimente sme zisťovali schopnosť produkcie PL pri 19 klinických izolátoch *C. albicans* a zároveň sme testovali možnosti inhibície jej tvorby rastlinnými silicami (RS) z klinčekovca voňavého (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) a pamajoránu obyčajného (*Origanum vulgare*, Lamiaceae) v koncentráciách 400  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  a 800  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Na základe indexu aktivity PL (Pz) bola vyhodnotená intenzívna produkcia PL pri 78,9 % klinických izolátoch (Pz = 0,65±0,08). Po expozícii rastlinnými silicami bola zaznamenaná redukcia tvorby PL, priemerné hodnoty Pz sa pohybovali od 0,70 do 0,83. Najlepší účinok vykazovala silica z *Origanum vulgare*, v koncentrácii 800  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , pri ktorej pri izolátoch s intenzívnou tvorbou PL sme evidovali pokles zo 78,9 % na 31,6 % a pri 7 izolátoch (36,8 %) sme zistili úplnú redukciu tvorby PL.

## ÚVOD

Napriek tomu, že *C. albicans* je prirodzeným komenzálom zdravého organizmu, môže za určitých podmienok spôsobiť mierne až život ohrozujúce infekcie (Pegorie a kol., 2017). Vzostup incidencie kandidóz v posledných desaťročiach vedie k hľadaniu nových stratégií prevencie a liečebných postupov, ktoré sú zamerané na faktory virulencie mikroorganizmov. Okrem adherencie, významnú úlohu zohráva aj tvorba či aktivita PL. Zvýšená aktivita PL vedie k dysfunkcii bunkových membrán buniek hostiteľa, narušením ich zložiek – fosfolipidov, čím sa podporí invázia kvasiniek (Ghannoum, 2000).

Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť schopnosť produkcie PL a intenzitu jej aktivity u klinických izolátov *C. albicans* a otestovať možnosť jej inhibície rastlinnými silicami z klinčekovca voňavého a pamajoránu obyčajného.

## MATERIÁL A METODIKA

Skríning produkcie fosfolipázy *C. albicans* sme vykonali použitím EGG Yolk agarovej metódy (Ellepola a kol., 2016). Celkovo bolo otestovaných 19 klinických izolátov *Candida albicans*, ktoré boli získané od pacientov s výskytom rôznych slizničných a kožných kandidóz. Z čerstvých, 24 h izolátov inkubovaných pri 35 °C, sme si pripravili v sterilnom fosfátovom pufri (PBS) bunkové suspenzie, pomocou spektrofotometra pri 520 nm a optickej denzite 1,5. Na testovanie inhibičnej schopnosti tvorby PL sme si vybrali dve rastlinné silice, z klinčekovca voňavého – *Caryophylli aetheroleum* (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae) a pamajoránu obyčajného – *Origani aetheroleum* (*Origanum vulgare*, Lamiaceae), v koncentráciách 400  $\mu\text{l.ml}^{-1}$  a 800  $\mu\text{l.ml}^{-1}$ . Ku 2 ml sterilného PBS (kontrola), resp. sterilného PBS s rastlinnou silicou sme pridali 0,5 ml bunkovej suspenzie kvasiniek. Po 30 min. expozícii, pri teplote 35 °C, sme bunky scentrifigovali (10 minút, 3 000 otáčok). V dvoch následných cykloch sme získané pelety buniek premyli s 2,5 ml sterilného PBS, čím sme úplne eliminovali rezíduá rastlinných silíc. K premytým bunkám sme pridali opäť 2,5 ml sterilného PBS a na povrch egg yolk agaru sme aplikovali 10  $\mu\text{l}$  bunkovej suspenzie kvasiniek. Produkciu PL, ktorá sa prejavila vytvorením precipitačnej zóny okolo kolónie, sme posudzovali po 7 dňovej inkubácii (teplota 35 °C). Aktivitu PL sme vyhodnotili na základe indexu Pz, ktorý sme vypočítali ako podiel priemeru kolónie a priemeru kolónie spolu so zónou. Na základe Pz boli izoláty zaradené do 4 skupín intenzity tvorby PL: žiadna (Pz =

1), slabá ( $P_z = 0,99 - 0,90$ ), mierna ( $P_z = 0,89 - 0,80$ ), stredná ( $P_z = 0,79 - 0,70$ ) a intenzívna ( $P_z < 0,69$ ).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*C. albicans* patrí k najvirulentnejším druhom rodu *Candida* spp. V dôsledku rozsiahleho užívania širokospektrálnych antimikrobiálnych látok, vykonávania invazívnych postupov v nemocniciach a stále častejšieho imunopresívneho stavu pacientov, narastá v posledných desaťročiach incidencia infekcií spôsobených rodom *Candida* spp. (Cortegiani, a kol., 2018). Vzostup incidencie kandidóz vedie k hľadaniu nových stratégií prevencie a liečebných postupov, zameraných na faktory virulencie mikroorganizmov (Rossoni a kol., 2013). V patogenéze *C. albicans* hrá jednu z dôležitých úloh produkcia hydrolytických enzýmov – fosfolipáz, ktoré uľahčujú prenikanie patogéna do hostiteľskej bunky. Vyššia fosfolipázová aktivita je pozorovaná pri izolátoch získaných od pacientov s kandidózou v porovnaní so zdravými jedincami (Ellepola a kol., 2016). V našej štúdiu sme zaznamenali intenzívnu tvorbu fosfolipázy až pri 15 izolátoch (78,9 %) (tab. 1). Priemerná hodnota  $P_z$  (tab. 2) dosahovala 0,65 (SD  $\pm 0,08$ ). Negatívna, resp. slabá tvorba PL nebola zistená ani pri jednej vzorke, čo potvrdzuje fakt, že izoláty boli získané od chorých jedincov. V súčasnosti, pri hľadaní nových liečiv s potenciálnymi antifungálnymi účinkami, sa osobitná pozornosť venuje prírodným produktom, ku ktorým patria aj rastlinné silice. Nami vykonané testy poukazujú na efektivitu rastlinných silíc aj v redukcii tvorby PL (graf 1 a 2). Po expozícii kvasiniek silicou zo *Syzygium aromaticum* klesol počet izolátov produkujúcich PL intenzívne z 15 (78,9 %) na 10 (52,6 %) pri koncentrácii  $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , resp. na 9 (47,3 %) pri koncentrácii  $800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Účinnejšou sa však javí silica z *Origanum vulgare*, pri ktorej v koncentrácii  $800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  bola intenzívna tvorba PL zistená iba pri 6 izolátoch (31,6 %), v siedmich prípadoch (36,8 %) nebola zaznamenaná tvorba PL. Inhibičný účinok silice zo *Syzygium aromaticum* je založený na prítomnosti hlavnej obsahovej látky, eugenolu (Alshaikh a Perveen, 2017). Brondani a kol., 2018 potvrdili redukcii tvorby PL, a to v závislosti od času, aj u silice z *Origanum vulgare* a za jej inhibítora považujú 4-terpineol. Našou štúdiou sme potvrdili vplyv týchto rastlinných silíc na tvorbu PL. Dosiagnuté výsledky sme vyhodnotili štatistickým programom GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software Inc. CA, USA) pomocou jednocestného ANOVA testu, Dunnettov porovnávací test.

**Tab. 1** Vplyv rastlinných silíc na produkcia fosfolipázy (PL) izolátmi *C. albicans*

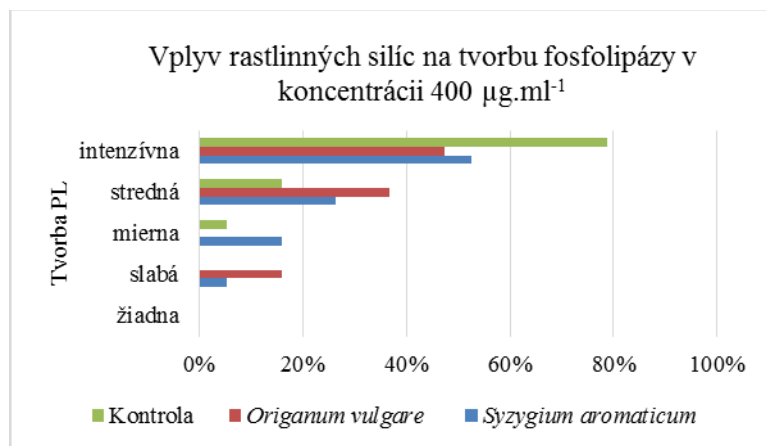
Tvorba PL	Kontrola	Klinčekovec voňavý		Pamajorán obyčajný	
		$400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
	n/%	n/%	n/%	n/%	n/%
žiadna	0/0	0/0	0/0	0/0	7/36,8
slabá	0/0	1/5,3	1/5,3	3/15,8	0/0
mierna	1/5,3	3/15,8	1/5,3	0/0	3/15,8
stredná	3/15,8	5/26,3	8/42,1	7/36,8	3/15,8
intenzívna	15/ 78,9	10/52,6	9/47,3	9/47,4	6/31,6

**Tab. 2** Priemerná hodnota (x) indexu  $P_z$  a smerodajná odchýlka ( $\pm$ SD)

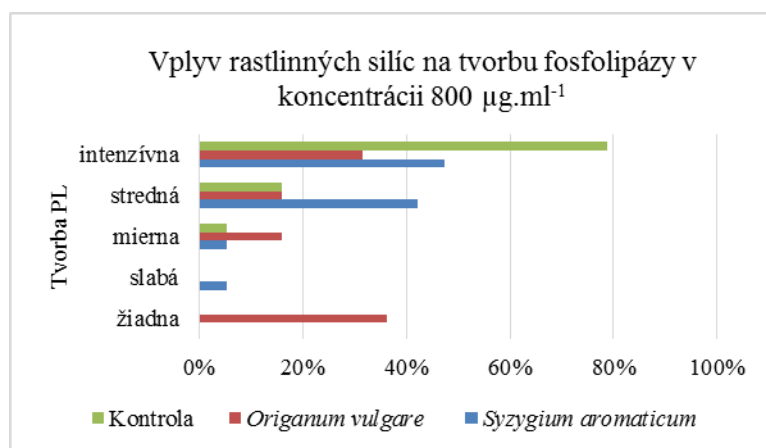
Kontrola	<i>Caryophylli</i> aetheroleum		<i>Origani</i> aetheroleum	
	$400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$800 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
0,65 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	0,71 <sup>a</sup> $\pm$ 0,10	0,70 <sup>a</sup> $\pm$ 0,08	0,73 <sup>a, c</sup> $\pm$ 0,10	0,83 <sup>b, c</sup> $\pm$ 0,17

*a, b, c* - hodnoty s odlišným označením sú štatisticky rozdielne  $p < 0,05$

**Graf 1** Ovplyvnenie tvorby PL rastlinnými silicami (400 µg.ml<sup>-1</sup>)



**Graf 2** Ovplyvnenie tvorby PL rastlinnými silicami (800 µg.ml<sup>-1</sup>)



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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alshaikh N, Perveen K. Anti-candidal activity and chemical composition of essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2017 ; 20(4):951-8.
- Brondani LP, et al. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. *Journal de mycologie medicale*. 2018; 28(1):94-100.
- Cortegiani A, et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *Journal of intensive care*. 2018; 6(1):69.
- Ellepola AN, et al. Extracellular phospholipase production of oral *Candida albicans* isolates from smokers, diabetics, asthmatics, denture wearers and healthy individuals following brief exposure to polyene, echinocandin and azole antimycotics. *Brazilian journal of microbiology*. 2016; 47(4):911-6.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 2000; 13(1):122-43.
- Pegorie M, et al. Estimating the burden of invasive and serious fungal disease in the United Kingdom. *Journal of Infection*, 2017; 74(1):60-71.
- Rossoni RD, et al. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Brazilian Journal of Oral Sciences*. 2013; 12(3):199-204.

# POUŽITIE GLUTARALDEHYDOVÉHO KOAGULAČNÉHO TESTU PRI DIAGNOSTIKE OCHORENÍ PAZNECHTOV DOJNÍC

Slovák P., Mudroň P.

*Klinika prežívavcov, UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo overiť význam použitia glutaraldehydového koagulačného testu (GAT) pri diagnostike zápalových ochorení paznechtov hovädzieho dobytká. Sledovanie bolo vykonané na 55 kusoch hovädzieho dobytká, z čoho krívalo 41 dojníc. Príčina krívania bola diagnostikovaná vyšetrením vo fixačnej klietke. Všetky zvieratá boli podrobené glutaraldehydovému koagulačnému testu. Zo získaných výsledkov bola vypočítaná citlivosť 66,1 % a špecifickosť 100 %. V našom experimente sa teda ukázalo, že glutaraldehydový test nie je dostatočne citlivý na odhalenie každého zápalového procesu.

## ÚVOD

Závažnou prekážkou pri dosahovaní optimálnej produkcie dojníc, ich zdravia a welfare je krívanie, ktoré chovateľom hovädzieho dobytká spôsobuje nemalé finančné straty (Suleyeman a kol., 2012). Infekčné a traumatické ochorenia spúšťajú u postihnutého zvieratá zápalový proces (Medzhitov, 2008). Glutaraldehydový koagulačný test je jednoduchá a rýchla semikvantitatívna metóda na detekciu hladiny imunoglobulínov a fibrinogénu v krvi hovädzieho dobytká, čo poukazuje na prítomnosť zápalového procesu v organizme (Metzner a kol. 2006). Táto metóda je založená na reakcii voľných amino skupín molekúl bielkovín s aldehydovými skupinami reagentu, čo vyúsťuje do vzniku tuhého gélu (koagulácia). Rýchlosť reakcie je priamo závislá na koncentrácii imunoglobulínov a fibrinogénu vo vzorke (Liberg, 1978). Rýchlosť reakcie do 3 minút predstavuje vysoké zvýšenie gamaglobulínov a fibrinogénu vo vzorke, od 3 do 6 minút – stredné zvýšenie, 6-15 minút – mierne zvýšenie a keď čas presiahne 15 minút tak tieto látky nie sú zvýšené (Kováč a kol. 1987).

## MATERIÁL A METODIKA

Do sledovania bolo zaradených 41 krívajúcich dojníc a skupina 14 kontrolných, nekrívajúcich zvierat ktoré pozostávali z 9 kusov dospelého hovädzieho dobytká a 5 kusov mladého hovädzieho dobytká. Kontrolné zvieratá neprejavovali žiadne príznaky prítomnosti zápalového ochorenia a krívajúce dojnice boli postihnuté len zápalovými ochoreniami paznechtov. Pre vylúčenie prípadných subklinických mastitíd, bol vykonaný NK-test, ktorý bol u všetkých dojníc v tejto práci negatívny. Bola vykonaná diagnostika príčiny krívania vo fixačnej klietke. Všetkým zvieratám bola odobraná krv a urobený rýchly glutaraldehydový koagulačný test. Glutaraldehydový test bol vykonaný tak, že do skúmavky s reagentom bolo pridané rovnaké množstvo venóznej krvi. Zmes krvi a reagentu bola premiešaná každých 30 sekúnd do času vytvorenia zrazeniny. Tento čas bol následne zaznamenaný. Ak nedošlo ku zrazeniu krvi do 15 minút, išlo o negatívny výsledok testu. Na základe získaných výsledkov bola vypočítaná citlivosť a špecifickosť testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Reakcia glutaraldehydového testu bola pri 14 kontrolných (nekrívajúcich) zvieratách negatívna, čo potvrdilo neprítomnosť zápalového procesu. Z krívajúcich dojníc reagovalo 20 zvierat pozitívne a 21 negatívne (Tab. 1). Z ochorení paznechtov dominovali u krívajúcich dojníc pododermatitída a digitálna dermatitída (Tab. 2)

**Tab. 1. Reakcia experimentálnych zvierat na glutaraldehydový test (GAT)**

	Krívajúce zvieratá (n = 41)	Kontrolná skupina (n = 14)
<b>Pozitívny výsledok GAT</b>	20	0
<b>Negatívny výsledok GAT</b>	21	14

**Tab. 2. Choroby paznechtov u krívajúcich dojníc (n = 41)**

	Počet	%	Citlivosť testu
<b>Pododermatitída</b>	14	34,15%	73,7 %
<b>Digitálna dermatitída</b>	14	34,15%	66,7 %
<b>Chronická laminitída</b>	7	17,07%	0%
<b>Nekróza hrotu paznechtu</b>	3	7,32%	60%
<b>Akútna artritída paznechtové kĺbu</b>	2	4,88%	100%
<b>Chronická artritída paznechtové kĺbu</b>	1	2,44%	100%
<b>Spolu</b>	41	100 %	66,1 %

Na základe týchto výsledkov bola stanovená citlivosť a špecifickosť GAT. Citlivosť bola stanovená na 66,1 %, čo znamená, že tento test odhalí zápalové ochorenie paznechtov v dvoch tretinách prípadov. Jedna tretina prípadov zostáva týmto testom nedetegovaná. Špecifickosť testu bola stanovená na 100%, čiže ak je výsledok testu pozitívny, vždy je v organizme prítomný zápalový proces. Digitálna dermatitída je bakteriálne ochorenie ktoré primárne postihuje kožu nad pätkami dobytka. Infekcia spôsobuje zápal a poškodenie kože vedúce k bolesti a diskomfortu (Palmer a kol., 2015). Je hlavnou príčinou krívania dojníc (Laven a kol., 2006) a teda významným problémom pre mliečnu výrobu v mnohých krajinách. Spôsobuje redukcii welfare a ekonomické straty (Laven, 2001). Citlivosť glutaraldehydového testu na toto ochorenie je podľa našich zistení 66,7% v prípade akútnej aj chronickej formy. Tento výsledok môže byť vysvetlený tým, že treponémy asociované s digitálnou dermatitídou vykazujú známky limitovanej indukcie humorálnej a bunkovej imunitnej reakcie (Wilson-Welder a kol., 2015). Pozorovateľný je široký rozsah koncentrácií sérových protilátok od zvierat'a ku zvierat'u v rámci skupiny zvierat (Moe a kol., 2010). Variabilita v imunitnej reakcii môže byť čiastočne vysvetlená rôznymi fylogtypmi treponém nájdených v léziách digitálnej dermatitídy. Ďalej existuje predpoklad, že treponémové a bakteriálne populácie sa časom menia, sú rôzne distribuované v lézii a teda poskytujú malý alebo obmedzený kontakt s imunitným systémom hostiteľa (Krull a kol., 2014). Navyše niektoré treponémy sú súčasťou normálnej intestinálnej flóry a ich prítomnosť môže viesť k imunologickej tolerancii a nedostatočnej protilátkovej odpovedi (Evans a kol., 2012). Pododermatitídy sú ďalším veľmi častým ochorením spôsobujúcim bolesť a krívania u dojníc (Van Amstel a kol., 2006). Pri tomto ochorení sme zistili citlivosť glutaraldehydového testu 73,7 %. Postihnuté zvieratá vykazujú rôzne stupne krívania. Skoré štádiá sú typické bolestivosťou a hemorágiami bez otvoreného defektu na rohovine. Pri zrelej lézii je povrch rohoviny poškodený a často uvoľnený a podmínovaný. Odhalená škára je traumatizovaná rohovinovými okrajmi defektu a prostredím a dochádza k vzniku granulačného tkaniva. V chronických prípadoch môže byť prítomný drenážny trakt, ktorý sa rozprestiera od miesta vredu do päty alebo od kože dorzálného korunkového okraja až po distálny interfalangeálny kĺb (Van Amstel a kol., 2006).



Dlhotrvajúci proces, otvorený defekt, dráždenie tkaniva, toto sú všetko faktory, vďaka ktorým môže dôjsť k silnej zápalovej reakcii, ktorá sa môže odzrkadliť v pozitívnom glutaraldehydovom teste. Celkovo však sa však glutaraldehydový koagulačný test, na základe našich zistení, nepreukázal ako nápomocný pri detekcii patológií paznechtov ako skriningové vyšetrenie a nedokáže nahradiť základné klinické vyšetrenie v ortopedickej kľietke.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Evans NJ, et al. Host and environmental reservoirs of infection for bovine digital dermatitis treponemes. *Veterinary microbiology*, 2012, 156.1-2: 102-109.
- Kováč G, et al. Utilization of the Glutaraldehyde Coagulation Test in Cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 1987, 56.3: 275-280.
- Krull AC, et al. Deep sequencing analysis reveals temporal microbiota changes associated with development of bovine digital dermatitis. *Infection and immunity*, 2014, 82.8: 3359-3373.
- Laven RA, et al. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. *The Veterinary Journal*, 2006, 171.1: 79-88.
- Laven R. Control of digital dermatitis in cattle. *In Practice*, 2001, 23.6: 336-341.
- Liberg P. The fibrinogen concentration in blood of dairy cows and its influence on the interpretation of the glutaraldehyde and formol-gel test reactions. *Acta vet. scand.* 1978; 19, 413-421.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, London, 2008; 454,7203: 428- 435.
- Metzner M, et al. Application of the glutaraldehyde test in cattle. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2007; 54.9: 449-454.
- Moe KK, et al. Analysis of the IgG immune response to *Treponema phagedenis*-like spirochetes in individual dairy cattle with papillomatous digital dermatitis. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, 17.3: 376-383.
- Palmer M, et al. Digital dermatitis in dairy cows: A review of risk factors and potential sources of between-animal variation in susceptibility. *Animals*, 2015, 5.3: 512-535.
- Suleyeman M, Fromsa A. Lameness in dairy cattle: Prevalence, risk factors and impact on milk production. *Global veterinaria*, 2012, 8.1: 01-07.
- Van Amstel S, et al. Review of pododermatitis circumscripta (ulceration of the sole) in dairy cows. *Journal of veterinary internal medicine*, 2006, 20.4: 805-811.
- Wilson-Welder J, et al. Digital dermatitis in cattle: current bacterial and immunological findings. *Animals*, 2015, 5.4: 1114-1135.

## FOKÁLNA INFEKCIA DENTOGÉNNEHO PÔVODU

Stašková A.<sup>1,2</sup>, Lauko S.<sup>1</sup>, Jenča A.<sup>2</sup>, Nemcová R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra mikrobiológie a imunológie, Ústav mikrobiológie a gnotobiológie, Laboratórium gnotobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko

<sup>2</sup> Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Akadémia Košice, n.o., Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, Báčikova 7, 040 01 Košice, Slovensko

### ABSTRAKT

Cieľom práce je identifikácia baktérií získaných z jednotlivých častí ústnej dutiny pri ochoreniach tvrdých a mäkkých tkanív, ktoré sú zdrojom fokálnej infekcie dentogénneho pôvodu. Získané poznatky umožnia vývoj nových možností ako pozitívne ovplyvniť orálne a celkové zdravie u ľudí. Eliminovaním fókusov v ústnej dutine sa znížia srdcovo-cievne ochorenia (*endocarditis*, *myocarditis*, *flebitis*), ochorenia pohybového aparátu (*arthritis*, *myositis*), ochorenia očí (*irits*, *iridocyklitis*), gastrointestinálneho traktu (*cholecystitis*, *cholangoitis*, *appendicitis*), močových ciest (*nefritis*, *pyelonefritis*, *cystitis*), nervového systému (*neuritídy*, *neuralgie*, *ischias*, *migrény*), kože (ekzémy, akné, *urtika*, *furunkulóza*). Identifikáciu jednotlivých baktérií sme realizovali izoláciou kultivovateľných baktérií pomocou moderných molekulárných metód.

### ÚVOD

Fokálna infekcia dentogénneho pôvodu obsahuje patologické stavy, kde patologické ložisko vzniká na podklade rôznych etiologických vplyvov a má patologický vplyv na vzdialený orgán. Fokus je ohraničený zápalový proces, vo väčšine prípadov má chronický charakter, je následkom dráždivého pôsobenia baktérií, toxínov, či alergénov. Väčšina výskumov o vzniku fokálnej infekcie kladie na prvé miesto paradontitídu ako najčastejší etiologický faktor. Infekcia bakteriálneho pôvodu tkanív zubnej drene prestupuje cez *foramen apicale* zuba a infikuje tkanivá paradontu. Ak je oštiepenie koreňového kanálka devitálneho zuba uskutočnené správne nasleduje liečenie periapikálneho nálezu, niekedy chronická periapikálna paradontitída pretrváva, môže sa komplikovať vznikom fistuly alebo abscesu. Fokálna infekcia dentogénneho pôvodu je definovaná ako sekundárna alebo celková infekcia spôsobená rozptylom mikroorganizmov do vzdialených orgánov, pričom primárna infekcia je lokalizovaná v tkanivách apikálneho a marginálneho paradontu. Z hľadiska fokálnej infekcie sú najzávažnejším etiologickým agensom: *Streptococcus viridans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus milleri*, *Streptococcus sanguis* (Petrašová a kol., 2009). V priebehu niekoľkých rokov sa postupne menil názor na to, čo je zdrojom fokálnej infekcie v ústnej dutine. Následkom nedostatočných možností oštiepenia koreňových kanálikov, boli mnohé zuby extrahované (Maoyang a kol., 2019). Endodoncia je odbor zubného lekárstva, zaoberajúci sa diagnostikou a liečbou patologických stavov zubnej drene a periapikálnych tkanív (Mäkinen, 2010). V prípade nedokonalého odstránenia infikovanej zubnej drene, prípadne prenesenia infekcie do periapikálneho priestoru a nedokonalého zaplnenia koreňového kanálka sa stáva takýto zubný pilier zdrojom fokálnej infekcie. Tieto ložiská môžu vzniknúť zanedbaním starostlivosti o ústnu dutinu, patologickým pôsobením niektorých mikroorganizmov alebo nepriaznivými anatomickými pomermi v dutine ústnej.

### MATERIÁL A METODIKA

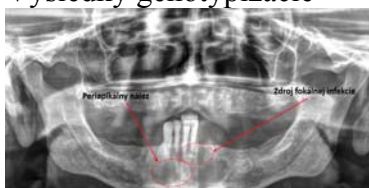
Terapia fokálnej infekcie dentogénneho pôvodu môže byť konzervačná, konzervačno-chirurgická (resekcia koreňového hrotu, hemisekcia) a radikálna, ktorou je extrakcia zuba. Pri vyšetrení fokálnej infekcie využívame aspekciu, poklop, palpáciu, vyšetrenie vitality zubnej drene, kompletne RTG vyšetrenie. Realizovali sme identifikáciu zástupcov kultivovateľnej mikrobioty z povrchu extrahovaného zuba u pacientov s ochorením tvrdých a mäkkých zubných tkanív. DNA sme izolovali zo solitérnych kolónií s použitím DNAzol direct

(Molecular Research Center Inc., Cincinnati, USA) podľa pokynov výrobcu. Gény 16S rRNA z izolátov boli amplifikované pomocou PCR priméry 27F (5-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 a 1492R (5-CGGYTACCTTGTTACGACTT-3) (syntetizované Sigma Aldrich). Podmienky cyklu boli 5 minút pri 94 ° C, 1 minúta pri 94 ° C, 1 minúta pri 55 ° C a 3 minút pri 72 ° C a 10 minút pri 72 ° C. PCR sa uskutočňovala na termocyklerochoch (TProfessional Basic, Biometra GmbH, Göttingen, Nemecko). Produkty PCR sa vizualizovali pomocou gélového červeného biotia UV na 3% TAE agarózovom géli elektroforéza Produkty amplifikácie 1400 bp boli purifikované a sekvenované v oboch smeroch (Microsynth AG Postfach 58 6961 Wolfurt-Bahnhof Austria) a získané sekvencie kultivovateľných baktérií sme porovnali so sekvenciami v databáze GenBank pomocou BLASTn analýzy.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### Kazuistika č. 1

#### Výsledky genotypizácie



P1/ 43/3 *Streptococcus anginosus*, P1/43/8/2 *Staphylococcus epidermidis*, P1/43/1B *Streptococcus anginosus*, P1/43/4 *Streptococcus anginosus*, P1/43/5 *Streptococcus anginosus*, P1/43/6 *Staphylococcus epidermidis*, P1/43/1D *Streptococcus anginosus*; P1/43/2 *Staphylococcus epidermidis*; P1/41/1 *Staphylococcus epidermidis*; P1/41/4 *Staphylococcus epidermidis*; P1/41/5 *Staphylococcus epidermidis*; P1/41/6 *Staphylococcus hominis*, P1/41/7 *Staphylococcus epidermidis*

### Kazuistika č. 2



ALV1/1 *Streptococcus salivarius*, ALV1/1V *Staphylococcus hominis*, ALV1/2/MK *Staphylococcus hominis*, ALV1/2/M *Lactobacillus fermentum*, ALV1/2/Mhem *Lactobacillus fermentum*, ALV1/1 *Streptococcus salivarius*

### Kazuistika č. 3



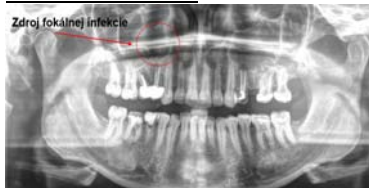
MM3 *Streptococcus salivarius*, MM3V *Enterococcus faecalis*, MM5 *Streptococcus parasanguinis*

### Kazuistika č. 4



H2 *Lactobacillus rhamnosus*, H4 *Staphylococcus hominis*, H3 *Streptococcus* sp., H1D *Lactobacillus rhamnosus*, H2M *Staphylococcus epidermidis*

### Kazuistika č. 5



G3M *Streptococcus* sp. (*Enterococcus faecium*), G4VM *Staphylococcus epidermidis*

### Kazuistika č. 6



P1 *Staphylococcus epidermidis*, P3 *Streptococcus anginosus*, P6/1 *Staphylococcus epidermidis*, P4 *Staphylococcus epidermidis*, P6 *Staphylococcus epidermidis*

### Kazuistika č. 7



12/2 *Bacillus toyonensis*, 13/1/2 *Enterococcus faecalis*, 12/3/2 *Streptococcus parasanguinis*, 12/5 *Streptococcus parasanguinis*, 11/8D *Streptococcus sp.*, 11/8V *Enterococcus faecalis*, 11/7D *Streptococcus anginosus*, 13/1 *Streptococcus sp.*, 13/1/3 *Staphylococcus hominis*

### Kazuistika č. 8



3/1/1 *Staphylococcus hominis*

V našej štúdií sme analyzovali orálnu mikrobiotu rôznych chorobných stavov mäkkých a tvrdých zubných tkanív, ktoré sú zdrojom fokálnej infekcie. Klinické nálezy sú zobrazené na jednotlivých RTG snímkach. Pri RTG vyšetrení sme sledovali stav tkanív apikálneho paradontu, periapikálne ložiská, ich veľkosť a tvar. V našej štúdií väčšina identifikovaných izolátov patrí do rodu *Streptococcus* a *Stafylococcus*. V menšej miere sú zastúpené rody *Lactobacillus* a *Enterococcus*.

Vega 1/0788/19 Štúdium zmien v mikroflóre dentálnych biofilmov u ľudí a psov za účelom harmonizácie mikrobiocenózy ústnej dutiny pomocou vybraných orálnych probiotík.

### POUŽITÁ LITERATÚRA

Maoyang L, Songyu X, Zhao W. Oral microbiota: A new view of body health. Food Science and Human Wellness. 2019; 8:8-15.

Mäkinen K. K. Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. International Journal of Dentistry. 2010; 26:8.

Petrášová A. Zborník referátov 1. Kongres biomedicíny v oromaxiofaciálnej oblasti. 2009; 113-119.

# ANTIBIOTICKÁ REZISTENCIA U BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z JEDINEJ ZLATEJ BANE NA SLOVENSKU

Timková I., Lachká M., Maliničová L., Kisková J., Nosáľová L., Pristaš P., Sedláková-Kaduková J.

*Katedra mikrobiológie, UPJŠ, Košice*

## ABSTRAKT

Životné prostredie kontaminované ťažkými kovmi v dôsledku ľudských aktivít predstavuje závažnú hrozbu aj vďaka potenciálu ťažkých kovov selektovať antibioticky rezistentné baktérie kvôli väzbe medzi génmi rezistencie voči ťažkým kovom a antibiotikám.

Predkladaná práca monitoruje profil tolerancie voči antibiotikám u baktérií izolovaných z prostredia zlatej bane. Medzi viac ako 150 študovanými izolátmi prevládala tolerancia voči ampicilínu (MIC > 100 µg/ml – 49 % izolátov), kanamycínu (MIC > 100 µg/ml – 18 % izolátov) a chloramfenikolu (MIC > 20 µg/ml – 16 % izolátov). Tolerancia voči tetracyklínu (MIC > 20 µg/ml) bola detegovaná u menej ako 1 % izolátov.

## ÚVOD

Objav antibiotík (ATB) od základov zmenil spôsob liečby bakteriálnych infekcií (Pal a kol., 2017). Avšak podľa najnovších zistení Svetovej zdravotníckej organizácie (World Health Organisation - WHO) vstupujeme do obdobia post-antibiotickej éry, kedy je úspešná liečba a profylaxia bakteriálnych ochorení ohrozená fenoménom zvaným antibiotická rezistencia. Životné prostredie zohráva dôležitú úlohu z hľadiska vzniku a šírenia bakteriálnej ATB rezistencie (Ashbolt, 2013). Doterajšie predpoklady, že jedinou príčinou ATB rezistencie je nadmerné a nesprávne užívanie ATB, sú už neakceptovateľné, pretože aj napriek zníženému a kontrolovanému užívaniu týchto substancií nebol pozorovaný pokles bakteriálnej ATB rezistencie (Knapp a kol., 2017). Existuje mnoho dôkazov poukazujúcich na fakt, že znečistenie ťažkými kovmi je jedným z dôležitých selekčných faktorov ATB rezistencie (Stepanauskas a kol., 2006). Banská činnosť je jedným z hlavných antropogénnych aktivít vedúcich k znečisteniu životného prostredia ťažkými kovmi a takto kontaminované miesta sú dnes považované za tzv. horúce miesta pre vznik a vývin ATB rezistentných bakteriálnych druhov (Hu a kol., 2016; Knapp a kol., 2011; Su a kol., 2015).

Cieľom predkladanej práce bolo stanovenie MIC (minimálnej inhibičnej koncentrácie, z angl. minimal inhibitory concentration) u baktérií izolovaných z povrchového, ale aj hlbinného prostredia jedinej zlatej bane na Slovensku a overenie hypotézy, že banská činnosť prispieva k vytváraniu podmienok na vznik, selekciu a šírenie determinantov ATB rezistencie medzi mikroorganizmami.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorka bola sterilne odobratá z poslednej aktívnej zlatej bane v strednej Európe - Rozália v Hodruši-Hámroch, SK (GPS N 48°45.658' E 18°85.166').

1 g vzorky bol rozsuspendovaný v 10 ml sterilného fosfátového tlmivého roztoku a intenzívne premiešavaný po dobu 30 minút. Následne bolo 100 µl vybraných desiatkových riedení pôdnych eluátov naočkovaných na kultivačné médiá, ktoré boli kultivované za aeróbnych podmienok cez noc pri izbovej teplote.

Na základe rôzneho fenotypu bakteriálnych kolónií boli reprezentatívne izoláty podrobené stanovovaniu MIC vybraných ATB. Testovanie bolo uskutočnené agarovou dilučnou metódou na Mueller-Hintonovej kultivačnom médiu s prídavkom jednotlivých ATB: 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. Kultivácia prebiehala aeróbne

počas 48 hodín pri izbovej teplote, po ktorej bol rast baktérií vyhodnotený a izoláty boli označené ako tolerantné, resp. senzitivné.

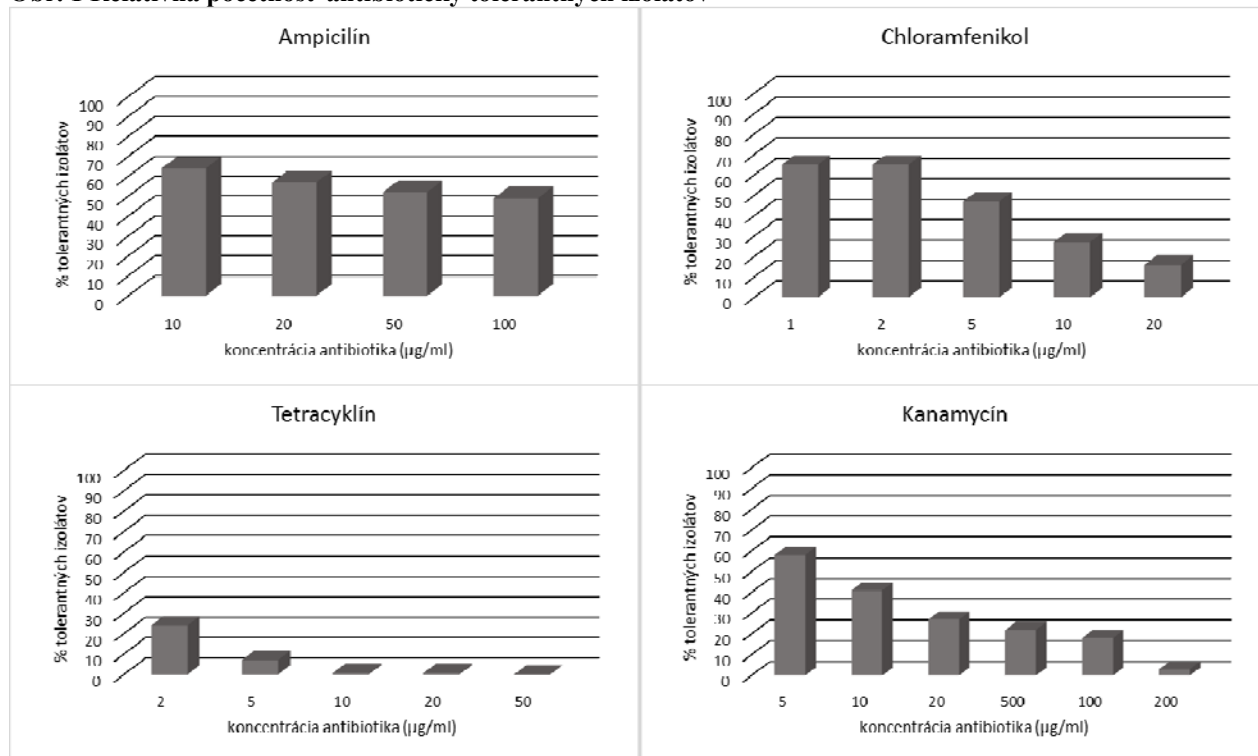
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zlatá baňa bola vybraná kvôli svojej vysokej kontaminácii ťažkými kovmi (napr. koncentrácia Fe - 38723 mg/kg, Zn - 1397 mg/kg, Pb - 706 mg/kg...), nakoľko gény rezistencie voči ťažkým kovom predstavujú selekčný marker determinantov antibiotickej rezistencie.

Kultiváciou sme stanovili početnosť kultivovateľných baktérií v jednom grame vzorky, tzv. CFU (z angl. colony forming units) -  $2,43 \times 10^5$ . Táto hodnota je 10 - 100-krát vyššia ako CFU pozorovaná vo výskume banského odpadu autormi Safari Sinegani a Younessi (2017), ktorí túto hodnotu stanovili na  $1,55 \times 10^3$  -  $1,48 \times 10^4$ . Naopak, Berg a kol. (2005) skúmaním početnosti baktérií v pôde s prídavkom medi odhalili rádovo rovnaké hodnoty CFU ako my -  $8,4 \times 10^5$ .

Celkovo sme získali 158 izolátov, u ktorých sme následne stanovovali MIC vybraných ATB (Obr. 1). Medzi študovanými baktériami dominovala vysoká miera tolerancie voči ampicilínu, kde sme pozorovali MIC vyššiu ako 100  $\mu\text{g/ml}$  až v 49 % izolátov. Podobne aj v prípade kanamycínu - pri jeho MIC viac ako 100  $\mu\text{g/ml}$  sme detegovali 18 % tolerantných izolátov a v prípade chloramfenikolu 16 % tolerantných izolátov schopných rásť pri koncentrácii tohto ATB vyššej ako 20  $\mu\text{g/ml}$ . Najnižšiu mieru tolerancie sme pozorovali pre tetracyklín, kde sme MIC vyššiu ako 20  $\mu\text{g/ml}$  stanovili pre menej ako 1 % izolátov.

**Obr. 1** Relatívna početnosť antibioticky tolerantných izolátov



Na základe získaných výsledkov bola v našom výskume ako najrozšírenejšia označená tolerancia voči ampicilínu v koncentrácii vyššej ako 100  $\mu\text{g/ml}$  až v 49 % izolátov, čo je v zhode so zisteniami Berg a kol. (2005), ktorí tento typ ATB tolerancie pozorovali taktiež ako najčastejšiu, ale až u 100 % svojich izolátov. Vysoký trend chloramfenikolovej tolerancie podobne ako v našom prípade bol pozorovaný aj u baktérií izolovaných zo vzoriek pôd

a sedimentu z Antarktídy Tomova a kol. (2015) – 58 % izolátov, naopak, kanamycínovú toleranciu pozorovali iba v 8 % izolátov (30 µg/ml), zatiaľ čo náš experiment odhalil 18% toleranciu voči koncentrácii tohto ATB vyššej ako 100 µg/ml. Tetracyklínová tolerancia (MIC > 20 µg/ml) bola v našom prípade pozorovaná u menej ako 1 % izolátov, no úplne odlišnú tendenciu zaznamenali Safari Sinigani a Younessi (Safari Sinigani a Younessi, 2017), ktorí tento druh tolerancie detegovali vo väčšine svojich izolátov vykultivovaných práve zo vzoriek z banskej pôdy (44,33 %).

## ZÁVER

Naše výsledky dokázali vysokú frekvenciu environmentálnych izolátov, ktoré v porovnaní s klinickými izolátmi (EUCAST, <http://www.eucast.org>) vykazovali zvýšené hodnoty MIC antibiotík a indikujú, že prostredia kontaminované ťažkými kovmi môžu ovplyvniť šírenie ATB rezistencie a môžu predstavovať environmentálne rezervoáre ATB rezistentných baktérií.

*Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/0229/17 a APVV-16-0171.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ashbolt NJ. Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic Resistance. *Environ Health Perspect.* 2013;121:993–1002.
- Berg J, Tom-Petersen A, Nybroe O. Copper amendment of agricultural soil selects for bacterial antibiotic resistance in the field. *Lett Appl Microbiol.* 2005;40:146–151.
- Hu HW, Wang JT, Li J, Li JJ, Ma YB, Chen D, He JZ. Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils. *Environ Microbiol.* 2016;18:3896–3909.
- Knapp CW, Callan AC, Aitken B, Shearn R, Koenders A, Hinwood A. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia. *Environ Sci Pollut Res. Environmental Science and Pollution Research*; 2017;24:2484–2494.
- Knapp CW, McCluskey SM, Singh BK, Campbell CD, Hudson G, Graham DW. Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils. *PLoS One.* 2011;6.
- Pal C, Asiani K, Arya S, Rensing C, Stekel DJ, Larsson DGJ, Hobman JL. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Adv Microb Physiol. Elsevier Ltd.*; 2017;70:261–313.
- Safari Sinigani AA, Younessi N. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *J Glob Antimicrob Resist.* Taibah University; 2017;10:247–255.
- Stepanaukas R, Glenn TC, Jagoe CH, Tuckfield RC, Lindell AH, King CJ, McArthur J V. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms. *Environ Microbiol.* 2006;8:1510–1514.
- Su JQ, Wei B, Ou-Yang WY, Huang FY, Zhao Y, Xu HJ, Zhu YG. Antibiotic Resistome and Its Association with Bacterial Communities during Sewage Sludge Composting. *Environ. Sci. Technol.* 2015.
- Tomova I, Stoilova-Disheva M, Lazarkevich I, Vasileva-Tonkova E. Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands. *Front Life Sci.* 2015;8:348–357.

# MODULÁCIA AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE INZULÍNU POUŽITÍM IMIDAZOLOVÝCH IÓNOVÝCH KVAPALÍN

Vaník V., Fedunová D., Bednáríková Z., Marek, J., Gažová Z.  
Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky SAV, Košice

## ABSTRAKT

Amyloidné fibrily predstavujú špeciálny typ poly/peptidových agregátov charakteristických vysokým obsahom  $\beta$ -listov v ich sekundárnej štruktúre. Hromadenie amyloidných agregátov *in vivo* je charakteristickou črtou mnohých vážnych ochorení, tzv. amyloidóz, ako napr. Alzheimerovej a Parkinsonovej choroby alebo systémových amyloidóz (Chiti a kol. 2017). Patrí tu aj injekčne lokalizovaná amyloidóza vyskytujúca sa u diabetikov dlhodobo liečených inzulínom. Štúdium tvorby amyloidných agregátov je zaujímavé aj z iného hľadiska, pretože na báze amyloidných fibríl je možné vytvoriť nové progresívne materiály. V súčasnosti sa štúdie zaoberajú predovšetkým hľadaním spôsobov, ako cielene regulovať proces amyloidnej agregácie. Tvorba amyloidných fibríl *in vitro* je vo veľkej miere ovplyvnená vlastnosťami rozpúšťadla. Iónové kvapaliny (IK) predstavujú novú triedu rozpúšťadiel, ktorých fyzikálno-chemické vlastnosti možno modifikovať vhodnou kombináciou ich kationovej a aniónovej zložky. Cieľom našej práce bolo identifikovať vzťah medzi fyzikálno-chemickými vlastnosťami IK (pozícia aniónu v Hofmeisterovej sérii, hydrofobicita, veľkosť, nábojová hustota) a ich vplyvom na kinetiku agregácie a morfológiu inzulínových amyloidných fibríl. Študovali sme účinok IK zložených z imidazolového kationu (1-etyl-3-metyl-imidazol) a rôznych aniónov ( $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ) na kinetiku fibrilizácie a morfológiu inzulínových fibríl pomocou spektroskopických metód a AFM mikroskopie. Zistili sme, že všetky študované IK boli schopné modulovať amyloidnú agregáciu inzulínu. Kinetika fibrilizácie silne závisela od koncentrácie IK a od typu aniónu. Študované IK tiež indukovali tvorbu fibríl s rôznou morfológiou v závislosti od typu aniónu. Miera účinku naznačuje špecifické iónové interakcie s povrchom proteínu.

## ÚVOD

Amyloidná agregácia proteínov sa v súčasnosti dostáva čím viac do centra pozornosti v širokom spektre vedeckých disciplín. Schopnosť formovať amyloidné agregáty (fibrily) je všeobecnou vlastnosťou polypeptidových reťazcov (Chiti a kol. 2008). Jednou z dôležitých podmienok vzniku amyloidných fibríl je prítomnosť čiastočne rozbalenej konformácie proteínu, ktorá zabezpečí odhalenie amyloidogénnych regiónov. Špecifické destabilizačné podmienky sa *in vitro* dosahujú pri určitých hodnotách teploty a pH solventu, pridaním ďalších aditív alebo miešaním. Iónové kvapaliny (IK) sú novou triedou progresívnych solventov, ktoré sa objavili ako alternatíva ku klasickým rozpúšťadlám. IK sú kvapalné elektrolyty zložené z veľkých organických kationov kombinovaných s rôznymi aniónmi. Výhodou oproti bežným rozpúšťadlám je možnosť cieleného výberu zložiek IK, ktorá umožňuje aby ich fyzikálno-chemické vlastnosti (teplota topenia, polarita, hydrofobicita, hustota, viskozita, rozpustnosť a ďalšie) zodpovedali požadovaným vlastnostiam pre vybrané aplikácie (Forsyth a kol. 2004). V biologických vedách sa IK používajú ako médium pre rôzne biokatalytické reakcie. Záujem o IK sa zvyšuje, pretože ich použitie ponúka zaujímavé vyhliadky na stabilizáciu proteínov a zachovanie ich enzymatickej funkcie/aktivity. Napriek rastúcemu množstvu štúdií stále neexistuje osvedčená metóda predikcie efektu konkrétnych IK na stabilitu a agregáciu proteínov. Z tohto dôvodu je vysoký dopyt po systematických štúdiách, ktoré by umožnili charakterizovať mechanizmus účinku IK a definovať vzťah medzi fyzikálno-chemickými vlastnosťami IK a ich efektom na stabilitu a amyloidnú agregáciu. Získané poznatky by pomohli prispieť k pochopeniu mechanizmu vzniku amyloidných agregátov ako aj pri ich biotechnologickom využití.



## MATERIÁL A METODIKA

Použité proteíny: ľudský inzulín bol zakúpený od firmy Sigma Aldrich vo forme lyofilizovaného prášku. Použité iónové kvapaliny: EMIM Cl (1-etyl-3-metyl imidazolium chlorid), EMIM AC (CH<sub>3</sub>COO-acetát), EMIM BF<sub>4</sub> (tetrafluóborát), EMIM NO<sub>3</sub> (nitrát) a EMIM HSO<sub>4</sub> (hydrogénsulfát) boli zakúpené od firmy IoLiTec.

Príprava amyloidných fibríl: lyofilizovaný inzulín bol rozpustený na finálnu koncentráciu 20 μM v ultračistej destilovanej vode a vodných roztokoch obsahujúcich rôzne koncentrácie (25mM resp. 100mM) rozpustených iónových kvapalín. pH vody a roztokov IK bolo upravené na hodnotu 1.6 použitím koncentrovanej HCl (v prípade acetátovej IK bolo namiesto HCl použité NaOH). Roztok inzulínu bol rozdelený na 100 μL alikvóty, ktoré sa následne inkubovali v termomixéri pri 50°C s konštantným trasením (1200 rpm) po dobu 150 min (inzulín rozpustený vo vode), resp. 60 -100 min (v roztokoch s IK). Tvorba inzulínových amyloidných fibríl bola monitorovaná pomocou fluorescenčného testu. Morfológia a štruktúrne charakteristiky fibríl boli skúmané použitím a atómovej silovej mikroskopie (AFM) a kruhového dichroizmu (CD).

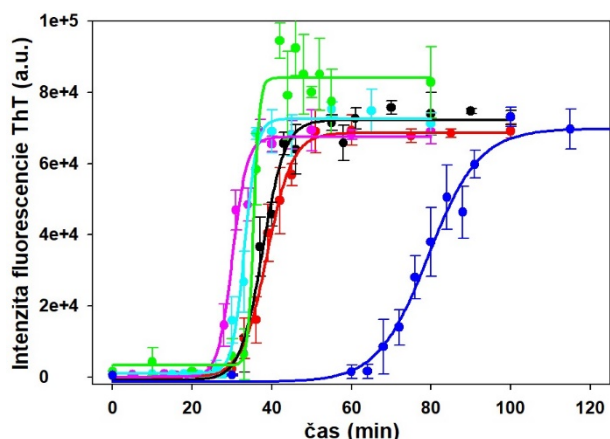
**Fluorescenčný test:** Kinetiku tvorby amyloidných fibríl sme študovali sledovaním charakteristického nárastu intenzity fluorescencie tioflavínuT (ThT). ThT bol pridaný ku vzorkám po inkubácii v termomixéri tak, aby výsledná koncentrácia ThT vo vzorkách bola ~ 25 μM. Nasledovala inkubácia pri 37 °C trvajúca 60 min. Merania sme uskutočnili pomocou spektrofluorimetra SynergyMX (BioTek) pri excitačnej vlnovej dĺžke 440 nm a emisía bola zaznamenávaná pri vlnovej dĺžke 485 nm.

**Kruhový dichroizmus (CD):** CD merania maturovaných inzulínových fibríl pripravených v jednotlivých IK sme uskutočnili pomocou spektropolarimetra JASCO J-810. Elipticita bola meraná v d'alekej-UV oblasti (195 – 270 nm). Zastúpenie sekundárnych štruktúrnych motívov v maturovaných fibrilách bolo vyhodnotené pomocou softvérového balíka CDPro Dichroweb. Na stanovenie priemerných štruktúrnych parametrov boli použité metódy CDSSTR a CONTIN s dvoma referenčným databázami.

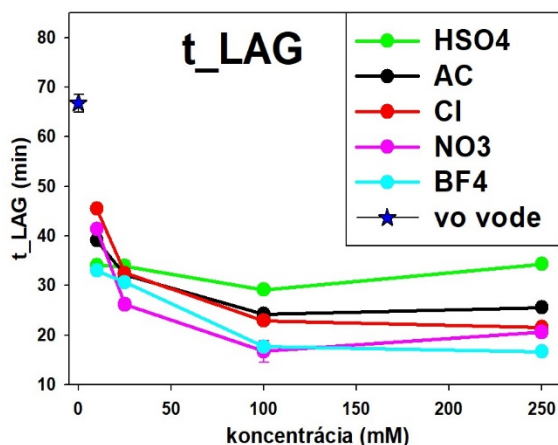
**Atómová silová mikroskopia (AFM):** Vzorky maturovaných fibríl boli zriedené v pomere 1:1 na finálnu koncentráciu 10 μM a nanosené na povrch čerstvo odštiepenej sľudy, kde sa nechali adsorbovať po dobu 5 min, následne boli opláchnuté ultračistou destilovanou vodou a vysušené na vzduchu. AFM snímky boli vytvorené pomocou mikroskopu Veeco/Bruker DI Innova v tapping móde pomocou NCHV hrotu. Topografické snímky boli upravené použitím tzv. flatteningu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kinetiku fibrilizácie (Obr. 1) inzulínu sme pozorovali pri špecifických podmienkach (pH = 1.6, 50°C) zabezpečujúcich odhalenie amyloidogénnych regiónov, vedúcich ku tvorbe zrelých fibríl. Zistili sme, že prídanie IK spôsobilo skrátenie lag-fázy fibrilizácie a miera skrátenia závisela od koncentrácie (iónovej sily) IK, čo naznačuje prípadné tienenie nabitých skupín proteínu (Obr. 2). Hydrofóbne IK pravdepodobne uľahčujú asociáciu hydrofóbných amyloidogénnych regiónov inzulínu a tým zrýchľujú fibrilizáciu. Miera účinku závisí od jednotlivých aniónov a je v súlade s reverznou Hofmeisterovou sériou, čo naznačuje špecifické iónové interakcie s povrchom proteínu. Na základe spektroskopických meraní sme zistili, že vytvorené inzulínové fibrilárne agregáty mali v sekundárnej štruktúre vysoký obsah β-listov (v porovnaní s natívnym inzulínom) pri všetkých študovaných koncentráciách IK, avšak nenašla sa korelácia s Hofmeisterovou sériou.

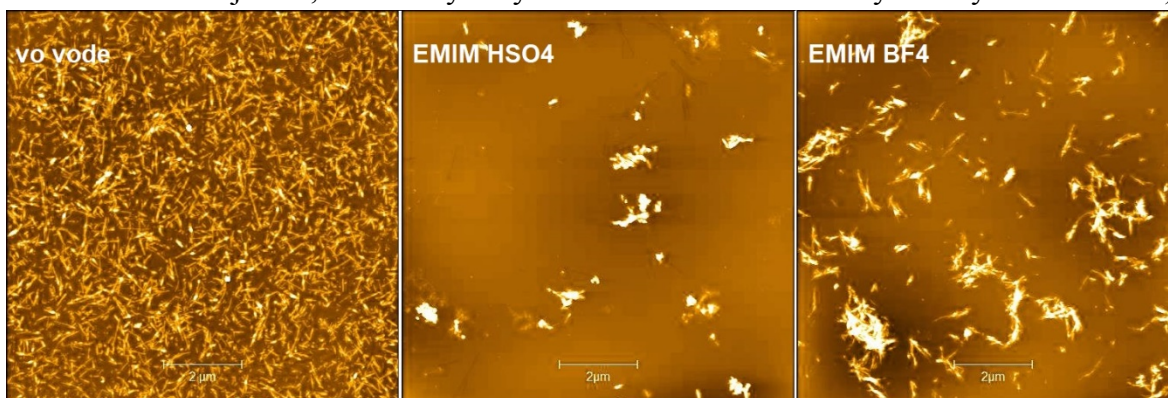


Obr. 1: Kinetika fibrilizácie inzulínu (20 µM) vo vode a v prítomnosti IK (25 mM), EMIM HSO<sub>4</sub>, EMIM AC, EMIM Cl, EMIM NO<sub>3</sub>, EMIM BF<sub>4</sub>, pH = 1.6, 50°C.



Obr. 2: Porovnanie dĺžky lag-fázy fibrilizácie vo vode a v prítomnosti IK (10 - 250mM)

AFM potvrdila prítomnosť maturovaných fibríl vo všetkých prípadoch. IK indukujú tvorbu fibríl s rozdielnou morfológiou – najvýraznejší vplyv prejavili anióny HSO<sub>4</sub> a BF<sub>4</sub> z opačných strán Hofmeisterovej série, ktoré navyše významne znížili množstvo vytvorených fibríl (Obr.3).



Obr. 3: AFM obrázky inzulínových (20 µM) fibríl pripravených vo vode a v prítomnosti IK (25 mM),

**HSO<sub>4</sub> > AC > Cl > NO<sub>3</sub> > BF<sub>4</sub>**  
**kozmotrópne | chaotrópne**

Obr. 4: Hofmeisterova séria študovaných aniónov

Na základe nameraných výsledkov možno konštatovať, že efekt Hofmeisterovej série aniónov (Obr. 4) iónových kvapalín na fibrilizáciu a morfológiu fibríl je komplexný, vysoko špecifický a nemožno ho jednoznačne zovšeobecniť. Pochopenie procesov zodpovedných za tvorbu štruktúrne a morfológicky definovaných fibríl je nevyhnutné pre ich využitie v rôznych oblastiach ako sú vývoj liekov proti amyloidózam alebo biotechnologické aplikácie.

Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0030/18, 2/0145/17, a APVV 18-0284.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chiti F, Dobson C. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86:27-68.  
 Chiti F, Dobson C. Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat. Chem. Bio.* 2008; 5:15-22.  
 Forsyth S, Pringle J, Macfarlane D. Ionic Liquids — An Overview. *Chem. Inform.* 2004; 35:20.

# ANTIPARAZITÁRNY ÚČINOK ENTEROCÍN-PRODUKUJÚCICH BAKTÉRIÍ NA INFEKCIU *TRICHINELLA SPIRALIS*

Vargová M.<sup>1</sup>, Dvorožňáková E.<sup>1</sup>, Hurníková Z.<sup>1</sup>, Revajová V.<sup>2</sup>, Lauková A.<sup>3</sup>

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

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

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

## ABSTRAKT

Protektivný účinok enterocínov Enterocín M a Durancín-like a ich produkujúcich kmeňov *E. faecium* CCM8558 a *E. durans* ED26E/7 pri experimentálnej infekcii *Trichinella spiralis* u myši bol testovaný ako nová terapeutická stratégia. Kmene *E. faecium* CCM8558 a *E. durans* ED26E/7 boli podávané myšiam *per os* denne v dávke 100 µl (10<sup>8</sup> KFJ/ml) a ich enterocíny Enterocín M (51 200 AU/ml) a Durancín-like (25 600 AU/ml) v dávke 50 µl/myš. Myši boli infikované 400 larvami *T. spiralis* na 7. deň terapie. Parazitárnu záťaž (intenzitu infekcie) sme vyhodnotili ako počet adultov parazita získaných výplachom tenkého čreva a počet lariev parazita izolovaných zo svalov tráviacou metódou. Počet novonarodených lariev na dospelú samičku v testoch plodnosti stanovil reprodukčnú kapacitu parazita. Prítomnosť parazita v tenkom čreve myši s aplikáciou enterocínov/enterokokov bola signifikantne potlačená na 11. deň p.i. a redukcia počtu adultov dosiahla 55% pri podávaní *E. faecium* CCM8558, 47% Enterocín M, 36% *E. durans* ED26E/7 a len 17% Durancín-like. Podobný redukčný účinok bol zaznamenaný aj na svalové larvy na 32. deň p.i., *E. faecium* CCM8558 – 56%, Enterocín M – 40%, *E. durans* ED26E/7 – 37%, Durancín-like – 17%. Kmeň *E. faecium* CCM8558 potlačil produkciu novonarodených lariev *ex vivo* o 74%, Enterocín M o 61%, *E. durans* ED26E/7 o 66% a Durancín-like o 38%. Priamy účinok enterocínov/enterokokov na plodnosť samičiek trichinel potvrdil test *in vitro*, v ktorom Durancín-like vykazoval porovnateľný redukčný účinok s Enterocínom M na rozdiel od *ex vivo* testu. Naša štúdia potvrdila antiparazitárny účinok testovaných enterocínov/enterokokov, pričom redukčná aktivita Enterocínu M bola porovnateľná s kmeňom *E. faecium* CCM8558, Durancín-like vykazoval nižšiu antiparazitárnu aktivitu ako jeho producent *E. durans* ED26E/7.

## ÚVOD

Trichinelóza je závažná zoonóza spôsobená nematódami rodu *Trichinella*, so širokým spektrom hostiteľov a celosvetovou distribúciou. Je charakterizovaná enteritídou (vyvolanou pohlavne zrelými trichinelami) a zápalom s degeneratívnymi zmenami v priečne pruhovanom svalstve (vyvolaným larvami). Chemoterapia dostupnými anthelmintikami (benzimidazoly) je účinná len proti dospelým červom, ale nie proti svalovým larvám (Bruschi a Chiumiento, 2012). Patogénnosť *T. spiralis* je vyššia ako u iných druhov črevných parazitov pre vysokú produkciu novonarodených lariev a silnú imunitnú reakciu hostiteľa (Pozio a kol., 1992). Závažnosť trichinelovej infekcie je v konečnom dôsledku ovplyvnená počtom migrujúcich novonarodených lariev. Účinná obrana hostiteľa je preto charakterizovaná reakciami, ktoré obmedzujú plodnosť samičiek parazita, poškodzujú alebo zničia novonarodené larvy a sprostredkujú elimináciu dospelých parazitov z čreva.

Baktérie s benefičnými účinkami môžu úspešne znížiť patogénnosť mnohých parazitov (Reda, 2018). Hlavnými mechanizmami ich účinku sú: zlepšenie črevnej epiteliálnej bariéry, zvýšenie adhézie k črevnej sliznici a súčasná inhibícia adhézie patogénu, kompetitívna eliminácia patogénov, produkcia antimikrobiálnych molekúl (bakteriocínov) a modulácia imunitného systému (Goudarzi a kol., 2014). Na základe týchto skutočností sa zvyšuje záujem vysvetliť interakcie medzi mikroorganizmami, imunitnou odpoveďou, zápalovými procesmi a črevnými parazitmi. Početné štúdie analyzujú imunomodulačné vlastnosti rôznych druhov *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* *in vitro* alebo *in vivo*. Aj keď štúdium druhu *Enterococcus* nebolo rozvinuté, v súčasnosti záujem oň rastie. Enterokoky sú ubikvitárne baktérie, dominantné v osídlení tráviaceho traktu ľudí a zvierat, ale sú prítomné aj v okolitom prostredí. Niekoľko kmeňov enterokokov produkuje rôzne typy bakteriocínov, ktoré môžu mať potenciálne využitie ako konzervačné látky pre potraviny, farmaceutiká, výživové doplnky a veterinárne lieky (Gillor a kol., 2008). Biokonzervačný potenciál bakteriocínov v potravinárskom priemysle je študovaný mnoho rokov (Alvarez-Sieiro a kol., 2016), antimikrobiálny účinok bakteriocínov sa skúma v poslednej dekáde rokov (Al Kassaa a kol., 2014), avšak antiparazitárny potenciál bakteriocínov zatiaľ nebol študovaný. Na základe našich pozitívnych výsledkov (Bucková a

kol., 2018) pri redukcii parazitárnej infekcie *Trichinella spiralis* po aplikácii bakteriocín-produkujúcich kmeňov (celých buniek) sme vybrali dva kmene, ktorých bakteriocíny chceme otestovať z aspektu imunomodulačného aj antiparazitárneho účinku.

Cieľom našej práce bolo otestovať antiparazitárny účinok enterocínov (Enterocín M a Durancín-like) a ich producentov - bakteriálnych kmeňov *Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558 a *E. durans* ED26E/7) u myši infikovaných *Trichinella spiralis*.

## MATERIÁL A METODIKA,

V experimente bolo použitých 80 myši BALB/c. Samce s hmotnosťou 18-20 g boli rozdelené do 5 skupín: Kontrola (n = 20) – infekcia *T. spiralis* bez terapie. 1. skupina (n = 15) – *Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558 a infekcia *T. spiralis*. 2. skupina (n = 15) – Enterocín M a infekcia *T. spiralis*. 3. skupina (n = 15) – *E. durans* ED26/7 a infekcia *T. spiralis*. 4. skupina (n = 15) – Durancín-like a infekcia *T. spiralis*. Enterocíny (Enterocín M, aktivita 51 200 AU/ml; Durancín-like, aktivita 25 600 AU/ml) boli podávané *per os* denne v dávke 50 µl a kmene *E. faecium* CCM8558 a *E. durans* ED26E/7 v dávke 100 µl ( $10^9$  KTJ/ml v Ringerovom roztoku). Myši boli infikované *per os* dávkou 400 lariev *T. spiralis*/myš na 7. deň aplikácie bakteriálnych kmeňov. *Enterococcus faecium* AL41 = CCM8558 je environmentálny izolát, produkujúci enterocín M a *E. durans* ED26/7 je izolát z ovčieho mlieka, produkujúci enterocín Durancín-like (oba Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice).

Izolácia parazita: Adulty *T. spiralis* boli získané z tenkého čreva (Campbell, 1983). Svalové larvy *T. spiralis* boli získané tráviacou metódou – umelá tráviaca šťava (1 % pepsín, 1% HCl na 4 h pri 37°C) (Kapel a Gamble, 2000). Test plodnosti samičiek *T. spiralis ex vivo* (Cabaj, 1990) – dospelé samice izolované z tenkého čreva troch myši z každej experimentálnej skupiny na 5. deň po infekcii (p.i.). Test plodnosti samičiek *T. spiralis in vitro* – infikované myši bez terapie (kontrola, n = 5) a samice boli inkubované v médiu s prídavkom bakteriálnych kmeňov alebo enterocínov. Štatistické rozdiely boli vyhodnotené one-way ANOVA a *post hoc* Tukey testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Odolnosť voči infekcii *T. spiralis* súvisí so schopnosťou hostiteľa zabrániť vzniku infekčných lariev, a to rýchlym vypudením dospelých červov z čreva, redukciou plodnosti dospelých samičiek a zničením migrujúcich novonarodených lariev (Vasconi a kol., 2015). Počas črevnej fázy trichinelózy u myši s aplikáciou enterocínov/enterocín-produkujúcich kmeňov sa počet dospelých červov znížil v porovnaní s infikovanými myšami bez terapie. Na 5. deň p.i, keď dospelé samičky trichinel začínajú rodiť nové larvičky (Pozio a kol., 1992), boli počty adultov zredukované u myši s Enterocínom M až o 44%, ale kmeň *E. faecium* CCM8558 indukoval len 11% zníženie počtu parazitov; antiparazitárny účinok Durancínu-like (33%) bol porovnateľný s *E. durans* ED26E/7 (35%). Zníženie počtu červov v tenkom čreve myši bolo signifikantné na 11. deň p.i. s najvyšším 55% redukčným účinkom po podávaní *E. faecium* CCM8558, následne pôsobil Enterocín M so 47% redukciov, *E. durans* ED26E/7 potlačil prítomnosť parazita v čreve o 36 % a Durancín-like len o 17%. Vo svalovej fáze infekcie bola najvyššia redukcia počtu lariev zistená na 25. deň p.i. *E. faecium* CCM8558 (67%), Enterocín M (52%), *E. durans* ED26E/7 (43%) a Durancín-like (32%). Antilarválny účinok enterocínovej a enterokokovej terapie (*E. faecium* CCM8558 – 56% , Enterocín M – 40%, *E. durans* ED26E/7 – 37%) pretrval do 32.deň p.i. s výnimkou Durancínu-like (16%). Infekčnosť *T. spiralis* bola hodnotená ako index reprodukčnej kapacity (RCI) - pomer počtu lariev získaných z jedinca k počtu lariev, ktorými bol nainfikovaný. RCI u neliečených myši dosiahli hodnoty 108 -126, čo bolo nad hodnotami zistenými u myši s aplikáciou enterocínov a enterokokov (46,1 - 90,7). Znížený reprodukčný potenciál trichinel môže byť výsledkom zníženej plodnosti samičiek, alebo inhibície prieniku novonarodených lariev do krvného a lymfatického obehu a následne ich usídlenia sa v priečne pruhovaných svaloch (Bucková a kol., 2018).

Test plodnosti samičiek trichinel *ex vivo* potvrdil zníženú reprodukčnú kapacitu trichinel z myši po aplikácii enterocínov a enterokokov. *E. faecium* CCM8558 potlačil produkciu novonarodených lariev o 74%, Enterocín M o 61%, *E. durans* ED26E/7 o 66% a Durancín-like o 38%. Test plodnosti samičiek trichinel *in vitro* dokumentuje priamy vplyv enterocínov/enterokokov na reprodukciu parazita. Produkcia novonarodených lariev nepriamo korelovala s koncentráciou kmeňa alebo enterocínu v

médiu . Enterokoky s koncentráciou  $10^7$   $10^5$  a  $10^3$  KTJ/ml účinne redukovali plodnosť trichinel v rozmedzí 69 – 35% ; enterocíny s koncentráciou 1% a 0,01% inhibovali produkciu lariev o 40 – 60 %. Plodnosť samiciek ovplyvňujú biochemické a fyziologické pomery v hostiteľskom organizme. Napr. známy je fakt, že samičky trichinel rozmnožujúce sa v ileu, sú menej plodné ako tie z jejuna, čo predurčujú fyzikálno-chemické vlastnosti tejto časti tenkého čreva (Sukhdeo, 1991). Iní autori (Gagliardo a kol., 2002) potvrdili, že črevná fáza životného cyklu *T. spiralis* (vrátane reprodukcie) je plne podporovaná epiteliálnymi bunkami hostiteľa.

Adhézia enterokokov na črevnú sliznicu, a tiež produkcia enterocínov či peroxidu vodíka môže zabrániť vstupu parazita do epiteliálnych buniek hostiteľa, v ktorých sa larvy trichinel zvliekajú, vyvíjajú na dospelých jedincov a rozmnožujú (Gagliardo a kol., 2002). Tieto bakteriálne látky, najmä peroxid vodíka, môžu tiež ovplyvniť vitalitu lariev a podieľať sa na ich deštrukcii. Redukcia plodnosti trichinel môže súvisieť s tým, že rod *Enterococcus* patrí k baktériám mliečneho kvasenia, ktoré v procese fermentácie glukózy produkujú kyselinu mliečnu a iné organické kyseliny, ktoré lokálne znižujú pH v čreve (Azat a kol., 2016). Kyslé pH významne znížilo fertilitu samiciek *T. spiralis* v dôsledku morfológických zmien matrice, čo viedlo k narušeniu embryogenézy (El Tamsahy, 2001). Naša štúdia potvrdila antiparazitárny účinok testovaných enterocínov a enterokokov, ktorý sa prejavil rýchlym vypudením dospelých červov z čreva (*E. faecium* CCM8558, Enterocín M, *E. durans* ED26E/7), inhibíciou reprodukčnej kapacity samiciek (všetky testované enterocíny a kmene) a redukciovou svalových lariev (*E. faecium* CCM8558, Enterocín M, *E. durans* ED26E/7).

*Táto práca bola podporená Slovenskou grantovou agentúrou VEGA 2/0056/19.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Al Kassaa I, et al. Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014;6:177-85.
- Alvarez-Sieiro P, et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100:2939-51.
- Azat R, et al. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented Xinjiang cheese. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2016; 17:597–609.
- Bruschi F, Chiumiento L. Immunomodulation in Trichinellosis: Does *Trichinella* really escape the host immune system? *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2012; 12:4–15.
- Bucková B, et al. The anti-parasitic effect of probiotic bacteria *via* limiting the fecundity of *Trichinella spiralis* female adults. *Helminthologia*. 2018; 55:102-11.
- Cabaj W. The effect of cyclosporine A on the course of infection by *Trichinella pseudospiralis* or *Nematospiroides dubius* on C3H strain mice. *Acta Parasitol Pol*. 1990; 35:241–53.
- Campbell W.C. *Trichinella* and Trichinosis. New York: Plenum Press, 1st ed., 1983; 582.
- El Tamsahy MM. The effect of changes in the gastric pH value on experimental trichinosis. *J Egypt Soc Parasitol*. 2001; 31:671–82.
- Gagliardo LF, McVay CS, Appleton JA. Molting, ecdysis, and reproduction of *Trichinella spiralis* are supported in vitro by intestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2002; 70:1853–59.
- Gillor O, Etzion A, Riley MA. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotech*. 2008; 81:591–606.
- Goudarzi M, Goudarzi H, Rashidan M. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. *Novel Biomed*. 2014; 2:22–30.
- Kapel CMO., Gamble HR. Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. in experimentally infected pigs. *Int J Parasitol*. 2000; 30:215–21.
- Pozio E, et al. Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *J Parasitol*. 1992; 78:647–53.
- Reda AA. Probiotics for the Control of Helminth Zoonosis. *J Vet Med*. 2018; Article ID 4178986.
- Sukhdeo MVK. The relationship between intestinal location and fecundity in adult *Trichinella spiralis*. *Int. J. Parasitol*. 1991; 21: 855–58.
- Vasconi MD, et al. Phenotypic Characterization of the Response to Infection with *Trichinella spiralis* in Genetically Defined Mouse Lines of the CBI-IGE Stock. *Open J Vet Med*. 2015; 5:111–22.

# ANTIFUNGÁLNE VLASTNOSTI *LACTOBACILLUS PLANTARUM* Z OVČIEHO MLIEKA

Vataščinová T.<sup>1</sup>, Pipová M.<sup>2</sup>, Maľa P.<sup>1</sup>, Demjanová S.<sup>2</sup>, Bujňák L.<sup>3</sup>, Kováčová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav hygieny a technológie mlieka, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF, Košice

<sup>3</sup>Ústav výživy, dietiky a krmovínarstva, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Je známe, že kyslomliečne baktérie produkujú rôzne antimikrobiálne zlúčeniny, ktoré sa považujú za dôležité pri biokonzervácii potravín a krmív. V našej práci sme testovali antifungálne vlastnosti 10 kmeňov *Lactobacillus plantarum* izolovaných zo surového ovčieho mlieka. Antifungálna aktivita bola stanovená pomocou diskovej difúznej metódy. Všetky testované kmene preukázali dobré inhibičné vlastnosti voči *Aspergillus ochraceus*, *Mucor fragilis*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium* sp.. Najsilnejšia antifungálna aktivita bola pozorovaná voči *Fusarium graminearum*, *Cladosporium herbarum* a *Alternaria alternata*. Za antifungálnu aktivitu možno považovať aj produkciu organických kyselín, ktorá bola detegovaná u testovaných kmeňov metódou kapilárnej izotachofórey v troch rôznych médiách. Najvyššia produkcia kyselín bola zaznamenaná v MRS bujóne. Produkcia kyselín bola špecifická pre daný kmeň.

## ÚVOD

Vláknité huby sú mikroorganizmy, ktoré sú zodpovedné za významné ekonomické straty nielen v agropotravinárskom sektore (Lipinska a kol., 2018), ale predstavujú tiež závažný zdravotný problém v dôsledku produkcie mykotoxínov. Medzi najrozšírenejšie rody nežiaducich mikromycét v potravinách patria *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus* a *Cladosporium* (Oliveira a kol., 2014). Nakoľko sa chemická konzervácia stáva pre spotrebiteľa menej lákavá, hľadajú sa prirodzené metódy ochrany potravín. Fermentácia kyselinou mliečnou bola známa a požíva sa od staroveku. V posledných rokoch sa baktérie produkujúce kyselinu mliečnu extenzívne skúmajú aj pre ich antifungálne vlastnosti. Bioprotektívne kultúry sa stále viac odporúčajú ako sľubný biotechnologický proces (Pawlowska a kol., 2012; Russo a kol., 2017). Obzvlášť zaujímavé sú laktobacily, ktoré konvertujú sacharidy na kyselinu mliečnu a octovú (primárne metabolity), ale aj na rad sekundárnych metabolitov, akými sú oxid uhličitý, etanol, peroxid vodíka, mastné kyseliny, acetoín, diacetyl, cyklické dipeptidy a tiež ribozomálne syntetizované bakteriocíny. Práve tieto látky produkované laktobacilmi vykazujú antifungálne vlastnosti (Crowley a kol., 2013). Kmene laktobacilov s vyššou prirodzenou schopnosťou inhibovať rast húb a kvasiniek sa čoraz častejšie stávajú objektom záujmu vedeckých prác.

## MATERIAL A METODIKA

Kmene *Lactobacillus plantarum* (L5, L10, L15, L16, L17, L18, L19, L20, L21 a L22) boli izolované zo surového ovčieho mlieka a uchovávané v zmesi MRS bujónu a glycerolu pri -20 °C. Ako indikátorové mikroorganizmy boli použité nasledovné referenčné kmene: *Mucor fragilis* CCM F-236, *Aspergillus ochraceus* CCM F-269, *Aspergillus flavus* CCM F-449, *Fusarium graminearum* CCM F-583, *Penicillium chrysogenum* CCM F-362, *Cladosporium herbarum* CCM F-455 a *Alternaria alternata* CCM F-397 (ČSM, Brno, ČR) a 3 izoláty *Penicillium* sp. z ovčieho hrudkového syra (P4b, P36, P3a).

Antifungálna aktivita laktobacilov sa sledovala dvojvrstvou difúznou metódou. Na sterilný 6 mm disk umiestnený na MRS agare bolo inokulovaných 10 µl nočnej kultúry laktobacilov. Po kultivácii, ktorá prebiehala pri 37 °C 48 h za anaeróbných podmienok v anaerostate, sa Petriho misky preliali Sabouraudovým agarom so vstupnou koncentráciou spór indikátorového kmeňa 10<sup>4</sup> ml<sup>-1</sup>. Platne boli následne inkubované pri 25 °C 3 - 4 dni a po



inkubácii boli odmerané priemery inhibičných zón v mm. Vplyv vyprodukovaných kyselín kmeňov laktobacilov na indikátorové kmene sa testoval difúznou metódou. Pre detekciu inhibície kyselinami bol z nočnej kultúry laktobacilov pripravený supernatant centrifugáciou (5 min., 25000 ot. min<sup>-1</sup>), ktorý bol nanesený (100 µl) na sterilný disk umiestnený na Petriho miskách preliatich Sabouraudovým agarom inokulovaným príslušným indikátorovým kmeňom mykromycét. Platne boli inkubované pri 25 °C 3 - 4 dni, po inkubácii boli odmerané priemery inhibičných zón v mm. Produkcia organických kyselín izolátov bola stanovená metódou kapilárnej izotachofórey (EA100, VILLA LABECO, SR) v troch rôznych médiách: MRS bujón, ovčie mlieko (tuk > 5 %), kravské polotučné mlieko (tuk = 1,5 %).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Antifungálnu aktivitu testovaných izolátov *Lactobacillus plantarum* sumarizuje tabuľka č. 1.. U všetkých testovaných kmeňov laktobacilov boli preukázané dobré inhibičné vlastnosti voči *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium chrisogenum*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* a tiež voči izolátom *Penicillium* sp., z ovčieho hrudkového syra. Slabší inhibičný účinok bol voči *Aspergillus flavus* a *Mucor fragilis*. Dal Bello a kol. (2007) identifikovali ako hlavné zložky zodpovedné za antifungálnu aktivitu *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 kyselinu mliečnu, kyselinu fenyloctovú a dva cyklické dipeptidy – cyklo (l-Leu-l-Pro) a cyklo (l-Phe-l-Pro). Viacerí autori informujú o laktobaciloch s produkciou látok, ktoré majú fungicídne a fungistatické vlastnosti (Li a kol., 2012; Rather a kol., 2013).

**Tab.1. Inhibičná aktivita kmeňov *Lactobacillus plantarum* na vybrané indikátorové kmene mikromycét**

Indikátorový kmeň	Antifungálna aktivita izolátov laktobacilov									
	L5	L10	L15	L16	L17	L18	L19	L20	L21	L22
<i>Mucor fragilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	++	++	++	+	++	++	++	++	+	++
<i>Aspergillus flavus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Fusarium graminearum</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Penicillium chrisogenum</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
<i>Cladosporium herbarum</i>	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>Alternaria alternata</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Penicillium</i> sp.P4b	++	++	++	+++	++	++	++	+	+++	+++
<i>Penicillium</i> sp. P36	+++	+	++	++	+	+	+	++	++	++
<i>Penicillium</i> sp.P3a	+	+++	++	++	+	+	+++	+	+++	++

+++ silný inhibičný efekt, ++ dobrý inhibičný efekt, + slabý inhibičný efekt, - bez inhibičného efektu

Inhibičný účinok vyprodukovaných kyselín laktobacilmi v podobe supernatantu voči indikátorovým kmeňom mikromycét nebol detegovaný.

Produkcia organických kyselín sa potvrdila u všetkých testovaných kmeňov (Tab. 2). Okrem kyseliny mliečnej, ktorú laktobacily produkovali vo väčšej miere vo všetkých skúšaných médiách, produkovali aj kyselinu octovú. Najvyššia miera produkcie kyselín bola v MRS médiu. Najvyššiu produkciu kyselín preukázali kmene L19 a L20. Pri porovnaní druhov mliek bola väčšia produkcia kyselín v ovčom mlieku, ktoré je aj prirodzeným habitatom laktobacilov. Ovčie mlieko tiež obsahuje vyšší podiel laktózy, ktorá je metabolizovaná mikroorganizmami na kyselinu mliečnu, ako kravské mlieko (Špánik a kol, 2015).

**Tab.2. Produkcia organických kyselín (mmol.l<sup>-1</sup>) izolátmi laktobacilov**

Izoláty <i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS bujón		Ovčie mlieko		Kravské mlieko	
	Kyselina mliečna	Kyselina octová	Kyselina mliečna	Kyselina octová	Kyselina mliečna	Kyselina octová
<b>L5</b>	229,79	0,66	15,21	3,3	9,88	5,95
<b>L10</b>	265,98	10,58	50,84	4,63	29,42	6,28
<b>L15</b>	228,24	2,8	52,73	6,28	34,08	8,76
<b>L16</b>	261,76	3,64	49,51	5,45	29,53	4,62
<b>L17</b>	251,77	4,62	55,84	6,12	26,53	6,28
<b>L18</b>	264,43	5,95	96,69	2,98	31,97	5,82
<b>L19</b>	271,09	10,08	97,58	4,79	19,21	3,14
<b>L20</b>	272,54	9,92	92,91	5,29	31,42	7,4
<b>L21</b>	190,16	3,8	49,73	3,14	24,76	3,9
<b>L22</b>	265,54	8,92	92,03	3,3	32,64	4,7

Inhibícia rastu plesní baktériami mliečného kvasenia sa javí ako sľubná stratégia biologickej kontroly v potravinách alebo krmivách podliehajúcich skaze, ktoré sú často kontaminované toxínogénnymi kmeňmi vláknitých húb (Dalié a kol., 2010).

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF08/2019 „Antimikrobiálny potenciál laktobacilov v surovom ovčom mlieku“.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Crowley S, Mahony J, Sinderen D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.*, 2013; 33: 93-109.
- Dal Bello F, et al. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.*, 2007; 45: 309-318.
- Dalié D K D, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 2010; 21: 370-380.
- Li H, et al. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*, 2012; 65: 156-161.
- Lipinska L, et al. Antifungal activity of *Lactobacillus pentosus* LOCK 0979 in the presence of polyols and galactosyl-polyols. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2018; 10: 186-200.
- Oliveira PM, Zannini E, Arendt EK. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. *Food Microbiol.*, 2014; 37: 78-95.
- Pawlowska A, et al. Chapter 5 “Green Preservatives”: Combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. *Adv. Food Nutr. Res.*, 2012; 66: 217-238.
- Rather I A, et al. Isolation and characterization of proteinaceous antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013; 57(1): 69–76.
- Russo P, et al. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *Int. J. Microbiol.*, 2017; 247: 48-54.
- Špánik J, Margetín M. Niekoľko zaujímavostí o ovčom mlieku a bryndzi. Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu – Ústav chovu oviec. 2015.





Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2019  
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu  
XIV. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2019

Prvé vydanie

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

Tlač: Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach

**ISBN 978-80-972752-7-3**