

CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2020

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

XV. ročník

Košice, 12. a 13. november 2020

**Zborník príspevkov prihlásených na
Seminár doktorandov venovaný pamiatke akademika Bod'u
12. a 13. november 2020
Košice**

Organizátori seminára:

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

Zborník zostavila:

RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

Recenzovali:

doc. MVDr. Katarína Beňová, PhD., UVLF v Košiciach

doc. MVDr. Radoslava Vlčková, PhD., UVLF v Košiciach

Organizačný a programový výbor:

MVDr. Dušan Fabian, DrSc., ÚFHZ CBv SAV

prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD., UVLF v Košiciach

Neprešlo jazykovou úpravou

ISBN 978-80-971428-6-5

Obsah

ÚČINNOSŤ FEKÁLNEJ MIKROBIÁLNEJ TRANSPLANTÁCIE (FMT) AKO ALTERNATÍVNEHO PRÍSTUPU PRI LIEČBE ZÁPALOVÝCH OCHORENÍ ČRIEV.....	
Adamková P., Hradická P., Kassayová M., Ambro L., Bertková I., Farkašová Iannaccone S., Demečková V.	7
EFFECT OF SUSTAINED DIETARY THYMOL APPLICATION ON SOME ANTIOXIDANT PARAMETERS AND ITS ABSORPTION AND EXCRETION IN RABBITS.....	
Bacova K., Zitterl-Eglseer K., Placha I.	10
GENETICKÁ A MORFOLOGICKÁ DIVERZITA STREPTOMYCÉT Z PROSTREDIA BANSKEJ HALDY	
Cimermanová M., Píknová M., Pristaš P., Sedláková-Kaduková J.	13
KONTAMINÁCIA VAJEC TOXINOGENNYMI DRUHMI RODU <i>PENICILLIUM</i>	
Demjanová S., Jevinová P., Pipová M., Regecová I.	16
GENETICKÁ TYPIZÁCIA VÍRUSU HEPATITÍDY E NA SLOVENSKU	
Dudášová K., Jacková A., Šalamúnová S., Molnár L., Kottferová L., Ciberej J., Vilček Š.	19
RIBOZÓMOVÝ DISPLEJ AKO NÁSTROJ VO VÝVOJI ENZÝMOV.....	
Dzurillová V., Sedlák E.	22
SLEDOVANIE VPLYVU SILYBÍNU NA BUNKOVÝ CYKLUS A METABOLICKÚ AKTIVITU NA PRASACÍCH INTESTINÁLNYCH BUNKÁCH.....	
Faixová D., Cingel'ová Maruščáková I., Mudroňová, D.	25
<i>ENTEROCOCCUS VILLORUM</i> VS <i>E. FAECIUM</i> K12b Z TRUSU KOŇA A JEHO BIOAKTIVITA.....	
Focková V., Kopčáková A., Pogány Simonová M., Lauková A.	28
NOVÉ MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY CHRONICKÝCH OCHORENÍ OBLIČIEK.....	
Grelová S.	31
ANALÝZA PRÍTOMNOSTI APOPTOTICKÝCH MARKEROV V BUNKÁCH MIECHY POTKANA POČAS POSTNATÁLNEHO OBDOBIA	
Holota R., Alexovič Matiašová A., Slovinská L., Tomori Z., Daxnerová Z., Ševc J.....	33
OVPLYVNENIE POPULÁCIE NEURÁLNYCH PROGENITOROVÝCH BUNIEK PROSTREDNÍCTVOM PRODUKTOV MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK.....	
Humeník F., Maloveská M., Hudáková N., Vikartovská Z., Hornáková L., Čížková D.....	36
PREPOJENIE KVALITATÍVNEHO SCREENINGU A ELISA METÓDY PRI STANOVENÍ KOKCIDIOSTATÍK V KRMIVÁCH A ICH REZÍDUÍ V TKANIVÁCH BROJLEROVÝCH KURČIAT.....	
Juščáková, D., Kožárová, I.	39
PREVALENCIA REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ U KMEŇOV <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH Z TRUSU KLINICKY ZDRAVÝCH PSOV	
Karahutová L., Kmeť V., Bujňáková D.	43
PAKOMÁRIKY (DIPTERA: <i>CULICOIDES</i>) DOLNÉHO ZEMPLÍNA.....	
Kasičová Z., Schreiberová A., Kimáková A., Kočišová A.	47
POROVNANIE DVOCH METÓD ARTRODÉZIE KORUNKOVÉHO KLĽBU ŽRIEBÄT ŤAŽNÝMI SKRUTKAMI	
Koľvek F., Žert Z., Pástor M., Nosál S. Korim F.	50

DETEKCIA ANTIMIKROBIÁLNEJ AKTIVITY V TRÁVIACOM TRAKTE <i>APIS MELLIFERA</i>	
Kratochwillová S., Kopčáková A., Guľašová A., Javorský P.	53
VPLYV ZINKU A EXTRAKTU <i>THYMUS VULGARIS</i> NA ANTIOXIDAČNÝ A MINERÁLNY STATUS KRÁLIKOV.....	
Kucková K.	56
POSÚDENIE FUNKCIE SIETNICE U PSOV S <i>DIABETES MELLITUS</i>	
Lapšanská M., Balicka A., Trbolová A.	59
CHEMICKÁ INDUKCIA ULCERÓZNEJ KOLITÍDY PROSTREDNÍCTVOM DSS U PGF MODELU ZVIERAT.....	
Lauko S., Gancarčíková S., Hřčková G., Andrejčáková Z., Hajdučková V., Maďar M., Kolesár Fecskeová L., Mudroňová D., Mravcová K., Štrkolcová G., Nemcová R., Bomba.....	62
VPLYV KOMPOSTOVACIEHO PROCESU NA PREŽÍVANIE MIKROORGANIZMOV V HNOJI HOVĎADZIEHO DOBYTKA.....	
Mindžáková I., Venglovský J., Gregová G., Sasáková N., Šubová E.	65
PRVÁ MOLEKULÁRNA IDENTIFIKÁCIA ZOONOTICKÉHO DRUHU <i>U. STENOCEPHALA</i> U PSOV NA SLOVENSKU.....	
Mravcová, K., Štrkolcová, G., Kočišová, A., Schreiberová, A., Mucha, R., Goldová, M.	68
PALINA PRAVÁ (<i>ARTEMISIA ABSINTHIUM</i>) A SLEZ LESNÝ (<i>MALVA SYLVESTRIS</i>) AKO PRÍRODNÉ ALTERNATÍVY KONTROLY HEMONCHÓZY U OVIEC.....	
Mravčáková D.	71
ROZDIELNE POHLADY NA DIVERZITU SÍRU-OXIDUJÚCICH BAKTÉRIÍ KULTIVAČNÝMI A NEKULTIVAČNÝMI METÓDAMI.....	
Nosáľová L., Kolesár-Fecskeová L., Pristaš P.	74
DETEKCIA ARBOVÍRUSOV Z KLIEŠŤOV U VTÁKOV ODCHYTENÝCH V DRIENOVSKÉJ MOKRADI.....	
Peňazziová K., Korytár L., Pisl J., Ondrejková A., Csank T.	77
VPLYV ZMESI SUCHÝCH LIEČIVÝCH RASTLÍN A ORGANICKÉHO ZINKU NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU, MIKROBIÁLNU POPULÁCIU A HISTOPATOLÓGIU U JAHNIAT.....	
Petrič D.	80
VPLYV RÔZNYCH HUMÍNOVÝCH PRÍPRAVKOV NA PRODUKČNÉ PARAMETRE A POSTMORTÁLNE PROCESY V PRSNEJ SVALOVINE BROJLEROVÝCH KURČIAT COBB 500.....	
Petříková, D., Koréneková B., Marcinčák, S. Kožárová, I.	83
MOLEKULÁRNE MECHANIZMY FAGOCYTÓZY APOPTOTICKÝCH BUNIEK V MYŠACOM PREIMPLATAČNOM EMBRYU.....	
Pisko J.	86
KURACIE EMBRYO AKO EXPERIMENTÁLNY MODEL VO VÝSKUME HADÍCH JEDOV.....	
Polláková M., Petrovová E., Andrejčáková Z., Vlčková R., Sopková D., Petrilla V.....	89
VPLYV SYNERGICKÉHO ÚČINKU VYBRANÝCH ANTIMYKOTÍK A RASTLINNÝCH SILÍC ČELADE <i>LAMIACEAE</i> NA TVORBU BIOFILMU <i>CANDIDA ALBICANS</i> „IN VITRO“.....	
Proškovcová M., Čonková E., Váczi P.	92

VPLYV PROBIOTICKEJ DIÉTY NA SYNTÉZU IMUNOLOGICKY VÝZNAMNÝCH MOLEKÚL U PSTRUHA DÚHOVÉHO.....	
Ratvaj M., Cingelová Maruščáková I., Schusterová P., Fečkaninová A., Popelka P., Mareš J., Mudroňová D.....	95
PROLONGÁCIA A MONITORING CELKOVEJ INJEKČNEJ ANESTÉZIE KONÍ KONTINUÁLNOU INFÚZIOU DKX.....	
Rovňanová N., Žert Z.....	98
VPLYV OCHORENÍ PAZNECHTOV DOJNÍC NA MNOŽSTVO BIELKOVÍN A MOČOVINY V MLIEKU.....	
Slovák P., Mudroň P., Hisira V.	101
VPLYV MOLEKULOVÝCH HYBRIDOV NA INHIBÍCIU AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE	
Spodniaková B., Bednáriková Z., Tvrdoňová M., Gažová Z.	104
DISTRIBÚCIA BAKTERIÁLNYCH DRUHOV V RÁMCI MIKROBIÓMU KOŽE PSOV	
Štempelová L.....	107
KOMPARATÍVNA GENOMIKA IZOLÁTU <i>ACINETOBACTER JOHNSONII</i> RB2-047 ZÍSKANÉHO Z HLBINNÉHO PROSTREDIA BANE.....	
Timková I., Maliničová L., Kisková J., Nosál'ová L., Pristaš P.	110
ABSORPCIA A STRÁVITEĽNOSŤ STOPOVÝCH PRVKOV V TENKOM ČREVE PRASIAŤ.....	
Tokarčíková K.	113
STRATIFIKÁCIA PACIENTOV S KANÍNNOU KOGNITÍVNOU DYSFUNKCIOU.....	
Vikartovská Z., Farbáková J., Smolek T., Hanes J., Žilka N., Horňáková Ľ., Humeník F., Maloveská M., Čížková D.	116
ANALÝZA CIEVNEJ SIETE VO VYVÍJAJÚCEJ SA MIECHE POTKANA POČAS NESKOREJ EMBRYOGENÉZY A V POSTNATÁLNOM OBDOBÍ.....	
Zrubáková J., Alexovič Matiašová A., Ševc J., Daxnerová Z.	119

ÚČINNOSŤ FEKÁLNEJ MIKROBIÁLNEJ TRANSPLANTÁCIE (FMT) AKO ALTERNATÍVNEHO PRÍSTUPU PRI LIEČBE ZÁPALOVÝCH OCHORENÍ ČRIEV

Adamková P.¹, Hradická P.¹, Kassayová M.¹, Ambro L.², Bertková I.², Farkašová Iannaccone S.³, Demečková V.¹

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav experimentálnej medicíny

³Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav súdneho lekárstva

ABSTRAKT

Zápalové ochorenie čriev (IBD, Inflammatory Bowel Disease) je chronický multifaktoriálny zápal gastrointestinálneho traktu (GIT), ktorý zahŕňa hlavne Crohnovu chorobu a ulceróznou kolitídu (UK). Liečba IBD v posledných rokoch zaznamenáva významný progres, pričom jej cieľom je navodiť dlhotrvajúcu remisiu pomocou supresie imunitného systému. Dysbióza črevnej flóry predstavuje pravdepodobne najdôležitejší faktor, ktorý prispieva k patogenéze IBD. Práve preto boli terapie zamerané na moduláciu črevnej mikroflóry navrhnuté ako jeden z najslubnejších terapeutických prístupov. Cieľom tejto štúdie bolo predklinické overenie terapeutického potenciálu FMT na chemicky indukovanom modeli UK s využitím samcov potkanov kmeňa Sprague Dawley. Potkanom bol pravidelne podávaný fekálny transplantát a boli odoberané vzorky trusu, ktoré boli determinované NGS analýzou. V krvnom sére boli stanovené hladiny cytokínov IL-4, IL-6, IL-10 a IL-17A a črevo bolo spracované pre histologické analýzy. Výsledky potvrdzujú terapeutický účinok FMT na priebeh experimentálnej UK, čo sa prejavilo upravením črevnej dysbiózy, znížením expresie zápalových cytokínov a regeneráciou sliznice.

ÚVOD

Nešpecifické zápalové ochorenia čriev predstavujú multifaktoriálne imunitné ochorenia, vyskytujúce sa u oboch pohlaví, charakterizované chronickým relapsujúcim zápalom čreva (Binder, 2004). Etiológia IBD ostáva nejasná, avšak predpokladá sa, že narušenie imunitného systému a/alebo nerovnováha interakcií s mikrobiotou vedú k rozvoju chronického zápalu čreva, k čomu prispievajú aj environmentálne či genetické faktory. Výskyt a prevalencia IBD sa v druhej polovici 20. storočia výrazne zvýšili a od začiatku 21. storočia sa IBD považuje za jedno z najrozšírenejších gastrointestinálnych chorôb (Abraham a Cho, 2009). Okrem špecifickej imunity sú do patogenézy IBD zapojené aj bunky vrodenej imunity, predovšetkým makrofágy a dendritové bunky (Medzhitov a Janeway, 2000). Nové liečebné prístupy IBD sa v súčasnosti zameriavajú predovšetkým na moduláciu črevnej mikrobioty, ktorá sa výraznou mierou podieľa na patogenéze daného ochorenia. Črevná dysbióza, charakterizovaná zníženou mikrobiálnou biodiverzitou a narušenou mikrobiálnou funkciou, bola demonštrovaná u IBD pacientov v rámci viacerých klinických štúdií (Sartor a Wu, 2017). Zdravá črevná mikrobiota sa vyznačuje veľkou početnosťou baktérii predovšetkým z dvoch hlavných kmeňov, *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (Jalanka-Tuovinen a kol., 2011). Tieto anaeróbne baktérie sú v IBD významne znížené. Mikrobióm IBD je tiež charakterizovaný zvýšením fakultatívnych anaeróbov, vrátane oddelení *Actinobacteria* a *Proteobacteria* (Png a kol., 2010). FMT predstavuje metódu, pri ktorej je do GIT pacienta podaná upravená stolica od zdravého darcu, s cieľom zmeniť črevnú mikrobiotu príjemcu, normalizovať jej zloženie a dosiahnuť terapeutický účinok (Collado a kol., 2015). Ukázalo sa, že tento terapeutický prístup je neuveriteľne úspešný pri liečbe recidivujúcej infekcie *Clostridium difficile*, ďalšieho ochorenia, pri ktorom sa predpokladá, že dysbióza má dominantnú patogénnu úlohu (Van Nood a kol., 2013).

Heterogénne štúdie však ponechávajú niekoľko otázok, na ktoré je treba odpovedať, vrátane toho, ako najlepšie implementovať túto novú terapiu do liečby CD a UK. A preto sú pre

zistenie či FMT môže prevziať doplnkovú úlohu pri štandardnom liečení IBD potrebné ďalšie štúdie, ktoré môžu napomôcť vyvinúť nové personalizované terapie pacientov s IBD.

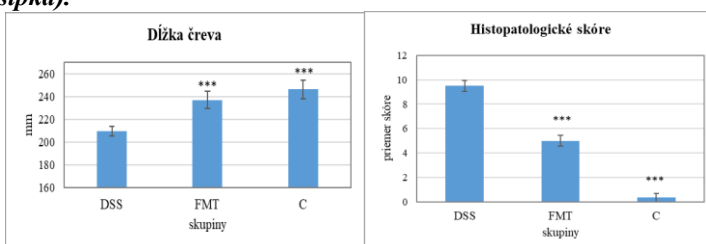
MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonané na chemicky indukovanom modeli UK s využitím samcov potkanov kmeňa Sprague Dawley (Charles River Laboratories, Nemecko) (n = 18). Potkany boli rozdelené do 3 skupín, a to na zdravú kontrolnú skupinu (C) (n = 6), DSS (n = 6) a skupinu FMT (n = 6). Potkanom v skupinách DSS a FMT sa orálne podávalo 5% DSS (w / v) (TdB Consultancy AB, Švédsko) v deionizovanej vode počas 7 dní na vyvolanie UK. FMT bola podaná orálne počas ďalších 5 dní a bol vyhodnotený jej terapeutický účinok. Pre stanovenie mikrobiálneho zloženia bola vzorka stolice od darcu FMT testovaná pomocou NGS analýzy. Počas experimentu boli pravidelne odoberané vzorky stolice a zloženie mikrobiómu bolo hodnotené pomocou PCR-DGGE 16S rRNA a NGS analýzy. Potkany boli usmrtené dekapitáciou v inhalačnej anestézii izofluránom (VETPHARMA ANIMAL HEALTH, S.L., Španielsko), hrubé črevo bolo odstránené a zmerala sa jeho dĺžka. Následne sa hrubé črevo spracovalo metódou Swiss roll a bolo umiestnené do fixačného roztoku. Tkanivo bolo ďalej spracované na histologické pozorovanie podľa štandardného postupu. Mikroskopickému poškodeniu epitelu hrubého čreva bolo skóre pridelené podľa Katakura et al., 2005. Bola tiež stanovená hladina cytokínov IL-4, IL-6, IL-10 a IL-17A v krvnom sére. Štatistické analýzy boli uskutočnené pomocou testu ANOVA a dáta sú vyjadrené ako priemer ±SEM.

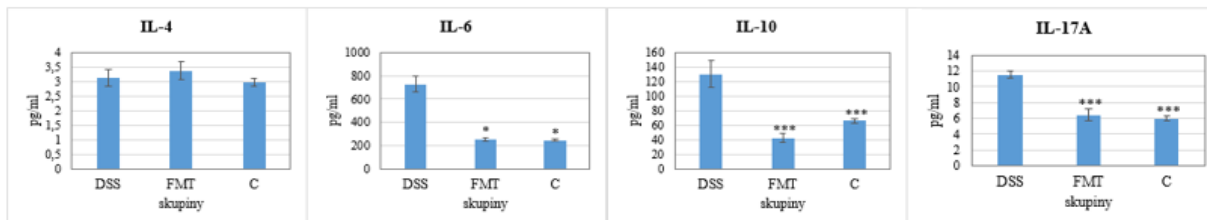
VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obr.1. Histologické poškodenie čreva po podaní DSS. Vzorky hrubého čreva boli analyzované pomocou farbenia hematoxyлін-eozín. Črevo vykazuje známky akútnej kolitídy, početné granulómy (A, C - šípky), aberantné krypty (B - šípka).



Obr.2. Histologické poškodenie čreva po podaní DSS spojené so skrátením jeho dĺžky (vľavo). Histopatologické skóre vzoriek tkaniva hrubého čreva (vpravo). Dáta sú vyjadrené ako priemer ± SEM a boli analyzované pomocou jednosmernej ANOVA štatistickej analýzy (***) $p < 0,001$.



Obr. 3. Hladiny cytokínov IL-4, IL-6, IL-10 a IL-17A v krvnom sére, ktoré preukázali zvýšenú reguláciu exprese so zvyšujúcou sa závažnosťou poškodenia hrubého čreva (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Dáta sú vyjadrené ako priemer ± SEM.

V skupine ošetrenej FMT boli v porovnaní s DSS skupinou pozorované znížené hladiny IL-10, IL-17A ($p < 0,001$) aj IL-6 ($p < 0,05$) (Obr.3). Hladiny IL-4 nevykazovali štatistickú významnosť. IL-4 má modulačnú úlohu a môže ovplyvňovať rovnováhu Th1 a Th2 buniek smerom k protizápalovým bunkám. Jeho nedostatok je typický pre lymfocyty v lamina propria u pacientov s UK. Okrem toho bola pozorovaná zvýšená regulácia expície IL-10 so zvyšujúcou sa závažnosťou poškodenia hrubého čreva. V korelácii s týmito výsledkami je aj štúdia Egger et al., 2000, kedy boli produkcia a uvoľňovanie rôznych prozápalových cytokínov potlačené IL-10 na *in vitro* aj *in vivo* úrovni. Možno preto predpokladať, že pri akútnej kolitíde sú stále zachované regulačné účinky, ako je expresia IL-10, ktorá reguluje Th1 reakciu, avšak nie je postačujúca. Zvýšenie IL-10 je s najväčšou pravdepodobnosťou pokusom o potlačenie a tlmenie zvýšenej Th1-bunkovej odpovede. NGS analýza transplantátu darcu nepreukázala výskyt patogénnych druhov. Testovanie vzoriek trusu dokázalo pokles zastúpenia druhov kmeňa *Bacteroidetes* a zvýšenie druhov kmeňa *Actinobacteria* v skupine DSS. Histológia poukazuje na abscesy, vymiznutie Gobletových buniek a zhrubnutú submukózu v skupinách DSS (Obr.1). Skrátenie dĺžky hrubého čreva predstavuje primárny ukazovateľ chronických zápalových procesov hrubého čreva *in vivo*, ktoré bolo pozorované iba v skupine DSS (Obr.2). Tieto výsledky potvrdzujú terapeutický účinok FMT na priebeh experimentálnej UK, čo sa prejavilo upravením črevnej dysbiózy, znížením expície zápalových cytokínov, výrazným spomalením skracovania dĺžky čreva a regeneráciou sliznice. Úspech tejto metódy bude však závisieť hlavne od zloženia mikroflóry darcu, a preto pre efektívnejšie terapeutické výsledky bude nutné racionálne navrhnúť spôsob FMT aplikácie a prísne kontrolovať mikrobiálne kmene berúc do úvahy dôležité faktory prispievajúce ku klinickému úspechu.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. In N. Engl. J. Med. 2009; 361: 2066-2078.
- Binder, V. Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. In BEST PRACT RES CL GA. 2004; 18:463-479.
- Collado MC, et al. Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. In Pediatric Research. 2015; 77: 726-731.
- Egger B, et al. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. In Digestion. 2000; 62:240-248.
- Jalanka-Tuovinen J, et al. Intestinal microbiota in healthy adults: temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. In PLoS One. 2011; 6:e23035.
- Katakura K, et al. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. J Clin Invest. 2005; 115:695-702.
- Medyhitov R, Janeway C. Innate immunity. In N. Engl. J. Med. 2000; 343:338-344.
- Png CW, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment *in vitro* utilization of mucin by other bacteria. In Am J Gastroenterol. 2010; 105:2420-2428.
- Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. In Gastroenterology. 2017; 152:327-339.
- Van Nood E, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. In N. Engl. J. Med. 2013; 368:407-415.

EFFECT OF SUSTAINED DIETARY THYMOL APPLICATION ON SOME ANTIOXIDANT PARAMETERS AND ITS ABSORPTION AND EXCRETION IN RABBITS

Bacova K.¹, Zitterl-Eglseer K.², Placha I.¹

¹*Institute of Animal Physiology, Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Košice*

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

ABSTRACT

Thymol, the main bioactive component of *Thymus vulgaris* L., has been shown to have beneficial properties in the animal organism which is caused by its phenolic structure, which may adsorb and neutralize free radicals. As the data concerning the thymol metabolism in animal organism are scarce, the aim of our study was to find the connection between thymol accumulation in tissues and its effect on chosen antioxidant parameters: malondialdehyde (MDA) in plasma, liver, muscle; glutathione peroxidase (GPx) in blood; lactate dehydrogenase (LDH) in liver and muscle. Forty-eight rabbits were divided into two groups: control (C), fed by basal diet (BD) and experimental, fed by BD with thymol addition (250 mg/kg feed) along 21 days (TA) and next 7 days the thymol was withdrawn (TW). The MDA concentration and GPx activity in blood ($p = 0.003$, $p = 0.0177$) and activity of LDH in muscle ($p = 0.0411$) decreased. Thymol in plasma significantly correlated with that in the intestinal wall ($r_s = -1.000$, $p = 0.0167$) in TA and was detected in faeces (TA and TW). The results showed that thymol was efficiently absorbed from the gastrointestinal tract and was able to demonstrate its biological activity in blood and the muscle during the application time.

INTRODUCTION

Due to the susceptibility of rabbits to digestive disorders, antibiotic growth promoters have been commonly included in the diet of growing rabbits (Hashem et al., 2017). Since their prophylactic use has been banned, there is an urgent need to find alternatives (Dalle Zotte et al., 2016). Several studies have shown the beneficial properties of thymol, particularly regarding the animal health parameters. These studies suggest that thymol with strong antioxidant properties may become important as natural replacement for synthetic antioxidant food additives (Salehi et al., 2018). However, the current problem is that there is only limited number of scientifically verified works focused on the mechanism of action and metabolism of thymol in animal organism (Placha et al., 2019).

MATERIAL AND METHODS

A total of forty-eight rabbits of both sexes at 35 days of age were randomly allocated to the 2 groups: control (C) and experimental. The C group was fed a basal diet (BD) and experimental group was fed BD with thymol addition (TA, 250 mg/kg feed) during the first 21 days and for the next 7 days, the thymol was withdrawn (TW). Thymol ($\geq 99, 9\%$, Sigma Aldrich) in white powder form was mixed with the commercial diet and pelleted for the experimental animals. Rabbits were housed in standard conditions in cages, with free access to drinking water and feed ad libitum. Eight rabbits per each group were slaughtered after 3 weeks of feeding with thymol (C, TA) and then after 1 week without thymol addition (C, TW). Stability of thymol in pelleted feed was determined by High-Performance Liquid Chromatography and the thymol concentration in the individual samples (plasma, intestinal wall and faeces) was analysed using solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry described by Placha et al. (2019). Activity of glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) in blood was measured in accordance with Paglia and Valentine (1967), using a commercial kit (Randox, UK). Malondialdehyde (MDA) was analysed in plasma, liver and muscle using the modified fluorimetric method of Jo and Ahn

(1998). LDH activity in muscle and liver was measured using a commercial diagnostic kit (Randox, UK) with an Alizé automatic biochemical analyser (Pouilly-en-Auxois, France) according to Andrejčáková et al. (2016). Values of thymol, MDA, GPx and LDH concentrations were tested for normal distribution with the Kolmogorov-Smirnov test. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis. Results were presented as the mean value \pm standard deviation. Significant differences were considered at $p < 0.05$. Correlations of thymol concentrations between plasma and intestinal wall were analysed using nonparametric Spearman's rank correlation and expressed as Spearman's correlation coefficient (r_s). Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Thymol content in feed amounted to $148\,900 \pm 16\,650$ ng/g dry matter (DM). Thymol concentration was detected in plasma (46.2 ± 28.4 ng/L) and intestinal wall (39.6 ± 38.3 ng/g DM) during thymol addition but was not detected after thymol withdrawal. Thymol in faeces was detected in both groups (TA – 894.0 ± 458.2 ng/g DM, TW – 76.4 ± 41.6 ng/g DM). Rabbits have a unique digestive system which is represented by caecotrophy. This process includes excretion and immediate consumption of specific soft faeces termed “caecotrophs”. During the thymol biotransformation the part of metabolites (thymol sulfate, thymol glucuronide) in intestinal wall gets converted back to thymol (parental compound) and is again reabsorbed. Other molecules can be transported back into intestinal lumen and are excreted from the body or transported to the blood (Ocel'ová, 2017). We assume that after sustained application, the thymol should create depots in tissues which are in equilibrium with the free unbound compounds in plasma. If the plasma concentration decreases due to biotransformation and excretion, the thymol could be released from tissue back into the blood circulation and processes of biotransformation are repeated. This is probably the explanation of thymol presence in faeces after its withdrawal. However, further studies should be conducted to confirm the thymol accumulation in the rabbit organism.

We found the significant correlation between thymol concentration in plasma and intestinal wall ($r_s = -1.000$, $p = 0.0167$), which points to intensive absorption of thymol from the digestive tract into the blood. Our result is in agreement with the study of Placha et al. (2019), who demonstrated the effective absorption of thymol from the gastrointestinal tract into the bloodstream in broiler chickens. In our experiment, we found significant decreasing of MDA concentration (354.8 ± 24.7 vs 251.6 ± 62.5 $\mu\text{mol/L}$, $p < 0.05$), activity of GPx (216.5 ± 37.5 vs 150.9 ± 32.0 U/g Hb $p < 0.05$) in blood and LDH activity (4723 ± 1778 vs 2584 ± 1693 U/g protein, $p < 0.05$) in muscle in TA group. Oxidative stress is associated with derangements of the cellular metabolism which cause apoptosis and disruption of balance between production of reactive oxygen species and the level of antioxidants. During lipid peroxidation, unsaturated lipids are oxidized and small fragments such as alkanes, alkenals and MDA are created. Our results pointed to the sparing effect of thymol on cellular metabolism, which could be explained by the fact that thymol, after effective absorption manifested its antioxidative effects and protected cells from lipid peroxidation.

In conclusion, the aim of our study was to find the answer to the question whether thymol is able to accumulate in the rabbit organism and subsequently exhibits its beneficial properties after its sustained administration. However, these are only partial results and further studies should be conducted to confirm the thymol distribution and deposition within the rabbit organism with purpose to provide an appropriate dose for its application.

The research was supported by grants of Slovak Scientific Agency VEGA project No. 2/0009/20 and the Austrian Federal Ministry for Science, Research and Economics, OeAD, Ernst Mach Grant Action Austria-Slovakia.

REFERENCES

- Andrejčáková Z, et al. Synbiotics suppress the release of lactate dehydrogenase, promote non-specific immunity and integrity of jejunum mucosa in piglets. *Anim. Sci. J.* 2016; 87: 1157-66.
- Dalle Zotte A, Celia C, Szendrő ZS. Herbs and spices inclusion as feedstuff or additive in growing rabbit diets and as additive in rabbit meat: A review. *Livest. Sci.* 2016; 189:82-90.
- Hashem NM, Abd El-Hady AM, Hassan OA. Inclusion of phytogetic feed additives comparable to vitamin E in diet of growing rabbits: Effects on metabolism and growth. *Ann. Agric. Sci.* 2017; 62:161-7.
- Jo C, Ahn DU. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult. Sci.* 1998; 77: 475-80.
- Oceľová, V. Plant additives in relation to the animal gastrointestinal tract and metabolism of their main compounds. Dissertation thesis 2017; Košice: SAV, Institute of Animal Physiology.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 1967; 70:158-69.
- Placha I, et al. Effect of thymol on the broiler chicken antioxidative defence system after sustained dietary thyme oil application. *Br. Poult. Sci.* 2019; 60:589-96.
- Salehi B, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytother. Res.* 2018; 32:1688-706.

GENETICKÁ A MORFOLOGICKÁ DIVERZITA STREPTOMYCÉT Z PROSTREDIA BANSKEJ HALDY

Cimermanová M., Píknová M., Pristaš P., Sedláková-Kaduková J.
Katedra Mikrobiológie, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Hľadanie nových a účinných látok pre použitie v biotechnológiách sa v súčasnosti sústreďuje na neprebádané a pre život nepriaznivé prostredia. Baktérie rodu *Streptomyces*, známe produkciou dôležitých metabolitov, obývajú aj takéto prostredia, čo umožňuje nachádzať nové a extrémom prispôsobené druhy. Cieľom našej práce bolo študovať diverzitu streptomycét z kontaminovaného prostredia banskej haldy použitím morfológických a molekulárných metód (16S rRNA) a analyzovať ich biotechnologický potenciál. Pozorovali sme nezvyčajne vysokú biodiverzitu streptomycét v študovanom prostredí, kde sme detegovali minimálne 7 rôznych skupín streptomycét, z ktorých jedna je pravdepodobne tvorená izolátmi patriacimi k novému druhu.

ÚVOD

Medzi významných producentov bioaktívnych zlúčenín (antibakteriálne a protinádorové látky, herbicidy, zlúčeniny viažuce ťažké kovy a pod.) patria baktérie z rodu *Streptomyces*. Streptomycéty v súčasnosti produkujú viac ako tretinu komerčne dostupných antibiotík (Kämpfer a kol., 2014). Sú to vláknité, Gram-pozitívne, predovšetkým pôdne baktérie patriace do kmeňa *Actinobacteria*. Predstavujú najväčší rod tohto kmeňa s viac ako 800 popísanými druhmi z rôznych prostredí. Vďaka ich schopnosti prosperovať a prežiť v rôznych prostrediach a bohatému sekundárnemu metabolizmu sú dôležité pre získavanie nových biologicky aktívnych látok (Law a kol., 2019). V dnešnej dobe je takýto výskum zameraný na neprebádané, často krát extrémne prostredia, medzi ktoré patrí aj prostredie kontaminované ťažkými kovmi. Preto sme sa v práci zamerali na diverzitu streptomycét z extrémneho prostredia banskej haldy v lokalite Tarnowskie Góry (Poľsko).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorku substrátu sme sterilne odobrali z haldy z hĺbky 20 cm a obsah kovov sme stanovili použitím XRF metódy (Delta XRF Analyzer, Olympus). 5 g vzorky sme rozsuspendovali v 50 ml sterilného PBS tlmivého roztoku a po 30 minútovom premiešavaní sme 100 μ l výluhu vysiali na selektívne kultivačné médium (Porter a kol., 1960). Po sedemdnovej kultivácii pri laboratórnej teplote sme kolónie s typickou morfológiou preočkovali a ďalej charakterizovali (Shirling a kol., 1966). Pre molekulárnu identifikáciu izolátov sme izolovali totálnu DNA a s použitím univerzálnych bakteriálnych primérov fD1 a rP2 sme amplifikovali gén pre 16S rRNA a sekvenovali ho (Eurofins Genomics, Nemecko). Získané sekvencie sme analyzovali použitím BLAST analýzy (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) voči databáze NCBI. Fylogenetickú príbuznosť izolátov sme analyzovali pomocou programu MEGA (Kumar a kol., 2018). Druhovou rozmanitosť vzorky sme odhadli použitím CHAO1 metódy (Chao a kol., 1984).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Banská halda v lokalite Tarnowskie Góry vznikla dlhodobým hromadením odpadu z ťažby olovnatých, strieborných a zinkových rúd a vykazuje vysoký obsah ťažkých kovov v porovnaní s normálnymi hodnotami v poľnohospodárskej pôde. Počet baktérií rastúcich na selektívnych médiách bol $0,88 \pm 0,33 \cdot 10^6$ KTJ/g substrátu. Vzhľadom na nepriaznivé podmienky je tento počet relatívne vysoký. Grishko a kol. (2009) izolovali z kovmi kontaminovanej pôdy aktinomycéty v počte $0,14 - 0,3 \cdot 10^6$ KTJ/g. Efekt ťažkých kovov na diverzitu a početnosť baktérií v pôde závisí od mnohých faktorov vzhľadom k tomu, že

niektoré štúdie uvádzajú negatívny efekt (Grishko a kol., 2009) a iné naopak pozitívny efekt (Větrovský a kol., 2015). Pre následné analýzy sme vybrali 19 izolátov s morfológiou typickou pre streptomycéty. Substrátové mycélium bolo prevažne béžovej, žltej až bielej farby. Vzdušné mycélium bolo vo väčšine prípadov bielej farby. 53% izolátov produkovalo žlté alebo hnedé difúzne exopigmenty (Tab. 1).

Na základe podobnosti získaných čiastočných sekvencií génu pre 16S rRNA (okolo 1300 bp) sme izoláty klasifikovali do 7 okruhov. Samotná analýza génu pre 16S rRNA totiž v prípade streptomycét neumožňuje jednoznačne identifikovať druhy, nakoľko variácia sekvencií je príliš nízka aj vo variabilných regiónoch (Rong a kol., 2010). Štatistické analýzy pomocou CHAO1 metódy potvrdili, že študované izoláty reprezentujú prakticky kompletnú biodiverzitu streptomycét v študovanom prostredí.

Tab. 1 Morfológická a molekulárna charakteristika izolátov *Streptomyces* sp.

Okruh	Izolát	Morfológické znaky				Molekulová analýza	
		Farba mycélia/pigmentu			RS	% Identit y	Najpríbuznejší druh
		substrátové	vzdušné	pigment			
		ISP2/ ISP4	ISP2/ ISP4	ISP2/ ISP4			
A	P1	B/ B	Bi/ S	-/-	RF	100	<i>S. pratensis</i> ; <i>S. cyaneofuscatus</i> ; <i>S. anulatus</i> = <i>S. praecox</i> ; <i>S. griseus</i> = <i>S. baarnensis</i> , <i>S. flavofuscus</i> , <i>S. fimicarius</i> , <i>S. acrimycini</i> , <i>S. caviscabies</i>
	P18						
	P4	OB/ Ž	Bi/ Bi	h/ h	RF		
	P6			h/ -	R		
	P10				A		
P11	RB/ Ž						
B	P14	B/ Bi	Bi/ Bi-Z	-/-	RF	100	<i>S. fulvissimus</i> , <i>S. microflavus</i> = <i>S. alboviridis</i>
	P15						
C	P2	O/ ŽBi	Bi/ Ž	ž/ ž	RF	100	<i>S. globisporus</i> = <i>S. albovinaceus</i> , <i>S. griseinus</i> , <i>S. mediolan</i> ; <i>S. rubiginosohelvolus</i> ; <i>S. parvus</i> ; <i>S. pluricolorescens</i> ; <i>S. badius</i> ; <i>S. sindenensis</i>
D	P22	ŽB/ OB	Bi/ Bi	-/ -	RF	99,85	<i>S. spororaveus</i> ; <i>S. nojiriensis</i> ; <i>S. avidinii</i> ; <i>S. subbrutilus</i> ; <i>S. xanthophaeus</i>
	P3	B/ B		±ž/ ±h	R A		
	P5		-/ Bi	-/ -	RF		
	P8	ŽB/ B					
E	P9	B/ B	-/ Bi	-/ ±ž	RF	99,85	<i>S. narbonensis</i>
	P24						
F	P21	B/ OB	T/ Bi	-/-	RF	100	<i>S. phaeochromogenes</i>
G	P12	B/ B	-/-	±h	RF	98,91	<i>S. flavofungini</i> ; <i>S. violarius</i> ; <i>S. arenae</i> ; <i>S. zinciresistens</i>
	P17					98,75	
	P7					98,68	

± malé množstvo pigmentu; - žiadne spóry/ žiadny pigment; Pigment; h: hnedý; ž: žltý; Substrátové mycélium; B: béžová; RB: ružovobéžová; OB: oranžovobéžová; ŽB: žltobéžová; Bi: biela; ŽBi: žltobiela; Ž: žltá; O: oranžová; Vzdušné mycélium; Bi: biela farebná séria (biely, sivobiely, ustricovo biely, alabastrový odtieň), Ž: žltá farebná séria (belavo-žltá, svetlo žltá alebo žltá), S: sivá farebná séria (sivá), Z: Zelená farebná séria (olivovo sivá), T: transparentná; RS - reťazec spór: RF- Rectus Flexibilis, RA-Retinaulum-Apertum.

Do okruhu A patrí 6 izolátov (P1, P4, P6, P10, P11, P18). U izolátov P1 a P18 a zvyškom skupiny možno pozorovať morfológickú variabilitu najmä v tvorbe vzdušného mycélia a produkcii pigmentu. BLAST analýzou 16S rRNA sme identifikovali viaceré druhy s identickými sekvenciami, z ktorých druh *S. griseus* patrí medzi významných producentov bioaktívnych sekundárnych metabolitov (Rong a kol., 2010). Druhy z tohto okruhu sa izolovali z kovmi kontaminovaného prostredia (Baz a kol. 2015). Okruh B tvoria dva izoláty (P14, P15) na úrovni 16S rRNA identické s druhmi *S. fulvissimus* a *S. microflavus* produkujúcimi antibakteriálne a antiparazitické zlúčeniny. Izolát P2 z okruhu C, vykazoval

identickú 16S rRNA so 6 druhmi streptomycét. K producentom antibiotických zlúčenín patria druhy *S. parvus*, *S. pluricologrescens* a *S. sindenensis*. Izoláty z tejto vetvy boli taktiež identifikované v práci autorov Baz a kol. (2015). V okruhu D sú 4 izoláty (P3, P5, P8, P22) s podobnosťou 16S rRNA sekvencií 99,85% k piatim rôznym druhom. Všetky tieto druhy, okrem *S. spororaveus*, sú producentmi antibiotických zlúčenín. Okruh E (izoláty P9 a P24) vykazuje podobnosť 16S rRNA sekvencií 99,85% s druhom *S. narbonensis*, ktorý je producentom antibiotických látok. Do okruhu F sme zaradili izolát P21, ktorý je na úrovni 16S rRNA sekvencií identický s druhom *S. phaeochromogenes*, ktorý produkuje deriváty penicilínu. 3 izoláty zaradené do okruhu G, sú pravdepodobne predstaviteľmi nového druhu, keďže podobnosť ich 16S rRNA sekvencií k platne popísaným druhom streptomycét neprekročila 99%, čo je hraničná hodnota pre izoláty jedného druhu (Mohammadipanah a kol., 2014). Medzi najbližšie príbuzné druhy patrí *S. flavofungini* a producenti antibiotických zlúčenín *S. arenae* a *S. violarius*. Ďalší príbuzný druh, *S. zinciresistens*, bol podobne ako naše izoláty izolovaný z kovmi kontaminovanej pôdy a patrí k druhom vysoko rezistentným voči zinku (Lin a kol., 2011).

Naše výsledky potvrdzujú, že aj prostredie vysoko kontaminované ťažkými kovmi predstavuje bohatý zdroj biodiverzity a nových druhov streptomycét.

Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/0229/17 a SK-PL-18-0012.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baz SE, et al. Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas. *Sci World J.* 2015; 761834.
- Grishko VN, Syshchikova OV. Streptomyces Communities in Soils Polluted with Heavy Metals. *Eurasian Soil Sc.* 2009; 42:217–224.
- Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat.* 1984; 11: 265-270.
- Kämpfer P, et al. The Family Streptomycetaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, et al. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014.
- Kumar S, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *MBE.* 2018; 35:1547-1549.
- Law JW, et al. Diversity of Streptomyces spp. from mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. *Sci Rep.* 2019; 9(1):15262.
- Lin YB, et al. Streptomyces zinciresistens sp. nov., a zinc-resistant actinomycete isolated from soil from a copper and zinc mine. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011; 61(Pt 3):616-620.
- Mohammadipanah F, et al. *Streptomyces zagrosensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64(Pt 10):3434-40.
- Porter JN, Wilhelm JJ, Tresner HD. Method for the Preferential Isolation of Actinomycetes from Soils. *Appl Microbiol.* 1960; 8(3):174–178.
- Rong X, Huang Y. Taxonomic evaluation of the Streptomyces griseus clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010; 60(Pt 3):696-703.
- Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterisation of Streptomyces species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1966; 16(3):313-340.
- Větrovský T, Baldrian P. An in-depth analysis of actinobacterial communities shows their high diversity in grassland soils along a gradient of mixed heavy metal contamination. *Biol Fertil Soils.* 2015; 51:827–837.

KONTAMINÁCIA VAJEC TOXINOGENNÝMI DRUHMI RODU *PENICILLIUM*

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

Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bola identifikácia zástupcov *Penicillium* spp. izolovaných z povrchu škrupiny plesnivých slepačích vajec a stanovenie schopnosti izolátov produkovať vybrané druhy mykotoxínov. Kultivačných mykologickým vyšetrením 30 ks slepačích vajec sa získalo 169 makroskopicky odlišných izolátov mikromycét. Na základe makroskopických a mikroskopických znakov bolo 128 z nich zaradených do rodu *Penicillium*. Metódou ITS-PCR-RFLP boli izoláty identifikované ako *Penicillium brevicompactum* (6), *P. commune* (45), *P. crustosum* (19), *P. expansum* (10), *P. chrysogenum* (13), *P. polonicum* (6), *P. verrucosum* (19) a *P. viridicatum* (10). Metódou TLC bola u izolátov detekovaná produkcia kyseliny cyklopiazónovej (*P. commune*, *P. polonicum*, *P. viridicatum*), citrinínu (*P. expansum*, *P. verrucosum*), ochratoxínu A (*P. verrucosum*) a penitrému A (*P. crustosum*). Z tohto dôvodu môžu identifikované mikromycéty predstavovať riziko pre konzumenta.

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 toxínogénnych) v potravinách stávajú rastúcim objektom záujmu.

Penicillium spp. sú mezofilné mikromycéty rastúce pri teplotách v rozmedzí 5 – 37 °C a pH 3 – 4,5. Vyskytujú sa v pôde, na rozkladajúcej sa vegetácii a komposte, na sušených potravinách, korení, obilninách, čerstvom ovocí a zelenine, ako aj vo vzduchu a prachu (Samson a kol., 2010). Pri vysokej vlhkosti stavebného materiálu dokážu rásť aj na stenách budov (Storey a kol., 2004). Mikromycéty rodu *Penicillium* sú považované za hlavných pôvodcov znehodnotenia širokej škály potravín a potravinárskych materiálov (Perez-Nadales a kol., 2015; Dhungana a kol., 2018; Gonda a kol., 2019). To vedie k významným ekonomickým stratám pre potravinársky priemysel. Mnohé druhy majú schopnosť produkovať široké spektrum metabolitov, vrátane látok s antibiotickým a antivirálnym účinkom a mykotoxíny (Rundberget a kol., 2004), ktoré predstavujú potenciálne riziko pre verejné zdravie.

MATERIÁL A METODIKA

Mikromycéty boli izolované z povrchu škrupiny plesnivých slepačích vajec (30 ks) podľa pokynov STN ISO 21527-1 a STN ISO 21527-2. Fenotypová identifikácia bola vykonávaná podľa kritérií Frisvada a Samsona (2004). Porastené kolónie boli následne preočkované na povrch agarového média s kvasničným extraktom a sacharózou (YES), Czapekovho agarového média s kvasničným extraktom (CYA) a agarového média so sladovým extraktom (MEA) (Hi-Media, India) a inkubované 7 dní pri teplote 25 °C. Makroskopickým a mikroskopickým vyšetrením boli potvrdené charakteristické morfológické znaky zástupcov *Penicillium* spp. U izolátov zaradených do rodu *Penicillium* bol vykonaný Ehrlichov test a kreatínová skúška preočkovaním na povrch agarového média s kreatínom, sacharózou a farebným indikátorom brómkrezolovou purpurovou (CREA). Naočkované platne boli inkubované 5 dní pri teplote 25°C. Izoláty po tejto prvotnej fenotypovej identifikácii boli identifikované RFLP metódou.

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

ITS regióny rDNA 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 naštiepené reštrikčnými endonukleázami *Bsp1286I*, *XmaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *SfcI* a *Hpy188I* (New England BioLabs[®]Inc., USA).

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 GelTM Red (Biotium Inc., USA). Po nanosení produktov do agarózového gélu prebiehala elektroforéza 60 minút pri 120 V a následne boli jednotlivé produkty vizualizované pomocou readeru Mini Bis Pro[®] (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Izrael).

Veľkosti PCR produktov a reštrikčných fragmentov boli porovnané s mapou reštrikčných fragmentov príslušných referenčných kmeňov, ktorá bola vytvorená rovnakou metodikou popísanou vyššie.

Získané PCR produkty a reštrikčné fragmenty boli podrobené sekvenovaniu (GATC Biotech AG, Nemecko) a jednotlivé sekvencie porovnané so sekvenciami v databáze NCBI GenBank. Schopnosť izolátov produkovať vybrané druhy mykotoxínov bola stanovená TLC metódou podľa autorov Labuda a Tančinová (2006).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

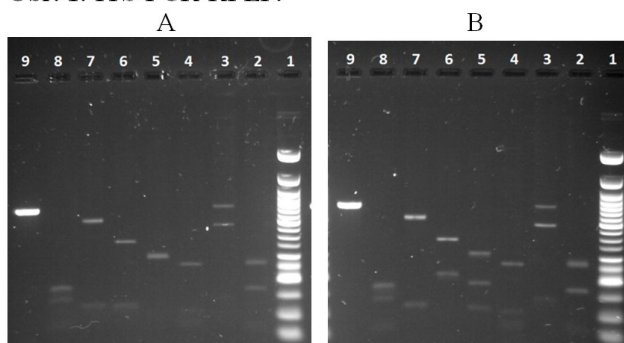
Z jednotlivých platní bolo na fenotypovú identifikáciu vybratých 169 makroskopicky odlišných izolátov. Z nich bolo 128 na základe makroskopických a mikroskopických znakov zaradených do rodu *Penicillium*.

PCR metódou boli získané amplikóny ITS regiónov testovaných izolátov mikromycét. Štiepením reštrikčnými endonukleázami *Bsp1286I*, *XmaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *SfcI* a *Hpy188I* vznikli u testovaných izolátov fragmenty rôznej veľkosti. Veľkosti

amplikónov ITS regiónov a reštrikčných fragmentov boli porovnané s vytvorenou reštrikčnou mapou referenčných kmeňov. Na základe podobností boli izoláty identifikované ako *Penicillium brevicompactum* (6), *P. commune* (45), *P. crustosum* (19), *P. expansum* (10), *P. chrysogenum* (13), *P. polonicum* (6), *P. verrucosum* (19) a *P. viridicatum* (10).

Na záver bola u testovaných izolátov potvrdená produkcia mykotoxínov detekovateľných TLC metódou. Pod UV svetlom pri vlnovej dĺžke 365 nm bol citrinín vizualizovaný ako žltozelená škvrna, grizeofulvín ako modrá škvrna a ochratoxín A ako modrozelená škvrna. Kyselina cyklopiazónová bola detegovaná pri dennom svetle po nanosení Ehrlichovho činidla vytvorením fialovej škvrny. Penitrém A bol detegovaný po nanosení 20 % AlCl₃ v roztoku 60 % etanolu pri zahriatí na 130 °C po dobu 8 minút, tvoril tmavozelenú až čiernu škvrnu. Získané výsledky boli porovnané so štandardami. Produkcia kyseliny cyklopiazónovej bola detegovaná u izolátov *P. commune*, *P. polonicum* a *P. viridicatum*, produkcia citrinínu u *P. expansum* a *P. verrucosum*, produkcia ochratoxínu A u *P. verrucosum* a produkcia penitrému A u *P. crustosum* (Tab. 1).

Obr. 1. ITS-PCR-RFLP.



A. *Penicillium commune*. Stĺpec 1: ladder 50 bp; Stĺpce 2 až 8: reštrikčné fragmenty vzniknuté digestiou endonukleázami *Bsp1286I*, *XmaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *SfcI* a *Hpy188I*; Stĺpec 9: PCR produkt *P. commune* (650 bp).
B. *Penicillium crustosum*. Stĺpec 1: ladder 50 bp; Stĺpce 2 až 8: reštrikčné fragmenty vzniknuté digestiou endonukleázami *Bsp1286I*, *XmaI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MseI*, *SfcI* a *Hpy188I*; Stĺpec 9: PCR produkt *P. crustosum* (650 bp).

Tab. 1 Mykotoxíny detekovateľné TLC metódou a ich produkcia testovanými izolátmi

Druh	Citrinín	Grizeofulvín	Kyselina cyklopiazónová	Ochratoxín A	Penitrém A
<i>P. brevicompactum</i>	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>P. commune</i>	0/45	0/45	45/45	0/45	0/45
<i>P. crustosum</i>	0/19	0/19	0/19	0/19	19/19
<i>P. expansum</i>	9/10	0/10	0/10	0/10	0/10
<i>P. chrysogenum</i>	0/13	0/13	0/13	0/13	0/13
<i>P. polonicum</i>	0/6	0/6	6/6	0/6	0/6
<i>P. verrucosum</i>	19/19	0/19	0/19	18/19	0/19
<i>P. viridicatum</i>	0/10	0/10	10/10	0/10	0/10

Okrem ekonomických strát, predstavuje kontaminácia konzumných vajec mikroskopickými vláknitými hubami aj riziko ohrozenia zdravia konzumenta, a to možnou produkciou mykotoxínov. Z tohto dôvodu je sledovanie a skorá identifikácia mikromycét (hlavne toxinogénnych) v potravinách dôležitá.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0705/16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in Mycology*. 2004; 49:1-174.
- Rundberget T, Skaar I, Flaoyen A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes. *Int. J. Food Microbiol.* 2004; 90:2:181-188.
- Samson RA, et al. Food and indoor fungi. CBS KNAW Biodiversity Centre, Utrecht. 2010. 390 p.
- STN ISO 21527-1: Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Časť 1: Metóda počítania kolónií vo výrobkoch s aktivitou vody väčšou ako 0,95.
- STN ISO 21527-2: Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu kvasiniek a plesní. Časť 2: Metóda počítania kolónií vo výrobkoch s aktivitou vody menšou ako 0,95 alebo rovnajúcou sa 0,95.
- Storey E, et al. Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. University of Connecticut Health Center, Farmington, 2004; 58 p.
- Gonda A, et al. Evaluation of different hurdles on *Penicillium crustosum* growth in sponge cakes by means of a specific real time PCR. *J Food Sci Technol.* 2019; 56:2195–2204.
- Dhungana B, et al. Incidence of *Penicillium verrucosum* in Grain Samples from Oat Varieties Commonly Grown in South Dakota. *Journal of Food Protection.* 2018; 81:898–902.
- Perez-Nadales E, et al. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal Genet. Biol.* 2014; 70:42-67.
- Labuda R., Tančinová D. Fungi recovered from Slovakian poultry feed mixtures and their toxinogenicity. *Ann Agric Environ Med.* 2006; 13:193–200.

GENETICKÁ TYPIZÁCIA VÍRUSU HEPATITÍDY E NA SLOVENSKU

Dudášová K.¹, Jacková A.¹, Šalamúnová S.¹, Molnár L.², Kottferová L.², Ciberej J.³, Vilček Š.¹

¹Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF, Košice

²Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat, UVLF, Košice

³Ústav pre chov a choroby zveri a rýb, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bola detekcia výskytu vírusu hepatitídy E (HEV) v populácii diviakov na území Slovenskej republiky a následná fylogenetická analýza získaných sekvencií za účelom genetickej typizácie HEV. Celkovo sme pomocou nested RT-PCR metódy analyzovali 227 vzoriek pečeneového tkaniva, pričom prítomnosť RNA vírusu sme zaznamenali v 15,42% vzoriek a 25 vzoriek svaloviny s výskytom RNA na úrovni 16%. Na základe fylogenetической analýzy nami získaných HEV sekvencií sme zistili prítomnosť zoonotického genotypu HEV-3 vo všetkých vzorkách.

ÚVOD

Vírus hepatitídy E je príčinou vzniku akútnej vírusovej hepatitídy E (VHE) a je rozšírený po celom svete. HEV je neobalený vírus s lineárnym ssRNA genómom pozitívnej polaritý s dĺžkou približne 6,6 – 7,2 kb pozostávajúcim z troch otvorených čítacích rámcov (ORF1 – ORF3). Podľa súčasnej taxonómie ICTV (Medzinárodná komisia pre taxonómiu vírusov) patrí do čeľade *Hepeviridae*, ktorá sa člení na 2 rody: *Orthohepevirus* a *Piscihepevirus*. Izoláty patriace do čeľade *Hepeviridae* boli identifikované u veľkého množstva živočíšnych druhov a niektoré sú v súčasnosti stále nezatriedené (napr. líščie, losie, sokolie izoláty HEV), čo zdôrazňuje významnú genomickú variabilitu tejto čeľade. Rod *Orthohepevirus* zahŕňa všetky cicavčie a vtáčie izoláty HEV a člení sa na 4 druhy (A – D), rod *Piscihepevirus* zahŕňa iba jeden druh vyskytujúci sa u lososovitých rýb (Purdy a kol., 2017). Druh *Orthohepevirus* A pozostáva zo 7 genotypov (HEV-1 až HEV-7) a má širokú škálu hostiteľských druhov: genotypy HEV-1 a HEV-2 sú špecifické iba pre ľudskú populáciu, genotypy HEV-3 a HEV-4 infikujú ľudí, diviaky, domáce ošipané, hovädzí dobytok, ovce, kozy, psy, zajace a jeleňovitú zver, genotypy HEV-5 a HEV-6 sú špecifické iba pre populáciu diviakov na ázijskom kontinente a genotyp HEV-7 bol izolovaný zo vzoriek ťavy jednohrbej, ako aj od ľudského pacienta (Kenney, 2019; Lee a kol., 2015). Medzi zoonotické genotypy teda patria HEV-3, HEV-4 a HEV-7. V rámci jednotlivých genotypov navrhli Smith a kol. (2016) vo svojej štúdií referenčné sekvencie pre subtypy genotypov HEV-1 až HEV-7. Genotyp HEV-1 tak má na základe tejto štúdie šesť subtypov (1a – 1f), HEV-2 dva subtypy (2a – 2b), HEV-3 desať subtypov (3a – 3j a 3ra) rozdelených do dvoch hlavných skupín: 3abchij a 3efg, HEV-4 deväť subtypov (4a – 4i) a HEV-5 až HEV-7 po jednom subtype.

Infekcie genotypmi HEV-1 a HEV-2 sa vyskytujú prevažne v rozvojových krajinách sveta (Ázia, Afrika, Stredná Amerika) s vysokou denzitou obyvateľstva a s nesprávnymi hygienickými návykmi. Hlavnou cestou transmisie HEV je v týchto oblastiach prenos vodou kontaminovanou výkalmi, infekcie sa vyskytujú epidemicky a sú obzvlášť závažné pre gravidné ženy, u ktorých bol zaznamenaný rozvoj fulminantnej hepatitídy a mortalita na úrovni 15 až 25% (Sharma a kol., 2017). Genotypy HEV-3 a HEV-4 sa vyskytujú prevažne v rozvinutých krajinách, spôsobujú sporadické prípady vírusovej hepatitídy E (VHE) u ľudí spájané s konzumáciou tepelne nedostatočne spracovaného mäsa a produktov živočíšneho pôvodu, nesprávnou hygienou v kuchyni alebo s profesionálnou expozíciou vírusom. K transmisii vírusu v populácii zvierat dochádza fekálno-orálnou cestou (Dalton a kol., 2014). Zoonotický prenos HEV bol dokázaný viacerými štúdiami. V Japonsku bolo grilované mäso diviakov potvrdené ako zdroj infekcie zistením identických sekvencií HEV u pacienta, ako aj vo zvyškoch mäsa, ktoré skonsumoval (Li a kol., 2005). Podobne sa aj v ďalšom prípade preukázalo, že sekvencie HEV získané z pečene diviakov sú totožné so sekvenciami

izolovanými od dvoch pacientov, ktorí ju konzumovali (Matsuda a kol., 2003). Diviakky spolu s domácimi ošípanými sú považované za primárny rezervoárový druh zvierat a predstavujú riziko infekcie nielen pre ľudskú populáciu, ale aj pre ostatné domáce a voľne žijúce zvieratá.

MATERIÁL A METODIKA

Na analýzu sme použili vzorky pečeneového tkaniva (n= 227) a svaloviny (n= 25) diviakov lesných (*Sus scrofa*) pochádzajúce z rôznych poľovných revírov nachádzajúcich sa prevažne na území východného a stredného Slovenska. Prvým krokom analýzy bola izolácia RNA, použili sme TRIzol reagent (Ambion) alebo RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) s QIAcube analyzátorom a postupovali sme podľa priložených protokolov od výrobcov. Z vyzolovanej RNA sme na syntézu komplementárnej DNA (cDNA) použili RevertAid reverznú transkriptázu (Thermo Fisher Scientific) a gén špecifický primer (ORF1a1/3157-ER). Ďalším krokom bola nested RT-PCR zameraná na časti ORF1 a ORF2 oblasti genómu HEV. Na amplifikáciu časti ORF1 oblasti genómu HEV o veľkosti 287 bp sme použili primery ORF1s1/ORF1a1 a ORF1s2/ORF1a2 (Erker a kol., 1999), na amplifikáciu časti ORF2 oblasti genómu HEV (348 bp) primery 3156-EF/3157-ER a 3158-EF/3159-IRS (Meng a kol., 1997). Na vyhodnotenie výsledkov nested RT-PCR sme využili agarózovú elektroforetickú separáciu PCR produktov. Po ofarbení farbivom Gel-Red (Biotum) sme ampikóny vizualizovali pomocou zobrazovacieho zariadenia Gel Doc EZ (BIO-RAD) s príslušným softvérom. Získané PCR produkty o požadovanej veľkosti boli sekvenované komerčnou firmou (Microsynth) použitím Sangerovej metódy. Fylogenetickú analýzu nukleotidových sekvencií HEV sme vykonali v programoch DNASTAR (Lasergene) a MEGA6 (Tamura a kol., 2013). Všetky použité kmene, ako aj referenčné kmene HEV sme získali z GenBank databázy NCBI (National Center for Biotechnology Information).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vo vzorkách pečeneového tkaniva diviakov lesných sme zaznamenali prítomnosť RNA HEV na úrovni 15,42%, vo vzorkách svaloviny bola RNA prítomná v 16,00% vzoriek. Celkovo sme analyzovali vzorky z 28 poľovných revírov Slovenska, RNA HEV sme potvrdili v 10 (35,71%) z nich (Tab. 1). Z celkového počtu vzoriek predstavovalo 15 vzoriek spárované vzorky pečeneového tkaniva a svaloviny od jedného jedinca. Prítomnosť RNA HEV v pečeni aj vo svalovine sme zaznamenali u 3 jedincov.

Tab. 1. Výskyt HEV u diviakov lesných na Slovensku

	Počet (n)	HEV+	HEV+ (%)	Genotyp	Subtyp
Pečeneové tkanivo	227	35	15,42 %	HEV-3	3abchij; 3efg
Svalovina	25	4	16,00 %	HEV-3	3abchij; 3efg
Počet revírov:	28	10	35,71 %		

Fylogenetická analýza preukázala prítomnosť zoonotického genotypu HEV-3 vo všetkých pozitívnych vzorkách, ich vzájomná nukleotidová podobnosť (nt) bola v rozmedzí 69,8 – 100% v ORF1 a 78,9 – 100% v ORF2 oblasti genómu HEV. Nami získané sekvencie sa zoskupili podľa ich geografického pôvodu, t. j. sekvencie pochádzajúce z toho istého poľovného revíra si boli takmer 100% podobné. Pri podrobnejšej fylogenetickej analýze sme zistili, že sekvencie sa zoskupili do troch subtypov, a to HEV-3a, HEV-3i a HEV-3e, pričom najviac zastúpený bol subtyp HEV-3a. Naše sekvencie patriace do subtypu HEV-3a zdieľali v rámci Európy najvyššiu nt podobnosť (89,7 – 97,1%) s maďarskými sekvenciami pochádzajúcimi od domácej ošípanej a diviakov (prístupové čísla GenBank: EU718647, EU718646, EU718647).

V európskych krajinách bol zaznamenaný výskyt RNA HEV u diviakov lesných na úrovni od 0 po 68,2%. Na detekciu boli však použité rôzne vzorky a metódy s rôznou mierou senzitivity kvôli absencii jednotnej štandardizovanej metodiky. Približne rovnaký výskyt HEV vo vzorkách pečene ako v našej práci bol zaznamenaný v štúdií z Nemecka (14,9%) (Schielke a kol., 2009), Maďarska (12,2%) (Reuter a kol., 2009) a Chorvátska (12,3%) (Prpic a kol., 2015), vyšší v Taliansku (33,5%) (Montagnaro a kol., 2015). Vo všetkých uvedených štúdiách, ako aj v našej práci, bol u diviakov potvrdený výskyt zoonotického genotypu HEV-3. Tieto výsledky poukazujú na možné riziko transmisie HEV na humánnu populáciu prostredníctvom tepelne nedostatočne spracovaného mäsa a mäsových výrobkov alebo priamym kontaktom s infikovanými jedincami.

Táto práca vznikla vďaka podpore projektu VEGA 1/0429/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dalton HR, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E in developed countries: current status and future perspectives. *Future Microbiol.* 2014; 9(12):1361-72.
- Erker JC, Desai SM, Mushahwar IK. Rapid detection of Hepatitis E virus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction using universal oligonucleotide primers. *J Virol Methods.* 1999; 81(1-2):109-13.
- Kenney SP. The current host range of Hepatitis E viruses. *Viruses.* 2019; 11(5):452.
- Lee GH, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016; 150:355-57.
- Li TC, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(12):1958-60.
- Matsuda H, et al. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J Infect Dis.* 2003; 188(6):944.
- Meng XJ, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(18):9860-5.
- Montagnaro S, et al. Viral and Antibody Prevalence of Hepatitis E in European Wild Boars (*Sus scrofa*) and Hunters at Zoonotic Risk in the Latium Region. *J Comp Pathol.* 2015; 153(1):1-8.
- Prpic J, et al. Distribution and Molecular Characterization of Hepatitis E virus in Domestic Animals and Wildlife in Croatia. *Food Environ Virol.* 2015; 7:195-205.
- Purdy MA, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2017; 98(11):2645-46.
- Reuter G, et al. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol.* 2009; 44(4):277-81.
- Sharma S, et al. Risk factors for vertical transmission of hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat.* 2017; 24(11):1067-75.
- Schielke A, et al. Detection of hepatitis E virus in wild boars of rural and urban regions in Germany and whole genome characterization of an endemic strain. *Virol J.* 2009; 6:58.
- Smith DB, et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J Gen Virol.* 2016; 97:537-42.
- Tamura K, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013; 30(12):2725-29.

RIBOZÓMOVÝ DISPLEJ AKO NÁSTROJ VO VÝVOJI ENZÝMOV

Dzurillová V.¹, Sedlák E.²

¹Ústav fyzikálnych vied, Katedra Biofyziky, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach
²Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

ABSTRAKT

Haloalkánové dehalogenázy sú hydrolázy, ktoré dokážu rozštiepiť väzbu medzi uhlíkom a halogénom vďaka čomu napomáhajú k premene toxických halogénovaných zlúčenín na menej toxické látky. Dehalogenácia sprostredkovaná týmito enzýmami má navyše široké využitie v priemysle a vysoký potenciál pre aplikáciu v bioremediácii prominentných polutantov. Praktické využitie haloalkánových dehalogenáz je však sprevádzané mnohými prekážkami ako je nízka efektivita katalýzy, nedostatočná špecificita či nízka stabilita v prítomnosti organických kosolventov. Účinnú a funkčnú modifikáciu týchto vlastností je možné dosiahnuť tzv. evolučnými technikami. V našej práci sa zameriavame na moduláciu katalytickej aktivity HLDs prostredníctvom evolučnej techniky ribozómový displej. V prvom kroku boli zhotovené DNA knižnice 2 vybraných variantov DhaAHT a DhaA dehalogenázy s optimalizovanou frekvenciou mutácií v priemere 5 mutácií/gén. V oboch prípadoch boli z počiatocnej knižnice selektované varianty voči imobilizovanému chloroalkánu niekoľkými po sebe nasledujúcimi kolami ribozómového displeja. Selektované varianty boli následne podrobené sekvenčnej analýze. Naše výsledky poukazujú na možnosť využitia tejto techniky pre evolúciu-riadenú modifikáciu haloalkánových dehalogenáz.

ÚVOD

Enzýmy v úlohe špecializovaných katalyzátorov sú nevyhnutnou súčasťou biologických systémov. Rôznorodosť špecializácie enzýmov ich zároveň predurčuje k širokému využívaniu v oblasti medicíny, farmácie, chemického priemyslu a bioremediácie. Jedným z príkladov sú aj bakteriálne enzýmy haloalkánové dehalogenázy (HLDs). HLDs katalyzujú hydrolytické štiepenie väzby uhlík-halogén pričom vzniká alkohol, halidový ión a protón. Tieto enzýmy patria k alfa/beta hydrolázam a dokážu odštiepiť halogén z chlórovaných, brómovaných, iódovaných alifatických a cyklických uhľovodíkov (Janssen, 2007). HLDs sa vyznačujú unikátnym katalytickým mechanizmom, robustnosťou a širokou substrátovou špecificitou. Vďaka týmto vlastnostiam sa stali atraktívnym cieľom pre výskum a rôzne biotechnologické aplikácie. Bioremediácia toxických environmentálnych polutantov, dekontaminácia chemických bojových látok, biomonitoring znečisťujúcich látok v prostredí, recyklácia vedľajších produktov pri organickej syntéze, produkcia opticky čistých molekúl vo farmácii a značenie proteínov pri bunkovom zobrazovaní, to všetko sú príklady sľubných aplikácií HLDs v priemysle (Koudelakova a kol., 2012). Praktické využitie HLDs má stále niekoľko obmedzení. Jedným z najkritickejších limitujúcich faktorov je nedostatočne efektívna katalytická aktivita prírodných HLDs. Napriek tomu, že HLDs sú intenzívne študované, modifikácia katalytickej aktivity enzýmov je vo všeobecnosti komplexný problém, ktorý nie je možné v súčasnosti vyriešiť pomocou racionálneho dizajnu. Alternatívnym prístupom k inžinierstvu tak komplexného zásahu do štruktúry enzýmu za účelom zefektívnenia katalýzy sú metódy riadenej evolúcie ako je fágový displej, kvasinkový displej a ribozómový displej (Sergeeva a kol., 2006). Úspešná aplikácia evolúciu-riadeného prístupu v modifikácii vlastností proteínov/enzýmov bola ocenená Nobelovou cenou za chémiu v roku 2018. V našej práci sme sa zamerali na potenciálne využitie evolučnej techniky ribozómového displeja na vývoj HLDs, vo všeobecnosti enzýmov, ako alternatívneho nástroja určeného na moduláciu vlastností proteínov/enzýmov.

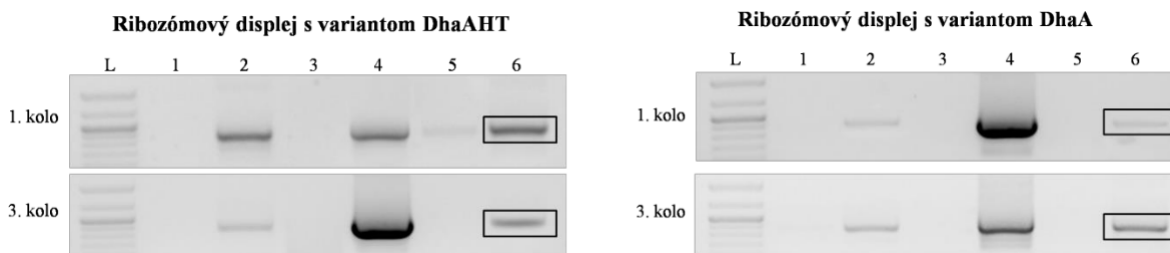
MATERIÁL A METODIKA

Príprava knižnice. DNA knižnica bola zhotovená pomocou *error-prone* PCR metódy. Na prípravu knižnice bol použitý variant génu kódujúci haloalkánovú dehalogenázu DhaAHT (K175M, C176G, H272F, Y273L). Gén DhaAHT bol amplifikovaný za použitia zmesi analógov nukleotidov 8-oxo-dGTP a dPTP a Taq polymerázy. Finálne PCR produkty boli poštiepené BamHI a HindIII a vložené do plazmidu pQE vopred poštiepeným rovnakými enzýmami. Ligačné zmesi boli transformované do chemokompetentných buniek *E. coli* XL1BLUE metódou teplotného šoku. Z 10 náhodne vybraných transformovaných kolónií boli izolované plazmidy pQE a odoslané na sekvenovanie. Početnosť mutácií bola analyzovaná použitím softvéru CLC Genomics (Qiagen). Rovnaký postup bol použitý aj v prípade variantu génu DhaA (H272F).

Ribozómový displej. Pri ribozómovom displeji sme postupovali podľa protokolu vypracovaného Zahnd a kol. (2007), pričom jednotlivé kroky tohto protokolu sme modifikovali a optimalizovali pre potreby selekcie variantov DhaA. Stručne, počiatková knižnica bola exprimovaná *in vitro* pomocou T7 RNA polymerázy a S30 extraktu. Exprimovaná proteínová knižnica vo forme komplexov mRNA-ribozóm-proteín bola následne selektovaná voči chloroalkánu v jamkách mikrotitračnej platničky. Intenzívnym premývaním boli vymyté všetky nenaviazané/slabo naviazané komplexy. Z komplexov, ktoré ostali pevne naviazané sme eluovali mRNA, ktorú sme reverzne prepísali a amplifikovali v PCR. Tento proces sme zopakovali 3-krát s obidvomi pripravenými knižnicami, pričom produkt z jedného selekčného kola bol zároveň templátom v ďalšom selekčnom kole. Selektované varianty z DhaA knižnice sme následne odoslali na sekvenovanie a podrobili sekvenčnej analýze.

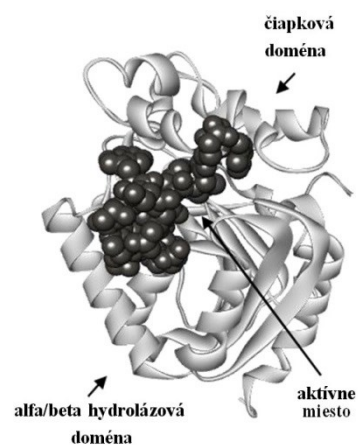
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nevyhnutnou podmienkou aplikácie ribozómového displeja na vývoj proteínov/enzýmov s vylepšenými vlastnosťami bolo úspešné etablovanie tejto techniky v našom laboratóriu. Ribozómový displej je komplexná metóda, ktorá pozostáva zo 6 základných krokov: príprava DNA konštruktu, *in vitro* transkripcia, *in vitro* translácia, selekcia, elúcia mRNA a reverzná transkripcia. Na dosiahnutie úspešnej selekcie je potrebné aby bol každý z týchto krokov čo najefektívnejší. Všetky zo spomenutých krokov sa nám podarilo optimalizovať. Takto optimalizovaný ribozómový displej sme použili na náš projekt - vývoj nových enzýmov na báze HLDs. Úspešné nájdenie variantu DhaA, ktorý sa bude vyznačovať zlepšenou katalýzou je zároveň podmienené tým, že potrebujeme vytvoriť dostatočne veľký sekvenčný priestor, t.j. pripraviť knižnicu, ktorá bude obsahovať analógy DhaA s rôznou kombináciou mutácií. Ďalej sme sa sústredili na vytvorenie knižnice, na prípravu ktorej sme použili analógy nukleotidov a nízku *proofreading* aktivitu Taq polymerázy, čím sme indukovali vznik náhodných mutácií v sekvenciách DhaA a DhaAHT. Otestovali sme niekoľko rôznych koncentrácií analógov nukleotidov a na základe sekvenčnej analýzy sme vybrali ako najvhodnejšie koncentrácie 3 a 5 μM . Výsledná knižnica mala optimalizovanú frekvenciu mutácií v priemere 5 mutácií/gén. Vytvorené knižnice sme následne využili v ribozómovom displeji v 3 po sebe nasledujúcich selekčných kolách. Funkčnosť nami vytvoreného postupu pre ribozómový displej HLDs sme overili s variantom DhaAHT (Obr. 1), ktorý sa vyznačuje silnou afinitou k chloroalkánu (Los a kol., 2008). Ak si porovnáme frakciu PCR produktov v elektroforetickej dráhe č. 6 (tá odpovedá množstvu selektovaných variantov z knižnice) a množstvo PCR produktov v dráhe 2, ktoré odpovedajú miere nešpecifickej väzby enzýmov, po treťom kole RD môžeme vidieť, že voči selekcii špecificky viazaných enzýmov na chloroalkán pochádzajúcich z počiatkovej knižnice dochádza k obohateniu molekúl so špecifickou väzbou pre daný ligand. Podobný efekt môžeme pozorovať aj po treťom kole RD s knižnicou variantu DhaA – divokému typu tohto enzýmu (Obr. 1).



Obr. 1 Ribozómový displej s haloalkánovou dehaogénázou DhaA. L- 100bp DNA ladder; 1,3,5 – negatívna kontrola. 2 – vzorka z jamky bez ligandu, 4 – templátová mRNA, 6- vzorka z jamky s ligandom.

Nakoľko DhaA je hlavným objektom nášho záujmu, po treťom kole RD sme výslednú frakciu DNA knižnice podrobili sekvenčnej analýze. Účelom tejto analýzy bolo nájsť určitý vzor alebo preferenciu pre indukované mutácie, ktoré by mohli prispieť k zlepšeniu vlastností DhaA, v našom prípade zlepšeniu efektivity katalýzy. Analýzou získaných sekvencií proteínov sme zistili, že sekvenované gény a následne získané primárne štruktúry proteínov obsahovali predovšetkým bodové mutácie, ktoré boli roztrúsené v rámci celej štruktúry proteínu. V malej frakcii sme však identifikovali deléciu medzi 132-144 aminokyselinou (Obr. 2). Táto delécia sa nachádza v oblasti štruktúry enzýmu, ktorá bola v predchádzajúcich štúdiách terčom proteínového inžinierstva HLDs. Obsahuje aminokyselinové zvyšky, ktoré lemujú vedľajší tunel pre vstup a výstup reaktantov a produktov, a ako sa ukázalo práve modifikácia tunelov v enzýmoch je vhodnou stratégiou na moduláciu ich katalytickej aktivity (Pavlova a kol., 2009). Táto nezávislá identifikácia oblasti proteínu s pravdepodobne dôležitou úlohou pre väzbu enzýmu s ligandom poukazuje na možnosť potenciálneho využitia ribozómového displeja vo vývoji dizajnových HLDs. Výzvou do budúcnosti je potreba zvýšenia efektivity selekcie, t.j. rýchlejšieho obohatenia enzýmov s požadovanými vlastnosťami. V tejto súvislosti je nevyhnutné uskutočniť experimenty, ktoré by identifikovali vzťah medzi efektivitou interakcie HLDs s ligandom, t.j. experimentálnym obohatením a biofyzikálnymi vlastnosťami, akými sú zbalenie, stabilita, rozpustnosť a katalytická efektivita, takto selektovaných enzýmov



Obr. 2 Trhrozmerná štruktúra DhaA (PDB - 1CQW) s vyznačenou pozíciou identifikovanej delécie (tmavo-šedá).

Ďakujeme prof. Damborskému za poskytnutie plazmidov obsahujúcich gény kódujúce dehalogenázy. Táto práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja č. APVV-15-0069.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Janssen DB. Evolving haloalkane dehalogenases. *Curr Opin Chem Biol.* 2004; 8(2):150-159.
- Koudelakova T, et al. Haloalkane dehalogenases: biotechnological applications. *Biotechnol J.* 2013; 8:32-45.
- Los GV, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol.* 2008; 3:373-382.
- Pavlova M, et al. Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat Chem Biol.* 2009; 5:727-733.
- Sergeeva A, et al. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58(15):1622-1654.
- Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods.* 2007; 4(3):269-279.

SLEDOVANIE VPLYVU SILYBÍNU NA BUNKOVÝ CYKLUS A METABOLICKÚ AKTIVITU NA PRASACÍCH INTESTINÁLNYCH BUNKÁCH

Faixová D., Cingel'ová Maruščáková I., Mudroňová, D.

Katedra mikrobiológie a imunológie Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Plody *Silybum marianum* obsahujú silimarín, z ktorého sa pripravuje štandardizovaný extrakt, ktorý obsahuje silybín (zmes dvoch diastereoizomérov A a B), ktorý má preukázané rôzne farmakoterapeutické využitie. Vzhľadom na potrebu testovania vlastností naturálnych látok je potrebné vykonať najprv *in vitro* experimenty na bunkových kultúrach, na základe ktorých je možné prírodné látky testovať na experimentálnych zvieratách. Sledovali sme metabolickú aktivitu pomocou MTS testu a bunkový cyklus prietokovou cytometriou IPEC-1 buniek po ošetrení silybínom v koncentráciách 5, 10, 20, 40 a 80 μM po 4 a 24 hodinovej inkubácii. Zistili sme, že po 4 hodinovej inkubácii koncentrácie od 5 do 40 μM silybínu signifikantne znížili percento buniek v G2/M fáze. V koncentracii 80 μM sme nezaznamenali zníženie mitotickej aktivity na rozdiel od koncentrácií 5-40 μM . Po 24 hodinovej inkubácii sme sledovali zvýšené percento buniek v G2/M fáze v koncentráciách 5-40 μM v porovnaní s kontrolou (vo všetkých prípadoch $p < 0,05$), čo bolo spôsobené spomalením mitózy, ktorú sme zaznamenali po 4 hodinovej inkubácii. Metabolická aktivita IPEC-1 buniek ošetrených rôznymi koncentraciami silybínu bola po 4 hodinovej inkubácii stimulovaná a následne po 24 hodinovej inkubácii klesala.

ÚVOD

V súčasnosti je predmetom mnohých moderných vedeckých tímov sledovanie vlastností látok naturálneho pôvodu. Niektoré ich terapeutické vlastnosti sú dlhodobo využívané v prírodnom liečiteľstve a ich využitie v modernej medicíne môže viesť k zníženiu užívania chemických terapeutík pacientami. Plody *Silybum marianum* obsahujú silimarín, z ktorého sa pripravuje štandardizovaný extrakt, ktorý obsahuje silybín (zmes dvoch diastereoizomérov A a B). Okrem silybínu je komplex tvorený aj značným množstvom iných flavonolignanov – izosilybín, dehydrosilybín, silychristín, silydianín a flavonoidmi, hlavne taxifolínom. Najznámejšie farmakoterapeutické využitie plodov pestreca mariánskeho je najmä ako hepatoprotektívum a antioxidant. Okrem toho je v súčasnosti skúmaný jeho účinok na metabolický syndróm (Vahabzadeh a kol., 2018), využitie v dermatológii (Dorjay a kol., 2018), funkcia pri terapii diabetu mellitu (Stolf a kol., 2017) a Alzheimerovej choroby (Guo a kol., 2019). Opísané sú aj jeho neuroprotektívne (Devi a kol., 2017), antivirotické (Liu a kol., 2019), antiparazitické (Faridnia a kol., 2018) a čiastočne aj imunomodulačné účinky (Esmaeil a kol., 2017).

V dnešnej dobe sa ku tradičnej terapii mnohých ochorení pridávajú naturálne terapeutiká, ktoré majú za úlohu znížiť nežiaduce účinky, príp. podporiť pozitívny účinok klasickej terapie. Vzhľadom na potrebu testovania vlastností naturálnych látok je potrebné vykonať najprv *in vitro* experimenty na bunkových kultúrach, na základe ktorých je možné prírodné látky testovať na experimentálnych zvieratách.

MATERIÁL A METODIKA

V rámci *in vitro* testovania biologickej aktivity silybínu sme hodnotili vplyv na priebeh bunkového cyklu IPEC-1 buniek. Bunky boli nasadené v počte $2,25 \times 10^5$ buniek na jamku v štandardných 24-jamkových platničkách v celkovom objeme 1 ml. Po nočnej kultivácii sa vymenilo IPEC-1 médium a následne sa bunky ošetrili silybínom, s ktorým sa následne inkubovali. Po 4 a 24 hodinovej inkubácii sa zozbierali adherované aj uvoľnené bunky, premyli sa v ľadovom FFR. Po fixácii v alkohole sa následne inkubovali s farbiacim

roztokom obsahujúcim propídium jodid a ribonukleázu A. Vzorky sa analyzovali na prietokovom cytometri a výsledky sa vyjadrili ako percentuálne zastúpenie buniek v jednotlivých fázach bunkového cyklu.

Vplyv prírodných látok na metabolickú aktivitu buniek sa testoval v štandardných 96-jamkových platničkách pomocou MTS testu. Bunky boli nasadené v koncentrácii 30 000 buniek/jamku v roztoku kompletného kultivačného média a po 4 a 24 hodinovej inkubácii sa vytvoril monolayer. Médium sa následne odsalo a pridal sa silybín. Po 24 hodinovej inkubácii pri 37 °C 5% CO₂ sa prikvapol MTS reagent a následne sa inkubovali 1 – 4 hodiny pri 37 °C 5% CO₂. Odmerali sme absorbanciu pri 490 nm a metabolická aktivita buniek sa vyjadrila percentuálne v porovnaní s negatívnou kontrolou.

Výsledky metabolickej aktivity boli štatisticky spracované jednosmernou analýzou rozptylu s doplnkovým POSTHOC Turkeyho testom. Výsledky bunkového cyklu boli štatisticky spracované jednosmernou analýzou rozptylu s doplnkovým Dunnettovým testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

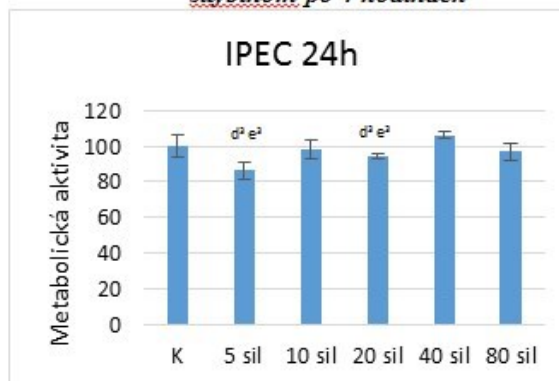
Po 4 hodinovej inkubácii IPEC-1 buniek so silybínom v rôznych koncentráciách sme sledovali signifikantne zvýšené percento buniek v G1 fáze oproti kontrole a naopak signifikantne zníženie percentálneho počtu buniek v S fáze (vo všetkých prípadoch $p < 0,01$). Koncentrácie od 5 do 40 μM taktisto signifikantne znížili percento buniek v G2/M fáze. V koncentrácii 80 μM sme nezaznamenali zníženie mitotickej aktivity na rozdiel od koncentrácií 5-40 μM .

Po 24 hodinovej inkubácii sme sledovali zvýšené percento buniek v G2/M fáze v koncentráciách 5-40 μM v porovnaní s kontrolou (vo všetkých prípadoch $p < 0,05$), čo bolo spôsobené spomalením mitózy, ktorú sme zaznamenali po 4 hodinovej inkubácii.

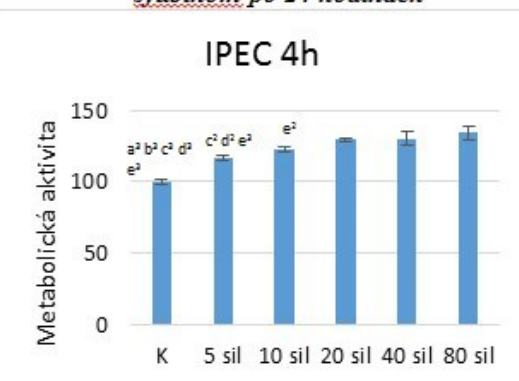
Sledovali sme metabolickú aktivitu IPEC-1 buniek po ošetrení silybínom v rôznych koncentráciách po 4 a 24 hodinách (Graf 1 a 2). Zistili sme, že metabolická aktivita buniek ošetrených 5 μM a 10 μM roztokom silybínu bola zvýšená oproti kontrole po 4 hodinovej inkubácii. Po 24 hodinovej inkubácii sme zaznamenali v koncentráciách 5 μM a 20 μM signifikantne nižšiu metabolickú aktivitu oproti 40 μM a 80 μM . Zistili sme, že metabolická aktivita IPEC-1 buniek ošetrených rôznymi koncentraciami silybínu bola po 4 hodinovej inkubácii stimulovaná a následne po 24 hodinovej inkubácii klesala.

Zistili sme, že silybín neovplyvňuje negatívne metabolickú aktivitu zdravých črevných buniek (v rozpätí koncentrácií 5 - 80 μM) ale čiastočne znižuje mitotickú aktivitu (proliferáciu) týchto buniek. Na základe zisteného budú rovnaké testy vykonané na nádorovej línii črevných buniek (CACO) aby sa zistili rozdiely v účinku silybínu na tieto dve bunkové línie.

Graf 1 Metabolická aktivita IPEC-1 po ošetrení silybinom po 4 hodinách



Graf 2 Metabolická aktivita IPEC-1 po ošetrení silybinom po 24 hodinách



P<0.01 a- signifikančný rozdiel oproti 5 sil
 P<0.001 b- signifikančný rozdiel oproti 10 sil
 c- signifikančný rozdiel oproti 20 sil
 d- signifikančný rozdiel oproti 40 sil
 e- signifikančný rozdiel oproti 80 sil

Práca bola podporená grantom IGA 12/2020.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Devi KP, et al. A Mini Review on the Chemistry and Neuroprotective Effects of Silymarin. *Curr Drug Targets*. 2017; 18(13):1529-1536.

Dorjay K, Arif T, Adil M. Silymarin: an interesting modality in dermatological therapeutics. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2018; 84(2): 238-243.

Esmail N, et al. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. In *Int Immunopharmacol*. 2017; 50:194-201.

Faridnia R, et al. Investigating in vitro anti-leishmanial effects of silibinin and silymarin on *Leishmania major*. In *Ann Parasitol*. 2018; 64(1):29-35.

Guo H, et al. Silymarin's Inhibition and Treatment Effects for Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2019; 24(9)

Stolf AM, Cardoso CC, Acco A. Effects of Silymarin on Diabetes Mellitus Complications: A Review. *Phytother Res*. 2017; 31(3):366-374.

Liu CH, et al. Antiviral activities of silymarin and derivatives. In *Molecules*. 2019; 24(8)

Vahabzadeh M, Amiri N, Karimi G. Effects of silymarin on metabolic syndrome: a review. *J Sci Food Agric*. 2018; 98(13):4816-4823.

ENTEROCOCCUS VILLORUM VS E. FAECIUM K12b Z TRUSU KOŇA A JEHO BIOAKTIVITA

Focková V., Kopčáková A., Pogány Simonová M., Lauková A.
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Viacerí zástupcovia rodu *Enterococcus* sú v súčasnosti využívaní ako prospešné baktérie, pretože vykazujú antimikrobiálne účinky cez produkciu bakteriocínov. Cieľom tejto štúdie bolo detegovanie a účinok substancie s antimikrobiálnou bakteriocínovou aktivitou z autochtónneho kmeňa K12b izolovaného z trusu zdravého koňa. Kmeň bol taxonomicky zaradený ku druhu *E. villorum* na základe evaluácie identifikačným systémom MALDI – TOF, no sekvenovanie preukázalo jeho príslušnosť ku druhu *E. faecium*. Z hľadiska základného výskumu je významné zistenie inhibičnej aktivity bakteriocínovej substancie z kmeňa K12b; detegovaná bola inhibícia rastu indikátorových kmeňov enterokokov, ako aj stafylokokov.

ÚVOD

Do rodu *Enterococcus* radiaceho sa do kmeňa *Firmicutes* patria aj kyselinu mliečnu produkujúce baktérie. Sú to Gram-pozitívne, fakultatívne anaeróbne koky, nachádzajúce sa v gastrointestinálnom trakte zvierat, ale aj ľudí. Sú tiež súčasťou životného prostredia a boli izolované aj z rastlín či potravinových produktov (Gilmore a kol., 2002). Predstavujú baktérie, ktoré na jednej strane môžu spôsobiť ochorenia, avšak aj naopak, sú to baktérie, ktoré svojimi metabolitmi dokážu inhibovať rast baktérií vyvolávajúcich iné bakteriálne ochorenia. Niektoré enterokoky vykazujú prospešné vlastnosti ako je napr. produkcia substancií bielkovinovej povahy s antimikrobiálnym účinkom - bakteriocínov resp. enterocínov; preto sú viacerí zástupcovia rodu *Enterococcus* využívaní ako prospešné baktérie (Franz a kol., 2011, Lauková a kol., 1993). Niektoré enterocíny preukázali prospešné účinky v chove králikov, hydiny či koní (Lauková a kol., 2008, 2017, 2018). Napr. po podávaní Enterocínu M produkovaného kmeňom EFAL41=CCM8558 z taxonomického druhu *E. faecium* alebo durancin z kmeňa *E. durans* 26E/7 prejavili antibakteriálny účinok a stimulovali fagocytárnu aktivitu u vyššie zmieňovaných zvierat. Bakteriálny druh *Enterococcus villorum* bol prvýkrát izolovaný z hnačkujúcich ciciakov a popísaný ako nový taxonomický druh v rámci rodu *Enterococcus* (Vancanneyt a kol., 2001). Kmeň K12b bol izolovaný z trusu Slovenského teplokrvníka v strednom stupni záťaže. Vzhľadom na skutočnosť, že o mikrobiote koní ako takej a možnosti niektorých jej zástupcov produkovať antimikrobiálne bakteriocínové substancie sú len limitované informácie, bola táto štúdia zameraná na testovanie inhibičnej aktivity substancie produkovanej kmeňom *E. villorum/E. faecium* K12b s cieľom jej ďalšieho aplikačného využitia.

MATERIÁL A METODIKA

Kmeň *Enterococcus villorum/E. faecium* K12b bol izolovaný z trusu koňa. Vzorok trusu boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou podľa ISO s použitím M-Enterococcus agaru (Difco). Čistá kolónia bola postúpená identifikácii MALDI-TOF identifikačným systémom. Kmeň bol následne fenotypizovaný a osekvenovaný pomocou Blast analýzy. Inhibičná (bakteriocínová) aktivita kmeňa K12b bola najprv testovaná kvalitatívnou metódou podľa Skalku a kol. (1983) pri použití hlavného indikátorového kmeňa *Enterococcus avium* EA5 (izolát nášho laboratória). Následne bol pripravený supernatant z kmeňa K12b po jeho 18 h kultivácii v MRS bujóne (Merck, Nemecko) a centrifugácii (10 000 x g) 30 minút. Supernatant bol rozdelený na rovnaké objemy s rozdielnymi pH (4,5; 6,3 a 7,3). Inhibičná (bakteriocínová) aktivita supernatantu bola testovaná kvantitatívnou metódou tzv. agar spot testom podľa De Vuysta a kol. (1996) opäť na indikátorový kmeň *E. avium* EA5.

V stručnosti, Petriho miska s 1, 5 % mozgovo-srdcovým agarom (BHA, Difco™) bola preliata 0,7% agarom (4 ml) s obsahom 200 µl indikátorového kmeňa EA5. Inhibičná aktivita bola vyjadrená v Arbitrárných jednotkách na ml (AU/ml), čo zodpovedá najvyššiemu riedeniu substancie, ktorá ešte spôsobí inhibíciu rastu indikátorového kmeňa (AU/ml). Supernatant (60 ml pre každé pH 4,5; 6,3 a 7,3) bol následne 10 x zahustený s použitím koncentratora-Concentrator Plus (Eppendorf) a opäť bola testovaná jeho inhibičná aktivita na indikátorový kmeň *E. avium* EA5 a vyjadrená v AU/ml. Ako indikátorové kmene boli použité aj kmene *E. hirae* (15) izolované z trusu pštrosov a bažantov.

Následne bola pripravená čiastočne purifikovaná substancia tzv. precipitát: po 18 h kultivácii produkčného kmeňa K12b v MRS bujóne (Merck, Nemecko) a centrifugácii (10 000 x g) 30 minút a úprave pH supernatantu na 4,5 a 6,3 boli tieto supernatanty precipitované síranom amónnym pri laboratórnej teplote po dobu 4 hodín (40% saturácia). Získané precipitáty boli resuspendované v minimálnom objeme fosfátového pufru (10 mM, pH 6,5) a testované na inhibičnú aktivitu použijúc hlavný indikátorový kmeň *E. avium* EA5. Pre testovanie bolo použitých ešte 82 kmeňov stafylokokov izolovaných z rôznych zdrojov (trus koní, vysokej zvere, psa, črevný obsah bobrov alebo rýb).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prvotnou identifikáciou (MALDI-TOF systém) bol izolát K12b priradený ku taxonomickému druhu *Enterococcus villorum*. Identifikačné skóre dosiahlo hodnotu 2,152, čo odpovedá bezpečnej/pravdepodobnej identifikácii rodu (hodnota skóre 2,000-2,299). Kmeň bol následne osekvenovaný pomocou Blast analýzy, z jednej strany a sekvencia bola na 99.71% identifikovaná pre druh *E. faecium*. *E. faecium* je spolu s druhom *E. faecalis* najstarším druhom patriacim do rodu *Enterococcus* (Takashi a kol., 1999). Patrí aj medzi najčastejšie zastúpenú enterokokovú mikrobiotu u zvierat. Lauková a kol. (2008) detegovali *E. faecium* ako najčastejší druh v gastrointestinálnom trakte koní. Detegovanie kmeňa z taxonomického druhu *E. villorum* bolo prekvapujúce; avšak sekvenácia potvrdila zaradenie kmeňa K12b ku druhu *E. faecium*.

Pri kvalitatívnej metóde testovania inhibičnej (bakteriocínovej) aktivity kmeňa EV K12b bol rast hlavného indikátorového kmeňa *E. avium* EA5 inhibovaný pri veľkosti inhibičnej zóny 24 mm. Pri kvantitatívnej metóde bola inhibičná aktivita supernatantu s pH 7,3 800 AU/ml (na *E. avium* EA5); supernatanty s pH 6,3 a 4,5 vykazovali nižšiu aktivitu (200 AU/ml).

Pri testovaní inhibičnej aktivity koncentrátu s pH 6,3 dosiahla aktivita 102 800 AU/ml pri použití indikátora *E. avium* EA5, v prípade koncentrátu s pH 4,5 to bola aktivita 51 200 AU/ml. Pri koncentráte o pH 7,3 bola aktivita najnižšia - 6 400 AU/ml. Pri použití koncentrátu s pH 4,5 bol inhibovaný rast 15 kmeňov *E. hirae* pri aktivite do 400 AU/ml; koncentrát s pH 6,3 inhiboval rast kmeňov s aktivitou 400-800 AU/ml. Pri použití koncentrátu o pH 7,3 bol rast kmeňov *E. hirae* inhibovaný s aktivitou 400, 800 a 1 600 AU/ml. V rámci 82 indikátorových kmeňov stafylokokov bol po ošetrení koncentrátom K12b s pH 4,5 inhibovaný rast 55 kmeňov s inhibičnou aktivitou 100 AU/ml a to nasledovne: z 9 kmeňov *S. epidermidis* bol inhibovaný rast 3 kmeňov (K9PL/1, SER44/1 a SE89); z 10 kmeňov *S. haemolyticus* boli inhibované 4 kmene. Inhibované boli tiež kmene *S. hominis* (5 z 8 kmeňov), ako aj jeden kmeň z 5 kmeňov *S. capitis* (Sca P8). Inhibovaný bol tiež rast 20 kmeňov *S. vitulinus*; po jednom kmeni zástupcovia z druhov *S. intermedius*, *S. arlettae*, *S. aureus*, *S. lentus*, *S. succinus*, 5 kmeňov *S. cohnii* a 3 kmene *S. equorum*. Kmene *S. pasteurii*, *S. xylosus* a *S. warneri* inhibované neboli. Pri koncentráte K12b s pH 6,3 bolo z 82 stafylokokov inhibovaných 38; 16 z 20 kmeňov *S. vitulinus*, 2 kmene z 9 *S. epidermidis*, 1 z 10 kmeňov *S. haemolyticus*, 5 z 8 *S. hominis*, 3 zo 6 *S. warneri*, 2 *S. cohnii* a po jednom kmeni *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. aureus*, *S. arlettae*, *S. lentus* a *S. xylosus*. Precipitát K12b (pH 4,5) vykazoval najvyššiu inhibičnú aktivitu na kmeň *E. avium* EA5 - 204

800 AU/ml; zatiaľ čo precipitát s pH 6,3 dosiahol aktivitu 6 400 AU/ml. Inhibičná aktivita precipitátu K12b s pH 4,5 bola otestovaná aj na 40 kmeňov stafylokokov; tieto boli citlivé ku koncentrátu K12b (s pH 4,5). Najviac inhibované boli kmene *S. epidermidis* SEK9PL/1 z trusu koní (25 600 AU / ml), *S. vitulinus* SvK6PL/1, K6PL/2, K8PL/1, K15PL/1 (25600 AU ml) a *S. cohnii* ScoK6/1 z koňa (25 600 AU/ml). Bakteriocíny produkované zástupcami z rodu *Enterococcus* patria medzi substancie so širokospektrálnou inhibičnou aktivitou (Lauková a kol., 1993; Franz a kol., 2007), čomu zodpovedá i substancia kmeňa K12b, aj keď v testovaní ešte pokračujeme.

Substancia z kmeňa *E. villorum/E. faecium* K12b vykazuje výraznú inhibičnú aktivitu. V rámci supernatantov bol najaktívnejší supernatant o pH 7,3; ale ako koncentrát vykazoval nižšiu aktivitu na indikátor EA5 než na ostatné indikátory. Najaktívnejším bol koncentrát o pH 6,3, ktorý dosahoval aktivitu 102 400 AU/ml pri indikátore EA5. Významným zistením je inhibícia rastu 55 z 82 kmeňov stafylokokov pri použití koncentrátu o pH 4,5. Najaktívnejšou substanciou bol precipitát K12b o pH 4,5, ktorý na indikátorový kmeň *E. avium* EA5 vykazoval aktivitu až 204 800 AU/ml. V testovaní pokračujeme; je možné aplikačné zavedenie substancie K12b nielen v chove koní.

Táto práca vznikla za podpory projektu č. 2/0006/17, grantovej agentúry VEGA.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- De Vuyst L, Callewaert R, Pot B. Characterization of antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE471 and large-scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. *Syst. Appl. Microbiol.* 1996; 19: 9-20.
- Franz CHMAP, et al. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol.* 2011; 151: 125 - 140.
- Gilmore MS, et al. Enterococcal virulence in the Enterococci: Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, DC. 2002; 301-354.
- Lauková A, Mareková M, Javorský P. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231. *Lett. Appl. Microbiol.* 1993; 16: 257 - 260.
- Lauková A, et al. Potential of enterococci isolated from horses. *Anaerobe*, 2008; 14:234-236.
- Lauková A, et al. Beneficial effect of bacteriocin-producing strain *Enterococcus durans* ED 26E/7 in model experiment using broiler rabbits. *Czech J Anim Sci.* 2017; 62: 168-177.
- Lauková A, et al. Enterocin M and its Beneficial Effects in Horses- a Pilot Experiment. *Prob Antimicrob Prot.* 2018; 10: 420-426.
- Skalka B, Pillich J, Pospíšil L. Further observation on *Corynebacterium renale* as an indicator organism in the detection of exfoliation-positive strains of *Staphylococcus aureus*. *Zentralbl Bacteriol Hyg.* 1983; A256:168-174.
- Strompfová V, Lauková A. *In vitro* study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens. *Anaerobe.* 2007; 13: 228-237.
- Takashi T, Satoh I, Kikuchi N. Phylogenetic relationship of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Bacteriol.* 1999; 49:725-728.
- Vancanneyt M, et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001; 51: 393-400.

NOVÉ MOŽNOSTI DIAGNOSTIKY CHRONICKÝCH OCHORENÍ OBLIČIEK

Grelová S.

Klinika malých zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V praxi malých zvierat sa hlavne u mačiek stále častejšie stretávame s chronickým ochorením obličiek. Toto ochorenie patrí medzi jedno z najčastejších a postihuje až 30% mačiek starších ako 10 rokov. Ide o progresívnu, nezvratnú stratu funkčných nefrónov vedúcu k úplnej strate funkcie obličiek prejavujúcu sa urémiou. V snahe spomaliť priebeh tohto ochorenia sa pozornosť zameriava hlavne na skorú diagnostiku a terapeutickú intervenciu. Včasná diagnostika sa zameriava na využitie nového špecifického biomarkeru SDMA, ktorý odhalí degradáciu funkcie obličiek ešte pred samotným zvýšením kreatinínu.

ÚVOD

Chronické ochorenie obličiek (CKD-*Chronic kidney disease*) patrí medzi jedno z najčastejších metabolických ochorení mačiek starších ako 10 rokov (Lulich a kol. 1992) a je doprevádzané funkčnými a štrukturálnymi abnormalitami jednej alebo oboch obličiek. CKD vzniká následkom dlhotrvajúcich inzultov poškodzujúcich obličku do takej miery, že dôjde k strate funkčných nefrónov. Spektrum týchto primárnych ochorení je široké, väčšinou sa však počiatočná príčina neodhalí (Chakrabarti a kol., 2013). V praxi malých zvierat sa CKD diagnostikuje na základe zvýšených hodnôt kreatinínu a urey, a teda k diagnóze CKD dochádza často až po nástupe zjavných klinických príznakov s rozvojom azotémie.

DIAGNOSTIKA CKD

Kombinácia azotémie, nevhodne koncentrovaného moču (MH < 1,035 u mačiek) a štrukturálnych abnormalít obličiek tvorí základ diagnostiky CKD. Vzťah medzi kreatinínom a rýchlosťou glomerulárnej filtrácie nie je lineárny, a zvýšenie sérového kreatinínu odráža až 75% stratu funkcie nefrónov (Von Hendy-Willson a Pressler, 2011). Kreatinín je tiež ovplyvňovaný rôznymi extra-renálnymi faktormi, hlavne prítomnosťou dehydratácie a stratou svalovej hmoty (Grauer, 2019). Táto skutočnosť podnecuje výskum nových molekúl, ktorých hladina sa zvyšuje ešte pred vzostupom kreatinínu.

NOVÝ BIOMARKER FUNKCIE OBLIČIEK

Medzi nové biomarkery hodnotenia glomerulárnej filtrácie patrí symetrický dimetylgarginín (SDMA), ktorý umožňuje skoršiu diagnostiku ochorenia obličiek ako tradičné testovanie kreatinínu a bol zahrnutý ako súčasť usmernení IRIS (*International renal interest society*) (Tab. 1) na stanovenie štádia skorého aj pokročilého CKD u mačiek a psov (Hall a kol., 2014; Braff a kol., 2014). SDMA je stabilná molekula, ktorá pochádza z intracelulárnych proteínov, ktoré zohrávajú neoddeliteľnú úlohu v základnom bunkovom metabolizme. SDMA a príbuzné zlúčeniny sa produkujú v jadre všetkých buniek. K ich tvorbe dochádza obligátnou posttranslačnou modifikáciou a metyláciou arginínových zvyškov rôznych proteínov a následnou proteolýzou (Kielstein a kol., 2006). Malá molekulová hmotnosť SDMA (202 g / mol) a kladný náboj umožňujú voľné filtrovanie glomerulárnou membránou. Pretože SDMA sa z väčšej časti vylučuje obličkami, je dobrým kandidátom na biomarker pre funkciu obličiek (Glorieux a kol., 2016). V prvej klinickej štúdii SDMA u veterinárnych pacientov so spontánnym ochorením obličiek, Jepson a kol. (2018) uviedli, že SDMA dobre korelovala s kreatinínom ($r = 0,741$; $P < 0,001$) u 69 mačiek s CKD a hypertenziou. V inej štúdii sa v populácii geriatrických mačiek s prirodzene sa vyskytujúcim chronickým ochorením obličiek sa plazmatická koncentrácia SDMA v priemere zvýšila o 17 mesiacov pred zvýšením koncentrácie kreatinínu v plazme nad hornú referenčnú hranicu (Hall a kol. 2014). Štúdie

preukázali, že na rozdiel od sérového kreatinínu je hladina SDMA nezávislá od osvalenia, takže je citlivejším markerom pre ochorenie obličiek u pacientov s rôznymi príčinami straty svalovej hmoty (Hall a kol., 2015).

Tab 1.: IRIS klasifikácia CKD

Koncentrácie kreatinínu ($\mu\text{mol/l}$)			
SDMA ($\mu\text{g/dl}$)			
< 140	140 – 250	251 - 440	> 440
< 18	18 – 25	26 - 38	> 38
Stupeň 1	Stupeň 2	Stupeň 3	Stupeň 4
Neazotemické	Mierna renálna azotémia	Stredná renálna azotémia	Ťažká renálna azotémia
Prítomné obličkové abnormality (neschopnosť koncentrovať moč, abnormálna renálna palpácia)	Klinické príznaky mierne alebo chýbajú	Môžu byť prítomné extrarenálne klinické príznaky	Zvýšené riziko systémových klinických príznakov a uremickej krízy

Projekt je podporovaný grantom IGA 2019/2020 Vzťah medzi SDMA, FGF-23 a aldosterómom na podklade chronickej choroby obličiek u mačiek.

ZÁVER

Rutinné využívanie SDMA v diagnostike renálnych ochorení umožňuje včasné zachytenie poklesu funkcie obličiek a umožní rýchlu terapeutickú intervenciu, spomalenie progresie ochorenia a zlepšenie kvality života pacientov.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Braff J, et al. Relationship between serum symmetric dimethylarginine concentration and glomerular filtration rate in cats. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1699–1701
- Chakrabarti S, et al. Histomorphometry of feline chronic kidney disease and correlation with markers of renal dysfunction. *Veterinary Pathology* 2013;50:147–155
- Glorieux G, et al. Uraemic toxins: overview. *Oxford textbook of clinical nephrology.* 4. vydanie. Oxford (United Kingdom): Oxford University Press; 2016. p. 2161–73
- Grauer GF. Reassessment of „normal“ values in dogs and cats with chronic kidney disease 2019. From http://www.iris-kidney.com/education/ckd_assessment_levels.html
- Hall JA, et al. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2014;28:1676–1683
- Hall JA, et al. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2015;3:808–14
- Jepson RE, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, l-arginine and nitrite/nitrate concentrations in cats with chronic kidney disease and hypertension. *J Vet Intern Med* 2008;22:317–24
- Kielstein JT, et al. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function – a meta analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2445–51
- Lulich JP. Feline renal failure: questions, answers, questions. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1992; 14:127-152
- Von Hendy-Willson VE, Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Veterinary Journal* 2011; 188(2):156-165

ANALÝZA PRÍTOMNOSTI APOPTOTICKÝCH MARKEROV V BUNKÁCH MIECHY POTKANA POČAS POSTNATÁLNEHO OBDOBIA

Holota R.¹, Alexovič Matiašová A.¹, Slovinská L.², Tomori Z.³ Daxnerová Z.¹, Ševc J.¹
¹ *Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta Univerzita Pavla
Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice*
² *Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Košice*
³ *Ústav experimentálnej fyziky SAV, Košice*

ABSTRAKT

Apoptóza zohráva dôležitú úlohu počas embryonálneho vývinu nervového systému, kde prostredníctvom tohto procesu dochádza k odstraňovaniu vysokého množstva nervových a gliových buniek. Rola apoptózy v mieche hlodavcov v postnatálnom období však nie je detailne preskúmaná, preto sme sa v bunkách miechy potkana v skorom postnatálnom období a v dospelosti zamerali na analýzu prítomnosti dvoch často využívaných markerov odumierajúcich buniek – aktivovanej kaspázy-3 a poštiepenej formy proteínu PARP-1. Na základe imunofluorescenčného značenia sme identifikovali masívnu populáciu buniek s aktivovanou formou kaspázy-3 (aC3), pričom počet týchto buniek v oboch študovaných intervaloch (P8=1965579±168429 buniek/mm³, P90=341372±10929 buniek/mm³) výrazne prevyšoval počet buniek, u ktorých bola pozorovaná poštiepená forma proteínu PARP-1 (cPARP) (P8=2766±261 buniek/mm³, P90=819±159 buniek/mm³). Nepomer v počte buniek s poštiepenou formou proteínu PARP-1 a aktivovanou formou kaspázy-3, ktorý sme zaznamenali v našich analýzách, ako aj morfológia buniek, ich distribúcia v mieche a fenotypové zastúpenie indikujú, že kým populácia buniek u ktorých dochádza k poštiepeniu proteínu PARP-1 predstavuje populáciu odumierajúcich buniek, len malá časť buniek s aktivovanou kaspázou-3 skutočne podstupuje apoptózu. Naše výsledky naznačujú, že k aktivácii kaspázy-3 by v bunkách nervového tkaniva miechy mohlo dochádzať aj v priebehu neapoptotických procesov, akými sú diferenciácia či proliferácia.

ÚVOD

Apoptóza ako fyziologický spôsob odumierania buniek predstavuje jeden z hlavných mechanizmov podieľajúcich sa na vývine orgánových sústav (Elmore, 2007). V embryonálnom období hrá apoptóza významnú rolu vo vývine nervového systému, kde týmto spôsobom odumierajú nadpočetné neuróny a gliové bunky (Yuan a kol., 2000). Dáta o apoptóze buniek v mieche hlodavcov a ich fenotype v priebehu postnatálneho obdobia sú však pomerne strohé (Lawson a kol., 1997). Je známe, že do molekulových dráh apoptózy sú zapojené početné signálne proteíny a enzýmy, medzi ktoré patria aj vysoko špecifické protéazy nazývané kaspázy. Kým iniciačné kaspázy sú zapojené do transdukcie apoptotického signálu, efektorové kaspázy sú prostredníctvom štiepenia početných substrátov zodpovedné za morfológické zmeny a rozpad bunky na membránou obalené apoptotické telieska (Taatjes a kol., 2008). Medzi substráty kaspáz patrí aj proteín PARP-1, bežne zapojený do opráv DNA, ktorý je počas apoptózy štiepený kaspázou-3 a/alebo 7 na dva fragmenty. Kým jeden z fragmentov proteínu PARP-1 stráca pôvodnú funkciu a opúšťa svoje miesto v jadre, druhý fragment prostredníctvom väzby na DNA napomáha progresii apoptózy (Soldani a kol., 2002). Na odhalenie apoptózy v bunkách miechy potkana v skorom postnatálnom období (8. postnatálny deň, P8) a v dospelosti (90. postnatálny deň, P90) sme v našej práci použili imunofluorescenčnú detekciu aktivovanej formy kaspázy-3 (aC3) a poštiepenej formy proteínu PARP-1 (cPARP), ktoré sú bežne aplikované v imunohistochemických a imunofluorescenčných analýzách ako markery odumierajúcich buniek. Na identifikáciu fenotypu odumierajúcich buniek sme uskutočnili kolokalizačnú štúdiu markerov apoptózy s markermi neurónov, astrocytov a oligodendrocytov.

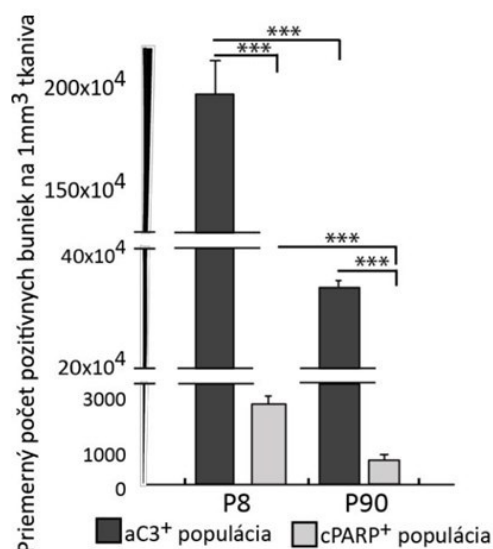
MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité samce potkanov kmeňa Wistar vo veku 8. a 90. postnatálny deň (P8 a P90). V každom časovom intervale bola použitá skupina troch zvierat ($n=3$). Po transkardiálnej perfúzii fyziologickým roztokom a roztokom 4% paraformaldehydu boli izolované miechy postfixované, prenesené do sacharózy a následne pomocou zmrazovacieho mikrotómu narezané na 40 μ m hrubé koronárne tkanivové rezy. Získané vzorky tkaniva boli spracované pomocou protokolu pre imunofluorescenčné značenie pomocou protilátok voči aktivovanej forme kaspázy-3 (aC3) a poštiepenej forme proteínu PARP-1 (cPARP). Na identifikáciu fenotypu buniek boli použité protilátky voči proteínu Neun (neuróny), Olig2 (oligodendrocyty) a S100 (astrocyty). Počet cPARP⁺ buniek v tkanive miechy bol vyhodnotený pomocou fluorescenčného mikroskopu. Populácia aC3⁺ buniek bola analyzovaná pomocou softvéru Confocounter vyvinutého doc. Tomorim z Ústavu experimentálnej fyziky SAV, ktorý umožňuje pomocou stereologických metód v trojrozmerných snímkach zhotovených pomocou konfokálneho mikroskopu vyhodnotiť početnosť vysoko zastúpených populácií buniek.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V prvom kroku sme sa zamerali na analýzu prítomnosti apoptotických buniek v mieche potkanov vo veku P8, kde sme identifikovali výrazný nepomer v priemernom počte aC3 a cPARP pozitívnych buniek. Kým aC3⁺ bunky v mieche potkana na P8 predstavujú masívnu bunkovú populáciu (1965579 \pm 16849 buniek/mm³, Obr.1) zastúpenú viac v bielej, ako v sivej hmote (Obr.2A), cPARP⁺ bunky, ktoré sú prítomné najmä v sivej hmote miechy (Obr.2B), predstavujú menej ako tisícinu tejto populácie (2766 \pm 261 buniek/mm³). Fenotypová analýza dokázala, že najviac zastúpenými bunkami aC3⁺ populácie sú astrocyty, ktoré v niektorých oblastiach miechy predstavujú takmer tri štvrtiny všetkých aC3⁺ buniek. Okrem astrocytových buniek, sme identifikovali aj početnú populáciu aC3⁺ oligodendrocytov, kým aC3⁺ neuróny mali výraznejšie zastúpenie len v dorzálnych rohoch sivej hmoty miechy. cPARP⁺ bunky boli v sivej hmote zastúpené prevažne neurónmi a malou populáciou astrocytov. V bielej hmote bola táto málo početná populácia zastúpená prevažne oligodendrocytmi.

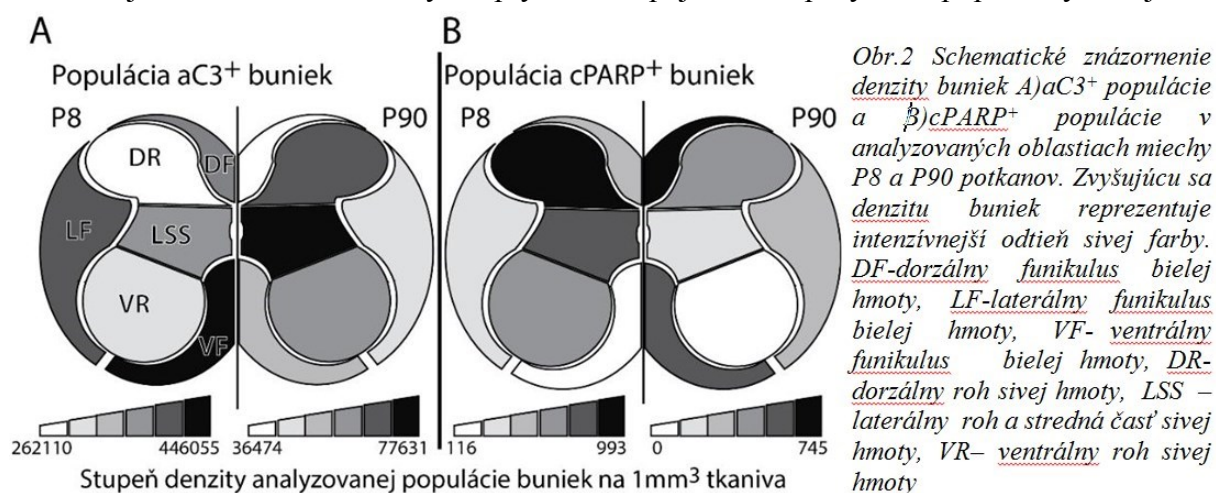
Aj napriek tomu, že v mieche P90 potkanov je priemerný počet aC3⁺ populácie (341371 \pm 10928 buniek/mm³, Obr.1) oproti tkanivu potkanov vo veku P8 menší, predstavuje nezanedbateľne veľkú populáciu vysoko prevyšujúcu priemerný počet cPARP⁺ buniek (819 \pm 159 buniek/mm³, Obr.1). V porovnaní s tkanivom mladých zvierat je aC3⁺ populácia u dospelých jedincov zastúpená prevažne v sivej hmote (Obr. 2A). Tieto rozdiely však môžu byť spôsobené zmenou denzity buniek v analyzovaných oblastiach súvisiacich s rastom tkaniva potkana počas jeho dospievania. Fenotypová analýza u aC3⁺ populácie opäť preukázala vyššie zastúpenie gliových buniek oproti aC3⁺ neurónom lokalizovaným rovnako ako u zvierat vo veku P8 v dorzálnych rohoch sivej hmoty miechy. cPARP⁺ populácia bola



Obr.1 Početnosť buniek značených protilátkami anti-aC3 a anti-cPARP na mm³ tkaniva miechy potkana v skorom postnatálnom veku (P8) a dospelého jedinca (P90)

výraznejšie zastúpená len v oblasti dorzálneho funikulu bielej hmoty (Obr.2B), kde boli identifikované prevažne cPARP⁺ pozitívne oligodendrocyty.

V súčasnosti je známe, že kaspázy môžu zohrávať v nervových bunkách úlohu aj v neapoptotických dejoch, napr. diferenciácia neurónov, ktorá bolo pozorovaná v *in vitro* prostredí (Fernando a kol., 2005), či proliferácia neurónov v proliferáčnych zónach mozgu (Yan a kol., 2001). Naše výsledky naznačujú, že za výrazný nepomer v početnosti sledovaných populácií môže byť u mladých (P8) zvierat zodpovedné práve zapojenie aC3 do týchto procesov. Výrazný nepomer v počte cPARP⁺ a aC3⁺ populácie u dospelých jedincov, u ktorých sú vývinové procesy ukončené naznačuje možné zapojenie kaspázy-3 aj do ďalších fyziologických dejov, ktoré je potrebné preskúmať. Z prezentovaných výsledkov vyplýva, že kým cPARP predstavuje spoľahlivý marker apoptózy buniek v tkanive miechy v postnatálnom období, imunofluorescenčná detekcia aktivovanej formy kaspázy-3 v odumierajúcich bunkách môže byť ovplyvnená zapojením kaspázy v neapoptotických dejoch.



Táto práca bola financovaná z projektov VEGA 1/0760/20 a APVV-15-0239.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
- Fernando P, Brunette S, Megeney LA. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J.* 2005;19(12):1671-1673.
- Lawson SJ, et al. Evidence that spinal interneurons undergo programmed cell death postnatally in the rat. *Eur J Neurosci.* 1997;9(4):794-799.
- Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis.* 2002;7(4):321-328.
- Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol.* 2008;129(1):33-43.
- Yan XX, et al. Expression of active caspase-3 in mitotic and postmitotic cells of the rat forebrain. *J Comp Neurol.* 2001;433(1):4-22.
- Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature.* 2000;407(6805):802-809.

OVPLYVNIENIE POPULÁCIE NEURÁLNYCH PROGENITOROVÝCH BUNIEK PROSTREDNÍCTVOM PRODUKTOV MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK

Humeník F.¹, Maloveská M.¹, Hudáková N.¹, Vikartovská Z.^{1,3}, Hornáková L.³, Čížková D.^{1,2}

¹Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, UVLF, Košice

²Neuroimunologický ústav, SAV, Bratislava

³Univerzitná veterinárna nemocnica, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Neurodegeneratívne a traumatické ochorenie CNS predstavujú závažný problém tak v humánnej, ako aj vo veterinárnej medicíne. V tejto oblasti je rozpracovaných mnoho stratégií a prístupov, ktoré zahŕňajú chirurgickú intervenciu, medikamentóznou liečbu a následnú rehabilitáciu. V súčasnosti sa však do popredia dostávajú inovatívne riešenia akou je bunková terapia. Hlavným cieľom tejto práce bolo poukázať na ovplyvnenie rastu a prežívania populácie neurálnych progenitorových buniek, ktorých zdrojom bol cerebrálny kortex, prostredníctvom mezenchymálnych kmeňových buniek. Mezenchymálne kmeňové bunky boli izolované z tukového tkaniva (AT MSCs) a pupočného povrazca (UC MSCs) psov a následne ocharakterizované prietokovou cytometriou pre potvrdenie prítomnosti CD90+ a CD29+ buniek, ktoré tvorili základ pre získanie kondicionovaného média. Vplyv produktov MSCs na populáciu NPCs sme skúmali aplikáciou kondicionovaného média a následnou analýzou nameraných výsledkov absorbančie MTT testu. Získané výsledky poukazujú na fakt, že produkty MSCs podporujú rast už existujúcich ako aj nových neuritov a súčasne UC MSCs pozitívne ovplyvňujú metabolickú aktivitu buniek vo vyššej miere ako negatívna kontrola (0.1911 ± 0.023 vs 0.1264 ± 0.0044) na rozdiel od AT CM kde namerané výsledky poukazujú na metabolickú aktivitu blízku negatívnej kontrole (0.1519 ± 0.0247 vs 0.1264 ± 0.0044).

ÚVOD

Neurálne progenitorové kmeňové bunky (NPCs) predstavujú multipotentné bunky schopné samoobnovy a diferenciacie na 4 základné línie – astrocyty, oligodendrocyty, mikrogliu a neuróny (Horner a kol., 2000). Mezenchýmové kmeňové bunky (MSCs) je možné charakterizovať ako multipotentné kmeňové bunky, fibroblastoidného tvaru s výraznou schopnosťou samoobnovy. Podľa International Society for Stem Cells Research musia MSCs spĺňať následné požiadavky: (1) adhéncia v štandardnej statickej kultúre, (2) expresia povrchových markerov CD105, CD73 a CD90 pri súčasnej absencii CD45, CD34, CD14/CD11b, CD79/CD19 a HLA-DR a (4) multilíniový potenciál (Dominici a kol., 2006). Pre MSCs je taktiež typický imunomodulačný, parakrínny a patotrofický efekt (Hofer a Tuan, 2016). Predovšetkým parakrínny a imunomodulačný efekt spôsobený sekréciou cytokínov, chemokínov a rastových faktorov zohráva úlohu v inovatívnej terapii hojenia, reparácie a regenerácie poškodeného tkaniva. Všetky vyššie spomenuté substancie je možné získať izoláciou kondicionovaného média (CM) (Kang a kol., 2012). Cieľom tejto štúdie bolo porovnať vplyv CM izolovaného z MSCs pupočného povrazca (UC CM) a MSCs tukového tkaniva (AT CM) na prežitie, metabolickú aktivitu a prerastanie neuritov v populácii neurálnych progenitorových buniek (NPCs).

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia, kultivácia MSCs a príprava kondicionovaného média

Podkožný tuk (5-7g) sme získali počas operačného zákroku zo skapulárnej oblasti čistokrvného psa plemena nemecký ovčiak (vek 3 roky, hmotnosť 36kg). Pupočný povrazec sme získali počas cisárskeho pôrodu od šteniat plemena rotwailer (počet narodených šteniat $n=2$, hmotnosť 465g a 425g). Získané tkanivo bolo následne niekoľkokrát premyté

fosfátovým pufrom s obsahom 2 % antibiotika a antimykotika (penicilín-streptomycín-amfotericín B) (Biowest), mechanicky rozdisociované a enzymaticky natrávené 0,25% roztokom Kolagenázy typ I (Gibco) pri teplote 37° po dobu 30 minút. Následne bol celý obsah prefiltrovaný použitím 100 µm sitka z dôvodu odstránenia tkanivových fragmentov. Získaná suspenzia bola následne centrifugovaná pri 400g po dobu 10 minút. Získaná peletka obsahujúca stromálnu vaskulárnu frakciu bola rozsuspendovaná v kultivačnom médiu zloženom z MEM Alpha, 10% fetálne bovinné sérum a 1% ATB + ATM (všetko Biowest) a nasadená na kultivačnú fľašu s obsahom 25cm². Neadherované bunky boli po dvoch dňoch kultivácie odstránené. Výmena média prebiehala 2x týždenne. Kondicionované médium sme získavali z bunkových populácií AT MSCs a UC MSCs v tretej pasáži. Bunky boli kultivované v Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Biowest) bez FBS a ATB-ATM počas 24h, pri teplote 37°C a 5% CO₂. Získané CM bolo prefiltrované použitím 0,2µm filtra a následne uskladnené pri -80°C.

Izolácia primárnej kultúry NPCs

NPCs sme izolovali z mozgu potkaních mláďat plemena Wistar (n=3) na tretí deň po narodení. Zvieratá boli usmrtené a tkanivo izolované podľa schváleného protokolu (Ro739/17-221). Následne boli odstránené mozgové obaly, celá mozgová kôra bola sterilne odobratá a získané tkanivo bolo mechanicky rozdisociované a enzymaticky natrávené použitím 0,25% roztoku Kolagenázy typu IV a trypsínu (všetko Gibco) pri teplote 37°C po dobu 30 min. Po ukončení inkubácie bola suspenzia presítkovaná použitím 100 µm sitka a centrifugovaná pri 300g/12 min. Získaná peletka bola rozsuspendovaná v kompletnom proliferáčnom kultivačnom médiu pozostávajúcom z Dulbecco's Modified Eagle Medium and Ham's F12 (DMEM-F12, Biosera) 1% ATB + ATM, B27, N2 (Gibco), bFGF (20 ng/ml) (Milipore), EGF (20 ng/ml) (AppliChem), 5% FBS pri 37 °C, 5% CO₂ počas 4 dní.

Kvantifikácia rastu neuritov a MTT test

Po uplynutí 4 dní, keď NPCs dosiahli typický tvar neurosfér a cca 70% konfluenciu, sme bunky odtrypsinizovali použitím 0,25% trypsínu a opätovne nasadili na 96 jamkové platničky pre posúdenie rastu neuritov a metabolickej aktivity. NPCs boli kultivované v DMEM médiu s 5% FBS a 1% ATB+ATM počas 2 dní pokiaľ adherovali. Následne bolo médium nahradené : i) AT CM, ii) UC-CM, iii) negatívnu CTR (DMEM bez suplementov a iv) pozitívnu CTR (DMEM + B27(10 ng/ml), N2 (10 ng/ml), recombinant human bFGF (20 ng/ml) and human EGF (20 ng/ml)) a kultivované počas 3 dní. Počet výbežkov bol kvantifikovaný na prvý, druhý a tretí deň použitím Zeiss softvéru (Carl Zeiss AxioVision software). Výbežky boli počítané v desiatich rôznych poliach a následne spriemerované. Následne bol vykonaný na všetkých skupinách MTT test pre určenie metabolickej aktivity podľa odporúčaného protokolu. Získané výsledky sme štatisticky vyhodnotili prostredníctvom One-way ANOVA testu použitím GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

UC CM a AT CM zlepšujú rast neuritov. Médium pozitívnej kontroly, ktoré obsahovalo vysokú koncentráciu rastových faktorov vykazovalo najlepší efekt na zvýšenie celkového počtu výbežkov neurónov medzi 1. a 3. dňom (nárast o 91,98% v porovnaní s negatívnou kontrolou. Je nutné zdôrazniť, že koncentrácia rastových faktorov v médiu pozitívnej kontroly značne prevyšovala fyziologické hodnoty, preto nie je štatisticky možné porovnať výsledky pozitívnej kontroly a experimentálnej skupiny AT CM a UC CM. Výsledky experimentálnej skupiny UC CM vykazujú štatisticky významný nárast počtu výbežkov oproti negatívnej kontrole na druhý deň (p<0.01) a tretí deň (p<0.01), nie však na prvý deň (p=0.0709). Podobne experimentálna skupina AT CM vykazuje štatisticky významný nárast počtu

výbežkov na prvý deň ($p < 0.05$) avšak nie v nasledujúcich dňoch (deň2: $p = 0.5689$; deň3: $p = 0.69$).

Výsledky MTT analýzy poukazujú na fakt, že bunky kultivované v médiu pozitívnej kontroly produkujú v MTT teste viac formazánu ako bunky inkubované v médiu negatívnej kontroly. Avšak, využitím štatistickej metódy jendnokrokového ANOVA testu sme nezistili významné odchýlky ($p = 0.0574$). Avšak je zaujímavé, že namerané výsledky absorbcie získané MTT testom dokazujú že UC CM pozitívne ovplyvňuje metabolizmus buniek vo vyššej miere ako negatívna kontrola (0.1911 ± 0.023 vs 0.1264 ± 0.0044) na rozdiel od AT CM kde sú namerané výsledky podobné ako v negatívnej kontrole (0.1519 ± 0.0247 vs 0.1264 ± 0.0044).

V našej štúdii sme potvrdili pozitívny vplyv kondiciovaného média izolovaného z bunkovej populácie psích mezenchýmových kmeňových buniek tukového tkaniva a pupočného povrazca na rast neuritov, prežívanie a metabolizmus populácie NPCs. Táto skutočnosť je zapríčinená najmä obsahom rastových faktorov ako sú VEGF, IGF 1, β -NGF, PDGF, TGF- β , BDNF, GDNF a TGF II majúci pozitívny vplyv na neuronálne populácie buniek prostredníctvom ovplyvnenia imunomodulačných a neurotrofných mechanizmov ((Gu a kol., 2010), (Constantin a kol., 2009), (Nakamura a kol., 2020), (Crigler a kol., 2006)).

Štúdia bola podporená projektami APVV-19-0193, VEGA 1/0376/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Constantin G, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells Dayt.* 2009; 27:2624–2635.
- Crigler L, et al. Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp. Neurol.* 2006; 198:54–64.
- Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8: 315–317.
- Gu W, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* 2010; 30: 205–217.
- Hofer HR, Tuan RS. Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Res. Ther.* 2016; 7:131.
- Kang SK, et al. Journey of mesenchymal stem cells for homing: strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells Int.* 2012; 342968.
- Nakamura M, et al. Canine mesenchymal stromal cell-conditioned medium promotes survival and neurite outgrowth of neural stem cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2020; 82, 668–672.

PREPOJENIE KVALITATÍVNEHO SCREENINGU A ELISA METÓDY PRI STANOVENÍ KOKCIDIOSTATÍK V KRMIVÁCH A ICH REZÍDUIÍ V TKANIVÁCH BROJLEROVÝCH KURČIAT

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 bez a po skrmovaní kŕmnej zmesi s prídavkom kokcidiostatika, v šŕave získanej z vyšetrovaných tkanív a v komerčných kŕmnych zmesiach pre hydinu. K stanoveniu boli použité mikrobiologické tubové screeningové metódy, Premi®Test a Explorer 2.0 test, platňový screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR) a kompetitívny enzýmový imunotest Ionophore EIA. Všetky tri screeningové metódy detegovali pozitívne, resp. dubiózne výsledky a poukázali na prítomnosť salinomycínu a jeho rezíduí vo vyšetrovaných vzorkách. Výsledok screeningových metód bol potvrdený a kvantitatívne vyhodnotený ELISA testom. Prepojenie screeningových testov a metódy ELISA jednoznačne predstavuje účinný nástroj na stanovenie rezíduí kokcidiostatík v rámci prvotného screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok.

ÚVOD

Kŕmne doplnkové látky (KDL) sú látky, mikroorganizmy, alebo prípravky odlišné od kŕmnych surovín a premixov, ktoré sa zámernie pridávajú do krmiva alebo do vody. Tieto látky musia priaznivo ovplyvňovať vlastnosti krmiva, vlastnosti živočíšnych produktov, uspokojovať nutričné potreby zvierat, priaznivo ovplyvňovať živočíšnu výrobu a úžitkovosť zvierat a pri kokcidiostatikách aj ničiť alebo brzdiť rast prvkov (Nariadenie (ES) č. 1831/2003). Zaradenie kokcidiostatík medzi KDL má veľký význam v dôsledku toho, že bez ich kontinuálneho podávania v krmive by nebol možný odchov cieľových druhov zvierat, predovšetkým hydiny. Ich bezpečnosť pre zvieratá, používateľov, spotrebiteľov a životné prostredie sa posudzuje Európskym úradom pre bezpečnosť potravín. Súčasťou hodnotenia bezpečnosti je aj stanovenie maximálnych limitov rezíduí pre kokcidiostatiká v živočíšnych produktoch cieľových i necieľových druhov zvierat (http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-20_08-SK.pdf). Kŕmivá, hydina a jej živočíšne produkty sú na kokcidiostatiká povinne kontrolované. Kokcidiostatiká patria medzi antimikrobiálne látky a preto sme na ich prvotný screening v testovaných maticiaciach hodnotili tri screeningové mikrobiálne inhibičné metódy, Premi®Test (R–Biopharm AG, GER) a Explorer 2.0 test (Zeu-Inmunotec, ESP), platňový screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (STAR) a špecifický kompetitívny enzýmový imunotest Ionophore EIA (EuroProxima, R–Biopharm NL, B.V.).

MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme ako vyšetrovaný materiál použili komerčné kŕmne zmesi (KKZ) BR2 a BR3 (DeHeus, ČR) a tkanivá brojlerových kurčiat (hybrid COBB 500, ľavá prsná svalovina (PSL), ľavá horná a dolná stehenná svalovina (SSHĽ, SSDĽ), srdce, pečeň, žalúdok, obličky, pľúca, slezina, koža a svalovina z krídla, tuk a mäsová šŕava získaná z týchto tkanív) kŕmených KKZ BR2 a BR3. KKZ BR2 obsahovala prídavok salinomycínu sodného v množstve 70 mg.kg⁻¹ a KKZ BR3 bola bez prídavku kokcidiostatika v krmive. Počas celého obdobia výkrmu mali kurčatá prístup k vode a ku krmivu *ad libitum*. Do 35. dňa veku boli kŕmené KKZ BR2 a do 40. dňa veku KKZ BR3. V uvedený deň boli usmrtené povoleným spôsobom. Získané tkanivá boli skladované do analýzy pri teplote -20 °C. Na

analýzu boli použité získané tkanivá a mäsová šťava. Na získanie mäsovej šťavy z vyšetovaných tkanív bol použitý jednotný postup pre všetky tri mikrobiologické screeningové metódy. Rozmrazením 3 g vzorky v mikrovlnnej rúre nastavením na „Defrost“ po dobu 2 ± 1 min. Na prípravu vzoriek krmív na analýzu bol použitý supernatant získaný podľa postupu Premi[®]Testu a Explorer 2.0 testu centrifugáciou 10 g krmiva v 30 ml sterilnej demineralizovanej vody. Premi[®]Test a Explorer 2.0 test: Pomocou mikropipety sme aplikovali 100 μ l získanej mäsovej šťavy a supernatantu do testovacích túb. Tuby boli najskôr preinkubované pri teplote 80 °C po dobu 10 min. a následne inkubované pri teplote 65 °C po dobu 3 hod. Metóda STAR: Vzorky vyšetovaných tkanív boli získané z matric použitím sterilného korkovrtu (\varnothing 9 mm), narezané sterilným skalpelom na disky s hrúbkou 2 mm a poukladané paralelne na povrch testovacích agarových platní. Supernatant bol aplikovaný paralelne na povrch testovacích platní pomocou papierových diskov (\varnothing 9 mm, Albet Lab Science, Nemecko, 30 μ l). Inkubácia prebiehala pri podmienkach stanovených metódou. Ionophore EIA: Na prípravu vzoriek na ELISA analýzu bol použitý jednotný postup pre všetky krmivá a tkanivá deklarovaný výrobcom 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, fortifikovaný PBS roztokom a opätovne centrifugovaný. Získaný supernatant bol použitý na analýzu..

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Premi[®]Test a Explorer 2.0: Výsledky boli stanovené posúdením farby dolných dvoch tretín agarového média. Fialové, resp. žlté/fialové sfarbenie pevného média poukazuje na prítomnosť rezíduí kokcidiostatík vo vyšetovanej vzorke, ktorých množstvo je nad úrovňou (pozitívna vzorka), resp. na úrovni (dubiózna vzorka) detegovateľnosti testov. Metóda STAR: Výsledky boli stanovené meraním veľkostí IZ od okraja papierových diskov po vonkajší okraj IZ pomocou digitálneho posuvného meradla s presnosťou na 0,01 mm (Mitutoyo, Japonsko). Za pozitívne sú považované vzorky na platniach *B. subtilis*, *B. cereus*, *E. coli*, *K. rhizophila*, ak IZ okolo vzorky bola ≥ 2 mm a pri platni *B. stearothermophilus*, ak IZ bola ≥ 4 mm. Vzhľadom na to, že uvedená metóda nestanovuje veľkosť IZ pre krmivá, považovali sme za pozitívnu každú vzorku, pri ktorej sa vytvorila IZ. Ionophore EIA: Výsledky boli stanovené na základe intenzity farby reakčného produktu. Vývoj farby sa zastaví pridaním konečného roztoku a fotometrickým meraním pri 450 nm sa odčítajú a vyhodnotia výsledky. Dosiahnuté výsledky sú prezentované v Tabuľke 1.

Tab 1.: Výsledky screeningu kokcidiostatík a ich rezíduí vo vyšetovaných matriciach stanovené platňovou metódou STAR, tubovými testami Premi® Test a Explorer 2.0 a ELISA testom Ionophore EIA

Skupina brojlerových kurčiat	Matrica	STAR					Premi® Test	Explorer 2.0 test	ELISA (mg.kg ⁻¹)	
		<i>B.stearothermophilus</i> IZ (mm±SD)	<i>B.subtilis</i> IZ (mm±SD)	<i>B.cereus</i> IZ (mm±SD)	<i>E.coli</i> IZ (mm±SD)	<i>K.rhizophila</i> IZ (mm±SD)				
BR2+SAL	PSL	2,74 ± 0,69	/	/	/	/	0,77 ± 0,20	±	+	0,030
	SSLH	3,17 ± 0,15	/	/	/	/	/	-	-	0,044
	SSLD	4,28 ± 0,70	/	/	/	/	/	-	-	0,046
	SRDCE	7,69 ± 0,49	/	/	/	/	1,01 ± 0,26	±	±	0,045
	PEČEŇ	11,38 ± 0,43	2,33 ± 0,85	/	/	/	3,71 ± 0,27	-	±	0,163
	ŽALÚDOK	4,01 ± 0,20	/	/	/	/	/	-	-	0,059
	OBLIČKY	7,72 ± 1,01	/	/	/	/	1,34 ± 0,13	-	-	0,079
	PLŮCA	9,98 ± 0,95	2,87 ± 0,45	/	/	/	3,10 ± 0,83	-	-	0,045
	SLEZINA	11,05 ± 0,71	/	/	/	/	2,54 ± 0,14	-	±	0,157
	KOŽA KRÍDLA	4,15 ± 0,19	/	/	/	/	/	-	-	0,125
KOŽA SVAL	4,59 ± 0,17	/	/	/	/	0,78 ± 0,27	±	±	0,191	
TUK	4,54 ± 0,48	/	/	/	/	2,04 ± 0,80	+	-	-	
BR3	PSL	3,63 ± 0,27	/	/	/	/	2,34 ± 0,51	-	±	0,032
	SSLH	4,97 ± 0,59	/	/	/	/	1,09 ± 0,50	-	±	0,046
	SSLD	4,46 ± 0,45	/	/	/	/	2,13 ± 0,42	-	+	0,038
	SRDCE	5,45 ± 0,78	/	/	/	/	15,36 ± 1,56	+	+	0,042
	PEČEŇ	6,88 ± 2,44	/	/	/	/	3,13 ± 0,38	±	+	0,041
	ŽALÚDOK	3,05 ± 0,41	/	/	/	/	12,42 ± 1,07	+	+	0,038
	OBLIČKY	7,71 ± 0,44	/	/	/	/	2,73 ± 0,41	-	±	0,049
	PLŮCA	9,48 ± 1,27	/	/	/	/	3,87 ± 0,79	±	+	0,045
	SLEZINA	12,22 ± 0,12	/	/	/	/	4,23 ± 0,39	±	+	0,051
	KOŽA KRÍDLA	3,98 ± 1,92	/	/	/	/	1,88 ± 0,75	-	+	0,044
KOŽA SVAL	2,87 ± 0,38	/	/	/	/	14,01 ± 0,56	±	±	0,046	
TUK	1,11 ± 0,23	/	/	/	/	/	+	+	0,032	
Krmivo	BR1 + NIC	2,47 ± 0,30	/	/	/	/	/	+	-	0,159
	BR2 + SAL	4,75 ± 0,31	/	0,22 ± 0,16	/	/	/	+	+	0,217
	BR3	/	/	/	/	/	/	-	-	0,071

Legenda, Zvýraznené veľkosti IZ predstavujú pozitívne výsledky; mm – milimeter; SD – smerodajná odchýlka, + pozitívna vzorka; - negatívna vzorka; ± dubiózna vzorka

Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR2+SAL sme metódou STAR zachytili prítomnosť rezíduí salinomycínu na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* vo všetkých vzorkách, s *K. rhizophila* v ôsmich vzorkách (PSL, srdce, pečeň, obličky, pľúca, slezina, koža sval, tuk) a s *B. subtilis* v dvoch vzorkách (pečeň, pľúca). Premi® Testom sme detegovali pozitívny výsledok pri jednej vzorke (tuk) a dubiózny výsledok pri troch vzorkách (PSL, srdce, koža sval). Explorer 2.0 test detegoval pozitívny výsledok tiež pri jednej vzorke (PSL) a dubiózny výsledok pri štyroch vzorkách (srdce, pečeň, slezina, koža sval). ELISA metódou sme zachytili prítomnosť rezíduí salinomycínu vo všetkých vyšetovaných vzorkách s výnimkou tuku. Vyšetrením tkanív kurčiat kŕmených KKZ BR3 sme metódou STAR zachytili pozitívny výsledok na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* vo všetkých vzorkách a s *K. rhizophila* vo všetkých vzorkách s výnimkou tuku. Premi® Testom sme detegovali pozitívny výsledok pri troch matriciach (srdce, žalúdok, tuk) a dubiózny výsledok pri štyroch vzorkách (pečeň, pľúca, slezina, koža sval) a Explorer 2.0 testom pri ôsmich matriciach (PSL, srdce, pečeň, žalúdok, pľúca, slezina, koža krídla a tuk) a dubiózny výsledok pri štyroch vzorkách (PSL, SSLH, obličky, koža sval). ELISA metódou sme zachytili prítomnosť rezíduí salinomycínu vo všetkých vyšetovaných matriciach. Vyšetrením tkanív kurčiat 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 vzorky pozitívne na salinomycín. Vyšetrením krmív metódou STAR sme zachytili pozitívny výsledok na platniach s testovacím kmeňom *B. stearothermophilus* (BR1, BR2) a s *B. cereus* (BR2). Premi® Test detegoval pozitívny výsledok pri dvoch vzorkách (BR1, BR2) a Explorer 2.0 test pozitívny výsledok pri jednej vzorke (BR2). Pri kvantitatívnom stanovovaní koncentrácií kokcidiostatík v krmivách použitím postupu stanoveného metódou ELISA detegované koncentrácie nekorešpondovali s koncentraciami kokcidiostatík deklarovanými výrobcami KKZ na obale. Uvedený postup nemôžeme považovať pri tak vysokých koncentráciách kokcidiostatík v krmive za vhodný na analýzu a vyžaduje si modifikáciu.

Screening kokcidiostatík v krmivách určených pre hydinu a ich rezíduí v tkanivách hydiny je veľmi dôležitý pre ochranu verejného zdravia a garanciu bezpečnosti potravín. Všetky tri screeningové metódy detegovali pozitívne, resp. dubiózne výsledky a poukázali na prítomnosť salinomycínu a jeho rezíduí vo vyšetrovaných vzorkách. Výsledok screeningových metód bol potvrdený a kvantitatívne vyhodnotený ELISA testom. Prepojenie screeningových testov a metódy ELISA jednoznačne predstavuje účinný nástroj na stanovenie rezíduí kokcidiostatík v tkanivách hydiny a potvrdenie vhodnosti použitia metódy STAR a screeningových testov s preferenciou testu Explorer 2.0 na relevantný screening kokcidiostatík a ich rezíduí v rámci prvotného screeningu rezíduí antimikrobiálnych látok v tkanivách potravinových zvierat. Výsledky stanovené ELISA testom v krmivách sú pre nás základom pre prehodnotenie postupu deklarovaného výrobcom za účelom využitia tohto testu aj pre stanovenie kokcidiostatík v koncentráciách vyšších, ako je detekčný limit metódy.

Spracovanie príspevku bolo podporené projektom VEGA MŠVVaŠ SR VEGA č. 1/0576/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003 o doplnkových látkach určených na používanie vo výžive zvierat. Úradný vestník Európskej únie L 268, 2003, s. 29 – 43. Dostupné na internete: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1831-20151230&from=EN>
http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-20_08-SK.pdf
https://www.svps.sk/dokumenty/zakladne_info/R_25.pdf
http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2026%20PREMi%20test.pdf
<http://europoxima.com/wp-content/uploads/5111IONO511.16.pdf>

PREVALENCIA REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ U KMEŇOV *E. COLI* IZOLOVANÝCH Z TRUSU KLINICKY ZDRAVÝCH PSOV

Karahutová L., Kmeť V., Bujňáková D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Escherichia coli (*E. coli*) patrí k indikátorovým mikroorganizmom a jej izolácia zo zdravých zvierat poskytuje spoľahlivý obraz vývoja antimikrobiálnej rezistencie v danej lokalite. Cieľom štúdie bolo vyhodnotiť MIC 90 dvadsiatich antibiotík u kmeňov *E. coli* z trusu zdravých psov a detegovať prítomnosť vybraných génov rezistencie. Výsledky poukázali na vysoké hodnoty hladín MIC 90 pre tetracyklín (32 mg/L); ampicilín (64 mg/L); ciprofloxacín (8 mg/L) a trimetoprim – sulfónamid (8 mg/L). Pre cefalosporíny sa hladiny MIC 90 vyskytovali pod hranicou rezistencie, konkrétne cefotaxím (0,25 mg/L), cefotaxím+klavulanát (0,5 mg/L), ceftazidím (0,5 mg/L), ceftazidím + klavulanát (0,25 mg/L) a cefepim (0,25 mg/L). U 16 izolátov boli detegované gény kódujúce plazmidom sprostredkovanú rezistenciu na chinolóny (PMQR) - *qnrB* (13/16), *qnrS* (2/16) a *aac*- (6')-*Ib-cr* (1/16). Plazmidové gény kódujúce rezistenciu na sulfónamidy (*sul1* = 1/10, *sul2* = 9/10) boli prítomné u 10 izolátov; gén kódujúci vysokú hladinu rezistencie na trimetoprim (*dfpA*) u troch izolátov a efluxom sprostredkovaná rezistencia na tetracyklíny kódovaná *tet* génmi bola potvrdená u 24 izolátov (*tetA* = 19/24; *tetB* = 5/24). Prítomnosť integrónu *int1* (12/38) a transpozómu *tn3* (12/38) zvyšuje možnosť prenosu získaných génov rezistencie a tým aj frekvenciu výskytu multirezistentných kmeňov, ktorých sme v našom prípade detegovali deväť. Získané výsledky poukazujú na fakt, že izoláty *E. coli* z fečes zdravých psov sú potenciálnym rezervoárom génov AMR.

ÚVOD

Gastrointestinálny trakt je dôležitým rezervoárom *E. coli*, ktorá nám môže indikovať výskyt antimikrobiálnej rezistencie (AMR) (Wellington a kol., 2013). Multirezistentné kmene *E. coli* sa bežne vyskytujú u psov a iných spoločenských zvierat (Shahdeen a kol., 2010). Niektoré štúdie v Európe (SVARM, 2006) preukázali, že zvieratá a ľudia často nesú rovnaké determinanty rezistencie a že psy/mačky/ľudia v spoločnej domácnosti môžu zdieľať identické mikroorganizmy (Johnson a kol., 2008). Hlavným problémom celosvetového zdravia je v poslednom desaťročí výskyt rezistencie u *Enterobacterales* voči karbapenémom a iným β – laktámovým ATB (Meletis, 2016). Baktérie produkujúce karbapenemázy sa najprv detegovali len u ľudí, ale od roku 2011 sa zistili aj u hospodárskych, spoločenských, divo žijúcich zvieratách či v životnom prostredí (Guerra a kol., 2014; Woodford a kol., 2014). Medzi najzávažnejšie mechanizmy rezistencie čelade *Enterobacterales* sa považuje produkcia karbapenemáz (CPE), ktoré môžu spôsobiť rezistenciu prakticky na všetky β – laktámové antibiotiká; produkcia β – laktamáz so širokým spektrom účinku (ESBL) hydrolyzujúce cefalosporíny III. generácie (ceftazidín, cefotaxím, cefpodoxím, ceftiofur) a získaná β – laktamáza typu AmpC (ampicilináza), ktorá má tiež široké spektrum rezistencie na cefalosporíny (EUCAST, 2017). Všetky tieto mechanizmy boli detegované ako u ľudí tak aj u psov. Cieľom práce bolo zhodnotiť hladiny MIC 90 (minimálna inhibičná koncentrácia ATB, ktorá inhibuje rast 90% testovaných kmeňov) a trend vývoja AMR v testovanej skupine zdravých psov.

MATERIÁL A METODIKA

Z 38 vzoriek trusu zdravých psov sa vyizolovalo 38 kmeňov *E. coli*. Testovanie antimikrobiálnej citlivosti sa vykonalo s použitím komerčného kitu firmy Bel-MIDITECH, Bratislava a vyhodnotilo na základe EUCASTu (EUCAST, 2020). 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). Skrining génov rezistencie pozostával z génov kódujúcich rezistenciu na trimetoprim (*dfrA*, *dfrB*; Navia a kol. 2003); sulfónamidy (*sul1*, *sul2*; Kerr a kol. 2002 a *sul3*; Guerra a kol. 2004); plazmidovú fluorochinolónovú rezistenciu (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*; Robicsek a kol., 2006; *qepA*; Yamane a kol., 2008; *oqxA*, *oqxB*; Chen a kol., 2012; *aac(6)IbCr*; Robicsek a kol., 2006); rezistenciu na kolistín (*mcr1*, *mcr2*; Wang a kol., 2019); tetracyklín (*tetA*, *tetB*; Guillaume a kol., 2000) a prítomnosť génov kódujúcich integron (*int1*; Mazel a kol., 2000) a transpozóm (*tn3*; Weill a kol., 2004).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka č.1. Hodnoty MIC 90 v mg/L testovaných ATB.

	AMP	SAM	TZP	CXM	CTX	CTC	CAZ	CAC	SPZ	FEP	ETP	MEM	GEN	TOB	AMI	TGC	CIP	TET	COL	COT
MIC 90	64	16	8	8	0,25	0,5	0,5	0,25	16	0,25	0,03	0,13	0,5	1	4	0,25	8	32	2	8

Pomocou interpretovaného odčítavania antibiotikogramu sme sa zamerali na detekciu hlavných mechanizmov AMR testovaných kmeňov. U *Enterobacteriales* produkujúcich karbapenemázy môže byť hodnota MIC karbapenémov nižšia ako sú jej klinické breakpointy (Nordmann a kol., 2012). K detekcii producentov karbapenemáz môžeme použiť ECOFF hodnoty a najlepší kompromis medzi senzitivitou a špecifitou dôkazu produkcie karbapenemáz je test s meropenémom (Nordmann a kol., 2012), pretože ertapeném má síce výbornú citlivosť, avšak nižšiu špecifitu. Pre meropeném je hodnota breakpointu 2 mg/L a pre ertapeném 0,5 mg/L. MIC 90 našich izolátov poukázala na pomerne nízke hodnoty (meropeném = 0,13 mg/L; ertapeném = 0,03 mg/L), ktoré ich vylučujú z produkcie karbapenemáz. Odporúčaná stratégia pre detekciu ESBL u enterobaktérií je založená na necitlivosti k indikátorovým oxymino-cefalosporinom (cefotaxim/ceftriaxon, ceftazidím). V súlade s návodmi EUCASTu sa ako pravdepodobný producent ESBL hodnotí kmeň, ktorý má aspoň pri jednom z týchto ATB hodnotu MIC vyššiu ako 1 mg/L. Izoláty vykazovali hodnotu MIC 90 nižšiu (cefotaxim = 0,25 mg/L; ceftazidim = 0,5 mg/L), avšak môžeme pozorovať postupne zvyšujúce sa hodnoty práve ceftazidímu. Fenotypové kritériá pre skúmanie produkcie AmpC (ampicilinázy) zahŕňajú cefoxitín (8 mg/L) v kombinácií s ceftazidínom a/alebo cefotaximom (1 mg/L). Pri skriningovom vyšetrení našich kmeňov sme nezaznamenali dosiahnutie týchto hodnôt. V minulosti sa rezistencia voči polymixinom považovala za chromozomálne sprostredkovanú, v roku 2015 sa objavili prvé správy o rezistencii na kolistín (Liu a kol., 2016) sprostredkované plazmidom, ktorý kóduje fosfoetanolamín transferázu (MCR-1). Cieľová MIC hodnota kolistínu je 4 mg/L, výnimočne 2 mg/L. Zaujímavým zistením bola práve detekcia fenotypovej kolistínovej rezistencie u dvoch kmeňoch a to konkrétne s hodnotami 4 mg/L a 8 mg/L. Pre ďalšie štúdium mechanizmu tohto typu rezistencie sa odporúča molekulárna metóda na dôkaz génu *mcr-1/2*, ktorá sa v našom prípade nepotvrdila. Hodnota MIC 90 pre tetracyklín bola na úrovni 32 mg/L a pre ampicilín 64 mg/L, čo poukazuje na rezistenciu izolátov voči týmto ATB. U TET-rezistentných kmeňoch sme pozorovali vyšší záchyt *tetA* génov, čo sa zhoduje aj s Costa et al, 2008 a poukazuje na fakt, že u psích izolátov *E. coli* prevláda práve tento gén. Zvýšená hladina MIC 90 fluorochinolónov (ciprofloxacín = 8mg/L) poukazovala na prítomnosť génov kódujúcich plazmidom sprostredkovanú rezistenciu na chinolóny (PMQR). Skrining génov PMQR potvrdil v 13 izolátoch prítomnosť génu *qnrB*, nasledovaný génom *qnrS* a v jednom

izoláte bol detegovaný gén *aac*- (6')-*Ib-cr*. Podobne ako aj v iných štúdiách (Zhao a kol., 2010; Aslantaş and Yilmaz, 2017) boli gény kódujúce PMQR prítomné aj v izolátoch citlivých na ciprofloxacín čo pravdepodobne nesúvisí len so selektívnym tlakom používaných fluorochinolónov. Antimikrobiálna multirezistencia (súčasná rezistencia na 3 až 4 skupiny antimikrobiálnych látok) bola zaznamenaná u 9 izolátov. Prítomnosť integrónu 1 (*int1*; 12/38) a transpozómu (*tn3*; 12/38) poukazuje na fakt, že genetický mechanizmus na získavanie génov AMR je prítomný nielen u klinicky získaných izolátov, ale aj v izolátoch normálnej mikrobioty spoločenských zvierat. *Int1* sa často vyskytuje v kombinácii s rezistenciou na trimetoprim (*dfp*) (Partridge a kol., 2009) a zaznamenali sme ju v dvoch prípadoch. Získané výsledky poukazujú na fakt, že animálne kmene *E. coli* môžu byť potenciálnym rizikom a rezervoárom AMR pre ľudí.

Táto práca bola podporená slovenským grantom VEGA 2/0085/18 a APVV-16-171.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aslantaş Ö, Yilmaz EŞ. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC β -lactamase (pAmpC) producing *Escherichia coli* in dogs. *J Vet Med Sci.* 2017; 79:1024-1030.
- Costa D, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol.* 2008; 127: 97-105.
- Guerra B, et al. Incidence of the recently described sulfonamide resistance gene *sul3* among german *Salmonella enterica* strains isolated from livestock and food. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:2712–2715.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol.* 2014; 171: 290-7.
- Guillaume G, et al. PCR typing of tetracycline resistance 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.
- Chen X, et al. Prevalence of *qnr*, *aac*(6')-*Ib-cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:3423–3427.
- Johnson JR, Clabots C, Kuskowski MA. Multiple-host sharing, long-term persistence, and virulence of *Escherichia coli* clones from human and animal household members. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:4078-4082.
- Kern MB, et al. Susceptibility of danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *Sul* genes conferring sulphonamide resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50:513–516.
- Liu YY, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 2016; 16: 161–168.
- 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.
- Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016, 3:15-21.
- Navia M, et al. Detection of dihydrofolate reductase genes by PCR and RFLP. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2003; 46:295–298.
- Nordmann P, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 432-438.
- Partridge SR, et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33:757–784.
- Robicsek A, et al. *Qnr* Prevalence in ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:2872–2874.
- Shaheen BW, et al. Antimicrobial resistance profiles and clonal relatedness of canine and feline *Escherichia coli* pathogens expressing multidrug resistance in the United States. *J. Vet. Intern. Med.* 2010; 24:323-330.
- <http://www.sva.se>
- https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
- https://eucast.org/clinical_breakpoints/

- 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- β -Lactamase (TEM-52) producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J. Clin. Microbiol.* 2004; *42*:3359–3362.
- Wellington EM, et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2013; *13*:155–65.
- Woodford N, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother*, 2014;*69*:287-91.
- Yamane K, et al. (). Plasmid- Mediated *qepA* Gene among *Escherichia coli* Clinical Isolates from Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; *52*:1564–1566.
- Zhao X, et al. Decreased quinolone susceptibility in high percentage of *Enterobacter cloacae* clinical isolates caused only by *Qnr* determinants. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010;*67*:110–113.

PAKOMÁRIKY (DIPTERA: *CULICOIDES*) DOLNÉHO ZEMPLÍNA

Kasičová Z., Schreiberová A., Kimáková A., Kočišová A.

Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia

ABSTRAKT

Pakomáriky *Culicoides* sú kozmopolitne rozšírené po celom svete. Ich uštipnutie sa môže prejavovať hypersenzitívnou reakciou a potenciálnym prenosom troch typov patogénov. Cieľom našej práce bolo sledovanie fauny pakomárikov a identifikácia hostiteľa z krvi nacicovaných samičiek pakomárikov. Počas roku 2019 sme odchytili 3432 kusov 15 druhov pakomárikov na Dolnom Zemplíne, ktoré sme diagnostikovali pomocou morfológických znakov. Zaznamenali sme aj druh *C. bysta*, ktorý bol prvýkrát popísaný v roku 2017 na území východného Slovenska. U nacicovaných samičiek 5 druhov pakomárikov *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. newsteadii*, *C. punctatus*, *C. lupicaris* a *C. pulicaris* sme metódou PCR a následným sekvenovaním získali sekvenciu časti mitochondriálneho génu pre cytochróm *b* (*cyt b*) s použitím primerov *cyt bb1* a *cyt bb2*, na základe čoho sme identifikovali hostiteľov na ktorých pakomáriky parazitovali. Pakomáriky odchytené v našej štúdií cicali krv na hostiteľských druhoch *Bos taurus*, *Lepus europeus*, *Passer montanus* a *Homo sapiens*.

ÚVOD

Pakomáriky *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) sú malé krv-cicajúce dvojkrídlovce parazitujúce na zvieratách a ľuďoch. Pre prenos patogénov a rozmnožovanie je nutné nacicanie sa krví vhodného hostiteľa (Wittmann a Baylis, 2000). V ostatných rokoch bol zvýšený záujem o tieto malé dvojkrídlovce z dôvodu prenosu medicínsky a veterinárne významných patogénov. Prenášajú vírusy (*Bluetongue* vírus, *Schmallenberg* vírus, *Oropouche* vírus), helminty (*Onchocerca*, *Mansonella*, *Dipetalonema*) a hemosporídie (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Plasmodium*) (Mellor a kol., 2000).

Na území Slovenska sa monitoringom pakomárikov *Culicoides* venovali kolektívy vedcov pod vedením Országha (1984) a Sarvašovej a kol. (2017). Údaje o tom na akých hostiteľoch pakomáriky parazitovali na našom území chýbajú. Toto zistenie je užitočné pre pochopenie vzťahov medzi pakomárikmi, hostiteľmi a patogénmi, ktoré tieto vektory prenášajú. V našej práci sme sa zamerali na monitoring pakomárikov na Dolnom Zemplíne. Okrem toho sme na základe segmentu mitochondriálneho génu cytochrómu *b* vyšetrovali hostiteľskú krv v nacicovaných pakomárikoch a zároveň sme doplnili chýbajúce informácie o faune pakomárikov parazitujúcich na území Slovenska.

MATERIÁL A METODIKA

Na odchyt pakomárikov *Culicoides* boli použité svetelné lapače modelu CDC 1212 v mesiacoch máj až október. Pakomáriky boli odchyťované na družstvách s chovom hovädzieho dobytku na východnom Slovensku v obciach Ostrov a Horňa. Monitorovali sme aj poľovnícky revír Holub a dvor s chovom kura domáceho v Sobranciach. Odchytené pakomáriky boli oddelené od ostatného hmyzu pod binokulárnou lupou. Podľa charakteristických škvŕn na krídlach sme pakomáriky rozdelili do druhov podľa dostupných kľúčov (Mathieu a kol. 2012). Fyziologický stav samičiek bol určený na základe prítomnosti pigmentu v podkožných bunkách bruška. Samičky sme rozdelili na 4 skupiny a to nulliparous (nenacicané), parous (prítomný burgundský pigment po nacicaní krvi, prázdny obsah bruška), engorded (nacicané) a gravidné (prítomné vajíčka v brušku).

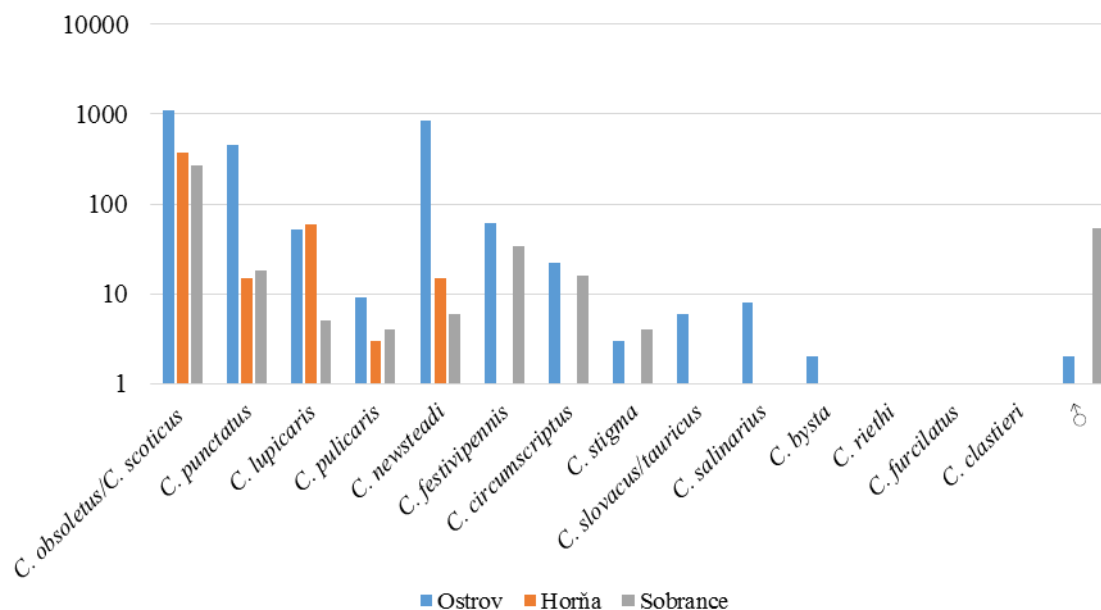
Nacicané samičky boli použité na detekciu hostiteľskej krvi. Diagnostickým kitom Qiagen blood & tissues (Nemecko) sme vyzolovali DNA. Na základe segmentu mitochondriálneho génu (*cyt b*) sme robili PCR s použitím primerov *cyt bb1* (5'-CCA TCM AAC ATY TCA DCA TGA TGA AA-3') a *cyt bb2* (5'-GCH CCT CAG AAT GAY ATT TGK CCT CA-3').

Výsledné PCR produkty sme analyzovali na 1 % agaróznom géli. Veľkosť PCR produktu bola 350 bp.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V priebehu roku 2019 sme monitorovali faunu pakomárikov *Culicoides* v oblasti Dolného Zemplína. Odchytili sme 3432 jedincov 15 druhov pakomárikov a to: *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi*, *C. bysta*, *C. furcillatus*, *C. festivipennis*, *C. circumscriptus*, *C. stigma*, *C. riethi*, *C. slovacus/tauricus*, *C. salinarius*, *C. clastieri* (obrázok 1). Najvyššiu abundanciu sme zaznamenali pre druh *C. obsoletus/C. scoticus* a to 1725 jedincov (50,26 %). Pakomáriky tohto druhu sú najviac zastúpeným druhom v Európe. Sú parazitmi vtákov a cicavcov. *Pulicaris* komplex Slovenska je reprezentovaný 5 druhmi pakomárikov a to: *C. punctatus*, *C. pulicaris*, *C. lupicaris*, *C. newsteadi* a *C. bysta*. Prítomnosť všetkých 5 druhov sme zaznamenali v našich odchytoch. Avšak novoobjavený druh *C. bysta*, ktorý bol prvýkrát zaznamenaný na území východného Slovenska v roku 2017 (Sarvašová a kol. 2017) sme odchytili len v obci Ostrov a bol reprezentovaný dvomi jedincami (0,06 %).

Obr. 1. Druhovú skladbu pakomárikov Dolného Zemplína počas roku 2019



Identifikácia hostiteľa z krvi nácianých pakomárikov nás informuje o vzťahoch medzi vektorom-hostiteľom, ekológiou a patogénmi. Európske druhy pakomárikov parazitujú najmä na prežúvavcoch. Časté môžu byť aj iné druhy cicavcov ako napríklad ľudia, kone a svine. Ďalšou rozmanitou skupinou sú vtáky, avšak v porovnaní s cicavcami na nich pakomáriky parazitujú menej často (Tomazatos a kol. 2020). Detekciu hostiteľskej krvi pakomárikov sme robili u 19 jedincov 5 druhov pakomárikov (Tabuľka 1) a to *C. obsoletus/C. scoticus*, *C. newsteadi*, *C. punctatus*, *C. lupicaris* a *C. pulicaris*. Keďže naše odchyty boli robené na družstvách s chovom hovädzieho dobytku, tento druh bol dominantným hostiteľom. Medzi ďalších hostiteľov v našej štúdii patrili *Passer montanus* (vrabec obyčajný) a *Lepus europeus* (zajac poľný). Okrem zvierat pakomáriky *Culicoides* parazitujú aj na ľuďoch. V Európe po ich uštipnutí dochádza len k hypersenzitívnym reakciám, avšak v oblastiach Južnej Ameriky a Afriky prenášajú helminty (*Mansonella*) (Heyneman, 2004). Počas nášho monitoringu sme zachytili druh *C. punctatus*, parazitujúci na človeku.

Tab. 1. Detekcia hostiteľskej krvi pakomárikov *Culicoides*

Označenie	Druh	Lokalita	Hostiteľ
Vzorka 3	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Sobrance	Passer montanus
Vzorka 4	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Horňa	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 5	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 10	<i>C. pulicaris</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 27	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Horňa	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 28	<i>C. newsteadi</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 29	<i>C. newsteadi</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 30	<i>C. newsteadi</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 31	<i>C. lupicaris</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 33	<i>C. punctatus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 34	<i>C. punctatus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 35	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Lepus europeus</i>
Vzorka 36	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 37	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 38	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 40	<i>C. punctatus</i>	Ostrov	<i>Homo sapiens</i>
Vzorka 45	<i>C. newsteadi</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 46	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>
Vzorka 47	<i>C. obsoletus/C. scoticus</i>	Ostrov	<i>Bos taurus</i>

Na základe týchto výsledkov možno konštatovať, že fauna pakomárikov Dolného Zemplína je reprezentovaná nami zaznamenanými 15 druhmi pakomárikov *Culicoides*. Doplnili sme údaje o hostiteľoch, na ktorých pakomáriky *Culicoides* parazitovali. Ďalšie štúdie zamerané na detekciu patogénov ukážu aké riziko tieto parazity predstavujú pre ľudí, hospodárske, spoločenské a voľne žijúce zvieratá na území Slovenska.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0043/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Heyneman D. Medical parasitology. In medical microbiology. McGraw Hill, Boston, USA. 2004, s. 661–701.
- MATHIEU B, et al. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palearctic region. *Parasites and Vectors*. 2012; 13
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annu. Rev. Entomology*. 2000; 45:307–340.
- Országh I.: Ceratopogonidae, In: Čepelák J. 1984. (ed), Diptera Slovenska I. Diptera of Slovakia J. Veda, Bratislava, 1984. s. 65–74.
- Sarvašová A, et al. Description of *Culicoides (Culicoides) bysta* n. sp., a new member of the *Pulicaris* group (Diptera: Ceratopogonidae) from Slovakia. *Parasites & Vectors*. 2017; 10:1–14.
- Tomazatos A, et al. Blood-meal analysis of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) reveals a broad range and new species records for Romania. *Parasites and Vectors*. 2020; 13: 1–12.
- Wittmann EJ, Baylis M. Climate Changes: Effects on *Culicoides*-Transmitted Viruses and Implications for the UK. *The Veterinary Journal*. 2000; 160:107–117.

POROVNANIE DVOCH METÓD ARTRODÉZIE KORUNKOVÉHO KLBU ŽRIEBÄT ŤAŽNÝMI SKRUTKAMI

Koľvek F.¹, Žert Z.¹, Pástor M.², Nosál S.³, Korim F.⁴

¹Klinika koní, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

²Katedra aplikovanej mechaniky a strojného inžinierstva, Strojnícka fakulta, TUKE

³Súkromný veterinárny lekár, Baška

⁴Študent UVLF

ABSTRAKT

Indikáciou pre artrodéziu korunkového klbu (PIPJ) u žriebät predstavujú patologické stavy ako osteoartrída („krúžok“), cysty subchondrálnej kosti, luxácia alebo subluxeácia korunkového klbu a zlomeniny korunkovej kosti. Prvá technika artrodézie PIPJ bežne používaná od 80. rokov 20. storočia predstavovala dve alebo tri transartikulárne kortikálne skrutky, ktoré boli umiestnené paralelne ťažným spôsobom. Táto technika je stále popisovaná v odbornej literatúre a je predmetom experimentálnych štúdií. Cieľom našej štúdie bolo experimentálne porovnať biomechanické vlastnosti, pevnosť a stabilitu pri mechanickom zaťažení konvenčnej metódy artrodézie s našou pôvodnou metódou použitím dvoch transartikulárnych skrutiek umiestnených abaxiálnym smerom z dorzálnej časti sponkovej kosti do palmárnej časti korunkovej kosti a jednej axiálnej skrutky umiestnenej z dorzálnej časti korunkovej kosti do palmárnej časti korunkovej kosti. Na vykonanie štúdie bolo odobratých 20 končatín (10 párov) od 7 kadaveristických žriebät. Do týchto končatín boli aplikované skrutky bordovaným chirurgom a to takým spôsobom, že do jednej končatiny z páru boli aplikované tri paralelne skrutky a do kontralaterálnej končatiny tri skrutky v skríženom smere. Končatiny boli následne fixované v konštrukte a testované v 3-bodovom ohýbaní v smere palmaro/plantaro dorzálnom pomocou špeciálneho trhacieho prístroja. Hodnoty posunutia pri deštrukcii konštruktu a sila boli analyzované medzi jednotlivými metódami. V štádiu predpokusu sme mechanicky zaťažili a následne deštruovali 4 končatiny (2 páry hrudníkových končatín) 2-mesačných žriebät. Z doterajších pozorovaní a parciálnych výsledkov mechanickej deštrukcie môžeme konštatovať, že aplikácia troch paralelných skrutiek je technicky menej náročná v porovnaní s našou metódou, avšak odolnosť oboch konštruktov v palmaro-dorzálnom smere bola v jednom prípade skoro rovnaká, v druhom bol náš konštrukt v porovnaní s konvenčným signifikantne pevnejší.

ÚVOD

Artrodézia proximálneho interfalangeálneho klbu (korunkový klb, PIPJ) je spravidla vykonávaná u skeletálne zreých koní na zmiernenie bolestivosti spojennej s osteoartrídou alebo ako súčasť fixácie intraartikulárnych zlomenín (Watts a kol., 2007). K najčastejším patologickým stavom u žriebät patrí luxácia resp. subluxeácia PIPJ pri porušení dôležitých palmárnych/plantárnych mäkkých štruktúr a bolestivosť prejavujúca sa krívaním v dôsledku cýst v subchondrálnej kosti alebo osteoartrotických zmien. Dlhodobou presadzovanou metódou artrodézie PIPJ je použitie troch transartikulárnych kortikálnych skrutiek v ťažnom smere. Doterajšie kadaveristické štúdie porovnávali kombináciu troch paralelných 4,5 mm alebo dvoch 5,5 mm kortikálnych skrutiek v 3-bodovom ohybe a ich deštrukciu, a takisto aj stabilitu v rámci hrudníkových a panvových končatín (Watt a kol., 2001). Záverom ich štúdie bolo, že ohybové momenty boli väčšie na hrudníkových končatinách ako na panvových. Takisto konštatovali, že dve 5,5 mm kortikálne skrutky poskytnú rovnako silnú artrodéziu PIPJ v porovnaní s tromi 5,5 mm kortikálnymi skrutkami zavedenými rovnakým spôsobom v 3-bodovom ohybe a pri mechanickom zaťažení (Read a kol., 2005; Carmalt a kol., 2010). V týchto štúdiách nebol pozorovaný žiadny zreteľný mechanický rozdiel medzi konštrukciami hrudníkovej a panvovej končatiny. Technika ťažnej skrutky môže predstavovať spôsob fixácie pri artrodézii PIPJ u mladých žriebät. Takmer lineárne uloženie skrutiek vo frontálnej

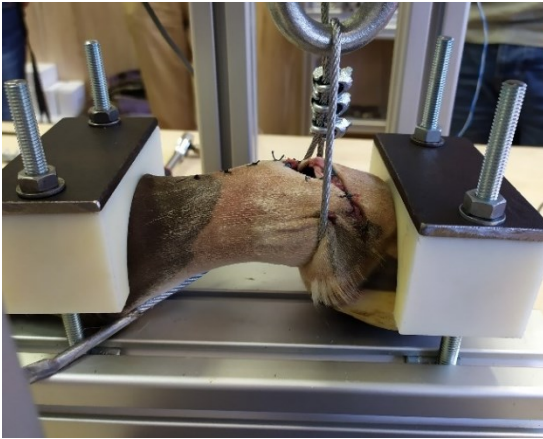
rovine poskytuje minimálnu stabilitu, najmä v dorzálnej časti kĺbu. To má za následok diskomfort pacienta v dôsledku dráždenia mäkkých štruktúr periostálnou reakciou. To pravdepodobne odráža zníženú stabilitu (Auer a kol., 2019). Cieľom našej štúdie bolo porovnať klasickú metódu zavádzania ťažných skrutiek s našou pôvodnou metódou (Žert a kol., 2013).

MATERIÁL A METODIKA

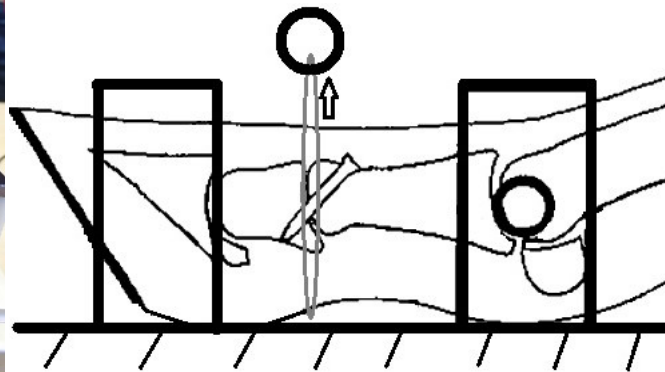
Od siedmich žriebät utratených bez poškodeného muskuloskeletálneho aparátu bolo odoberávaných 10 párov končatín (vek 3 dní-2 mesiace). Hrudníkové a panvové končatiny boli odstránené v úrovni distálnej časti metakarpu/metatarzu, zmrazené pri -20°C až do doby aplikácie skrutiek, kedy boli rozmrazené pri izbovej teplote. V rámci páru končatín boli do jednej z nich aplikované 3 skrutky v paralelnom smere a príslušnej kontralaterálnej končatiny 3 skrutky v skríženom smere. Operačný postup pri oboch metódach predstavoval kožnú incíziu v tvare obráteného písmena „V“, následne incíziu extenzorovej šľachy pod úrovňou úponu extenzorových vetiev medzikostného svalu. Kolaterálne väzy PIPJ boli incidované, kĺb bol disartikulovaný a chrupavka odstránená použitím ostrých lyžičiek. V prípade konvenčnej metódy boli použitím vodiča vrtáku navŕtané klzné diery 4,5 mm vrtákom do distálnej časti sponkovej kosti dorzopalmárnym smerom, po tomto nasledovala apozícia kĺbových plôch s navŕtaním závitovej diery 3,2 mm do proximo-palmárnej plochy korunkovej kosti. Skrutky príslušnej dĺžky a priemeru (4,5 mm) boli vložené a dotiahnuté skrutkovačom, pričom uťahovací moment nebol štandardizovaný. Technika s použitím troch skrížených skrutiek spočíva v predvŕtaní dvoch abaxiálnych klzných dier do distálnej časti sponkovej kosti v dorzo-palmárnom smere a jednej axiálnej diery do proximo-palmárnej časti korunkovej kosti o priemere 4,5 mm. Po priložení kĺbových plôch nasledovalo vŕtanie závitových dier o priemere 3,2 mm s následnou aplikáciou kortikálnych skrutiek. Chirurgické miesta boli štandardne zošité nevstrebateľným šicím materiálom. Takto pripravené končatiny boli postupne umiestnené dorzálnou plochou končatiny smerom hore na špeciálny duralový profil s drážkami a pripevnené upevňovacím mechanizmom v oblasti rohového puzdra kopyta a v úrovni sponkového kĺbu (Obr. č. 1). Dorzálna plocha končatiny bola fixovaná kolmo k miestu zaťažovania, čo predstavovalo miesto v palmárnej oblasti v úrovni PIPJ. Vzďialenosť medzi upevňovacími bodmi končatiny bola v rámci testovaného páru konštantná. V štádiu predpokusu sme mechanicky zaťažili a následne deštruovali 4 končatiny (2 páry hrudníkových končatín) 2-mesačných žriebät. Pevnosť jednotlivých konštruktov bola pomocou servohydraulického stroja na testovanie materiálov sledovaná v ťahu v palmaro-dorzálnom smere v mieste PIPJ (Obr. č. 2) až do pozorovania zlyhania (zlomenie skrutky, ohnutie alebo vytrhnutie z kosti). Pre každý konštrukt bola po testovaní zaznamenaná sila v čase deštrukcie a posun, boli vyhotovené röntgenogramy a vykonaná detailná pitva končatiny.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V štádiu predpokusu sa snažíme optimalizovať upevňovací systém, detektory posunov pre detailné vyhodnotenie deštrukcie. Pre určenie metodiky testovania pevnosti konštruktov sme vychádzali jednak z odbornej literatúry ale aj konzultáciou so strojníkmi z Technickej univerzity v Košiciach.



Obr. č. 1 – Montážny profil pre mechanické testovanie pevnosti konštraktu. Na obrázku zachytený ohybový moment v čase zlyhania konštraktu.



Obr. č. 2 – Ilustrácia mechanického testovania konštraktu artrodézie v palmaro/plantarodorzálnom smere 3-bodovým systémom ohýbania.

Dospeli sme k názoru, že hoci je klinicky korunkový kĺb zaťažovaný v kombinácii ohybových, torzných a kompresných síl rozhodli sme sa pre 3-bodové testovanie v ohybe aj vzhľadom na to, že testovanie v torzii a kompresii je pomerne technicky náročné. Doterajšie štúdie používali na testovanie pevnosti konštruktov 3-bodový ohyb v dorzo-palmárnom smere, ktorý podľa našich úvah neberie do úvahy palmárne mäkké štruktúry, ktoré absorbujú silu nárazu resp. tlaku. V našich pokusoch teda modifikujeme túto metodiku s tým, že k deštrukcii bude dochádzať palmaro/plantaro-dorzálnym smerom v ťahu. Predpokladáme, že konvenčná metóda artrodézie nezabezpečuje potrebnú stabilitu v dorzálnnej časti PIPJ na rozdiel od nami popisovanej metódy, kde túto stabilitu podporuje axiálna skrížená skrutka. Z doterajších testovaní a meraní konštatujeme, že v prvom testovanom páre končatín došlo ku deštrukcii a zlyhaniu konštraktu v rovnakom silovom zaťažení, avšak v druhom testovanom páre sme pozorovali skoro dvojnásobnú pevnosť nášho konštraktu. Záverom doterajších meraní a výsledkov mechanickej deštrukcie je, že aplikácia troch paralelných skrutiek je technicky menej náročná v porovnaní s našou metódou, avšak odolnosť oboch konštruktov v palmaro-dorzálnom smere bola v jednom prípade skoro rovnaká, v druhom bol náš konštrukt v porovnaní s konvenčným signifikantne pevnejší.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Auer JA, et al. Arthrodesis techniques. Equine Surgery. 5rd ed. Elsevier., Philadelphia, 2019;1378.
- Carmalt JL, Delaney L, Wilson DG. Arthrodesis of the proximal interphalangeal joint in the horse: a cyclic biomechanical comparison of two and three parallel cortical screws inserted in lag fashion. Vet Surg. 2010;39:91–94.
- Read EK, Chandler D, Wilson DG. Arthrodesis of the equine proximal interphalangeal joint: a mechanical comparison of 2 parallel 5.5 mm cortical screws and 3 parallel 5.5 mm cortical screws. Vet Surg. 2005;34:142–147.
- Watt BC, et al. Arthrodesis of the equine proximal interphalangeal joint: a biomechanical comparison of three 4.5-mm and two 5.5-mm screws. Vet Surg. 2001;30:287–294.
- Watts AE, Fortier LA, Caldwell FJ. Proximal interphalangeal joint arthrodesis in a one-month-old foal for superficial digital flexor tendon and straight sesamoidean ligament disruption. Equine Veterinary Education, 2007, 19.8: 407-412
- Zert Z, Krisova S, Zuffova K. Pastern joint arthrodesis using two paraaxial and one axial crossed lag screws: a case report. Vet Med-Czech, 2013, 58.6: 322-326.

DETEKCIA ANTIMIKROBIÁLNEJ AKTIVITY V TRÁVIACOM TRAKTE *APIS MELLIFERA*

Kratochwillová S.^{1,2}, Kopčáková A.¹, Guľašová A.¹, Javorský P.¹

¹Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, Košice 04001

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, Šrobárova 2, Košice 04154

ABSTRAKT

Trávaci trakt včiel je osídlený množstvom baktérií. Zloženie mikrobiómu tráviaceho traktu závisí od spôsobu výživy, prostredia a fyziologických zmien spojených s vekom včiel. V posledných rokoch sa zdravotný stav včiel zhoršuje. Jednou z príčin sú ochorenia, ktoré môžeme rozdeliť na parazitárne, mykotické, vírusové a bakteriálne. Medzi celosvetovo rozšírené ochorenia včiel patrí mor včelieho plodu, ktorého pôvodcom je baktéria *Paenibacillus larvae*, na ktorú doposiaľ neexistuje žiadna účinná liečba. V súčasnosti sa preto hľadajú rôzne alternatívy biologickej ochrany. Cieľom našej práce bolo selektovať baktérie primárne z tráviaceho traktu včiel s antimikrobiálnou aktivitou voči tejto patogénnej baktérii. Kultivačnými metódami bolo na selektívnych a neselektívnych agarových médiách zachytených množstvo izolátov nachádzajúcich sa v tráviacich traktach včiel, z ktorých boli doposiaľ vybrané izoláty s antimikrobiálnou aktivitou voči moru včelieho plodu detegované v prvom kroku pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie, neskôr sekvenčnou analýzou 16S rRNA génu ako *B. pumilus* M1-2, *B. licheniformis* 3SV15, *B. subtilis* TV1/1 a *B. megaterium* BM. Čiastočná charakterizácia fenotypu u vyššie uvedených izolátov rodu *Bacillus* na Biolog GEN III Microplate korelovala s genotypovou identifikáciou. Pomocou MIC stripov bola detegovaná rezistencia na klindamycín u *B. megaterium* BM a *B. licheniformis* 3SV15 a na chloramfenikol u *B. pumilus* M1-2. U *B. subtilis* TV1/1 nebola detegovaná rezistencia na žiadne antibiotikum, a tak možno predpokladať potenciál tohto kmeňa pri liečbe moru včelieho plodu. Pre potvrdenie tejto hypotézy sú však potrebné ešte ďalšie štúdie.

ÚVOD

Vyvážené zloženie mikrobiómu predstavuje jednu zo zložiek, ktoré sú zodpovedné za zdravie celého včelstva (Anderson a kol., 2011). Súčasťou tráviaceho traktu včiel sú prospešné a komenzálne mikroorganizmy, ale aj patogény. Interakcie medzi mikroorganizmami môžu mať na jednej strane synergický efekt s patogénmi, čo negatívne vplyva na zdravie včiel, ale takisto môžu niektoré baktérie poskytovať ochranu pred patogénmi (Engel a kol., 2016). Takáto skupina baktérií je zastúpená aj napríklad v rode *Bacillus*, ktorý je známy produkciou antimikrobiálnych látok, medzi ktoré patria aj bakteriocíny. Bakteriocíny majú široké spektrum účinku (Bhuvanewari a kol., 2015), ale vo všeobecnosti sa dá povedať, že majú antibakteriálny účinok voči fylogeneticky blízko príbuzným (Jasniewsky a kol., 2008). Medzi jedno z najzávažnejších ochorení postihujúce včely je mor včelieho plodu. Pôvodcom tohto ochorenia je *Paenibacillus larvae* (Neuendorf a kol., 2004). Doposiaľ neexistuje žiadny liek, ktorým by sa mohlo toto ochorenie liečiť. Jediný účinný spôsob „liečby“ je spálenie celého včelstva (Descamps a kol., 2016), čo má ekonomické dopady. Práve z tohto dôvodu, sa začali hľadať alternatívne spôsoby ako tomto ochoreniu zabrániť, alebo predísť (Mudroňová a kol., 2011) a to na báze prírodných biologických substancií, čo je aj cieľom našej práce zameranej na skupinu bakteriocínov, konkrétne na bakteriálny rod *Bacillus*.

MATERIÁL A METODIKA

Naše vzorky pochádzali zo včelích úl'ov (15 úl'ov) nachádzajúcich sa na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach a v Rozhanovciach. Z každého úl'a bolo odobratých desať včiel. Trávacie trakty včiel boli po vybratí rozsuspendované vo

fyziologickom roztoku a riedené metódou desatinného riedenia. Homogenizát bol inokulovaný na selektívne a neselektívne agarové pôdy, konkrétne na MYPGP agar (Las, CZ), NA (nutrient agar) (Laboratorios Conda, Španielsko) a TSA (Tryptone Soya Broth) (SIGMA-ALDRICH, USA). Po kultivácii pri 37°C boli zachytené izoláty identifikované pomocou MALDI-TOF MS a testované voči zbierke *P. larvae* (4488, 4484, D3, D4, 38, 5680, M1, 5S a 10S), ktorá sa nachádza na Ústave fyziológie hospodárskych zvierat, CBV SAV v Košiciach. Na testovanie inhibičnej aktivity bola použitá agarová difúzna metóda. Antibiotická rezistencia na vybrané antibiotiká bola testovaná pomocou testovacích MIC (*Minimal Inhibition Concentration*) stripov a získané výsledky boli porovnávané s tabuľkami EFSA (*European Food Safety Authority*). Na štúdium fenotypových vlastností boli použité Biolog GEN III Microplate testovacie panely (Biolog Inc., USA). DNA vybraných izolátov bola izolovaná pomocou GenElute Bacterial Genomic DNA kitu (SIGMA-ALDRICH, USA) a detegovaná pomocou elektroforézy v 0,8% agarózovom géli. 16S rRNA gén bol amplifikovaný PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Získané fragmenty očakávanej veľkosti boli zaslané na sekvenačnú analýzu a vyhodnotenú pomocou Blast (*Basic Logical Alignment Search Tool*) analýzy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Paenibacillus larvae predstavuje pre včely veľkú hrozbu. Nakoľko doposiaľ neexistuje žiadny liek, s ktorým by sa dalo bojovať proti moru včelieho plodu bolo nevyhnutné začať hľadať alternatívne metódy liečby. Jednou z metód je využitie baktérií, ktoré majú antimikrobiálny účinok voči pôvodcovi včelieho moru a zároveň sú neškodné pre včely. Z uvedeného dôvodu sme sa rozhodli študovať baktérie primárne z tráviaceho traktu včiel s antimikrobiálnou aktivitou voči tejto patogénnej baktérii. V našich experimentoch bolo doposiaľ študovaných 570 gastrointestinálnych traktov včiel. Klasickými kultivačnými metódami bolo zachytených na selektívnych a neselektívnych agarových pôdach veľké množstvo rôznych druhov baktérií, z ktorých bol pomocou MALDI-TOF MS selektovaný rod *Bacillus*, práve pre jeho známu produkciu bakteriocínov s antimikrobiálnou aktivitou a fylogeneticky blízku príbuznosť s rodom *Paenibacillus* (Abriouel a kol., 2010). Celkovo bolo pomocou MALDI-TOF MS identifikovaných 18 druhov baktérií rodu *Bacillus*: *B. megaterium*, *B. weihenstephanensis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis*, *B. oleronius*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. muralis*, *B. endophyticus*, *B. clausii*, *B. pumilus*, *B. simplex*, *B. niacini*, *B. saphensis*, *B. mariflavus* a *B. arsenicus*, z ktorých doposiaľ 4 testované druhy: *B. pumilus* M1-2, *B. licheniformis* 3SV15, *B. subtilis* TV1/1, *B. megaterium* BM vykazovali inhibičnú aktivitu voči zbierke *P. larvae*. Konkrétne *B. megaterium* BM vytváral slabé inhibičné zóny voči 2 z 9 izolátov *P. larvae*. *B. pumilus* M1-2 inhiboval 7 z 9 izolátov *P. larvae* a *B. licheniformis* 3SV15 vykazoval inhibičný účinok voči 8 z 9 *P. larvae*. Čo sa týka veľkosti zón, najväčšia veľkosť zón bola zaznamenaná u *B. subtilis* TV1/1, ktorý inhiboval rast všetkých *P. larvae* z našej zbierky. Antibiotickými MIC stripmi so známou koncentráciou antibiotika bola detegovaná rezistencia u *B. megaterium* BM a *B. licheniformis* 3SV15 na klindamycín a u *B. pumilus* M1-2 bola zistená rezistencia na chloramfenikol. Z doterajších literárnych zdrojov nie je známe, že by *B. megaterium* BM a *B. licheniformis* 3SV15 izolované z tráviaceho traktu včiel boli rezistentné na klindamycín a takisto nie je známe ani o kmeni *B. pumilus*, že by niesol prirodzené gény rezistencie voči chloramfenikolu. Môžeme však predpokladať, že ide o získanú rezistenciu. Posledným z nateraz testovaných druhov bol *B. subtilis* TV1/1, ktorý bol senzitívny voči všetkým nami testovaným antibiotikám. Štúdium fenotypových vlastností pomocou Biolog GEN III Microplate (Biolog Inc., USA) a korelácia s literatúrou potvrdila podobnosť s nami študovanými kmeňmi (Taale a kol., 2015). Sekvenčnou analýzou sme potvrdili výsledky získané pomocou MALDI-TOF MS a to konkrétne u izolátov *B. megaterium* BM, *B. subtilis* TV1/1, *B. pumilus* M1-2 a *B. licheniformis* 3SV15. Na základe

získaných výsledkov možno predpokladať potenciálne využitie kmeňa *B. subtilis* TV1/1 v prevencii moru včelieho plodu. Pre potvrdenie tejto hypotézy sú však potrebné ďalšie štúdie.

Táto práca vznikla s podporou projektu VEGA 2/0100/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abriouel H, et al. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiology Reviews. 2010; 35(1):201–232.
- Anderson KE, et al. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). Insectes Sociaux. 2011, 58:431-444.
- Bhuvanewari S, Madhavan S, Panneerselvam A. Optimization of bacteriocin production by *Bacillus subtilis* BMP01 isolated from *Solanum trilobatum* L. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 2015; 4(3):617-626.
- Descamps T, et al. Multiple locus variable number of tandem repeat analysis: A molecular genotyping tool for *Paenibacillus larvae*. Microbial biotechnology. 2016, 9(6), 772-781.
- European Food Safety Authority (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal. 2012; 10(6):2740.
- Engel P, et al. The bee microbiome: Impact on bee health and model for evolution and ecology of host-microbe interactions. American society for microbiology. 2016; 7(2):e02164-15
- Jasniewski J, et al. Optimization of the production and purification processes of carnobacteriocins Cbn BM1 and Cbn B2 from *Carnobacterium maltaromaticum* CP5 by heterologous expression in *Escherichia coli*. Journal of Microbiological Methods. 2008; 73(1), 41-48.
- Mudroňová D, et al. *Lactobacillus* sp. as a potential probiotic for the prevention of *Paenibacillus larvae* infection in honey bees. Journal of Apicultural Research. 2011; 50(4): 323-324
- Neuendorf S, et al. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial pathogen. Microbiology. 2004, 150, 2381-2390.
- Taale E., et al. Characterization of *Bacillus* species producing Bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) isolated from fermented food in Burkina Faso. Int. J. Adv. Res. Biol.Sci. 2015; 2(4):279-290.

VPLYV ZINKU A EXTRAKTU *THYMUS VULGARIS* NA ANTIOXIDAČNÝ A MINERÁLNY STATUS KRÁLIKOV

Kucková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Centra biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Rastlinné extrakty a stopové prvky používané ako nutraceutiká sú dôležité pre zdravie a produkciu hospodárskych zvierat vďaka ich zdraviu prospešným a antioxidačným účinkom. Cieľom našej práce bolo zistiť vplyv extraktu *Thymus vulgaris* a organického zinku na antioxidačný a minerálny status králikov stanovením koncentrácie Zn, Cu, Fe, Mn a antioxidačných parametrov v krvi alebo plazme a v tkanivách králikov. Zvieratá boli počas šiestich týždňov rozdelené do štyroch experimentálnych skupín: kontrolná skupina (1), zvieratá suplementované organickou formou zinku (2) alebo extraktom vňate *T. vulgaris* L. (3) a zvieratá suplementované kombináciou oboch aditív (4). Výsledky ukázali, že príjem extraktu *T. vulgaris* neovplyvnil negatívne koncentráciu stopových prvkov v plazme a tkanivách králikov. Príjem organického Zn a extraktu dúšky tymiánovej zlepšil antioxidačný status králikov, pričom súčasné podávanie oboch aditív sa pozitívne prejavilo predovšetkým v tkanive obličky signifikantným zvýšením celkovej antioxidačnej kapacity a aktivity glutatión peroxidázy, ako aj znížením lipidovej peroxidácie.

ÚVOD

Thymus vulgaris L. obsahuje mnoho biochemických zlúčenín (flavonoidy, fenolové zlúčeniny a terpenoidy), ktoré majú zdraviu prospešné, protizápalové, antibakteriálne a antivirálné účinky. Bioaktívne zlúčeniny tymol, karvakrol a iné fenolové deriváty sú zodpovedné za antioxidačné účinky dúšky tymiánovej (Hosseinzadeh a kol. 2015). Zinok zohráva dôležitú úlohu v množstve fyziologických a biochemických procesov, predovšetkým ako štrukturálny komponent mnohých metaloenzýmov (Sloup a kol., 2017). V systéme antioxidačnej ochrany pôsobí ako kofaktor antioxidačných enzýmov, stabilizátor sulfhydrylových skupín či ochrana bunkových membrán pred oxidačným poškodením. Zinok indukuje expresiu metalotioneínu, ktorý má viacero biologických úloh a okrem schopnosti priamo vychytávať voľné radikály, je taktiež zodpovedný za homeostázu zinku (Powell, 2000; Bonaventura a kol., 2015). Výhodou organických minerálnych zdrojov je vyššia biologická dostupnosť stopových prvkov, ich intestinálna absorpcia a nižšia exkrécia, v porovnaní s tradične využívanými anorganickými formami, avšak literárne údaje v tomto smere sú často nejednotné (Cao a kol., 2000).

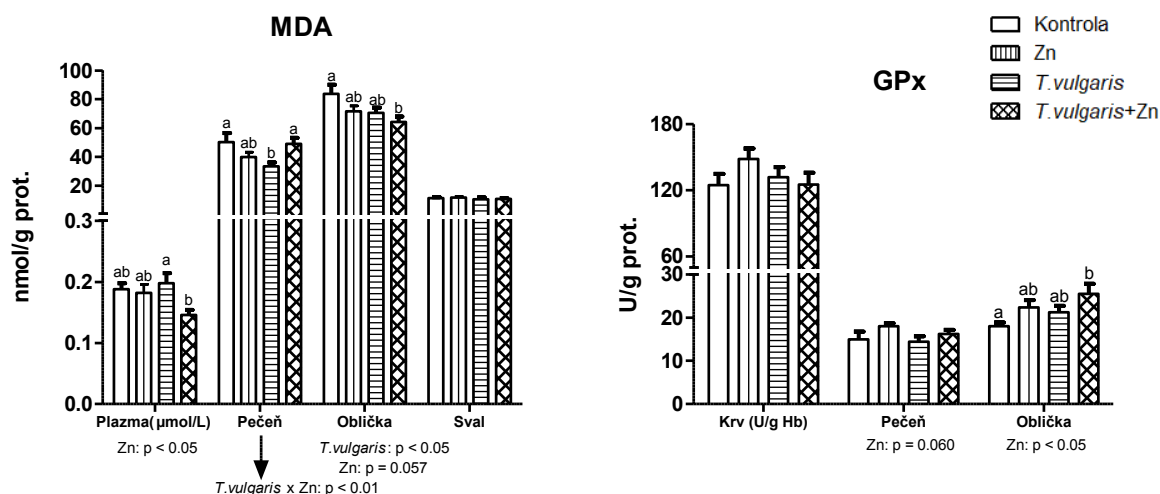
MATERIÁL A METODIKA

Deväťdesiatšesť králikov (lína P91 a M91) vo veku 35 dní bolo rozdelených do štyroch skupín, pričom každá pozostávala zo 6 replikátov so 4 ks králikov v replikáte (24 ks/skupina). Zvieratá boli umiestnené v štandardných klietkach (2 zvieratá/klietka) s voľným prístupom k vode. Všetky skupiny zvierat boli kŕmené komplexnou granulovanou bazálnou diétou (BD) *at libitum*. Prvá skupina bola kontrolná (89 mg Zn/kg). Zvieratá v druhej skupine boli suplementované príslušným množstvom Bioplexu-Zn, ktorá zodpovedala dávke 50 mg Zn/kg diéty (analyzovaný obsah 146 mg Zn/kg krmiva). Zvieratá v tretej skupine dostávali 0,1 % extrakt vňate *Thymus vulgaris* L. (*Calendula a.s.*) v pitnej vode. Zvieratá vo štvrtej skupine boli suplementované kombináciou oboch aditív. Po 42 dňoch experimentu boli zvieratám (1 zviera/replikát) odobraté vzorky krvi a po usmrtení aj vzorky tkanív (pečeň, oblička, sval MLD, mukóza jejuna). V krvnej plazme a tkanivách bola stanovovaná koncentrácia stopových prvkov Zn, Cu, Fe, Mn pomocou atómového absorpčného spektrofotometra (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko) (Grešáková a kol., 2016). Spektrofotometrickými metódami sme stanovovali aktivitu superoxid dismutázy (SOD, Cu/Zn SOD) (Marklund

a Marklund, 1974), aktivitu katalázy (CAT) (Aebi, 1983), aktivitu glutatión peroxidázy (GPx) (Paglia a Valentine, 1967) a koncentráciu celkových sulfhydrylových skupín (TSH) (Ellman, 1959). Celková antioxidačná kapacita (TAC) bola stanovovaná metódou FRAP (Benzie a Strain, 1996) a koncentrácia malodialdehydu (MDA) spektrofluorometrickou metódou podľa Jo a Ahn (1998). Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá dvojcestná analýza variancie (ANOVA) na zistenie vplyvu Zn, extraktu *T.vulgaris* alebo ich vzájomnej interakcie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýzou etanolového extraktu *Thymus vulgaris*, ktorá bola vykonaná pomocou vysoko účinnej hmotnostnej spektrometrie a plynovej chromatografie, bol preukázaný obsah flavonoidov (271,97 mg/g extraktu) a fenolových kyselín (315 mg/g extraktu), ako aj hlavných bioaktívnych zložiek extraktu: tymolu 5,22 %, karvakrolu 2,23 % a vanilínu 1,89 %. Výsledky naznačujú, že bioaktívne zložky *T.vulgaris* L. majú prospešné antioxidačné účinky (Zotte a kol., 2016), nakoľko obsah MDA, ktorý je považovaný za indikátor lipidovej peroxidácie, bol signifikantne znížený v obličke ($p < 0,05$) a v plazme ($p < 0,05$), pričom najnižšie hodnoty boli pozorované v skupine dostávajúcej kombináciu oboch aditív (Obr.1.). Príjem diét obohatených o organický Zn mal za následok zvýšenie celkovej antioxidačnej kapacity ($p < 0,01$), koncentrácie celkových sulfhydrylových skupín ($p < 0,05$) v obličke, s najvyššími hodnotami zaznamenanými v skupine suplementovanej oboma aditívami. Vplyv prijímaných diét na aktivitu antioxidačných enzýmov sa prejavil iba zvýšenou aktivitou GPx v obličke zvierat dostávajúcich Zn (Obr.1.), pričom najvyššia aktivita bola opäť zistená u zvierat dostávajúcich kombináciu oboch aditív v porovnaní s kontrolnou skupinou ($p < 0,05$). Antioxidačný účinok zinku prostredníctvom GPx sa môže prejavovať dvojakým spôsobom. Jednak tým, že ovplyvňuje expresiu glutamát-cysteín ligázy, ktorá je zapojená do syntézy glutatiónu, ktorý priamo neutralizuje voľné radikály alebo nepriamo ako kofaktor antioxidačného enzýmu glutatión peroxidázy (Marreiro a kol., 2017).



Obr.1. Koncentrácia MDA a aktivita GPx v plazme alebo krvi a v tkanivách králikov

Aktivita SOD, špecifickej Cu/Zn SOD a katalázy neboli ovplyvnené príjmom experimentálnych diét. Rovnako sme signifikantné zmeny nepozorovali v koncentráciách Mn a Fe v plazme a tkanivách. Koncentrácia Zn v obličke bola ovplyvnená príjmom *T.vulgaris* ($p < 0,001$), pričom najvyššie hodnoty boli pozorované v skupine dostávajúcej iba Zn, v porovnaní s oboma skupinami dostávajúcimi extrakt dúšky tymiánovej. Nadmerný príjem zinku môže mať za následok deficienciu medi, s čím môžu súvisieť aj ďalšie nepriaznivé

účinky a patologické prejavy (Sloup a kol., 2017). V našom experimente bol obsah zinku v diéte králikov do maximálnej povolenej koncentrácie Zn v kompletnej krmnej zmesi, čo predstavuje u králikov 150 mg Zn/kg krmiva (EC, 2020). Napriek tomu, príjem Zn v našom experimente mal za následok zníženie koncentrácie Cu vo svaloch ($p < 0,05$). Podobná tendencia bola pozorovaná aj v plazme ($p = 0,056$). Tieto výsledky naznačujú možný antagonistický vzťah Cu a Zn pri ich absorpcii (Sloup a kol., 2017).

Na základe koncentrácie stopových prvkov v plazme a tkanivách môžeme konštatovať, že príjem extraktu *T. vulgaris* (0,1 %) vodou neovplyvňuje absorpciu stopových prvkov u králikov. Príjem organického Zn a tymiánu pozitívne ovplyvnil antioxidačný status zvierat, čo sa najviac prejavilo predovšetkým v tkanive obličky pri súčasnom prijímaní oboch nutraceutík.

Práca bola podporená grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-17-0297.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aebi HE. Catalase. Methods of enzymatic analysis. 1983; 3:273-286.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. biochem. 1996; 239:70-76.
- Bonaventura P, et al. Zinc and its role in immunity and inflammation. Autoimmunity reviews. 2015; 14:277-285.
- Cao J, et al. Chemical characteristics and relative bioavailability of supplemental organic zinc sources for poultry and ruminants. Anim. Sci. J. 2000; 78:2039-2054.
- EC. Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No. 1831/2003. Luxembourg: Publications Office of the European Union. 2020. Dostupné online: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/animal-feed-eu-reg-comm_register_feed_additives_1831-03.pdf
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 1959; 82:70-79.
- Grešáková L, Venglovská K, Čobanová K. Dietary manganese source does not affect Mn, Zn and Cu tissue deposition and the activity of manganese-containing enzymes in lambs. JTEBF. 2016; 38:138-143.
- Hosseinzadeh S, et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: A review of *Thymus vulgaris*. Int. J. Clin. Med. 2015; 635-642.
- Jo C, Ahn DU. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. Poult. Sci. 1998; 77:475-480.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974; 47:469-474.
- Marreiro DN, et al. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. Antioxidants. 2017; 6:24-33.
- Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967; 70:158-169.
- Powell S. The antioxidant properties of zinc. J. Nutr. 2000; 130:1447-1454.
- Sloup V, et al. Zinc in the animal organism: a review. SAB. 2017; 48:13-21.
- Zotte AD, Celia C, Szendrő Zs. Herbs and spices inclusion as feedstuff or additive in growing rabbit diets and as additive in rabbit meat: A review. Livest. Sci.. 2016; 189:82-90.

POSÚDENIE FUNKCIE SIETNICE U PSOV S *DIABETES MELLITUS*

Lapšanská M., Balicka A., Trbolová A.

Klinika malých zvierat, UVLF Košice

ABSTRAKT

Oko je obzvlášť citlivé na rôzne patologické procesy prebiehajúce v organizme. U psov s endokrinopatiami a metabolickými ochoreniami je riziko vývoja rôznych oftalmologických ochorení vyplývajúcich z hormonálnej a metabolickej dysbalancie. Cieľom práce bolo posúdenie funkcie sietnice u psov s ochorením *Diabetes mellitus* (DM). Oftalmologické vyšetrenie u pacienta s *Diabetes mellitus* sa vykonáva podľa štandardného oftalmologického protokolu pomocou špeciálneho prístrojového vybavenia. Elektroretinografické (ERG) vyšetrenie poskytuje informácie o fungovaní sietnice u rôznych druhov zvierat. Výsledky ERG vyšetrenia boli analyzované meraním a- a b-vln implicitného času a amplitúdy vlny. Amplitúda a-vlny a b-vlny počas štandardnej stimulácie zmiešanej odozvy tyčiniek a čapíkov sa javila štatisticky významne nižšia u psov s *Diabetes mellitus* v porovnaní so zdravou skupinou psov.

ÚVOD

Oko svojou štruktúrou, funkciou a anatómiou patrí k jedným z najzložitejších orgánov. Je jedinečné svojou transparentnosťou, čo umožňuje vo veľkej miere jeho priame vyšetrenie bez použitia invazívnych metód. Je dôležitým zdrojom informácií o zdravotnom stave vyšetřovaného jedinca. Okrem ochorení samotných očí je pri komplexnom oftalmologickom vyšetrení možné odhaliť aj niektoré systémové poruchy zdravia. Je veľmi veľa systémových ochorení, medzi ktoré patrí aj *Diabetes mellitus* a prejavujú sa očným a orgánovým poškodením. U psov s endokrinopatiami a metabolickými ochoreniami je riziko vývoja rôznych oftalmologických ochorení vyplývajúcich z hormonálnej a metabolickej dysbalancie (Plummer a kol., 2007). Sietnica a optický nerv sú deriváty predného mozgu a ich morfológia a fyziológia je podobná mozgu. Senzorická sietnica je pripojená k mozgu optickým nervom a optickými dráhami. Fotoreceptorové bunky sietnice obsahujú komplexnú vrstvu špecializovaných buniek (tyčiniek a čapíkov), ktoré obsahujú fotopigmenty a menia sa po expozícii svetlom a produkujú chemickú energiu. Táto energia je potom konvertovaná do elektrickej energie, ktorá je nakoniec prenesená do centra videnia v mozgu (Ofri, 2013, Martin, 2005). Elektroretinografia je neinvazívne, objektívne vyšetrenie sietnice, ktoré poskytuje informácie o funkcii jednotlivých bunkách sietnice. Cieľom vyšetrenia je elektrická stimulácia sietnice rôznou intenzitou svetla a jej prenos cez jednotlivé bunky sietnice do mozgu. Odpoveď na stimuláciu buniek sietnice dáva ucelený obraz o jej funkcii. ERG je bežná diagnostická metóda v humánnom a veterinárnom lekárstve (McLellan a kol., 2015).

MATERIÁL A METODIKA

Výber pacientov

V štúdiu bolo vyšetrených 27 mezocefalických psov, rôznych plemien. Pacienti boli rozdelení do dvoch skupín a podrobení celkovému klinickému, oftalmologickému a laboratórnemu vyšetreniu. Kontrolná skupina (KO) pozostávala zo 14 pacientov (7 samíc a 7 samcov) vo veku od 4 do 11 rokov. Pacienti s akoukoľvek zmenou v klinickom, oftalmologickom alebo laboratórnem vyšetrení boli zo štúdie vyradení. Druhú skupinu tvorilo 13 pacientov (9 samíc a 4 samci) s ochorením *Diabetes mellitus* v terapii vo veku od 7 do 11 rokov.

Postup elektroretinografického vyšetrenia

Oftalmologické vyšetrenie bolo vykonané minimálne hodinu pred začatím samotného ERG vyšetrenia. Vyšetrenie bolo vykonané v mydriáze. Na mydriázu zreníc boli použité 1% očné

kvapky tropikamidu (Unitropic 1%, United Pharma, Slovensko). Očné kvapky boli aplikované 2 krát v 15 minútovom intervale. Nasledovala 20 minútová adaptácia v tmavej miestnosti pri tlmenom červenom svetle. Aktívna elektróda bola aplikovaná na rohovku. Priestor medzi aktívnou elektródou a rohovkou bol vyplnený 2,5% metylcelulózou (Goniovisc, Ocu Science, USA). Referenčná elektróda bola umiestnená do podkožia 3 centimetre od laterálneho očného kútika. Uzemňovacia elektróda bola umiestnená do podkožia v oblasti *os occipitale*. Všetky elektródy boli pripojené do prístroja HMSeRG (Handheld Multi-species Electrorretinography, Model 2000, Ocu Science, USA). Na prístroji bol zvolený QuickRetCheck Plus protokol. Výsledky boli automaticky zaznamenané na pamäťovú kartu prístroja.

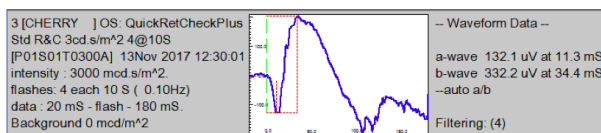
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky ERG vyšetrenia boli analyzované meraním a- a b-vln implicitného času a amplitúdy vlny ľavého oka. Amplitúda a-vlny bola meraná od prestimulačnej základnej vlny do bodu a-vlny a amplitúda b-vlny bola meraná od a-vlny k vrcholu b-vlny. Implicitný čas a-vlny bol meraný od začiatku stimulu do bodu a-vlny a implicitná doba b-vlny bola meraná od začiatku stimulu k vrcholu b-vlny.

V rámci štatistickej analýzy boli použité základné metódy spracovania dát doplnené o neparametrický Studentov T-test na hladine významnosti $P < 0,05$. Štatistickou analýzou dát týkajúcich sa stimulácie zo zmiešanej odozvy tyčíniek a čapíkov (Std R&C) ľavého oka s porovnaním kontrolnej skupiny psov a skupiny psov s *Diabetes mellitus* bol zistený štatisticky význam. Amplitúda a-vlny a b-vlny počas štandardnej stimulácie R&C sa javila štatisticky významne nižšia ($p < 0,05$) u psov s *Diabetes mellitus* v porovnaní so zdravou skupinou psov. Priemerné hodnoty Std R&C amplitúdy a-vlny boli pri kontrolnej skupine psov $115,43 \pm 25,28$ uV a pri skupine psov s *Diabetes mellitus* $80,66 \pm 28,88$ uV. Priemerné hodnoty Std R&C amplitúdy b-vlny boli pri kontrolnej skupine psov $258,36 \pm 65,38$ uV a pri skupine psov s *Diabetes mellitus* $186,21 \pm 54,08$ uV. Pri štatistickom porovnaní kontrolnej skupiny psov a skupiny psov s *Diabetes mellitus* boli zaznamenané isté odlišnosti z hľadiska skúmaných parametrov Std R&C implicitného času a-vlny; Std R&C implicitného času b-vlny; Std R&C b/a pomer amplitúdy; avšak rozdiely neboli štatisticky významné na hladine významnosti $P < 0,05$.

Tab.1. Rozsah hodnôt implicitného času a amplitúdy vlny pri ERG vyšetrení **Obr.1. Elektretinogram zdravého psa**

		KO (kontrolná skupina) (n=14)					DM (diabetes mellitus) (n=13)					T-test
		Average	Median	± std	Min	Max	Average	Median	± std	Min	Max	P hodnota
Std R&C	a-wave - amplituda [uV]	115,43	125,25	25,28	60,20	144,80	80,66	83,30	28,88	29,80	134,30	0,0016
	a-wave - implicit. č. [ms]	13,44	13,50	1,57	10,90	15,60	13,88	14,00	1,80	9,80	16,50	0,2479
	b-wave - amplituda [uV]	258,36	249,10	65,38	170,40	381,10	186,21	201,90	54,08	95,50	261,70	0,0036
	b-wave - implicit. č. [ms]	40,02	34,65	11,81	29,90	66,20	34,12	29,60	11,25	21,90	61,30	0,0984
	b/a ration amplitúdy [uV]	2,35	2,32	0,79	1,23	3,66	2,57	2,45	0,93	1,57	4,59	0,2697



Katarakta patrí k najčastejšiemu patologickému prejavu na očiach u zvierat s DM (Gelatt, 2014). Elektretinografia je elektrodiagnostická metóda, ktorá umožňuje objektívne vyšetriť a posúdiť funkciu sietnice. Vo veterinárnej medicíne sa ERG vyšetrenie vykonáva na stanovenie vrodených dedičných a získaných ochorení sietnice a na posúdenie sietnice, keď nie je možné vykonať oftalmoskopické vyšetrenie v dôsledku netransparentnosti rohovky, prednej očnej komory, šošovky a pri zákaloch sklivca (Narfström a kol., 2013).

Elektroretinografický záznam môže byť ovplyvnený vekom, plemenom, veľkosťou zreníc, adaptáciou do tmy, elektródami a intenzitou svetelných stimulov (Ekesten 2007), dedičnými ochoreniami sietnice (Safatle a kol., 2005) diabetickou retinopatiou (Layton a kol., 2007), kataraktou, šošovkou indukovanou uveitídou (Maehara a kol., 2007) a glaukómom (Ofri a kol., 1993). Pri katarakte sú z dôvodu filtrácie, redukcie svetelných stimulov, ktoré cez ňu prechádzajú. Zníženie amplitúdy vlny a oneskorený čas rôznych stimulácií boli popísané často u ľudí s *Diabetes mellitus*, ktorý mali diabetickú retinopatiu (DR) čo môže súvisieť so závažnosťou vývoja retinopatie a rýchlosťou progresie. U ľudí bolo tiež dokázané, že pri ERG vyšetrení sa najprv predĺžil čas odpovede, skôr ako redukcia amplitúdy vlny. Toto tvrdenie bolo popísané aj pri maximálnej svetelnej stimulácii a pri stimulácii blikajúcim svetlom (Bresnick & Palta 1987). Oneskorená odpoveď sietnice je porovnateľná s inými poruchami neurotransmisie v nervovom systéme u pacientov s DM. Bolo popísaných niekoľko štúdií oneskorenej vodivosti v iných elektrofyziologických testoch u pacientov s DM a tiež aj vodivosti v oblasti kortexu mozgu (Parisi a kol., 1997). Naša štúdia potvrdila podobné výsledky ako štúdia podľa Safatle 2010 (Safatle a kol., 2010). U pacientov s DM bola amplitúda a-vlny a b-vlny počas štandardnej stimulácie R&C štatisticky významne nižšia ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou psov. Štatistickým porovnaním kontrolnej skupiny psov a skupiny psov s *Diabetes mellitus* boli zaznamenané isté odlišnosti implicitného času z hľadiska skúmaných parametrov štandardnej zmiešanej odpovede tyčínok a čapíkov.

Táto práca vznikla vďaka podpore VEGA 1/0479/18.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bresnick GH, Palta M. Temporal aspects of the electroretinogram in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* 1987; 105:660-664.
- Ekesten B. Ophthalmic examination and diagnostics, *Veterinary Ophthalmology*. 4th ed. 2007; 520-535.
- Gellat KG. Systemic Disease and the Eye. *Essential of Veterinary Ophthalmology*, 3th edition, 2014, 571- 573.
- Layton CJ, Safa R, Osborne NN. Oscillatory potentials and the b-wave: partial masking and interdependence in dark adaptation and diabetes in the rat. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2007; 245:1335-1345.
- Maehara S, et al. The effects of cataract stage, lens-induced uveitis and cataract removal on ERG in dogs with cataract. *Vet. Ophthalmol.* 2007; 10:308-312.
- Martin CL. *Ophthalmic Disease in Veterinary Medicine*. London: Manson Publishing. 2005; 401—470.
- McLellan GJ, Narfström K. The fundus. *BSAVA Manual of Canine and Feline Ophthalmology*, 3rd ed. 2015; 322—356.
- Narfström K, Petersen-Jones SM. Diseases of the canine ocular fundus. *Veterinary Ophthalmology* 5th ed. 2013; 1303—1392.
- Ofri R, et al. Chronic ocular hypertension alters local retinal responsiveness. *Brit. J. Ophthalmol.* 1993; 77:502-508.
- Ofri R. Retina. *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*. 4th ed. 2013; 299-333.
- Parisi V, et al. Electrophysiological assessment of visual function in IDDM patients. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1997; 104:171-179.
- Petersen-Jones S, Tuntivanich N, Montiani-Ferreira F. Electroretinograms of dog and chicken. *Principles and Practice of Clinical Electrophysiology of Vision*. 2006; 911-921.
- Plummer CE, Specht A, Gelatt KN. Ocular Manifestation of Endocrine Disease. *Vet. Folio.* 2007; 2: 733- 743.
- Safatle AMV, et al. Comparison of full-field electroretinogram in diabetic and non diabetic dogs with cataracts. *Pesq. Vet. Bras.* 2010; 30(12):1071-1076.
- Safatle AMV, et al. Retinal degeneration in a Pit Bull dog: Electroretinographic findings. *Arch. Vet. Sci.* 2005; 10:119-124.

CHEMICKÁ INDUKCIA ULCERÓZNEJ KOLITÍDY PROSTREDNÍCTVOM DSS U PGF MODELU ZVIERAT

Lauko S.¹, Gancarčíková S.¹, Hřčková G.², Andrejčáková Z.³, Hajdučková V.¹, Maďar M.¹, Kolesár Fecskeová L.⁴, Mudroňová D.¹, Mravcová K.⁵, Štrkolcová G.⁵, Nemcová R.¹, Bomba A⁶

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, Slovenská republika

²Parazitologický ústav, SAV, Košice, Slovenská republika

³Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Košice, Slovenská republika

⁴Mikrobiologický ústav Českej akadémie vied, Centrum Algatech, Třeboň, Česká republika

⁵Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF, Košice, Slovenská republika

⁶Ústav experimentálnej medicíny, LF UPJŠ, Košice, Slovenská republika

ABSTRAKT

Experiment bol realizovaný na 126 ks specific pathogen-free (SPF) samičiach myši línie BALB/c. V I. fáze postupu boli zvieratá dekontaminované selektívnymi antibiotikami (*per os* aplikovaný amoxicilín a s.c. ciprofloxacín). V II. fáze postupu sme na PGF (pseudo germ-free) modeli sledovali patogenézu akútnej ulceróznej kolitídy (UC) pri rôznych koncentráciách (1, 3 a 5%) jej chemickej indukcie prostredníctvom DSS (dextran sulfátu sodného). Cieľom našej štúdie bolo získanie animálneho gnotomodelu, respektíve PGF modelu UC po chemickej expozícii DSS. Na základe dekontaminácie selektívnymi antibiotikami a sledovanej patogenézy UC pri rôznych koncentráciách jej chemickej indukcie expozíciou DSS sme získali optimálny animálny PGF model UC, manifestujúci sa stratou mucínu, degradáciou epitelu, infiltráciou neutrofilov v *lamina propria* a *submucosa*, kryptidídou, doprevádzaný znížením prežívateľnosti črevnej mikrobioty, úbytkom hmotnosti, dehydratáciou, miernym krvácaním z rekta a znížením vybraných markerov bunkovej proliferácie a apoptózy (PCNA, bcl-xl), ktoré boli detegované imunohistochemickou analýzou. Získaná optimálna indukcia akútnej UC expozíciou 5% DSS bude následne použitá v postupoch s transplantáciou fekálnej mikrobioty využitím PGF animálneho modelu.

ÚVOD

Pojem inflammatory bowel disease (IBD) alebo idiopatické zápalové črevné ochorenia označujú skupinu zápalových chorôb tráviaceho traktu so striedajúcimi sa obdobiami relapsu a remisie. Chorobné jednotky Crohnova choroba a ulcerózna kolitída tvoria dve hlavné manifestácie IBD, ktoré sa odlišujú hlavne lokalizáciou zápalových ložísk v tráviacom trakte a rozsahom histopatologických zmien v intestinálnej stene. Animálne modely chápeme ako špecifickú kombináciu živočíšneho druhu, buniek, tkanív spolu s genómom a iritujúcej látky, pod ktorej vplyvom sa navodí alebo napodobní proces ochorenia a patologického stavu, ktoré sú predmetom výskumu. Experimentálny výskum hľadajúci riešenia mnohých biologických a biomedicínskych otázok, týkajúcich nespočetných interakcií hostiteľ - patogén spojených s infekčnými chorobami a v neposlednom rade aj s vývinom nových liečiv, by nebol možný bez zložitých biologických systémov, ktoré predstavujú laboratórne zvieratá a animálne modely.

MATERIÁL A METODIKA

In vivo experiment schválený ŠVPS SR s protokolárnym č. 4073/18-221/3 bol vykonaný na SPF myšiach samičieho pohlavia, línie BALB/c z chovu Velaz s.r.o. (Praha) v počte 126 ks. I. fáza postupu cieľila na dekontamináciu zvierat selektívnymi antibiotikami. Cieľom II. fázy postupu bolo získanie akútnej ulceróznej kolitídy chemickou indukciou DSS, podľa nasledovnej aplikačnej schémy (**Tab.1**). Na sledovanie mikrobiologických parametrov v oboch fázach experimentu sme použili: kultivačné vyšetrenie (TSA agar, Schaedler Agar), prežívateľnosť cekálnych mikroorganizmov sa sledovala pomocou fluorescenčne aktivovaného triedenia buniek (FACS) vizualizovaného pomocou fluorescenčného rýchleho testu životaschopnosti na polykarbonátovom filtri (VFQTOPF), identifikácia

kultivovateľných baktérií prebehla na základe PCR reakcie a ich sekvencií génu 16S rRNA, identifikácia nekultivovateľných baktérií bola realizovaná amplikónovým sekvenovaním NGS. Hodnotenie stupňa chemicky navodenej UC pri rôznych koncentráciách aplikovaného DSS tvorili dva bodové systémy: disease activity index (DAI) a histological activity index (HAI). Narušenie rovnováhy medzi proliferáciou epitelových buniek a apoptózou bolo sledované proliferáčnym markerom PCNA (proliferating cell nuclear antigen) a markerom bunkovej apoptózy bcl-xl.

Tab.1 Aplikáčná schéma postupu

Skupina	Aplikácia antibiotík (každých 12 hodín po dobu 5 dní)	Rekonvalescencia	Indukcia IBD (chemický DSS)
AM1 (n=37)	Amoxicilín potencovaný klavulanátom draselným v dávke 0,2 ml <i>per os</i> (s koncentráciou účinnej látky 387,11 mg/kg/myš) + Ciprofloxacín 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)
AM3 (n=37)			DSS 3% (vo vode v 3% koncentrácii po dobu 5 dní)
AM5 (n=37)			DSS 5% (vo vode v 5% koncentrácii po dobu 5 dní)
K (n=15)			-

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Humánou mikrobiotou asociovaný gnotobiotický animálny model predstavuje z hľadiska štúdií zameraných na mechanizmy rôznych ciest patogenézy a alternatívnych možností terapie IBD nezastupiteľnú studnicu potenciálnych nových poznatkov. Aj napriek jedinečnosti a prevratným zisteniam dosiahnutých na animálnych modeloch v medicínskom výskume, je nutné brať na zreteľ skutočnosť, že žiadny model nezachytáva zložitost' a komplexnosť ľudského organizmu, čo platí aj pre patogenézu IBD (Kiesler a kol., 2015). Prietokovou cytometriou sme potvrdili negatívny vplyv 5-dňovej antibiotickej dekontaminácie na prežívateľnosť cekálnej mikrobioty zvierat, s jej významne zníženou aktivitou, pohybujúcou sa na úrovni 16.2% ($p < 0.001$), v porovnaní s obdobím pred aplikáciou ATB (74.5%). K významnému vzostupu prežívateľnosti cekálnych mikroorganizmov ($p < 0.001$) došlo na 10. deň po ukončení aplikácie ATB, pohybujúcej sa na úrovni 54.9 %. Aj keď širokospektrálne antibiotiká značne redukujú väčšinu bakteriálnych druhov, určitá časť intestinálnej mikrobioty pretrváva (Hansen, 1995). K obdobnému výsledku sme dospeli aj v našej štúdiu, kde sa pred aplikáciou ATB pohybovali počty kultivovateľných mikroorganizmov v truse SPF myší na úrovni 8.2 \log_{10} CFU/g, po 5-dňovej aplikácii ATB sme vo vzorkách trusu prítomnosť kultivovateľných mikroorganizmov už nezaznamenali, ale k opätovnému významnému navráteniu počtov kultivovateľných mikroorganizmov ($p < 0.001$) došlo na 10. deň od ukončenia aplikácie ATB. Na základe kultivácie sme zo vzoriek trusu a obsahu céca potvrdili dva morfológicky odlišné typy kolónií, ktoré pri analýze úseku DNA zodpovedajúceho 16S rRNA prostredníctvom BLAST-n analýzy, identifikovali ako *Escherichia coli* (GenBank: CP 025910.1) a *Enterococcus gallinarum* (GenBank: JN 412816.1). Päť dňová aplikácia ATB mala za následok redukciiu nekultivovateľnej zložky intestinálnej mikrobioty v prospech kmeňa *Firmicutes* (98,54%), ktorému dominuje čeľaď *Clostridiales* (98,5%), konkrétne druh *Roseburia* sp. (95%). Histologické rezy kolonu skupiny AM5 vykazovali značne narušenú histologickú architektúru *tunica mucosa* a *tela submucosa*. V rámci histologického skóre sme potvrdili významne vysokú pozitívnu koreláciu medzi infiltráciou zápalových buniek a eróziou epitelu ($r = 0.864$, $p < 0.001$). Tieto výsledky zodpovedajú tvrdeniam autorov štúdií, v ktorých bolo tiež použité DSS na indukciu kolitídy u myší (Matos a kol., 2013, Song a kol., 2013). Pri závažnom alebo dlhotrvajúcom zápale dochádza k deformácii a strate črevných krýpt (Erben a kol., 2014). Skupina AM5 vykazovala poškodenie črevných krýpt manifestované kryptitídou, deformitami alebo ich úplnou stratou na úrovni skóre 0.62.

Výsledky selektívnych morfológických parametrov kolonu skupiny AM5 preukázali zmenu histologickej architektúry kľkov oproti kontrolnej skupine (K), charakterizovanú významne nižšou reznou plochou kľkov, znížením ich výšky, sprevádzanú aj menšou hĺbkou krýpt ($p < 0.001$). V našej štúdií bola strata pohárikových buniek u experimentálnej skupiny myší (AM5) v porovnaní s kontrolou (K) na úrovni skóre 2.00, teda s maximálne 35% stratami týchto buniek, čo predstavovalo miernu úroveň ich deplécie. V rámci histologického skóre bola potvrdená významná, veľmi vysoká pozitívna korelácia medzi celkovým indexom histologickej aktivity (HAI) vs. redukciou gobletových buniek ($r = 0.912$, $p < 0.0001$). Pri ulceróznej kolitíde dochádza k narušeniu rovnováhy medzi proliferáciou epitelových buniek a apoptózou buniek (Pirincci a kol., 2020). Najbežnejšie používanými proliferačnými markermi sú antigény PCNA podieľajúce sa nielen na bunkovej proliferácii, ale aj na reparácii DNA po poškodení (Brown, 1990). Kvantifikáciou intenzity imunohistochemickej reakcie a expresie PCNA, vyjadrené ako relatívna optická denzita (ROD) rezu, sme zaznamenali predovšetkým u skupiny AM5 v porovnaní s kontrolnou skupinou (K) významne zníženú bunkovú proliferáciu ($p < 0.001$). Naopak, s ubúdajúcou koncentráciou aplikovaného DSS pri skupine AM1 bunková proliferácia stúpala. Negatívny vplyv aplikácie 5% DSS na bunkovú proliferáciu potvrdzuje aj zaznamenaná negatívna stredná korelácia PCNA markeru a indexu histologickej aktivity (HAI) ($r = - 0.563$), poukazujúca na vzťah medzi zvyšujúcim sa histologickým skóre a znižujúcou sa bunkovou proliferáciou. V tkanive kolonu myší bol imunohistochemickou analýzou ďalej detegovaný marker bunkovej apoptózy bcl-xl, ako anti-apoptotický marker. V poslednej dobe nadobúda tento proteín na význame v súvislosti s jeho spájaním sa ako markeru úspešnosti liečby IBD. Autori (Adachi a kol., 2015; Weder a kol., 2018), v svojich štúdiách popisovali zvýšenie expresie anti-apoptického markeru bcl-xl, ako markeru úspešnej liečby IBD a obnovenia rovnováhy medzi proliferáciou a apoptózou buniek enterocytov. Významné zníženie bcl-xl markeru u skupiny AM5 ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$) sme potvrdili, v porovnaní so všetkými skupinami (AM3, K a AM1). Negatívny vplyv 5% expozície DSS potvrdzuje aj nízka negatívna korelácia medzi markerom (bcl-xl) a HAI skóre ($r = - 0.309$). S klesajúcou koncentráciou DSS, naopak stúpala úroveň anti-apoptotického markeru podobne, ako marker bunkovej proliferácie PCNA. Po expozícii 5% DSS klesala aj prežívateľnosť cekálnej mikrobioty. Pozoruhodné bolo, že v závislosti od intenzity DAI sme u skupiny AM5 zaznamenali pri jej slabšej intenzite so skóre 1-2 prežívateľnosť cekálnej mikrobioty na úrovni 74.4%, a pri intenzite DAI na úrovni 5-6 sa prežívateľnosť mikrobioty pohybovala na úrovni 38.2 %. Nami získané výsledky jednotlivých analýz jednoznačne preukázali ako optimálnu 5% koncentráciu DSS na navodenie modelu akútnej ulceróznej kolitídy.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Adachi T, et al. Involvement of heat shock protein a4/apg-2 in refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2015; 21:31-9.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990; 17:489-503.
- Erben U, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7:4557-76.
- Hansen AK. Antibiotic treatment of nude rats and its impact on the aerobic bacterial flora. *Lab Anim.* 1995; 29:37-44.
- Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental models of inflammatory bowel diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015; 1:154-170.
- Arda-Pirincci P, Aykol-Celik G. Galectin-1 reduces the severity of dextran sulfate sodium (DSS)-induced ulcerative colitis by suppressing inflammatory and oxidative stress response. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020; doi: 10.17305/bjbm.2019.4539.
- Weder B, et al. BCL-2 levels do not predict azathioprine treatment response in inflammatory bowel disease, but inhibition induces lymphocyte apoptosis and ameliorates colitis in mice. *Clin Exp Immunol.* 2018; 193:346-360.
- Song JL, et al. Anti-inflammatory effects of kudingcha methanol extract (*Ilex kudingcha* C.J. Tseng) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Mol Med Rep.* 2013; 8:1256-62.
- Matos I, et al. Preventive and therapeutic oral administration of the pentacyclic triterpene α,β -amyryn ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: the relevance of cannabinoid system. *Mol Immunol.* 2013; 54:482-92.

VPLYV KOMPOSTOVACIEHO PROCESU NA PREŽÍVANIE MIKROORGANIZMOV V HNOJI HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Mindžáková I., Venglovský J., Gregová G., Sasáková N., Šubová E.

Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo posúdenie vplyvu kompostovacieho procesu na prežívanie indikátorových mikroorganizmov (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. koliformných mikroorganizmov a celkového počtu mikroorganizmov) a *Salmonella* spp. v komposte obohatenom o prírodný zeolit-klinoptilolit a hydratované vápno. Kompostovanie prebiehalo v troch porovnávacích hromadách hnoja hovädzieho dobytká počas 126 dní (kontrolná hromada, hromada s prídavkom zeolitu a hromada s prídavkom zeolitu a vápna). Prežívanie mikroorganizmov v hromadách so zeolitom a vápnom bolo ovplyvnené vyššími hodnotami pH (>8) a teploty (<52,8°C) v substráte. *Salmonella* spp. prežila v hromade s kombináciou zeolitu a vápna počas 41 dní, v hromadách so zeolitom a v kontrole preživala počas 63 dní. Počty indikátorových mikroorganizmov sa počas 126 dní kompostovania znížili o jeden až dva logaritmicke rady. Výsledky naznačujú, že kompost obohatený o zeolit má pozitívny vplyv na pokles počtu mikroorganizmov pričom prídavok vápna urýchľuje devitalizáciu patogénov v substráte.

ÚVOD

Kompostovanie patrí k prírodným, ekologicky a ekonomicky prijateľným metódam spracovania hnoja hospodárskych zvierat, pri ktorom dochádza k mikrobiálnemu rozkladu organických látok, ktorý však môže predstavovať riziko prenosu mikroorganizmov (aj patogénov) do potravinového reťazca. Pri nevhodnej aplikácii hnoja do poľnohospodárskej pôdy môže dôjsť ku kontaminácii poľnohospodárskych produktov. *Salmonella* spp. a *Escherichia coli* O157:H7 patria k mikroflóre tráviaceho traktu hospodárskych zvierat, zároveň sú najbežnejším etiologickým agensom spôsobujúcim ochorenia spojené s konzumáciou čerstvého ovocia a zeleniny kontaminovanej hnojom hospodárskych zvierat (Olaimat a Holley, 2012). V dôsledku ich nízkeho zastúpenia v environmentálnych podmienkach sa monitorovanie rizika v pôde opiera aj o detekciu indikátorových mikroorganizmov (Venglovský a kol., 2017). Cieľom tohto výskumu bolo zhodnotiť vplyv kompostovania obohateného o prídavok zeolitu a vápna na prežívanie patogénov v hnoji hovädzieho dobytká.

MATERIÁL A METODIKA

Kompostovanie prebiehalo v troch statických hromadách mechanicky zmiešaného hnoja hovädzieho dobytká a nasekanej slamy o objeme 1m³ (100 cm x 100 cm x 100 cm). V prvej kontrolnej hromade (K-hromada) bol kompostovaný hnoj hovädzieho dobytká bez prídavných látok. V druhej hromade bol kompostovaný hnoj hovädzieho dobytká s prídavkom prírodného zeolitu (ZEOCEM s.r.o) a haseného vápna (ZV-hromada) a do tretej hromady bol pridaný len zeolit (Z-hromada) do hmotnosti 2,5% celkového objemu kompostovaného substrátu. Zároveň sa do všetkých hromád pridávali mikroorganizmy *Salmonella typhimurium* (CCM 4763) a *Salmonella enteritidis* (CCM 4420). Počas 126 dní kompostovania bola meraná teplota substrátu termometrom Testo 175 T3 (Testo SE & Co. KGaA, Germany).

Z každej hromady boli odobraté vzorky (1, 2, 4, 6, 9, 14, 20, 27, 41, 63, 90 a 126 deň) na mikrobiologické a chemické stanovenie. pH vzoriek bolo merané pomocou prístroja HACH HQ440D. Zo základnej suspenzie riedenej desiatkovým riedením bolo rozterom naočkované 0,1 ml inokula na tuhé agarové médiá:

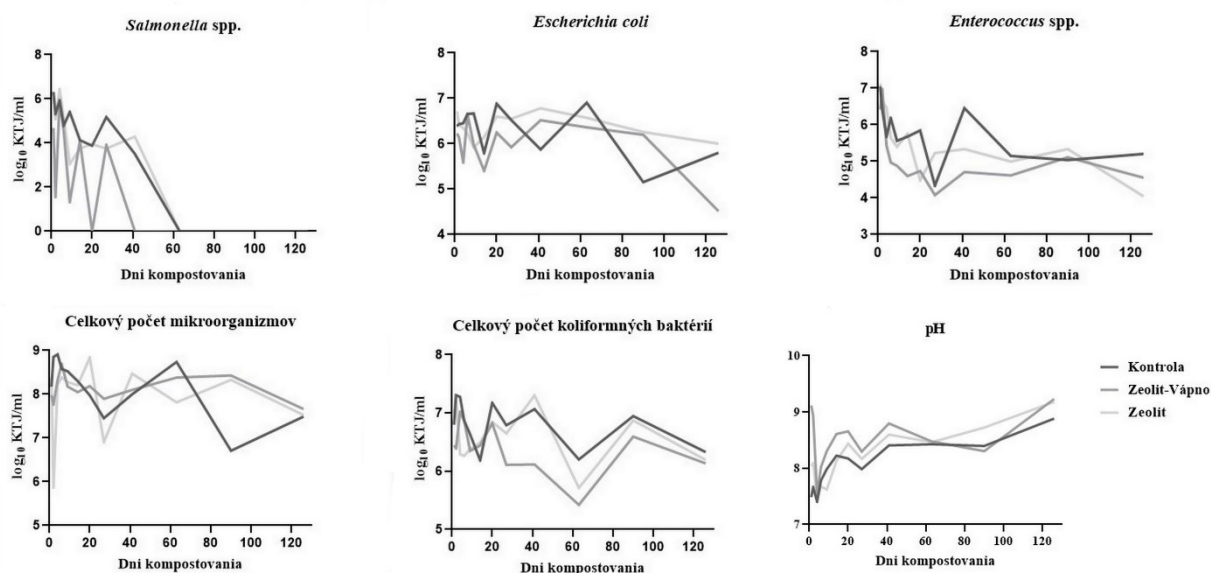
- Celkový počet mikroorganizmov – Mäso-peptónový agar – 37 °C/24 hodín,

- Celkový počet koliformných mikroorganizmov – Endo agar – 37 °C/24 hodín;
- Escherichia coli – Endo agar – 43 °C / 24 hodín;
- Enterococcus spp. – Slanetz-Bartley agar – 37 °C/48 hodín;
- Salmonella spp. – Salmonella-Shigella agar – 37 °C/24 hodín.

Na dôkaz stanovenia počtu a sérotypizáciu salmonel bola použitá horizontálna metóda STN EN ISO 6579-1:2018 za využitia selektívne obohateného tekutého média (Rappaport – Vassiliadis) a selektívnych tuhých agarov (XLD a Salmonella-Shigella). Vybrané kolónie boli testované EnteroPluri Testom (Liofilchem S.r.l., Taliansko) založeného na testovaní biochemických vlastností baktérií. Počty daných mikroorganizmov boli následne vyjadrené ako priemer troch vzoriek konvertovaných na \log_{10} KTJ/ml \pm štandardná odchýlka. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené analýzou rozptylu (one-way ANOVA) na hladinách významnosti $P < 0,05$, $P < 0,001$ a $P < 0,0001$ (GraphPad Prism 8).

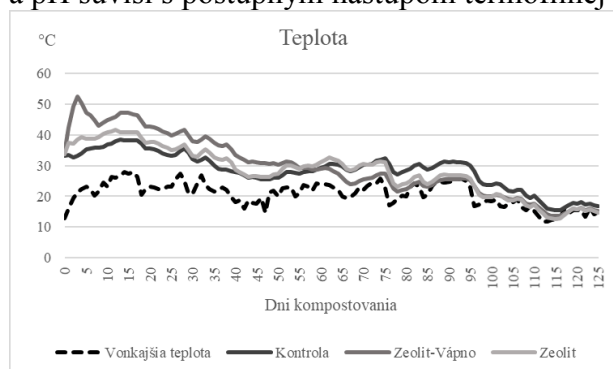
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po mechanickom zapracovaní zložiek kompostu došlo k zmenám mikrobiálnych populácií, ktoré neskôr vplyvom kompostovania klesali a pH, ktoré stúplo. Vývoj týchto parametrov je uvedený na obrázku 1.



Obr. 1. Zmeny v populácií mikroorganizmov a pH v hromadách kompostu

Na začiatku kompostovania sa počty vyšetřovaných mikroorganizmov zvýšili. Najvyššie počiatkové počty mikroorganizmov boli pozorované v kontrolnej hromade kompostu, čo súvisí s hygienickými vlastnosťami prídavných látok (zeolit, vápno). Ich vlastnosti sa prejavili aj v náraste pH v experimentálnych hromadách. Následný pokles počtu mikroorganizmov a pH súvisí s postupným nástupom termofilnej fázy v prvých dňoch kompostovania (obr. 1).



Obr. 1. Vývoj teplôt počas kompostovania hnoja hovädzieho dobytku

Maximálna teplota dosiahnutá v K-hromade bola 38,5°C, v Z-hromade bola 41,9°C na 14. deň kompostovania a v ZV-hromade bola na 4. deň kompostovania teplota 52,8°C.

Termofilná fáza kompostovania sa pohybuje v rozmedzí od 40°C do 65°C, pričom čo teploty nad 55 °C spôsobujú rýchlu devitalizáciu mikroorganizmov. Nedostatočný nárast teploty v experimente mohol byť zapríčinený zníženým prístupom kyslíka pre činnosť mikroorganizmov s čím súvisí nedostatočná dekompozícia organickej hmoty alebo relatívne malý objem hromád (zvýšená strata tepla. V termofilnej fáze došlo k signifikantnému zvyšovaniu pH na 8,1 – 8,6 ($P < 0,05$) následkom konverzie organického dusíka na NH_4^+ -N počas procesov rozkladu amoniaku. Počas kompostovania sa pH v hromadách s prídavkom zeolitu udržiavalo vo vyšších hodnotách v porovnaní s kontrolou ($P < 0,001$), čo sa pripisuje jeho sorpčným a kation-výmenným vlastnostiam.

Prežívanie mikroorganizmov bolo ovplyvňované aj vlhkosťou substrátu, ktorá sa postupne znižovala z iniciálnej hodnoty v K-hromade $82.12\% \pm 0.82$ na $77.36\% \pm 0.37$ ($P < 0,001$), ZV-hromade $80.39\% \pm 0.32$ na $73.10\% \pm 0.63$, a v Z-kope z $80.14\% \pm 0.23$ na $72.03\% \pm 0.61$ ($P < 0,0001$). Redukcia vlhkosti v ZV-hromade a Z-hromade je zapríčinená mikroporóznou štruktúrou zeolitu schopného udržať v sebe vodu až do 50% jeho celkovej hmotnosti (Vaneslow a kol., 2005). Následkom zmien teploty a chemického zloženia kompostu počas prvých dní procesu kompostovania dochádzalo k výraznému poklesu *Salmenolla* spp. v ZV-hromade z iniciálnej koncentrácie $\log_{10} 6,31 \pm 0,07$ na $1,33 \pm 0,10$, s následnou tendenciou ku kolísaniu až do ich úplného vymiznutia v ZV-hromade na 41.deň kompostovania. K devitalizácii salmonel v K-hromade ($P < 0,05$) a Z-hromade došlo na 63. deň kompostovania. Hygienický účinok vápna a zeolitu sa potvrdil v ZV-hromade na 20. deň procesu negatívnym dôkazom prítomnosti patogénu ako výsledok stresu bunky spôsobovaného zmenami prostredia substrátu. Počty indikátorových mikroorganizmov sa vyznačovali tendenciou kolísania, k ich poklesu došlo počas termofilnej fázy procesu s nárastom o 1 až 2 rady medzi 40 a 60 dňom kompostovania a potupným poklesom do konca pokusu. Signifikantné rozdiely medzi obohatenými kopami sa vyskytovali v zastúpení *Enterococcus* spp. a *Escherichia coli* ($P < 0,05$). Porovnaním celkových počtov mikroorganizmov počas kompostovania bol zistený výrazný pokles ich koncentrácie v ZV-hromade a Z-hromade oproti kontrole. Podobné výsledky v prežívaní salmonel a koliformných mikroorganizmov počas kompostovania s prídavkom zeolitu, ako aj vápna boli zistené aj v iných štúdiách (Azizi-Lalabadi a kol., 2019, Lopes a kol., 2013). Obohatenie kompostu zeolitom a vápnom má pozitívny účinok na devitalizáciu patogénov a iných mikroorganizmov (vymiznutie na 63. deň kompostovania). Napriek tomu nedostatočný pokles indikátorových mikroorganizmov počas kompostovania (aj po 126. dňoch) naznačuje potenciálne mikrobiálne riziko súvisiace s kontamináciou pôdy po aplikácii takého kompostu.

Príspevok vznikol za podpory projektu VEGA č. 2/0125/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Azizi-Lalabadi M, et al. Nanoparticles and Zeolites: Antibacterial Effects and their Mechanism against Pathogens. *Curr Pharm Biotechnol.* 2019; 20 (13):1074-1086.
- Lopes M, et al. Quick lime treatment and stirring of different poultry litter substrates for reducing pathogenic bacteria counts. *Poult Sci.* 2013; 92(3):638-44.
- Olaimat AN, Holley RA. Factors influencin the microbial safety of fresh produce: a review. *Food Microbiol.* 2012; 32:1-19.
- Vaneslow BA, Krause DO, McSweeney CS. The Shiga-like toxin *prducing Escherichia coli*, their ruminant hosts and potential on-farm interventions: a review. *Australian J Agric Res.* 2005; 57:215-32.
- Venglovsky J, et al. Devitalisation of pathogens in stored pig slurry and potentialrisk related to its application to agricultural soil. *Environ Sci Pollut Res.* 2017; 25 (9):21412-21419.

PRVÁ MOLEKULÁRNA IDENTIFIKÁCIA ZOONOTICKÉHO DRUHU *U. STENOCEPHALA* U PSOV NA SLOVENSKU

Mravcová, K¹., Štrkolcová, G¹., Kočíšová, A¹., Schreiberová, A¹., Mucha, R²., Goldová, M¹.

¹Katedra epizootológie, parazitológie a spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská Republika

²Neurobiologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice, Slovenská Republika

ABSTRAKT

Ankylostómy patria medzi hematofágne nematóda, ktoré parazitujú v tráviacom trakte rôznych druhov mäsožravcov a ľudí. Cieľom práce bolo sledovať výskyt črevných parazitárnych infekcií psov rôzneho plemena a veku pochádzajúcich z dvoch košických útulkov a rómskej osady v meste Medzev. V našej štúdii sme vyšetrili 270 vzoriek feces flotačnou metódou, vajíčka z čeľade *Ancylostomatidae* boli mikroskopicky identifikované v 26/270 (9,6 %) vzorkách. Najvyššiu prevalenciu sme potvrdili v rómskej osade 16/270 (5,9 %), nižší výskyt vajíčok z čeľade *Ancylostomatidae* sme zaznamenali v útulkoch 6/270 (2,2 %) a 4/270 (1,5 %). Genotypizácia sa uskutočnila pomocou úsekov génov 18 SSU rRNA, COX1 a ITS. Naše výsledky priniesli prvotné potvrdenie zoonotického druhu *Uncinaria stenocephala* pomocou molekulárnej analýzy u domácich psov (*Canis familiaris*) na Slovensku a v Európe.

ÚVOD

Do skupiny črevných parazitov, nazývaných ako „soil transmitted helminths“ (pôdou prenášané helminty) zaraďujeme aj zoonotické druhy z čeľade *Ancylostomatidae* (Tab. 1.). *Ancylostoma caninum* a *Uncinaria stenocephala* patria medzi najvýznamnejšie druhy infikujúce domáce a voľne žijúce mäsožravce. Vývinový cyklus je priamy, hostiteľ sa môže infikovať per-os, perkutánne, transmamárne alebo príležitostne paratenickým hostiteľom (hlodavce). Za priaznivých podmienok sa vo vonkajšom prostredí vyvinie z vajíčka infekčná filariformná larva. Po penetrácii kožou sa na končatinách vytvára dermatitída v podobe erytému, alopetických miest, papúl a pustúl známa ako *larva migrans cutanea* (LMC). Perkutánne sa môže infikovať aj človek (náhodný hostiteľ), v tomto prípade larvy nie sú schopné dosiahnuť pohlavnú zrelosť a zostávajú v podkoží a tkanivách ako hypobiotické larvy niekoľko týždňov až mesiacov. Dospelé adulty sa bukálnou kapsulou prichytávajú o mukózu duodena, živia sa tkanivom a krvou. Pri silnej intenzite infekcie spôsobujú zhoršené trávenie, zníženú absorpciu živín, zvýšenú produkciu hlienu a pri neliečených stavoch subakútne alebo chronický katarálny zápal (Brooker a kol., 2006a; Seguel a kol., 2017). Okrem toho, dospelé larvy produkujú antikoagulačné látky a narúšajú štruktúru krvných doštičiek hostiteľa (Deplazes a kol., 2016; Hotez a kol., 2016). Za hlavné klinické symptómy považujeme najmä anémiu, enteritídu, spomalený rast a pridruženú sekundárnu bakterémiu (Spraker a kol., 2007; Hotez a kol., 2016; Seguel a kol., 2017). V tomto príspevku sú publikované čiastočné výsledky prvého epizootologického výskumu ochorenia označovaného spoločným názvom „hookworm disease“ u psov na území Slovenska.

Hookworm	Hostiteľ	Geografická distribúcia	Referencie
<i>A. caninum</i>	domáce a voľne žijúce mäsožravce	kozmpolitne	Bowman <i>et al.</i> , 2011
<i>A. ceylanicum</i>	domáce a voľne žijúce mäsožravce	tropické regióny Ázie	Ngui <i>et al.</i> , 2012a, 2012b
<i>A. braziliense</i>	domáce a voľne žijúce mäsožravce	Ázia, Afrika	Montgomery <i>et al.</i> , 2020
<i>A. tubaeforme</i>	domáce a voľne žijúce mačkovité šelmy	Brazília, Taliansko, Čína	Abu-Madi <i>et al.</i> , 2010
<i>A. duodenale</i>	človek, mäsožravce	Afrika, Amerika	Bowman <i>et al.</i> , 2001
<i>N. americanus</i>	človek, mäsožravce	Amerika, južná časť Ázie	Jia <i>et al.</i> , 2012
<i>U. stenocephala</i>	mäsožravce	Kanada, Eurázia	Deplazes <i>et al.</i> , 2016

Tab 1. Geografická distribúcia zoonotických druhov mechovcov z čeľade *Ancylostomatidae* vo svete

MATERIÁL A METODIKA

Zber vzoriek

Na Katedre epizootológie, parazitológie a spoločného zdravia UVLF v Košiciach sme vyšetřili celkovo 270 féces. Vzorky pochádzali z útulku Vzájomnej pomoci zvierat a ľudí – ÚVP (100), zo súkromného zariadenia Malá Farma (60) a zo segregovanej rómskej osady v meste Medzev (110). Celkovú prevalenciu črevných parazitov psov sme stanovili flotačnou metódou. Mikroskopicky pozitívne vzorky boli použité na kultiváciu metódou koprokultúry.

Extrakcia DNA z vajíčok a lariev tretieho štádia (L3)

Izolácia DNA z vajíčok čeľade *Ancylostomatidae* sa uskutočnila pomocou komerčnej súpravy ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research, USA) podľa pokynov výrobcu. Z vykultivovaných lariev L3 sme na extrakciu DNA použili komerčne vyrábaný kit DNeasy Blood Tissue Kit (QIAGEN, Nemecko) podľa pokynov, ktoré odporučil výrobca.

PCR amplifikácia

Molekulárna identifikácia bola založená na sekvenčnej analýze génov 18 SSU rRNA, COX1 a ITS (Lesniak - a kol., 2017; Merino-Tejedor a kol., 2019).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej práci sme od mája do augusta (2018-2019) vyšetřili trus 270 psov z útulku ÚVP (100), Malej Farmy (60) a rómskej segregovanej osady v Medzeve (110). Na detekciu vajíčok z čeľade *Ancylostomatidae* sme použili flotačnú metódu, celková prevalencia dosiahla 9,6% (26/270). V osade sme vajíčka *Uncinaria spp./Ancylostoma spp.* potvrdili v 5,9 % vzorkách, v útulkoch bola prevalencia nižšia 2,2 % a 1,5 %. Koprologická metóda patrí k základným a najpoužívanejším postupom parazitologickej diagnostiky, napriek tomu môže viesť k nesprávnej identifikácii druhov z čeľade *Ancylostomatidae*. Prevalencie z jednotlivých štúdií sú založené len na identifikácii vajíčok *Uncinaria spp./Ancylostoma spp.*, ktoré sú takmer identické u všetkých druhov mechovcov. Jednou z najcitlivejších metód je molekulárna analýza, ktorá predstavuje dôležitý nástroj pre individuálnu diagnostiku ankylostóm. V našej práci sme na základe druhovo špecifických primerov 18 SSU rRNA,

COX1 a ITS ako prví na Slovensku potvrdili zoonotický druh *U. stenocephala* (Lesniak a kol., 2017; Merino-Tejedor a kol., 2019). Sekvencie všetkých pozitívnych PCR produktov boli porovnané so známymi sekvenciami pomocou BLAST analýzy (NCBI, USA) a vložené do databázy GenBank. Počiatočné výsledky v našej práci potvrdili autochtónny výskyt *U. stenocephala* na území Slovenska. Keďže neexistuje žiadna publikácia zaoberajúca sa identifikáciou druhov z čeľade *Ancylostomatidae* na našom území, je nevyhnutné naďalej pokračovať a rozšíriť epizootologický a epidemiologický výskum v tejto oblasti.

Táto publikácia vznikla vďaka podpore vedeckej grantovej agentúry VEGA č. 1/0536/18.

POUŽITÁ LITERTÚRA

- Abu-Madi et al. Intestinal helminths of feral cat populations from urban and suburban districts of Qatar. *Veterinary parasitology*; 2010; 168(3-4):284-292.
- Bowman DD, et al. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends in Parasitology*. 2010; 26(4):162-167.
- Brooker S, Hotez PJ, Bundy DAP. Hookworm-Related Anemia among Pregnant Woman: A Systematic Review. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2008; 2(9):291.
- Deplazes P, et al. Parasitology in Veterinary Medicine: Part III. Parasites and parasitoses: metazoa. 2016; 280-284.
- Hotez PJ, et al. Advancing a vaccine to prevent hookworm disease and anemia. *Vaccine*. 2016; 34(5):3001-3005.
- Jia et al. Soil-Transmitted Helminth Reinfection after Drug Treatment: A systematic Review and Meta-Analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(5):e1621.
- Lesniak I, et al. Surrogate host: Hunting dogs and recolonizing grey wolves share their endoparasites. *IJP: Parasites and Wildlife*. 2017; 6(3):278-286.
- Merino-Tejedor A, et al. Molecular identification of zoonotic hookworm species in dog faeces from Tanzania. *Journal of Helminthology*. 2019; 93(3):313-318.
- Montgomery SP. Cutaneous Larva Migrans. In *Hunters Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (Tenth Edition). 2020; 898-900.
- Ngui R, Lim YAL, Chua KH. Rapid detection and identification of human hookworm infections through high resolution melting (HRM) analysis. *Plos One*, 2012; (7):e41996.
- Seguel M, et al. Hookworm infection in South American fur seal (*Arctocephalus australis*). Pups. *Veterinary Pathology*. 2017; 54, 288-297.

PALINA PRAVÁ (ARTEMISIA ABSINTHIUM) A SLEZ LESNÝ (MALVA SYLVESTRIS) AKO PRÍRODNÉ ALTERNATÍVY KONTROLY HEMONCHÓZY U OVIEC

Mravčáková D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť vplyv paliny pravej (*Artemisia absinthium* L.) a slezu lesného (*Malva sylvestris* L.) ako doplnkov krmiva na parazitologický status, hematologické a imunologické parametre a lokálnu imunitnú odpoveď v abomase jahniat experimentálne infikovaných gastrointestinálnym nematódom *Haemonchus contortus*. Dvadsaťštyri experimentálne infikovaných jahniat bolo náhodne rozdelených do štyroch skupín: 1. infikované jahňatá (UNS), 2. infikované jahňatá suplementované s palinou pravou (ART), 3. infikované jahňatá suplementované so slezom lesným (MAL) a infikované jahňatá suplementované s mixom oboch rastlín (ARTMAL). Zmes rastlín obsahovala fenolové kyseliny (10,7 g/kg DM) a flavonoidy (5,51 g/kg DM). Priemerný počet vajíčok v truse zvierat sa medzi jednotlivými skupinami nelíšil ($p > 0,05$). Histopatologické zmeny boli pozorované hlavne v sliznici abomasu s prítomnosťou zápalových buniek v skupinách MAL, ART a ARTMAL. Produkcia hlienu bola najvyššia v skupine ARTMAL. Počet mastocytov bol signifikantne vyšší v skupinách UNS a ART ako v skupine MAL ($p < 0,01$ a $p < 0,05$). Počty plazmatických buniek boli vyššie v skupine ARTMAL ako v skupine MAL ($p < 0,05$). V skupine ARTMAL došlo k zvýšenej regenerácii tkaniva. Výsledky ukázali, že podávanie paliny pravej a slezu lesného do krmiva, pravdepodobne zvýšilo odolnosť jahniat, prostredníctvom zlepšenej lokálnej imunitnej odpovede.

ÚVOD

Hemonchóza, spôsobená parazitom gastrointestinálneho (GI) traktu, nematódom *Haemonchus contortus*, je rozšírené parazitárne ochorenie malých prežúvavcov spojené s ekonomickými stratami, zníženou produktivitou, chorobnosťou a úmrtnosťou zvierat (Besier a kol., 2016). Dospelé jedince *H. contortus* sú prichytené na sliznicu abomasu a živia sa krvou hostiteľa. V súčasnosti vzrastá záujem o prírodné alternatívy kontroly tejto infekcie vo forme liečivých rastlín ako nutraceutík, ktoré by nahradili konvenčnú antihelmintickú (chemoterapeutickú) liečbu (Hoste a kol., 2016). Liečivé rastliny obsahujú široké spektrum bioaktívnych látok, tzv. rastlinných sekundárnych metabolitov, s rôznym terapeutickým účinkom (Villalba a kol., 2017). Na jednej strane môžu tieto bioaktívne látky pôsobiť na GI parazita priamo - antihelminticky a na druhej strane môžu pôsobiť nepriamo, zvyšovaním odolnosti zvierat, prostredníctvom ich imunomodulačných a antioxidantných vlastností. Na základe našich predošlých experimentov sme dospeli k záveru, že doplnenie suchej zmesi niektorých liečivých rastlín v krmive jahniat pravdepodobne spomaľuje dynamiku infekcie a zvyšuje odolnosť jahniat pri hemonchóze (Váradyová a kol., 2018; Mravčáková a kol., 2019). Predpokladali sme, že doplnok krmiva vo forme liečivých rastlín dokáže ovplyvniť zdravie jahniat znížením vylučovania vajíčok v truse, znížením počtu dospelých parazitov v abomase a zároveň zlepšením imunitných reakcií hostiteľa. Cieľom nášho experimentu bolo vyhodnotiť účinok paliny pravej (*Artemisia absinthium* L.) a slezu lesného (*Malva sylvestris* L.) na parazitologický status, hematologické a imunologické parametre a na lokálnu imunitnú odpoveď jahniat infikovaných GI parazitom *H. contortus*.

MATERIÁL A METODIKA

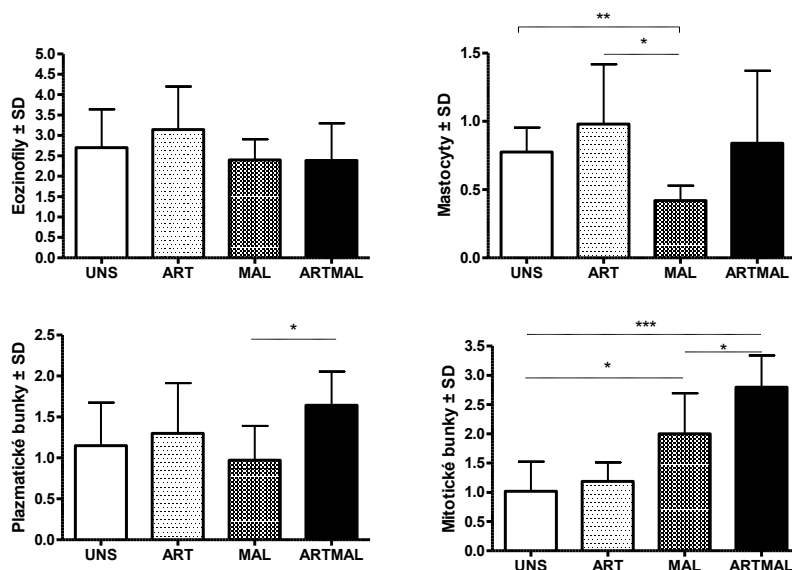
Všetky postupy a starostlivosť o zvieratá sa riadili smernicami Európskeho spoločenstva (smernica EÚ 2010/63 / EÚ). Experimentálny protokol bol schválený Etickou komisiou Parazitologického ústavu SAV podľa národnej legislatívy na Slovensku. *Dvadsaťštyri jahniat* (zošľachtená valaška, vek 3-4 mesiace, $18,67 \pm 0,55$ kg) bolo perorálne nakazených s približne 5000 larvami tretieho štádia (L3) kmeňa *H. contortus* citlivého na antihelmintiká (MHC01). Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín (n = 6 jahniat/skupinu): 1. infikované jahňatá (UNS), 2. infikované jahňatá suplementované s palinou pravou (ART, 1 g sušiny/deň/zviera), 3. infikované jahňatá suplementované so slezom lesným (MAL, 15 g sušiny/deň/zviera) a infikované jahňatá suplementované s mixom oboch rastlín (ARTMAL, 16 g sušiny/deň/zviera). Jahňatá boli denne kŕmené lúčnym senom (*ad libitum*), ovsom (500 g sušiny/deň) a liečivými rastlinami (AGROKARPATY, Plavnica, Slovensko) po dobu 75 dní. Obsah rastlinných sekundárnych metabolitov bol vyhodnotený kvantitatívne prostredníctvom ultra-vysoko-účinnnej kvapalinovej chromatografie (UPLC/MS/MS). Vzorky trusu boli počas experimentu pravidelne odoberané priamo z konečníka zvierat na detekciu vajíčok v truse pomocou McMasterovej metódy (Coles a kol., 1992). Vzorky krvi boli pravidelne odoberané na stanovenie hematologických a imunologických parametrov prostredníctvom komerčných kitov (RANDOX Laboratories, Ltd., UK; MyBioSource Ltd., San Diego, CA, USA). Po 75 dňoch experimentu boli zvieratá usmrtené, vykonala sa helmintologická pitva na stanovenie počtu dospelých parazitov v abomase a vzorky tkaniva abomasu boli odobraté na histopatologické vyšetrenie.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kvantitatívna analýza rastlinných sekundárnych metabolitov liečivých rastlín ukázala, že obsahovali fenolové kyseliny v rozsahu od 0,65 - 10,7 g/kg DM a flavonoidy v rozsahu od 0,35 - 6,48 g/kg DM. Počet vajíčok na gram trusu zvierat sa u všetkých pokusných skupín zvyšoval až do 50 dňa od infekcie a signifikantne sa nelíšil ($p > 0,05$) medzi skupinami. Rýchle zníženie vylučovania vajíčok po 50 dňoch experimentu (skupina MAL a ARTMAL), respektíve 57 dňoch experimentu (skupina ART), bolo sprevádzané po 75 dňoch experimentu nižším počtom dospelých červov *H. contortus* v skupine ARTMAL vyhodnotených pri pitve. Relatívne vysoká štandardná odchýlka (SD) v počte vajíčok môže poukazovať na potenciálne odlišný liečivý účinok rastlín na jahňatá v jednotlivých skupinách. Koncentrácia hemoglobínu v krvi klesala vo všetkých skupinách až do 45 dňa. U jahniat zo skupiny UNS, ART a MAL zostal hemoglobín stabilný až do konca experimentu. Koncentrácia albumínu v sére bola znížená u všetkých skupín v porovnaní s prvým odberom na 15 deň. Stabilné hodnoty albumínu mala iba skupina MAL. Histopatologické zmeny boli pozorované na sliznici abomasu, ako infiltrácia imunitných buniek (hlavne lymfocytov, makrofágov, plazmatických buniek a mastocytov), a to prevažne v skupine ARTMAL. Práve prítomnosť imunitných buniek v tkanivách je spojená s ochranou imunitnou reakciou proti GI parazitovi *H. contortus* (McRae a kol., 2015). V skupine ARTMAL bola pozorovaná aj zvýšená produkcia hlienu, ktorý predstavuje ochrannú vrstvu sliznice a zohráva dôležitú úlohu pri eliminácii parazitov z GI traktu (Balic a kol., 2006). To je v súlade aj s našimi výsledkami, pretože jahňatá zo skupiny ARTMAL mali najnižší počet parazitov v abomase v porovnaní s ostatnými experimentálnymi skupinami. Počet tkanivových eozinofilov nebol ovplyvnený liečbou, avšak jahňatá zo skupín UNS a ART vykazovali signifikantne vyšší počet mastocytov ($p < 0,01$ a $p < 0,05$) v porovnaní s jahňatami zo skupiny MAL. Priemerné hodnoty plazmatických buniek boli signifikantne vyššie ($p < 0,05$) u jahniat zo skupiny ARTMAL ako u jahniat zo skupiny MAL. Plazmatické bunky sú zodpovedné za tvorbu špecifických protilátok, a aj napriek ich rozdielnym počtom v jednotlivých skupinách sa protilátky IgG a IgA v sére

signifikantne nelíšili u jednotlivých skupín ($p > 0,05$). Rozdiely v protilátkovej odpovedi sa pravdepodobne mohli ukázať lokálne v abomase. Zvýšená regenerácia tkaniva abomasu bola pozorovaná v skupinách MAL a ARTMAL. Záverom môžeme povedať, že palina pravá a slez lesný nemali priamy antihelmintický vplyv na GI parazita *H. contortus*, avšak suplementácia týchto rastlín pravdepodobne zvýšila odolnosť experimentálnych jahniat, čo bolo potvrdené hlavne ich zlepšenou lokálnou imunitnou odpoveďou v sliznici abomasu.

Obr. 1. Priemerný počet imunitných a mitotických buniek v abomaze u jednotlivých skupín jahniat infikovaných GI parazitom *H. contortus* ($n = 6$).



Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 18-0131) a prostredníctvom STSM grantu COST CA16230.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Balic A, Cunningham CP, Meeusen ENT. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 2006;28:107–15.
- Besier R, et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus*. *Adv. Parasitol.* 2016; 93:95–143.
- Coles GC, et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 1992; 44:35–44.
- Hoste H, et al. Interactions Between Nutrition and Infections With *Haemonchus contortus* and Related Gastrointestinal Nematodes in Small Ruminants. Vol. 93, *Advances in Parasitology*. Elsevier Ltd; 2016. 239–351 p.
- Mcrae KM, et al. The host immune response to gastrointestinal nematode infection in sheep. *Parasite Immunol.* 2015;37(12):605–13.
- Mravčáková D, et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. *BMC Vet Res.* 2019;15:1–13.
- Váradyová Z, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res.* 2018;14(1).
- Villalba JJ, Costes-Thiré M, Ginane C. Phytochemicals in animal health: Diet selection and trade-offs between costs and benefits. *Proc Nutr Soc.* 2017;76:113–21.

ROZDIELNE POHĽADY NA DIVERZITU SÍRU-OXIDUJÚCICH BAKTÉRIÍ KULTIVAČNÝMI A NEKULTIVAČNÝMI METÓDAMI

Nosáľová L., Kolesár-Fecskeová L., Pristaš P.

Ústav biologických a ekologických vied UPJŠ, Katedra mikrobiológie, Košice

ABSTRAKT

Slovensko je neobyčajne bohaté na minerálne pramene, pričom časť z nich tvoria studené, na síru bohaté pramene, ktoré predstavujú ideálne prostredie pre život metabolicky a fylogeneticky rozmanitej skupiny sírnych baktérií. Sírne pramene predstavujú dobre preskúmané prostredie, avšak väčšina štúdií sa zameriava na horúce sírne pramene, na oblasti s vulkanickou činnosťou, vodu z prostredia jaskýň, alebo hydrotermálnych prieduchov. Doposiaľ ostáva mikróbovým studených sírnych prameňov s neutrálnym pH nepreskúmaná. Bežne používané laboratórne kultivačné techniky väčšinou nie sú vhodné pre kultiváciu sírnych baktérií, preto ich identifikácia je založená hlavne na molekulových analýzach génu pre 16S rRNA. Predkladaná práca ponúka rozdielny pohľad na diverzitu baktérií studeného prameňa Karol. Prostredníctvom genetických analýz boli identifikované rozdielne druhy síru-oxidujúcich baktérií z kmeňa *Proteobacteria*, čo naznačuje, že kultivačné podmienky majú významný vplyv na prežívanie a diverzitu mikrobioty sírnych prameňov.

ÚVOD

Väčšina globálnych cyklov prvkov je kontrolovaná prostredníctvom mikroorganizmov. Približne jednu polovicu globálneho cyklu síry predstavuje oxidácia redukovaných foriem síry a za tento proces sú zodpovedné predovšetkým síru-oxidujúce baktérie (Kumar a kol., 2018). Široké spektrum oxidačných stavov síry (-2 až +6) v prírode je využívaných viacerými redoxnými enzýmami, pričom elektróny z oxidácie síry sú využívané na získavanie energie v dýchacom reťazci a autotrofnú fixáciu oxidu uhličitého (Friedrich a kol., 2005; Ghosh a Dam, 2008). Anorganické redukované zlúčeniny síry sú oxidované zástupcami archeónov, alebo gram-negatívnymi baktériami kmeňa *Proteobacteria* (Lengeler a kol., 1999). Minerálne pramene sú bohaté na mikrobiálne spoločenstvá, ktoré hrajú kľúčovú úlohu pri premenách sírnych zlúčenín. Štruktúra mikrobiálnych komunít na síru bohatých prostrediach je priamo ovplyvňovaná environmentálnymi podmienkami ako pH, teplota, koncentrácia síry, tiosíranu, sulfidov, intenzita osvetlenia, koncentrácia organických látok (Headd a Engel, 2014). Mnoho z týchto mikroorganizmov nie je možné kultivovať prostredníctvom bežných kultivačných metód, preto poznanie týchto zložitých mikrobiálnych komunít pochádza hlavne z výsledkov molekulárnych analýz (Douglas a Douglas, 2001).

MATERIÁL A METÓDY

Hydrochemické vlastnosti vody (pH, teplota, vodivosť, TDS) boli stanovené pri odbere vzorky pomocou multimetra Combo HI98129 (Hannah Instruments, USA). Vzorky vody obsahujúcej biele vlákna boli sterilne odobraté do plastových skúmaviek a spracované do 24 hod.

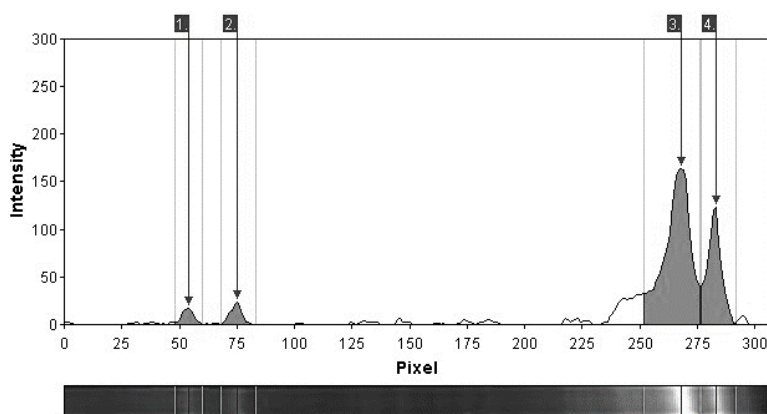
Vzorka sírnej vody bola inokulovaná do tiosíranového média (g/l: NH_4Cl - 0,1; NaHCO_3 - 0,2; K_2HPO_4 - 0,1). K 90 ml média bolo následne sterilne pridaných 10 ml 5% roztoku $\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_3$ a 10 ml vzorky. Inokulované médium bolo inkubované v tme, pri laboratórnej teplote. Priamo z natívnych vzoriek vody a z kultivačného média po narastení kultúry bola izolovaná celková DNA, ktorá bola následne použitá ako templát pri amplifikácii génu pre 16S rRNA s použitím univerzálnych primérov (Weisberg a kol., 1991). Amplikóny získané priamo z natívnych vzoriek boli použité v ďalšej PCR s použitím primérov 1401r a 968f a analyzované pomocou DGGE na prístroji D-code (Bio-Rad, USA) podľa Muyzer a kol (1993) s úpravami. Produkty amplifikácie a vybrané DGGE fragmenty boli purifikované kitom Wizard® SV Gel

and Clean-Up System (Promega, USA) a sekvenované vo firme Eurofins Genomics (Nemecko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prameň Karol (GPS: 48.8796222 S, 22.2218708 V) sa nachádza na južných svahoch Vihorlatu a je charakteristický výrazným sírovodíkovým zápachom. Analýzy potvrdili, že ide o studenú, hypotonickú vodu s teplotou vody pri odbere 12,3°C, pH 8,44, elektrickou vodivosťou 310 $\mu\text{s}/\text{cm}$ a TDS (celkovým obsahom solí) 161 ppm. Pri odbere boli pozorované dlhé biele vlákna, ktoré naznačovali prítomnosť síru-oxidujúcich baktérií.

Nekultivačná analýza založená na DGGE odhalila prítomnosť viacerých bakteriálnych druhov vo vzorke vlákien z prameňa Karol. Napriek tomu, mikrobiálna komunita sírneho prameňa Karol bola relatívne chudobná na bakteriálne druhy. Boli pozorované minimálne 4 dobre viditeľné bandy (Obr. 1) z toho dva dominantné č.3 a 4 boli podrobené ďalším analýzám. Sekvencia dominantného bandu (3), ktorá tvorila viac ako 65 % študovanej mikrobioty bola identifikovaná ako *Thiothrix unzii* (skóre podobnosti 99,77%). Teplota vody a pH prameňa Karol zodpovedajú optimálnym kultivačným podmienkam baktérie *T. unzii*, ktorej prítomnosť v spoločenstve mikroorganizmov studených sírnych minerálnych vôd bola zaznamenaná aj v minulosti, kde sa podieľala na tvorbe makroskopických bielych vlákien (Moissl a kol., 2002; Engel a kol., 2004). Sekvencia ďalšieho dominantného bandu (4) s takmer 27% podielom na študovanej komunite, vykazovala najvyššiu podobnosť s metanogénnou baktériou *Methylomonas methanica* (skóre podobnosti 100%). Oba bakteriálne druhy prežívajú v prostredí s nízkou koncentráciou kyslíka, v miestach kde sú prítomné redukované formy síry a metán. To ich predurčuje k spoločnému výskytu v mikroaerofilných zónach.



Obr. 2 Denzitometrická analýza výsledku DGGE minerálneho prameňa Karol

Odhaduje sa že viac ako 99% metabolicky aktívnych baktérií z environmentálnych vzoriek je s využitím bežných kultivačných techník nekultivovateľných (Overmann a Gernerden, 2000). Avšak pre detailné štúdium ako aj následne využitie mikroorganizmov v biotechnológiách je nevyhnuté bakteriálne izoláty kultivovať. Kultivácia bakteriálnej kultúry prameňa Karol v tiosíranovom médiu viedla k izolácii jediného bakteriálneho druhu, ktorý bol následne identifikovaný prostredníctvom analýzy génu pre 16S rRNA. Sekvencia získaného PCR amplikónu bola identická so 16S rDNA sekvenciou litoautotrofnej síru-oxidujúcej baktérie *Thiovirga sulfuroxydans*, ktorá bola po prvý krát izolovaná a popísaná z biofilmu odpadových vôd (Ito a kol., 2005). Porovnanie biodiverzity síru oxidujúcich baktérií kultivačnými a nekultivačnými metódami naznačuje, že kultivačné podmienky významným spôsobom ovplyvňujú pozorovanú biodiverzitu. Pôvodne dominantný druh *T. unzii* prežíva len vo veľmi úzkom gradiente kyslíka a sulfidov a vplyvom kultivácie teda došlo k eliminácii tohto druhu

a jeho nahradeniu druhom *T. sulfuroxydans*, ktorý nebol nekultivačnými metódami vôbec detegovaný.

ZÁVER

Prostredníctvom kultivačných aj nekultivačných metód boli v minerálnom prameni Karol identifikované sírne baktérii z triedy γ -*Proteobacteria*. Oba bakteriálne druhy síru-oxidujúcich baktérii sú schopné využívať rôzne zlúčeniny síry ako zdroj energie. Naše výsledky naznačujú, že biodiverzita síru-oxidujúcich baktérii je vyššia, než by sa dalo predpokladať na základe jedného typu analýzy a že podmienky kultivácie výrazne ovplyvňujú pozorovanú biodiverzitu síru-oxidujúcich baktérii. Získané výsledky prispievajú k poznaniu veľmi málo preskúmaných komunití sírnych baktérii studených minerálnych terestriálnych vôd a ponúkajú unikátny pohľad na mikrobiálne zloženie studeného sírneho prameňa na Slovensku.

Práca vznikla za podpory grantu VVGS 2019-1298.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Douglas D, Douglas D. Structural and geomicrobiological characteristics of a microbial community from a cold sulfide spring. *Geomicrobiol J.* 2001; 18:401-422.
- Engel A, et al. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic "*Epsilonproteobacteria*". *FEMS Microbiol Ecol.* 2004; 51:31-53.
- Friedrich C, et al. Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol.* 2005; 8:253-259.
- Gosh W, Dam B. Biochemistry and molecular biology of lithotrophic sulfur oxidation by taxonomically and ecologically diverse bacteria and archaea. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33:999-1043.
- Headd B, Engel A. Biogeographic congruency among bacterial communities from terrestrial sulfidic springs. *Front Microbiol.* 2014; 5.
- Ito T, et al. *Thiovirga sulfuroxydans* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a microaerobic waste-water biofilm. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005; 55:1059-1064.
- Kumar U, et al. Diversity of sulfur-oxidizing and sulfur-reducing microbes in diverse ecosystems. *Advances in soil Microbiology: Recent trends and future prospects, Microorganisms for sustainability 3*, Springer Nature:Singapore. 2018; 65-89.
- Lengeler J, et al. *Biology of the Prokaryotes: Diversity of metabolic pathways.* Wiley: USA. 1999; 161-241.
- Moissl Ch, et al. Natural communities of novel Archaea and Bacteria with string-of-pearls-like morphology: molecular analysis of the bacterial partners. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68.
- Muyzer G, et al. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:695-700.
- Weisberg W, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991; 173:697-703.

DETEKCIA ARBOVÍRUSOV Z KLIEŠŤOV U VTÁKOV ODCHYTENÝCH V DRIENOVSKÉJ MOKRADI

Peňazziová K.¹, Korytár L.², Pistl J.¹, Ondrejková A.², Csank T.¹

¹ Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

² Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Na území Slovenskej republiky pôsobia kliešte ako vektory pre vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV), Tribeč vírus (TRBV), Lipovník vírus (LIPV) a vírus Uukuniemi (UUKV). Medzi rody zodpovedné za prenos uvedených arbovírusov patria: *Ixodes* a *Haemaphysalis*. Cieľom našej práce bolo zistiť prítomnosť uvedených arbovírusov v kliešťoch získaných z vtákov odchytených v Drienovskej mokradi. Celkovo sme otestovali 155 kliešťov rozdelených do 46 poolov. Vírusy sme detegovali prostredníctvom molekulárnych (konvenčná PCR, hemi-nested PCR a RT-qPCR) a klasických virologických (izolácia na bunkovej línii Vero E6) metód. V 2 testovaných pooloch sa potvrdila prítomnosť TRBV. Pozitívne kliešte boli druhu *Ixodes ricinus* a získali sme ich z vtákov druhu vrchárka modrá (*Prunella modularis*) a drozd čierny (*Turdus merula*). Sekvencie našich izolátov sme porovnali s ďalšími kmeňmi kliešťami prenášaných orbivírusov a určili sme percento zhody a zostrojili fylogram. Najviac príbuzné našim izolátom sú kmene TRBV a LIPV zo Slovenska a Ukrajiny, kde sa percentuálna zhoda po porovnaní sekvencií pohybovala v rozmedzí 86,1-93,4 %. Ako blízko príbuzné sa ukázali aj kmene Muko vírusu, sekvenčná zhoda 78,0-79,4 %. Kmene Kemerovo a Great Island vírusu, ktoré sú v súčasnosti zaradené do tej istej séroskupiny ako TRBV vykazovali nízku sekvenčnú zhodu 60,0-64,8 %. Všetky pooly boli negatívne na prítomnosť TBEV, LIPV a UUKV.

ÚVOD

Na území Slovenskej republiky pôsobia kliešte ako vektory pre vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV; *Flavivirus*, *Flaviviridae*), Tribeč vírus, Lipovník vírus (TRBV, LIPV; *Orbivirus*, *Reoviridae*) a vírus Uukuniemi (UUKV; *Phlebovirus*, *Phenuiviridae*). Medzi rody zodpovedné za prenos uvedených arbovírusov patria: *Ixodes* a *Haemaphysalis* (Hubálek a kol., 2012). Najvýznamnejšími amplifikačnými hosťiteľmi uvedených arbovírusov sú malé lesné hlodavce, hmyzožravce a vtáky. Úloha vtákov ako rezervoárov TBEV doposiaľ nie je objasnená. Avšak najnovšie výskumy poukazujú na to, že druhy drozd čvíkota, pinka severská a žltouchost hôrny môžu zohrávať úlohu v ekológii TBEV (Hubálek a kol., 2012; Dobler a kol., 2018). Človek predstavuje náhodného hosťiteľa, u ktorého môže infekcia TBEV, TRBV a LIPV spôsobiť vážne zdravotné problémy. Predpokladá sa, že koinfekcia LIPV s TBEV môže mať vplyv na klinický priebeh KE (Libíková H a kol., 1978). Všetky vyššie uvedené výskumy a dáta podnietili náš záujem o štúdium fauny kliešťov (vektorov) a vtákov (rezervoárov), ako nevyhnutných článkov pre cirkuláciu mnohých arbovírusov.

MATERIÁL A METÓDY

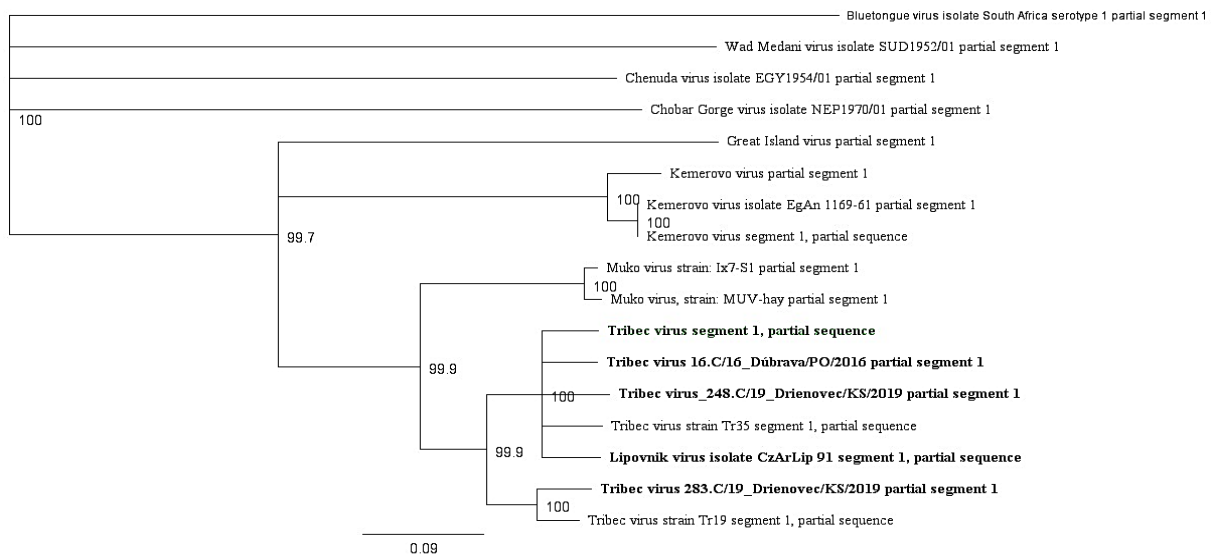
Odchyt vtáctva a kliešťov z vtákov bol realizovaný v spolupráci s licencovaným krúžkovateľom MVDr. Ľubošom Korytárom, PhD. Vtáky boli odchyťované na Drienovskej mokradi počas trvania jarnej a jesennej migrácie a počas hniezdnej sezóny. Po zbere sa skúmavky s kliešťami uložili do prenosnej chladničky a v čo najkratšom časovom intervale preložili do mrazu na -80 °C. Kliešte boli poolované na základe druhu, vývojového štádia, dátumu a druhu vtáka, z ktorého boli zozbierané. Kliešte boli určované na základe morfológických znakov. Pred homogenizáciou boli pooly 3× premyté (1×70 % alkohol a 2×voda bez nukleáz). Po premytí sa ku kliešťom pridalo 10 nerezových guľičiek (priemer 2,3 mm) a 700 µl sterilného 10 % EMEM s ATB. Homogenizácia prebiehala v Precellys 24 Dual. Stopäťdesiat mikrolitrov homogenátu bolo odobraných na izoláciu RNA a zvyšok bol

uskladnený pri teplote -80 °C. Izolácia RNA prebiehala prostredníctvom izolačného kitu NucleoSpin® RNA Virus (MACHEREY-NAGEL, Nemecko). Reverzná transkripcia prebehla s 10 µl RNA prostredníctvom LunaScript® RT SuperMix Kitu (New England Biolabs, USA). Vzorky boli vyšetrené molekulárnymi metódami - konvenčná PCR, hemi-nested PCR a RT-qPCR prostredníctvom špecifických primerov a prób. Primre pre konvenčnú PCR: PanFlavi-NS5-F (Csank a kol., 2016), cFD2 (Kuno a kol., 1998) – flavivírusy; PhIP2, PhIM2 (Klimentov a kol., 2016) - flebovírusy. Primre pre konvenčnú PCR na detekciu orbivírusov zo séroskupiny Great Island vírusu (GIV) boli dizajnované na našom pracovisku: Orbi_GIV_F (5'-ATGGCTGYRGTGGAGCAGC-3'), Orbi_GIV_R (5'-CCCCARTTCTTYACRAACC-3') - segment 1. Primre pre hemi-nested PCR na detekciu flavivírusov: PanFlavi-NS5-F, PanFlavi-NS5-R (Csank a kol., 2016). Primre a próba pre RT-qPCR na detekciu TBEV:F-TBE1, R-TBE1, TBE-probe-WT (Schwaiger a kol., 2003). Produkty z konvenčnej PCR (20 µl) sme naniesli na agarózový gél (zloženie gélu: 1X koncentrovaný TAE pufoľ, agaróza - 0,8 %, interakčné činidlo - koncentrácia 1:20000) a po skončení elektroforetickej separácie bandy vyrezali. Očistenú cDNA sme získali prostredníctvom kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System od spoločnosti Promega (USA). PCR produkty boli analyzované Sangerovou metódou. Okrem molekulárnych metód sme použili na izoláciu vírusu bunkovú líniu Vero E6. Ako inokulum sme použili 500 µl homogenátu z pozitívneho poolu + 500 µl 10 % EMEM s ATB. Po 1 hod. bolo inokulum odsaté a fľaša bola 3× premytá sterilným PBS. Po premytí sme pridali 1 % EMEM s ATB. Fľašu sme kultivovali 3 dni v CO₂ inkubátore a sledovali nástup CPE.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme otestovali 155 kliešťov rozdelených do 46 poolov. Najviac zastúpeným druhom bol *Ixodes ricinus* (n=144), medzi ďalšie odchytené druhy patrili: *Haemaphysalis concinna* (n=2), *I. frontalis* (n=2) a *Ixodes spp.* - kliešte určené len na úrovni rodu z dôvodu výrazného poškodenia tela (n=7). Najpočetnejším vývojovým štádiom boli nymfy (n=112), za nimi nasledovali larvy (n=41) a dospelce (n=2). Kliešte boli získané z 8 druhov odchytených vtákov: drozd čierny (*Turdus merula*), drozd plavý (*T. philomelos*), červienka obyčajná (*Erithacus rubecula*), sýkorka veľká (*Parus major*), pinka obyčajná (*Fringilla coelebs*), glezg hrubozobý (*Coccothraustes coccothraustes*), vrchárka modrá (*Prunella modularis*), kolibiarik čipčavý (*Phylloscopus collybita*).

Všetky pooly boli negatívne na prítomnosť TBEV, LIPV a UUKV. Na základe konvenčnej PCR na detekciu orbivírusov zo séroskupiny GIV sme v 2 testovaných pooloch potvrdili prítomnosť vírusu. V prvom prípade sa jednalo o izolát 248.C/19_Drienovec/KS/2019 z poolu 12 lariev *I. ricinus* drozda čierneho. V druhom prípade sa jednalo o izolát 283.C/19_Drienovec/KS/2019 z 1 nymfy *I. ricinus* vrchárkay modrej. Na základe výsledkov zo sekvenácie sme určili, že v oboch pozitívnych pooloch sa nachádza TRBV. Sekvencie našich izolátov sme porovnali s ďalšími druhmi, sérotypmi a kmeňmi kliešťami prenášaných orbivírusov (TRBV, LIPV, KEMV, Muko vírus - MUV, GIV, Chobar Gorge vírus - CGV, Chenuda vírus - CNUV, Wad Medani vírus - WMV). Najviac príbuzné kmene s izolátmi získanými z lariev a nymfy sú kmene TRBV a LIPV zo Slovenska a Ukrajiny, kde sa percentuálna zhoda po porovnaní sekvencií pohybovala v rozmedzí 86,1-93,4 %. Spoločného predka majú všetky kmene zo Slovenska vrátane izolátu 248.C/19 a jedného ukrajinského kmeňa. Avšak izolát 283.C/19 a druhý ukrajinský kmeň pochádzajú z iného predka. Izoláty 248.C/19 a 283.C/19 sú totožné v 85,6 % nukleotidov. Príbuzné MUV boli s novými TRBV izolátmi zhodné na 78,0-79,4 %. Kmene KEMV a GIV, ktoré sú v súčasnosti zaradené do tej istej séroskupiny ako TRBV vykazovali sekvenčnú zhodu 60,0-64,8 %. Príbuzensky najviac vzdialené boli kmene CGV, CNUV a WMV, sekvenčná zhoda 47,1-50,5 %. (Obr. 1.). Oba kmene TRBV z pozitívnych poolov sa podarilo izolovať aj na bunkovej línii Vero E6.



Obr. 1.: Fylogram zobrazujúci vzťahy medzi kliešťami prenášanými orbivírusmi; tučným písmom sú zvýraznené izoláty zo Slovenska; vírus choroby modrého jazyka (Orbivirus) je použitý na mimoskupinové porovnanie

TRBV bol doposiaľ detegovaný najmä v strednej Európe, kde sú jeho najčastejšími vektormi kliešte *I. ricinus*, ktoré sú v danej oblasti široko rozšírené. Funkciu vektorov môžu plniť aj druhy *I. persulcatus* a *H. punctata*. Hostiteľov TRBV predstavujú najmä malé hlodavce (Hubálek a kol., 2012). Úloha vtáčích rezervoárov pri prenose kliešťami prenášaných orbivírusov je doposiaľ uvádzaná len v jednej publikácii, ktorá opisuje izoláciu KEMV z krvi žltochvosta hôrneho v Egypte (Schmidt a kol., 1971). Vďaka schopnosti aktívneho letu migrujúce a čiastočne migrujúce druhy vtáctva v rámci svojich cirkanuálnych životných cyklov pokrývajú rozsiahle geografické plochy aj viacerých kontinentov. Migrujúce druhy vtáctva sa môžu podieľať na šírení mikroorganizmov tromi spôsobmi: (Hubálek a kol., 2012) ako rezervoáre, (Dobler a kol., 2018) ako mechanické nosiče a (Libíková H a kol., 1978) ako nosiče infikovaných hematofágnych ektoparazitov (Dobler a kol., 2018). Naše výsledky zatiaľ poukazujú na funkciu vtákov ako nosičov infikovaných kliešťov. V budúcom výskume sa chceme zamerať na vyšetrenie krvi získanej z infikovaných vtákov, aby sme mohli potvrdiť resp. vyvrátiť ich rezervoárovú úlohu pri prenose TRBV a na celogenómovú analýzu získaných izolátov.

Táto práca vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 03/2020 „Úloha vtáčích rezervoárov v cirkulácii kliešťami prenášaných arbovírusov so zoonotickým potenciálom“.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Csank T, et al. Detection of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in birds in Slovakia, using a universal primer set. *Archives of virology*. 2016; 161:1679-1683.
- Dobler G, et. al. The TBE book; 1st ed. Singapore: Global Health Press, 2018. 306 pp.
- Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. *Parasitology Research*. 2012; 111:9-36.
- Klimentov AS, et al. Development of pan-phlebovirus RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2016; 232:29-32.
- Kuno G, et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol*. 1998; 72:73–83.
- Libíková H, et al. Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases. *Medical Microbiology and Immunology*. 1978; 166:255-263.
- Schmidt JR, Shope RE. Kemerovo virus from a migrating common redstart of Eurasia. *Acta. Virol*. 1971; 15:112.
- Schwaiger M, Cassinotti P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J Clin Virol*. 2003; 27:136–45.

VPLYV ZMESI SUCHÝCH LIEČIVÝCH RASTLÍN A ORGANICKÉHO ZINKU NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU, MIKROBIÁLNU POPULÁCIU A HISTOPATOLÓGIU U JAHNIAT

Petrič D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť účinok doplnkov výživy obsahujúcich organický zinok a zmes sušených liečivých rastlín na bachorovú fermentáciu a mikrobiálnu populáciu ako aj histopatológiu bachora u jahniat. Dvadsaťštyri jahniat bolo rozdelených do štyroch experimentálnych skupín: 1. zvieratá bez suplementov (Kontrola), 2. Zvieratá suplementované organickým zinkom (Zn), 3. zvieratá suplementované zmesou liečivých rastlín (Herbmix) a 4. zvieratá suplementované Zn a Herbmixom (Zn+Herbmix). Zmes sušených rastlín Herbmix pozostávala zo štyroch rastlín, *Fumaria officinalis* L., *Malva sylvestris* L., *Artemisia absinthium* L. a *Matricaria chamomilla* L. Jahňatá boli po 70 dňoch experimentu humane usmrtené a obsah bachorov sa použil na stanovenie fermentačných parametrov a kvantifikáciu mikrobiálnej populácie molekulárnymi a mikroskopickými metódami. Na histopatologické vyhodnotenie zmien sa použili vzorky čerstvých tkanív bachora. Kvantitatívne analýzy rastlinných sekundárnych metabolitov pomocou hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením (UHRMS) identifikovali vo vzorkách rastlín fenolové kyseliny (0,7-12,1 mg/g DM), flavonoidy (0,35-12,2 mg/g DM) a alkaloidy (6,02 mg/g DM). Kvantitatívna real-time PCR ukázala pokles celkovej bakteriálnej populácie v skupinách Zn a Zn+Herbmix ($P < 0,05$). Morfologické pozorovanie bachorového tkaniva odhalilo fokálnu zmiešanú infiltráciu zápalových buniek v lamina propria v skupine Zn+Herbmix. Výsledky ukázali, že jahňatá sa pravdepodobne počas experimentu prispôbili diétam znížením celkového počtu bachorových baktérií, avšak bez ovplyvnenia bachorových fermentačných parametrov a protozoálnej populácie. Dlhodobé doplnenie diét jahniat zinkom v kombinácii s Herbmixom môže však pravdepodobne poškodiť bachorový epitel.

ÚVOD

Moderné poľnohospodárstvo v dnešnej dobe vyžaduje používanie rôznych nutraceutík, hlavne rastlinného pôvodu, pre optimálnu výrobu produktov aj zdravie prežívavcov. Z toho pohľadu je potrebné porozumieť bachorovému mikrobiómu so všetkými jeho aspektami (baktérie, archaea, eukaryota) a faktormi, ktoré ho môžu manipulovať v prospech maximálnej produkcie a zníženia negatívnych vplyvov na životné prostredie (Newbold a Ramos-Morales, 2020). Nedávna štúdia Petriča a kol. (2020) ukázala, že zmes liečivých rastlín obsahujúcich palinu, zemedym, harmanček a slez preukázala silnú antioxidačnú schopnosť a znížila produkciu metánu a koncentráciu amoniaku v bachore *in vitro*. Na druhej strane zinok spĺňa významnú katalytickú, štruktúrnu a regulačnú funkciu (Hilal a kol., 2016) a jeho organická forma je v tráviacom trakte odolnejšia a zároveň biologicky dostupnejšia (López-Alonso, 2012). Keďže povrchový epitel bachora zabraňuje invázii mikroorganizmov a toxínov a jeho absorpčná plocha a veľkosť listových papíl umožňuje selektívny príjem živín generovaných mikrobiálnou fermentáciou, našim cieľom bolo zistiť vplyv zmesi liečivých rastlín a organického zinku na bachorovú fermentáciu, protozoálnu a mikrobiálnu populáciu ako aj na histopatologické zmeny v tkanive bachora jahniat pri ich dlhodobom podávaní v diéte.

MATERIÁL A METODIKA

Dvadsaťštyri jahniat (vek 5 mesiacov, hmotnosť $23 \pm 2,9$ kg) bolo rozdelených do štyroch experimentálnych skupín: 1. zvieratá bez suplementov (Kontrola), 2. zvieratá, ktoré dostávali organický zinok (Zn, 70 mg/kg diéty), 3. zvieratá ktoré dostávali zmes liečivých rastlín

(Herbmix, 100 g DM/deň) a 4. zvieratá so zinkom a Herbmixom (Zn+Herbmix). Kŕmna dávka pozostávala z lúčneho sena (700 g DM/deň) a jačmeňa (300 g DM/deň). Zmes sušených liečivých rastlín (AGROKARPATY, Plavnica, SK) obsahovala zemedym (33%), slez (33%), harmanček (33%) a palinu (1%). V bachorovej tekutine boli stanovené fermentačné parametre (Wencelová a kol., 2016) a bola kvantifikovaná mikrobiálna populácia molekulárnymi (real-time PCR) a mikroskopickými metódami. Histopatologické vyhodnotenie vzoriek bachorového tkaniva sa uskutočnilo použitím mikroskopu Axio Lab.1 vybaveného digitálnym fotoaparátom AxioCam ERc5s (Carl Zeiss, Jena, Nemecko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V experimentálnych skupinách jahniat nebol zaznamenaný vplyv diét na bachorové fermentačné parametre (Tab. 1.). Pravdepodobne to poukazuje na relatívne nízky obsah anti-metanogénnych fytochemických látok, alebo na prispôsobenie mikrobiálnej populácie na rastlinné a zinkové diéty (Váradyová a kol., 2018; Ishaq a kol., 2019). Neboli tiež zaznamenané žiadne významné rozdiely v počte bachorových ciliát medzi skupinami (Tab. 2.). Jahňatá mali tri rôzne populácie ciliát, populáciu zmiešaného typu A-B u 19 zvierat (68%) s prítomnosťou *Polyplastron multivesiculatum* (100%), *Epidinium ecaudatum caudatum* (84%) a *Ophryoscolex caudatus tricornatus* (53%). Sedem zvierat (25%) obsahovalo populáciu typu A s prítomnosťou iba *P. multivesiculatum* (100%) a *O. caudatus tricornatus* (29%) a dve zvieratá (7%) obsahovali populáciu typu B s *E. ecaudatum caudatum* (100%). *Dasytricha ruminantium*, *Isotricha* spp. a *Entodinium* spp. boli prítomné u všetkých zvierat. Poukazuje to na postupnú zmenu populácie typu B na dominantnú populáciu typu A v priebehu pokusu (Williams a Coleman, 1992). Celková bakteriálna populácia v skupinách Zn a Zn+Herbmix sa znížila ($P < 0,05$) a významne ovplyvnila relatívnu početnosť *Ruminococcus albus* ($P < 0,05$), *Streptococcus bovis* ($P < 0,05$) a *Butyrivibrio proteoclasticus* ($P < 0,05$) v skupine Zn (Tab. 3.). Naše výsledky skôr poukazujú na priamy účinok zinku na bachorové mikroorganizmy v dôsledku interakcie s hrubým proteínom diéty, ako na výhody doplnenia liečivých rastlín a zinku na zviera (Hilal a kol., 2016). Histologické pozorovania odhalili fokálnu zmiešanú infiltráciu zápalových buniek v jednotlivých papilách epitelu a lamina propria v skupinách Herbmix a Zn+Herbmix, čo pravdepodobne môže viesť k zvýšeniu parakeratózy bachora a následnému zníženiu absorpcie a transportu UMK do najhlbších vrstiev epitelu.

Tab. 1. Vplyv zinku a Herbmixu na bachorovú fermentáciu jahniat (n=7)

Parameter	Kontrola	Zn	Herbmix	Zn+Herbmix	SD	P-value
pH	6,8	7,0	6,9	7,1	0,25	0,47
Amoniak (mg/l)	110	129	121	102	38,5	0,63
Metán (mM)	0,38	0,38	0,38	0,38	0,071	0,83
Celk. UMK ^a (mM)	54	43	47	37	14	0,19
K. octová (mol%)	69	69	70	68	2,04	0,66
K. propiónová (mol%)	13,8	13,9	14,5	14,5	1,55	0,75
K. n-maslová (mol%)	13,5	12,1	11,8	12,5	1,59	0,24

^a Unikavé masné kyseliny

Tab. 2. Vplyv zinku a Herbmixu na bachorovú ciliátovú populáciu jahniat (n=7)

	Kontrola	Zn	Herbmix	Zn+Herbmix	SD	P-value
<i>Dasytricha spp.</i> (10 ³ /g DM)	0,492	0,609	0,701	0,904	0,503	0,529
<i>Isotricha spp.</i> (10 ³ /g DM)	0,301	0,401	0,327	0,241	0,228	0,275
<i>Polyplastron spp.</i> (10 ³ /g DM)	0,234	0,333	0,291	0,075	0,216	0,133
<i>Epidinium spp.</i> (10 ³ /g DM)	2,26	0,018	0,274	1,57	1,12	0,044
<i>Entodinium spp.</i> (10 ³ /g DM)	63,1	59,9	49,4	52,8	17,3	0,490
Celkové protozoa (10 ³ /g DM)	66,4	61,9	51,0	55,7	17,9	0,400

Tab. 3. Vplyv zinku a Herbmixu na bachorovú mikrobiálnu populáciu jahniat (n=7)

	Kontrola	Zn	Herbmix	Zn+Herbmix	SD	P-value
Celkové baktérie (10 ⁸ /ml)	1,0	0,351	0,453	0,329	0,163	0,05
<i>Archaea</i> (10 ⁷ /ml)	1,0	2,81	2,32	0,928	1,07	>0,05
<i>R. albus</i> (AU) ^a	1,0	13,6	3,88	3,07	2,24	0,05
<i>S. bovis</i> (AU)	1,0	6,29	0,464	0,303	0,988	0,05
<i>B. proteoclasticus</i> (AU)	1,0	5,72	2,98	2,19	0,809	0,05
<i>R. flavefaciens</i> (AU)	1,0	0,155	0,791	0,352	0,159	>0,05

^a Relatívne množstvo kópií génov 16S rRNA vyjadrené ako ľubovoľná jednotka vzhľadom na celkovú početnosť kópií bakteriálnych génov u kontroly.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hilal EY, Elkhairey MAE, Osman AOA. The role of zinc, manganese and copper in rumen metabolism and immune function: a review article. *Open J Anim Sci.* 2016; 6:304-24.
- Ishaq SL et al. Zinc AA supplementation alters yearling ram rumen bacterial communities but zinc sulfate supplementation does not. *J Anim Sci.* 2019; 97:687-97.
- López-Alonso M. Trace minerals and livestock: not too much not too little. *ISRN Vet Sci.* 2012; 2012:704825.
- Newbold CJ, Ramos-Morales E. Review: Ruminant microbiome and microbial metabolome: effects of diet and ruminant host. *Animal.* 2020; 14:78-86.
- Petrič D, et al. Effect of dry medicinal plants (wormwood, chamomile, fumitory and mallow) on in vitro ruminal antioxidant capacity and fermentation patterns of sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2020; 104:1-14.
- Váradyová Z, et al. Modulation of ruminal and intestinal fermentation by medicinal plants and zinc from different sources. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2018; 102:1131-45.
- 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; 61:551-59.
- Williams AG, Coleman GS. The rumen protozoa. Springer Verlag. New York, USA. 1992; 441.

VPLYV RÔZNYCH HUMÍNOVÝCH PRÍPRAVKOV NA PRODUKČNÉ PARAMETRE A POSTMORTÁLNE PROCESY V PRSNEJ SVALOVINE BROJLEROVÝCH KURČIAT COBB 500

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

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

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo skúmať vplyv prídavku 2 prípravkov s obsahom humínových kyselín do komerčnej kŕmnej zmesi (KKZ) na produkčné a fyzikálno-chemické parametre v prsnej svalovine brojlerov COBB 500. Kurčatá (90 ks) boli rozdelené do 3 skupín. Kontrolná skupina bola kŕmená iba KKZ. Pokusná skupina 1 bola kŕmená KKZ s 0,5 % prídavkom prípravku Humac Natur Monogastric (HNM) a pokusná skupina 2 s 0,7 % prídavkom prípravku Humac Natur (HN). Naše výsledky naznačujú, že prídanie humínových kyselín do kŕmnej zmesi pre brojlere signifikantne zvýšilo živú hmotnosť ($p < 0,001$) a hmotnosť jatočného tela ($p < 0,01$). Prídavok humínových kyselín mal významný pozitívny vplyv na zrecie procesy v prsnej svalovine brojlerov.

ÚVOD

Humínové kyseliny vznikajú rozpadom organickej hmoty. Tvoria skupinu podobných aromatických polyfunkčných zlúčenín hnedej farby, strednej až vysokej molekulovej hmotnosti, ktoré sú rozpustné v alkalických rozpúšťadlách (Mokotedi a kol., 2018). Patria medzi najsilnejšie chelatačné činidlá z prírodných organických látok. Humínové kyseliny majú antimikrobiálny, analgetický, antidiarheálny, antitoxický a imunostimulačný účinok (Wang a kol., 2008). Obohatenie kŕmnych zmesí humínovými látkami vedie k zlepšeniu zdravotného stavu zvierat. Gomez-Rosales a Angeles (2015) zaznamenali u brojlerových kurčiat prírastky telesnej hmotnosti, zvýšenie hmotnosti jatočných tiel a zlepšenie konverzie krmiva.

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zapojených 90 brojlerových kurčiat COBB 500 (Mach Drubež Ltd. Litomyšl, ČR) o hmotnosti 50 g/ks, ktoré boli náhodne rozdelené do 3 skupín: 1 kontrolnej (30 ks) a 2 pokusných (60 ks). Kontrolná skupina bola kŕmená komerčnou kŕmnu zmesou (KKZ): BR1 do 10. dňa, BR2 od 11. dňa do 30. dňa a BR3 od 31. dňa do 37. dňa. Chemické zloženie KKZ je uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Chemické zloženie komerčnej kŕmnej zmesi

	BR1	BR2	BR3
SP (g/kg)	254,61	22,16	209,14
ST (g/kg)	56,24	55,17	60,09
SV (g/kg)	38,20	37,98	36,62
Škrob (g/kg)	454,38	497,13	504,23
Ca (g/kg)	11,43	9,84	9,05
P (g/kg)	6,52	5,89	5,59
ME (MJ/kg)	14,16	14,38	14,49

SP – surový proteín; ST – surový tuk; CV – surová vláknina; ME – metabolizovateľná energia, Ca – vápnik, P – fosfor

Pokusné skupiny boli kŕmené rovnakými kŕmnmymi zmesami ako kontrolná skupina, a navyše im bol podávaný prídavok humínových kyselín. Pokusnej skupine č. 1 (HNM) bol podávaný 0,5% prídavok prípravku Humac Natur Monogastric (obsah humínových kyselín min. 60% v sušine; fulvónové kyseliny min. 5% v sušine; kyselina mravčia 3,24% v sušine; komplex stopových prvkov a minerálnych látok) a pokusnej skupine č. 2 (HN) bol podávaný 0,7 % prídavok prípravku Humac Natur (obsah humínových kyselín min. 65% v sušine, fulvónové kyseliny min. 5% v sušine; minerály a mikroelementy: Ca 42,28 g/kg, Mg 5,11 g/kg, Fe 19,05 g/kg; Cu 15 mg /kg, Zn 37 mg /kg, Mn 142 mg /kg, Co 1,24 mg /kg, Se 1,67 mg /kg, Mo 2,7 mg /kg). Kurčatá boli chované na hlbokoj podstielke. Prístup ku krmivu a vode mali *ad libitum*. Kurčatá boli na 38. deň pokusu usmrtené cervikálnou dislokáciou, vykvrvené a jatočne opracované. Na stanovenie jatočnej výťažnosti kurčiat sa brojlery vážili pred a po zabíí. Hodnoty pH a koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov v prsnej svalovine sa merali 24 hodín po usmrtení a 3. a 7. deň po usmrtení. Vzorok boli až do použitia skladované pri 4 °C. Hodnoty pH vzoriek mäsa sa analyzovali digitálnym pH metrom (inoLab pH 720, WTW, Weilheim, Nemecko) so sklenenou elektródou vo vodnom extrakte mäsa. Koncentrácie kyseliny mliečnej a fosfátov sa analyzovali pomocou elektroforetického analyzátora EA 102 s vodivým detektorom (Villa Labeco, SR) podľa Mačangu a kol. (2011). Výsledky izotachoforetickej analýzy boli postupne spracovávané programom ITP Pro 32 (Kas-Comp, Bratislava, Slovensko). Výsledky experimentu sa štatisticky analyzovali pomocou Graph Pad Prism 5. Na porovnanie jednotlivých výsledkov medzi skupinami sa použil jednocestný ANOVA test (Tukeyho porovnávací test, $p < 0,05$).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V experimentálnej skupine HN došlo k štatisticky významnému zvýšeniu ($p > 0,001$) živej hmotnosti v porovnaní s kontrolnou skupinou. V skupine HN v porovnaní so skupinou HNM sa tiež zaznamenal štatisticky významný nárast ($p > 0,01$). V kontrolnej skupine ($p < 0,01$) a skupine HNM ($p < 0,05$) sa v porovnaní so skupinou HN zistilo štatisticky významné zvýšenie hmotnosti jatočných tiel. Významné zvýšenie ($p < 0,01$) hmotnosti prsného svalu bolo tiež zaznamenané v skupine HN v porovnaní s kontrolnou skupinou (Tab. 2.).

Tab. 2. Produkčné parametre hydiny

Parameter	Kontrola	HNM	HN	P hodnota
Živá váha	2309.3±90 ^b	2357.5±118.8 ^b	2524.5±148 ^a	P < 0.001
Mŕtva váha	1698.8±71,4 ^b	1766.5±133.9 ^b	1894.4±142.8 ^a	P < 0.01
Jatočná výťažnosť	73.6±1.6	74.9±2.8	75.0±1.9	P > 0.05
Váha pŕs	519.1±49.3 ^b	506.5±67.5 ^b	604.2±66.1 ^a	P < 0.01

a, b – hodnoty s rozdielnym označením v riadku sú štatisticky rozdielne, $p < 0,05$

Výsledky fyzikálno-chemických parametrov, ako sú hodnoty pH, koncentrácia kyseliny mliečnej a fosforečnanov počas postmortálnych procesov v prsnej svalovine sú uvedené v Tabuľke 3. Dynamika kyseliny mliečnej v celom časovom intervale procesu zrenia v mäse odráža kvantitatívnu konverziu glykogénu na kyselinu mliečnu. Je to kyselina mliečna, ktorá výrazne ovplyvňuje hodnoty pH mäsa (Scheffler a kol. 2013).

Tab. 3. Výsledky fyzikálno-chemickej analýzy prsnej svaloviny

Sledované parametre	Dni <i>post mortem</i>	Skupiny			P hodnota
		K	HNM	HN	
Kyselina mliečna (g/100 g vzorky)	1.	1,17 ± 0,42 ^{1,2}	1,34 ± 0,16 ¹	1,59 ± 0,33 ^{1,2}	P > 0,05
	3.	1,58 ± 0,11 ^{a1}	1,76 ± 0,20 ^{ab2}	1,93 ± 0,32 ^{b1}	P > 0,05
	7.	1,04 ± 0,21 ^{a2}	1,58 ± 0,15 ^{b1,2}	1,36 ± 0,36 ^{ab2}	P < 0,01
Fosfáty (g/100 g vzorky)	1.	0,83 ± 0,36 ^a	1,20 ± 0,09 ^{ab}	1,47 ± 0,34 ^{b1}	P < 0,01
	3.	0,82 ± 0,15 ^a	1,18 ± 0,11 ^b	1,23 ± 0,27 ^{b1,2}	P < 0,01
	7.	0,61 ± 0,15 ^a	0,14 ± 0,19 ^b	1,01 ± 0,24 ^{b2}	P < 0,001
pH hodnoty	1.	5,96 ± 0,07 ^a	5,81 ± 0,08 ^b	5,80 ± 0,9 ^b	P < 0,01
	3.	5,91 ± 0,12 ^a	5,71 ± 0,08 ^b	5,75 ± 0,11 ^b	P < 0,05
	7.	5,96 ± 0,08 ^a	5,79 ± 0,12 ^b	5,79 ± 0,07 ^b	P < 0,05

Hodnoty v riadkoch s rôznymi označeniami (a, b, c) a hodnoty v stĺpcoch s rôznymi označeniami (1,2,3) sú štatisticky odlišné pri hladinách významnosti $p \leq 0,05$. Riadky porovnávajú jednotlivé parametre (kyselinu mliečnu (LA), fosfáty (PO), hodnoty pH (pH) medzi kontrolnou skupinou (C) a experimentálnymi skupinami (HNM 0,5% a HN 0,7%). Stĺpce porovnávajú jednotlivé dni *post mortem* v rámci jednej skupiny.

V prsnej svalovine v kontrolnej skupine sa koncentrácia kyseliny mliečnej počas prvých troch dní zvýšila, následne na 7. deň *post mortem* bol zaznamenaný štatistický významný pokles ($p < 0,05$). Koncentrácia fosfátov postupne klesala, štatisticky významne sa nemenila. Hodnoty pH počas prvých troch dní pomaly klesali a následne na 7. deň opäť vzrástli na pôvodnú hodnotu. Dynamika kyseliny mliečnej, fosfátov a pH v experimentálnych skupinách mala podobný priebeh ako v kontrolnej skupine. V experimentálnej skupine HNM bol zaznamenaný signifikantný nárast ($p < 0,01$) kyseliny mliečnej medzi 1. a 3. dňom po usmrtení. V experimentálnej skupine HN bol zaznamenaný signifikantný pokles koncentrácie kyseliny mliečnej ($p < 0,05$) z 3. dňa na 7. deň. Výsledky práce naznačujú, že humínové kyseliny v kombinácii s kompletnými kŕmami pozitívne ovplyvňujú kvalitu hydínového mäsa.

Práca bola vykonaná vďaka finančnej podpore Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-18-0039.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gomez-Rosales S, Angeles ML. Addition of a worm leachate as source of humic substances in the drinking water of broiler chickens. *Asian-Austr. J. Anim.Sci.* 2015; 28:215–222.
- Mačanga J, et al. Post-mortem changes in the concentration of lactic acid, phosphates and pH in the muscles of wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) according to the perimortal situation. *Meat Sci.* 2011; 88:701–704.
- Mokotedi NP, et al. Meat quality of weaner steers adapted to a diet containing potassium humate in the feedlot. *SA J. An. Sci.* 2018; 48:19.
- Scheffler TS, et al. High glycolytic potential does not predict low ultimate pH in pork. *Meat. Sci.* 2013; 95:85–91.
- Wang Q, et al.. Effects of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs. *Liv. Sci.* 2008; 117:270–274.

MOLEKULÁRNE MECHANIZMY FAGOCYTÓZY APOPTOTICKÝCH BUNIEK V MYŠACOM PREIMPLATAČNOM EMBRYU

Pisko J.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied, SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo odhaliť mechanizmy, ktorými neprofesionálne embryonálne fagocyty odstraňujú apoptotické bunky v embryu. Zamerali sme sa na dôkaz účasti enzýmu RAC1 na tomto procese. Experimentálny dôkaz bol vykonaný pomocou imunohistochemického vyšetrenia myšacích blastocýst použitím myšacej monoklonálnej protilátky. Bolo vyšetrených 56 expandovaných blastocýst. Slabý signál pre RAC1 bol prítomný v cytoplazme väčšiny embryonálnych buniek a signifikantne zvýšený signál bol zaznamenaný v piatich prípadoch. Prítomnosť enzýmu v troch membránovitých formáciách obklopujúcich jedno jadro s normálnou morfológiou a jedno s kondenzovanou (apoptotickou) morfológiou dokázala, že RAC1 hrá dôležitú úlohu pri pohltení apoptotických buniek nielen v profesionálnych, ale aj v neprofesionálnych embryonálnych fagocytoch.

ÚVOD

Z predchádzajúcich štúdií vyplýva, že enzýmy RAC zo skupiny GTPáz sú kľúčovými komponentmi kontrolujúcimi cytoskeletálnu organizáciu aktínu, adhéziu buniek, migráciu, proliferáciu a prežívanie cicavčích buniek (Guo a kol., 2008). Štúdie na profesionálnych fagocytoch preukázali, že RAC1 je zapojený do vysoko konzervovanej signálnej dráhy v procese fagocytózy (Song a kol., 2016). RAC1 patrí do skupiny Rho GTPáz regulujúcich usporiadanie cytoskeletu v priebehu pohltienia apoptotických buniek. Ukázalo sa, že aktivácia RAC1 je nevyhnutná pre usporiadanie F-aktínu a jeho deaktivácia je nevyhnutná pre uzavretie fagocytového pohárika (Nakaya a kol., 2008). Mechanizmus závislý od RAC1 bol popísaný aj pri klírense umierajúcich buniek neprofesionálnymi fagocyty, konkrétne v respiračnom epiteli pľúc, resp. pri klírense zanikajúcich neurónov počas neurogenézy (Lu, Z. a kol., 2011; Juncadella, I. J. a kol.). Expresia RAC-1 bola potvrdená v početných tkanivách, zahrňujúcich myšacie oocyty (Halet a kol., 2007) a oocyty a embryá u ošípaných (Song a kol., 2016). Bolo preukázané, že RAC-1 zohráva dôležitú rolu v regulácii dozrievania oocytov, pri vzniku póloveho telieska a rovnako sa spolupodieľa na regulácii meiotického delenia (Penberthy a kol., 2016). Jeho úloha pri fagocytóze apoptotických buniek v embryu však zatiaľ potvrdená nebola. Výskyt fagocytovaného materiálu apoptotického pôvodu bol popísaný v bunkách myšacích, prasacích a ľudských blastocýst (Fabian a kol., 2005). Aby sme získali viac informácií o mechanizmoch tvorby fagozómov v myšacích blastocýstach, vykonali sme imunochemické vyšetrenie aktívnej formy RAC1.

MATERIÁL A METODIKA

Donorkami vyšetrovaných expandovaných blastocýst boli samice myši (outbredný kmeň CD-1). Samice vo veku 30 až 35 dní boli hormonálne synchronizované gonadotropínom gravidnej kobyly (eCG, 5IU, i.p.), po aplikácii ktorého nasledovala o 47 hodín neskôr stimulácia ľudským choriovým gonadotropínom (hCG, 4 IU intraperitoneálne). Samice sa cez noc páрили so samcami rovnakého kmeňa. Úspešné párenie sa potvrdilo identifikáciou vaginálnej zátky nasledujúce ráno (1. deň gravidity). Izolácia expandovaných blastocýst prebehla na 4. deň gravidity (120 hodín po hormonálnom ošetrení eCG).

Z čerstvo izolovaných blastocýst bola pronázou enzymaticky odstránená *zona pellucida*. Odzónované blastocysty boli fixované v 4% paraformaldehyde v PBS 10 minút pri štandardnej laboratórnej teplote.

Následne boli blastocysty premyté v PbS s obsahom 0,1% BSA (PbS BSA). V ďalšom kroku boli cytoplazmatické membrány permeabilizované použitím 0,5% Tritonu X-100 v PbS 1 hodinu.

Permeabilizované blastocysty boli dvakrát po sebe premyté v PbS s BSA, a následne boli nešpecifické imunoreakcie blokované 10% kozím sérom v PbS pri teplote 4°C cez noc.

V ďalšom kroku boli myšacie blastocysty inkubované s primárnou protilátkou (Anti-Active Rac1-GTP Mouse Monoclonal Antibody) zriedenou v pomere 1:50 s blokujúcim kozím sérom pri 4 ° C po dobu 24 hodín.

Následujúci deň boli blastocysty dôkladne premyté v blokovačom kozom sére a ďalej inkubované so sekundárnou protilátkou konjugovanou s Fluorescein FITC (zriedenou v pomere 1: 200 v blokujúcom roztoku) počas 1 hodiny pri laboratórnej teplote.

Negatívne kontrolné farbenie sa uskutočnilo vynechaním primárnej alebo sekundárnej protilátky. Posledným krokom bolo kontrastné farbenie pomocou Hoechst 33342 po dobu 5 minút pri laboratórnej teplote a následne boli blastocysty montované v médiu Vectashield na sklenené podložné sklíčka.

Hodnotenie bolo realizované s použitím konfokálnej laserovej mikroskopie ((Leica TCS SPE, Leica, Mannheim, Germany).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnotenie aktívnej formy RAC1, t.j. enzýmu dôležitého pre preskupenie aktínového cytoskeletu a tvorbu fagozómov, ukázalo nasledujúce výsledky u myších embryí: Slabý signál pre RAC1 bol prítomný v cytoplazme väčšiny embryonálnych buniek.

V minulosti bolo preukázané, že lokalizácia RAC1 u oocytov a embryí ošípaných koreluje s lokalizáciou aktínových filament, t.j. RAC1 je akumulovaná predovšetkým v kôre oocytov a v marginálnych oblastiach blastomér embrya v štádiu jeho brázdovania (Halet a kol., 2017). Obdobná distribúcia RAC1 na periférii blastomér bola zaznamenaná aj v našej štúdií na myšacích blastocystách . V našej štúdií bolo vyšetrených 56 blastocýst, pričom signifikatne zvýšený signál RAC1 sme zaznamenali v piatich prípadoch. Prítomnosť enzýmu v troch membránovitých formáciách obklopujúcich jedno jadro s normálnou morfológiou a jedno s kondenzovanou (apoptotickou) morfológiou dokázala, že počas preimplantačného vývinu hrá RAC1 dôležitú úlohu aj v pohltení apoptotických buniek. V porovnaní s inými testami na eferocytózu, ktoré sme vykonali v predchádzajúcich experimentoch, bola frekvencia pozorovaní fagocytózy apoptotických buniek pomerne nízka. To by sa však dalo vysvetliť krátkym časom procesu pohltienia, to znamená veľmi úzkym detekčným oknom.

Naše doposiaľ získané výsledky ukazujú, že embryonálne bunky v myších blastocystách majú všetky mechanizmy potrebné na rozpoznanie, pohltenie a trávenie poškodených blastomér. Zdá sa, že proces embryonálnej eferocytózy sa riadi štandardným fenotypom: začína rozpoznávaním apoptotickej bunky, t.j. väzbou rôznych fagocytárných receptorov na externalizovaný fosfatidylserín (alebo iné ligandy ako sú modifikované lipoproteíny), nastáva aktivácia receptorov a aktivácia GTPáz rodiny Rho vrátane RAC1. Táto signalizačná dráha vedie ku vzniku aktín dependentného fagocytového pohárka, pričom súčasne dochádza ku pohlteniu apoptotickej bunky neprofesionálnym fagocytom (embryonálnou bunkou) za vzniku fagozómu. Následne dochádza k dozrievaniu fagozómu cez jednotlivé medzistupne, čo vedie k postupnej degradácii jeho obsahu.

Práca bola podporená grantmi APVV-18-0389 a VEGA -2/0092/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Fabian D, Koppel J, Maddox-Hyttel P. Apoptotic processes during mammalian preimplantation development. *Theriogenology*. 2005; 64: 221-231
- Guon F, Cancelas AJ, Hildeman D. Rac GTPase isoforms Rac1 and Rac 2 play a redundant and crucial role in T-cell development. *Immunobiology*. 2008;1767 -75
- Halet G, Carroll J. Rac Activity Is Polarized and Regulates Meiotic Spindle Stability and in Anchoring Mammalian Oocytes. *Dev. Cell*. 2007; 12:309–17
- Juncadella IJ, et al. Apoptotic cell clearance by bronchial epithelial cells critically influences airway inflammation. *Nature*. 2013; 493:547–51.
- Lu Z, et al. Phagocytic activity of neuronal progenitors regulates adult neurogenesis. *Nat. Cell Biol*. 2011; 13, 1076–83.
- Nakaya M, et al. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008; 105:9198–9203.
- Penberthy KK, Ravichandran KS. Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. *Immunol. Rev.* 2016; 269:44–59.
- Song SJ, et al. Inhibition of Rac1 GTPase activity affects porcine oocyte maturation and early embryo development. *Sci. Rep.* 2016; 6:1–9.

KURACIE EMBRYO AKO EXPERIMENTÁLNY MODEL VO VÝSKUME HADÍCH JEDOV

Polláková M.¹, Petrovová E.², Andrejčáková Z.¹, Vlčková R.¹, Sopková D.¹, Petrilla V.¹

¹Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR

²Katedra morfológických disciplín, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR

ABSTRAKT

Africký druh hada Vretenica útočná lat. *Bitis arietans* z čeľade Viperidae predstavuje jeden z najjedovatejších druhov rodu *Bitis*. Predpokladá sa, že prevažná väčšina závažných uhryznutí jedovatými hadmi v Afrike je zapríčinená práve hadmi druhu *B. arietans*. Envenomácia je sprevádzaná enormnou bolestivosťou a vznikom edému, prípadne pľuzgierov v mieste uhryznutia, najčastejšie v oblasti predkolenia. Cytotoxický charakter jedu vyvoláva rozsiahle poškodenie tkaniva, čo môže viesť k strate prstov či končatín. Z hľadiska manažmentu terapie je vždy dôležité zohľadniť skutočnosť, že účinok jedu, klinický obraz a priebeh envenomácie sa môže líšiť v závislosti od lokality, v ktorej k uhryznutiu došlo. Metodika HET-CAM (Hen's Egg Test - Chorioallantoic membrane) podľa Luepkého umožnila sledovať vazoaktívny efekt a následne vyhodnotiť iritačný potenciál jednotlivých koncentrácií jedu hadov druhu *B. arietans* dvoch afrických lokalít - Cape Town (CT), Južná Afrika a Lake Nakuru (LN), Keňa. Oba testované jedy vyvolali vznik hemorágií a krvných zrazenín, pričom pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Lake Nakuru boli stanovené vyššie hodnoty iritačného potenciálu než pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Cape Town.

ÚVOD

Ako už samotný názov napovedá, vretenica útočná je známa pomerne agresívnym spôsobom sebaobrany. Anglické pomenovanie „puff adder“ poukazuje na schopnosť tohto druhu hadov nafúknuť sa, z anglického „puff“, čím pôsobia väčšie. Jed prevažne cytotoxického charakteru je do organizmu koristi vpravený jedovým aparátom solenoglyfného typu. Hady druhu *Bitis arietans* zastávajú v rámci ekosystémov funkciu predátora hlodavcov. Týmto spôsobom daný druh napomáha regulovať populácie škodcov a znižovať straty poľnohospodárov. I napriek svojmu významnému postaveniu v potravinovom reťazci je druh *B. arietans* spájaný najmä s negatívami, ktoré vyplývajú z veľkého množstva úmrtí a morbiditu v dôsledku uhryznutí jedincami tohto druhu (Animal diversity web, n.d.).

Zástupcovia druhu *B. arietans* obývajú rozsiahle oblasti od Maroka naprieč Subsaharskou Afrikou až po Arabský polostrov. Táto africká vretenica je považovaná za najrozšírenejšieho jedovateého hada Afriky, s najväčším podielom na intoxikáciách ľudí (Animal diversity web, n.d.). Chemické zloženie a účinok jedu hadov toho istého druhu sa môže líšiť v závislosti na geografickej lokalite, z ktorej pochádzajú (Chippaux, Williams a White, 1991).

Cieľom tejto práce bolo sledovať, hodnotiť a porovnať vazoaktívne účinky a iritačný potenciál jedu hadov druhu *B. arietans* pôvodom z dvoch rozličných afrických lokalít (Cape Town, Južná Afrika a Lake Nakuru, Keňa) použitím metodiky HET-CAM podľa Luepkého.

MATERIÁL A METODIKA

Oplozené kuracie vajcia, znesené v približne rovnakom čase, boli dovezené z liaharenského podniku Párovské háje (Nitra). Dovoz bol realizovaný pri teplote 15 °C. Pred naložením do inkubátora boli vajcia očistené 70 % etanolom a následne poukladané tupým pólom nahor. Inkubácia prebiehala pri teplote 37,5 °C; vlhkosti 60 % a automatický inkubátor zabezpečoval otáčanie vajec v pravidelných 3-hodinových intervaloch. Deň naloženia vajec do inkubátora predstavuje nulý embryonálny deň.

Na 3. embryonálny deň bol vykonaný odber bielka. Ostrými nožnicami sa vytvoril malý otvor na ostrom konci každého vajca, čo umožnilo odber bielka (2 ml) použitím sterilnej ihly

a striekačky. Následne boli otvory uzatvorené pomocou tekutého parafínu a vajcia boli uložené späť do inkubátora tak, aby ostrý koniec s uzatvoreným otvorom smeroval vždy nadol (Knight a kol., 2019).

Na 9. embryonálny deň prebiehala aplikácia jedu. Vajcia boli postupne vyberané z inkubátora a za pomoci nožníc sa z každého vajca odstránila škrupina vrchnej časti tupého pólu v takej miere, aby vzniknutý otvor umožňoval aplikáciu jedu na chorioalantoickú membránu (CAM) a sledovanie jeho účinkov. Neoplodnené vajcia boli v tejto fáze vyradené. Vhodnou pinzetou bola z vrchnej časti CAM odstránená papierová blana (*membrana papyracea*), čím sa odhalili cievy. Jed bol aplikovaný v množstve 50 µl/vajce priamo na cievy CAM. V kontrolnej skupine bol namiesto jedu aplikovaný fyziologický roztok (50 µl/vajce). Po aplikácii bol sledovaný a fotograficky zaznamenávaný vazoaktívny efekt jedu v intervaloch 0, 30, 120 a 240 sekúnd. Po ukončení experimentu nasledovalo vyhodnotenie získaných výsledkov a výpočet iritačného potenciálu pre jednotlivé koncentrácie jedov použitím Luepkého hodnotiaceho systému (Knight a kol., 2019).

Princíp HET-CAM testu spočíva v sledovaní výskytu zmien (hyperémia, hemorágie a zrážanie) bezprostredne po aplikácii testovanej látky na CAM. Každá zmena je bodovo hodnotená na základe času, ktorý uplynul od aplikácie látky na CAM po objavenie sa efektu. Na základe stanoveného kumulatívneho skóre možno klasifikovať iritačný potenciál látky (silný, mierny, nepatrný alebo zanedbateľný) (Knight a kol., 2019).

Tab. 1. Koncentrácie testovaných jedov (HET-CAM test)

Hadí jed	Hmotnosť 170 µl jedu (mg)	Koncentrácia (mg/ml)		
		E-1	E-2	E-3
<i>B. arietans</i> (CT)	182	18,2	1,82	0,182
<i>B. arietans</i> (LN)	184	18,4	1,84	0,184

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Jed hadov druhu *B. arietans* obsahuje zložky z rozličných skupín. Disintegríny Bitistatín, disintegrín izoforma D-2, disintegrín izoforma D-3, zinková metaloproteináza-disintegrín BA-5A, enzým uvoľňujúci kallidín zo skupiny serínových proteináz, postsynaptický neurotoxín Bitanarín zo skupiny fosfolipáz A 2, baptydy, hyaluronidázy Hy-1 a Hy-2, pravé lektíny C-typu CTL a CTL-2, lektínom podobné proteíny C-typu Snaclec, Cystatín, vaskulárny endoteliálny rastový faktor Barietín, fibrinogenáza Ba100 a ďalšie kvantitatívne menej zastúpené zložky boli izolované a popísané v rámci rozličných experimentálnych štúdií. Mnohé z týchto zložiek majú vplyv na kardiovaskulárny systém (UniProt, n.d.; VenomZone, n.d.).

Po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* lokalít CT a LN na CAM boli pozorované zmeny v podobe hemorágií a zrazenín. Hyperémia nebola prítomná. Štúdia hodnotiaca vazoaktivitu hemotoxických hadích jedov použitím HET-CAM testu a hodnotiaceho systému podľa Luepkého uvádza výskyt hemorágií a krvných zrazenín po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* z nešpecifikovanej lokality Juhoafrickej republiky. Zmeny v podobe hyperémie neboli pozorované (Knight et al. 2019). Rovnako, ani nami aplikované jedy hadov druhu *B. arietans* nevyvolali hyperémiu. Oba testované jedy vyvolali vznik hemorágií a krvných zrazenín, pričom pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Lake Nakuru boli stanovené vyššie hodnoty iritačného potenciálu než pre jed hadov druhu *B. arietans* z lokality Cape Town.

Toto zistenie poukazuje na možnú vyššiu mieru toxicity jedu zástupcov daného druhu z lokality Lake Nakuru.

Stanovené výsledky sú uvedené v tabuľke 2.

Tab. 2. Priemerné kumulatívne skóre a klasifikácia iritačného potenciálu rozličných koncentrácií vybraných hadích jedov

Jed	c	Hyperémia	Hemorágie	Zrážanie	Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
Kontrola	N/a	0	0	0	0	0
<i>B. arietans</i> (Cape town)	E-1	0	5	6	11	Silný
	E-2	0	4,5	0	4,5	Nepatrný
	E-3	0	5,5	0	5,5	Mierny
<i>B. arietans</i> (Lake Nakuru)	E-1	0	6	7	13	Silný
	E-2	0	6	6	12	Silný
	E-3	0	5,5	0	5,5	Mierny

Po aplikácii jedu hadov druhu *B. arietans* lokality Cape Town bola pozorovaná dočasná konstriktcia niektorých ciev CAM. Tieto výsledky potvrdzujú, že jed hadov druhu *B. arietans* obsahuje látky s priamym účinkom na cievy, avšak hodnotenie vazokonstriktčného resp. vazodilatačného účinku aplikovaných látok nie je súčasťou použitých metodík.

Práca demonštruje praktické využitie modelu kuracieho embrya vo výskume hadích jedov. Zistené výsledky sú v súlade so zisteniami a publikáciami iných autorov. Pre zvýšenie objektivity výsledkov je potrebný ďalší výskum a použitie širšieho spektra metodických postupov, ktoré by umožnili všetky pozorované zmeny kvantifikovať.

Ďakujeme chovnému zariadeniu VIPERAFARM, spol. s.r.o. (Ltd.) za poskytnutie hadích jedov. Práca bola realizovaná ako súčasť grantových úloh VEGA 1/0241/18, APVV-17-0017 a VEGA 1/0050/19 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Animal Diversity Web University of Michigan MUSEUM OF ZOOLOGY.
<https://animaldiversity.org/accounts/Bitis_arietans/#192D043A-FC99-11E8-AD69-005056AB59D3>.
- Chippaux JP, Williams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. 1991. 29; 11:1279-1303. ISSN 0041-0101.
- Knight RB. et al. Evaluation of vasoactivity after haemotoxic snake venom administration. *Toxicon*. 2019; 158:69-76. ISSN 0041-0101.
- The Universal Protein Resource (UniProt), A comprehensive resource for protein sequence and annotation data. <<https://www.uniprot.org/>>.
- VenomZone. <<https://venomzone.expasy.org/3856>>.

VPLYV SYNERGICKÉHO ÚČINKU VYBRANÝCH ANTIMYKOTÍK A RASTLINNÝCH SILÍC ČEĽADE *LAMIACEAE* NA TVORBU BIOFILMU *CANDIDA ALBICANS* IN VITRO

Proškovcová M., Čonková E., Váczi P.
Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Virulencia *Candida albicans* (*C. albicans*) je podmienená viacerými virulenčnými faktormi. Jedným z nich je tvorba biofilmu, ktorý viacerými mechanizmami znižuje citlivosť kvasinky na liečivo. Predmetom našej štúdie bolo otestovať účinnosť vybraných antimykotík (itakonazol, flukonazol, nystatín) v kombinácii s rastlinnými silicami z *Thymus vulgaris* a *Hyssopus officinalis* na biofilm-tvoriace izoláty *C. albicans* „in vitro“. Na základe hodnôt FICI (index frakčnej inhibičnej koncentrácie) najlepšiu antifungálnu aktivitu pri planktonických bunkách *C. albicans* vykazoval itakonazol. Pri MICC (minimálna inhibičná koncentrácia kombinácie) 1,1 µg/ml, v kombinácii so silicou z *Hyssopus officinalis* (800 µg/ml) pôsobil synergicky na všetky izoláty (100 %). V kombinácii so silicou z *Thymus vulgaris* (228,6 µg/ml) pri MICC 2,1 µg/ml bol jeho účinok prevažne aditívny (57,1 %) a iba v jednom prípade synergický (14,3 %). Pri hodnotení antibiofilmovej aktivity na fázu adherencie (0 h biofilm) sa perspektívnejšou javí kombinácia itakonazolu (2,2 µg/ml) so silicou z *Thymus vulgaris* (240 µg/ml), pri ktorej bol pri 4 vzorkách (80 %) zistený aditívny účinok a len v 1 prípade (20 %) indiferentný. V inhibičnom pôsobení na vytvorený, 48 h biofilm, bola účinnejšou aditívne pôsobiaca (57,1 %) kombinácia itakonazolu (21 µg/ml) so silicou z *Hyssopus officinalis* (1922,9 µg/ml), avšak pri vyšších hodnotách MICC ako v kombinácii itakonazolu (0,85 µg/ml) so silicou z *Thymus vulgaris* (400 µg/ml), pri ktorej bol zaznamenaný pri všetkých testovaných vzorkách indiferentný účinok (100 %). Dosiahnuté výsledky poukazujú na potenciálne využitie kombinácie konvenčných antimykotík s rastlinnými silicami pri inhibícii tvorby biofilmu ako aj pri jeho dezintegrácii.

ÚVOD

C. albicans, ako dimorfná eukaryotická bunka disponuje schopnosťou morfogénnej premeny z kvasinkovej na hýfovú formu (Tsui a kol., 2016). Táto vlastnosť podmieňuje jej patogenézu a umožňuje tvorbu biofilmu, čo je kľúčovým faktorom virulencie. Biofilm podporuje tiež rozvoj rezistencie kvasinky, čím sa liečba kandidóz komplikuje. V redukcii rezistencie biofilm-tvoriacich kvasiniek predstavujú možné riešenie rastlinné silice (RS), ktoré sú v poslednej dobe predmetom záujmu viacerých vedeckých štúdií. Bohatým zdrojom RS s rôznorodou bioaktivitou predstavuje čeľaď *Lamiaceae* (Raja, 2012; Mayer a kol., 2013).

MATERIÁL A METODIKA

Účinnosť kombinácií antimykotika (ATM) a RS bola stanovená šachovnicovým testom podľa Duarteho a kol. (2012) s určitými modifikáciami. Efektivita kombinácie bola po vypočítaní hodnoty $FICI = [MICC(RS \text{ v kombinácii}) / MIC(RS \text{ samostatne})] + [MICC(ATM \text{ v kombinácii}) / MIC(ATM \text{ samostatne})]$ vyhodnotená na základe interpretačných kritérií ($FICI \leq 0,5$ synergický efekt, $0,5 < FICI < 1$ aditívny efekt, $1 \leq FICI < 4$ indiferentný efekt, $FICI \geq 4$ antagonistický efekt). Na planktonických bunkách *C. albicans*, ktoré v pilotných testoch vykazovali rezistenciu, boli testované azolové ATM itakonazol (0,125 – 64 µg/ml) a flukonazol (0,25 – 64 µg/ml), z polyénov nystatín (0,0625 – 8 µg/ml) a RS z rastlín *Hyssopus officinalis* (yzop lekársky) a *Thymus vulgaris* (dúška tymianová) (100 – 6 250 µg/ml). Ich synergický účinok sa sledoval v pomeroch koncentrácií MICx8, MICx4, MICx2, MIC, MIC:2, MIC:4, MIC:8, MIC:16. Na základe dosiahnutých výsledkov sme na stanovenie účinku kombinácie na tvorbu biofilmu vybrali kombináciu itakonazolu (ITR) s oboma

silicami. ITR bol testovaný v rozpätí koncentrácií 0,25 – 128 µg/ml, silica z *Hyssopus officinalis* od 800 µg/ml do 25 000 µg/ml a silica z *Thymus vulgaris* od 200 do 6250 µg/ml. Uvedené koncentrácie zahŕňali hodnoty MICx8, MICx4, MICx2, MIC, MIC:2, MIC:4, MIC:8, MIC:16, MIC:32, MIC:64 pre ITR a MICx8, MICx4, MICx2, MIC, MIC:2, MIC:4 pre RS. Účinnosť ITR s RS bola testovaná na biofilm-tvoriace bunky (0 h biofilm) a na 48 h biofilm na základe metodiky popisovanej Jinom a kol. (2013).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V súčasnosti je zaznamenaný nárast kandidóz, najmä z dôvodu stúpajúcej rezistencie kvasinky voči konvenčným ATM. Rezistencia ako aj úzke spektrum ATM, či ich toxicita si vyžadujú hľadanie nových strategických postupov v terapii. Vhodnou alternatívou ATM sú RS z čeľade *Lamiaceae*, ktorá zahŕňa 236 rodov, asi 7000 druhov vyznačujúcich sa širokým spektrom biologickej aktivity (Raja, 2012). Jednou z možností ako zefektívniť liečbu kandidóz je testovanie možných interakcií medzi jednotlivými substanciami. Synergický účinok umožňuje zvýšiť sumárny účinok dvoch a viacerých liečiv, pričom sa dávka jedného liečiva znižuje, čo prispieva k zníženiu jeho toxicity (Lincová a kol., 2007). Z testovaných kombinácií pôsobiacich na planktonické bunky *C. albicans*, sa najefektívnejšou preukázala kombinácia ITR (1,1 µg/ml) so silicou z *Hyssopus officinalis* (800 µg/ml), pri ktorej bol zaznamenaný 100% synergický účinok (7 klinických izolátov) (Tab. 1.). Kombináciou ITR (2,1 µg/ml) so silicou z *Thymus vulgaris* (228,6 µg/ml) bol dosiahnutý iba v jednom prípade (14,3 %) synergický účinok. V tejto kombinácii dominoval aditívny účinok (57,1%), indiferentný účinok bol zistený pri 2 izolátoch (28,6 %). Najmenej efektívnou, spomedzi testovaných ATM, bola kombinácia nystatínu s oboma RS. Nystatín (0,08 µg/ml) pôsobil prevažne indiferentne, tak v kombinácii s RS z *Hyssopus officinalis* (1600 µg/ml) (66,7 %), ako aj z *Thymus vulgaris* (166,7 µg/ml) (66,6 %).

Tab. 1. Vyhodnotenie MICC (µg/ml) a účinnosti (%) ATM v kombinácii s RS na planktonické bunky *C. albicans*

Parameter		Itrakonazol		Nystatín		Flukonazol	
		<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Hyssopus officinalis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
MICC (µg/ml)	ATM	1,1	2,1	0,08	3,0	13,4	6,6
	RS	800	228,6	1600	166,7	1682,5	312,5
FICI (n/%)							
Synergický		7/100	1/14,3	0/0	1/16,7	0/0	2/25
Aditívny		0/0	4/57,1	2/33,3	1/16,7	5/62,5	2/25
Indiferentný		0/0	2/28,6	4/66,7	4/66,6	3/37,5	4/50
Anatagonistický		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0

Proces tvorby biofilmu pozostáva zo 4 fáz: adherencia kvasinkových buniek, proliferácia, maturácia biofilmu, počas čoho dochádza k morfogéneze kvasinkových buniek a následnej disperzii neadherovaných buniek, ktoré kolonizujú ďalšie povrchy (Tsui a kol., 2016). Pre testovanie antibiofilmového efektu kombinácie ATM a silíc boli do experimentu vybraté izoláty, pri ktorých bol zistený synergický, príp. aditívny účinok kombinácie ITR s RS z *Hyssopus officinalis* a *Thymus vulgaris* na planktonické bunky *C. albicans*. Efektivitu ich vplyvu na adherované bunky (0 h biofilm) a na zrelý, 48 h biofilm, uvádza tabuľka 2. Fáza adherencie bola výrazne inhibovaná kombináciou ITR (2,2 µg/ml) so silicou z *Thymus vulgaris* (240 µg/ml), pri ktorej bol zistený aditívny účinok pri 4 izolátoch (80 %)

a indiferentný pri 1 vzorke (20 %). Silica z *Thymus vulgaris* je známa obsahom predovšetkým dvoch fenolových monoterpénov, a to karvakrolu a tymolu (Alexa a kol 2018), ktoré predurčujú jej antifungálny účinok (Bona et al., 2016). V testovaní inhibičného vplyvu na vytvorený, 48 h biofilm, sa najperspektívnejšou preukázala kombinácia ITR (21 µg/ml) so silicou z *Hyssopus officinalis* (1922,9 µg/ml), s prevažne aditívnym účinkom (57,1%). Indiferentný efekt bol zaznamenaný pri 3 izolátoch (42,9 %). Za biologickú aktivitu RS z *Hyssopus officinalis* sú pravdepodobne zodpovedné majoritné obsahové látky: pinokamfén a β-pinén (Hristova a kol., 2015).

Tab. 2. Vyhodnotenie MICC (µg/ml) a účinnosti (%) ATM v kombinácii s RS na tvorbu biofilmu *C. albicans*

Parameter		Itrakonazol + <i>Hyssopus officinalis</i>		Itrakonazol + <i>Thymus vulgaris</i>	
		0 h	48 h	0 h	48 h
MICC (µg/ml)	ATM	35,6	21	2,2	0,85
	RS	1912,9	1922,9	240	400
FICI (n/%)					
Synergický		0/0	0/0	0/0	0/0
Aditívny		2/28,6	4/57,1	4/80	0/0
Indiferentný		4/57,1	3/42,9	1/20	5/100
Anatagonistický		1/14,3	0/0	0/0	0/0

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 05/2020 „In vitro“ stanovenie proapoptickej, antibiofilmovej a antioxidačnej aktivity vybraných silíc z rastlín čeľade Lamiaceae.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alexa E, et al. Synergistic antifungal, allelopathic and anti-proliferative potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Molecules*. 2018; 23(1): 185
- Bona E, et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: Are they an alternative to antifungal agents. *J. Appl. Microbiology*. 2016; 121:1530–1545.
- Duarte A, et al. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*. 2012; 19(3-4): 236-238.
- Hristova Y, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2015; 29(3):592-601.
- Jin YY, et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. *Journal of clinical microbiology*. 2003; 41(7):2961-7.
- Mayer FL, et al. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013; 4(2):119-28.
- Raja RR. Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. In *Research journal of medicinal plant*. 2012; vol. 6, no. 3, p.203-13.
- Tsui Ch, et al. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*. 2016; 74(4):ftw018.
- Lincová D, et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2.vyd. Brno : Galén, 2007. 32-33 s. ISBN 9788072623730.

VPLYV PROBIOTICKEJ DIÉTY NA SYNTÉZU IMUNOLOGICKY VÝZNAMNÝCH MOLEKÚL U PSTRUHA DÚHOVÉHO

Ratvaj M.¹, Cingel'ová Maruščáková I.¹, Schusterová P.¹, Fečkaninová A.², Popelka P.³, Mareš J.⁴, Mudroňová D.¹

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice, Slovensko

²Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, UVLF, Košice, Slovensko

³Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice, Slovensko

⁴Ústav zoologie, rybárství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita, Brno, Česko

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo skúmanie vplyvu podávania krmiva, ktoré bolo obohatené o autochtónny probiotický kmeň *Lactobacillus plantarum* R2 na syntézu imunologicky významných molekúl v orgánoch pstruha dúhového, ktoré sú zodpovedné za obranu organizmu pred patogénmi z prostredia. Pstruhy boli rozdelené do troch skupín. Jedna skupina dostávala probiotické krmivo kontinuálne, druhá cyklicky a tretia skupina slúžila ako kontrola. Po mesiaci kŕmenia bola uskutočnená pitva, pri ktorej boli odobraté orgány. V tejto časti experimentu sme skúmali zmenu relatívnej génovej expície pre bunky nesúce CD4 a CD8 znak, ako aj pre imunoglobulín T s využitím kvantitatívnej real time PCR. Ako referenčný gén sme využívali β -aktín. Probiotické krmivo stimulovalo syntézu imunoglobulínu T a taktiež tvorbu buniek nesúcich CD8 znak, charakteristický pre cytotoxické T-lymfocyty.

ÚVOD

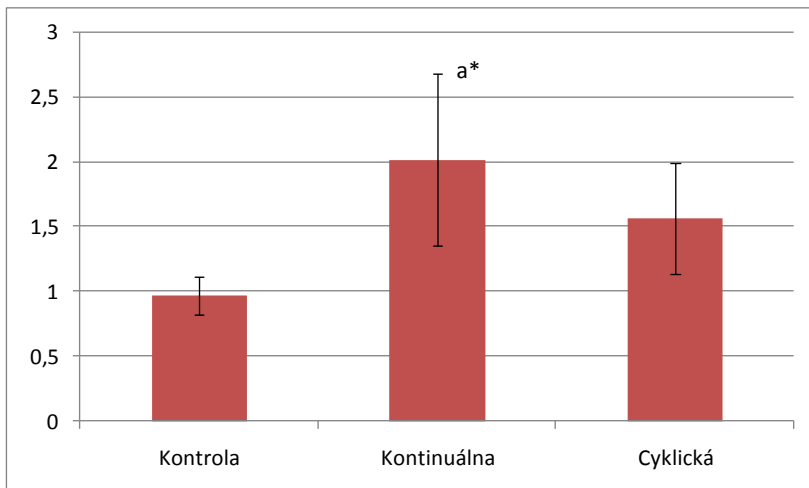
Probiotiká sa stávajú čoraz bežnejším doplnkom stravy nielen ľudí, ale aj hospodárskych zvierat. Ich úlohou je podľa definície FAO/WHO (2001) prispievať k zdraviu hostiteľa, pod podmienkou, že sú podávané v adekvátnom množstve. V predchádzajúcich rokoch bol na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach vykonaný experiment, pri ktorom boli izolované z čreva pstruha dúhového kmene laktobacilov, ktoré vykazovali vlastnosti, ako odolnosť voči antibiotikám či inhibícia rybičích bakteriálnych patogénov a tiež prežívali v podmienkach tráviaceho traktu pstruhov (Fečkaninová a kol., 2019). Na základe týchto vlastností boli označené za potenciálne probiotiká. Ich účinok na živý organizmus, a to či stimulujú imunitný systém ako aj rast rýb ako je tomu pri iných druhoch probiotík v akvakultúre (Kuebutornye a Abarike, 2019) je potrebné podložiť *in vivo* testovaním.

MATERIÁL A METÓDY

Probiotické krmivo bolo pripravené zmiešaním komerčne vyrábaného peletovaného krmiva určeného pre ryby chované v akvakultúre s koloidným oxidom kremičitým, škrobom a autochtónnym kmeňom *L. plantarum* R2, ktorého koncentrácia bola v krmive určená na 10^7 - 10^8 KTZ/g. Následne bolo krmivo dosušené a doručené na Mendelovu univerzitu, kde bolo skladované pri chladničkovej teplote a priebežne podávané rybám. Do experimentu bolo zaradených 1000 rýb, rozdelených do troch skupín. Každá skupina bola rozdelená do troch nádrží so samostatnou cirkuláciou. Prvá skupina dostávala obohatené krmivo kontinuálne, druhá cyklicky a tretia skupina bola kŕmená komerčným krmivom s prídavkom škrobu. Ryby prijímali probiotické krmivo ochotne. Prvý odber bol vykonaný po mesiaci kŕmenia, pričom spomedzi pokusných rýb boli vybraté jedince, ktoré vykazovali približne podobné fyzické rozmery. Pri pitve boli odobraté vzorky kože a žiaber a vzorky vnútorných orgánov; hlavová oblička, slezina a úsek zadného čreva z 10 rýb v každej skupine. Vzorky boli ihneď uložené v RNAlater a uskladnené pri -20 °C. Izolácia RNA zo vzoriek sleziny bola vykonaná pomocou kitu Omega E-Z Total RNA Kit (Bio-tech), po nej nasledoval prepis izolovanej RNA do cDNA s využitím kitu Quantitect Reverse Transcription Kit. Následne sme vo vzorkách cDNA analyzovali expíciu génov kódujúcich CD4, CD8 a IgT pomocou qPCR

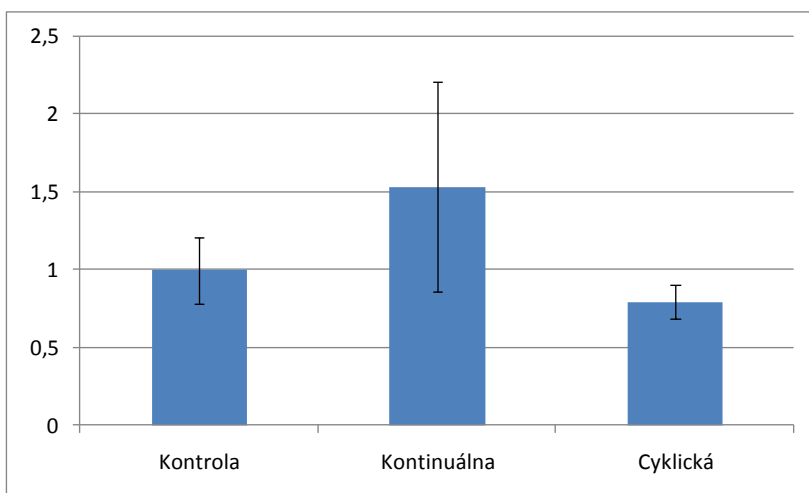
v prístroji iCycler CFX96 (BioRad, USA). Relatívna génová expresia bola hodnotená ako $\Delta\Delta C_t (\pm sd)$ pomocou CFX96 Manager softvéru (BioRad, USA), pričom ako referenčný gén bol použitý β -aktín. Pre štatistickú analýzu sme použili jednorozmernú analýzu rozptylu (one-way ANOVA) s doplnkovým Tukey testom v štatistickom programe GraphPad Prism Ver. 3.00.

VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obr. 1. Zmena relatívnej génovej expresie pre imunoglobulín T

pri skupine, ktorá bola kŕmená probiotickým krmivom kontinuálne, čo je pravdepodobne následok stimulácie tvorby imunoglobulínov B-lymfocytmi



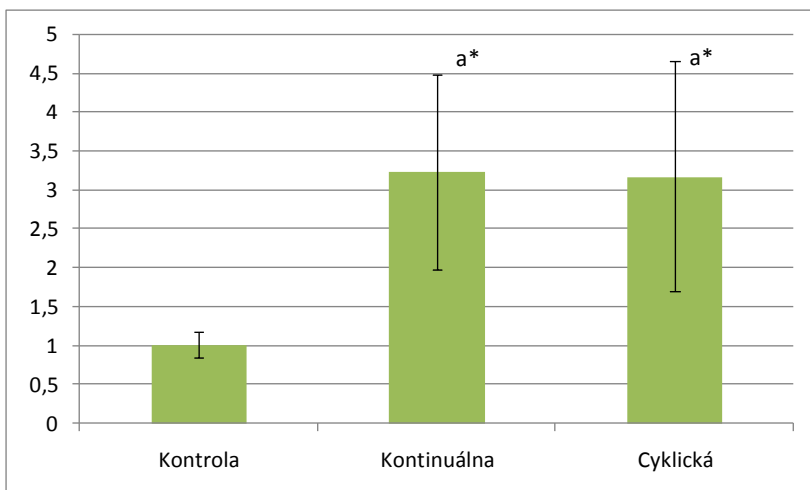
Obr. 2. Zmena relatívnej génovej expresie pre CD4

cyklicky, no nezaznamenali sme významnú zmenu oproti kontrolnej skupine.

CD8 sa nachádza na povrchu cytotoxických T-lymfocytov, ktoré sú zodpovedné za ničenie buniek napadnutých vírusom či intracelulárnymi patogénmi. Obe experimentálne skupiny vykazovali významne vyššiu mieru expresie génu pre túto molekulu oproti kontrolnej skupine (Obr. 3.), rozdiel medzi kontinuálnou a cyklickou skupinou nebol zaznamenaný.

Imunoglobulín T je u rýb pravdepodobne zodpovedný za slizničnú imunitu a jeho koncentrácia v sére je nižšia ako u ostatných imunoglobulínov rýb (Hordvik, 2015). Pri sledovaní relatívnej génovej expresie (Obr. 1.) vykazovali obe experimentálne skupiny vyššie hodnoty oproti kontrolnej skupine, pričom

významná miera zvýšenia bola pozorovaná pri vystavení patogénom (Castro a kol., 2013). CD4 je exprimovaný na povrchu Th-lymfocytov, ktoré sa podieľajú na regulácii vrodenej aj získanej imunitnej odpovede prostredníctvom produkcie cytokínov. Relatívna génová expresia pre tieto transmembránové glykoproteíny (Obr. 2.) bola zvýšená u kontinuálne kŕmenej skupiny a naopak znížená u skupiny, ktorá bola kŕmená probiotikami



Obr. 3. Zmena relatívnej génovej expresie pre CD8

Uvedená práca bola realizovaná s podporou projektu APPV-19-0234.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Castro R, et al. Teleost fish mount complex clonal IgM and IgT responses in spleen upon systemic viral infection. *PLoS pathogens*. 2013; 9.1: e1003098.
- FAO/WHO: Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint FAO/WHO working group meeting, London Ontario, Canada, 30 April-1 May 2002. [online]. 2002. p. 8 [cit. 2020.19.09] Dostupné na internete: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics2/en/index.html>.
- Fečkaninová A, et al. Characterization of two novel lactic acid bacteria isolated from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Slovakia. *Aquaculture*. 2019; 506: 294-301.
- Hordvik I. Immunoglobulin isotypes in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Biomolecules*. 2015; 5.1: 166-177.
- Kuebutornye FKA, Abarike ED, Lu Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. *Fish & shellfish immunology*. 2019; 87: 820-828.

PROLONGÁCIA A MONITORING CELKOVEJ INJEKČNEJ ANESTÉZIE KONÍ KONTINUÁLNOU INFÚZIOU DKX

Rovňanová N., Žert Z.,

Klinika koní, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom pokusu bolo porovnať kontinuálnu a diskontinuálnu celkovú úplnú injekčnú anestéziu u dvanástich koní. Sledované parametre zahŕňali kvalitu injekčnej anestézie a kvalitu zotavenia z anestézie šiestich koní v skupine A, v ktorej prolongácia anestézie bola zabezpečovaná zmesou anestetík kontinuálnou infúziou, a šiestich koní v skupine B, pri ktorej bola prolongácia diskontinuálna, vykonávaná aplikáciou bolusov zmesi anestetík. Sledované anesteziologické parametre boli: kvalita anestézie, spotreba anestetík, priebeh zotavenia z anestézie. Výsledky pokusu naznačujú, že ani jeden spôsob podávania anestetík a samotná kombinácia anestetík, nemali žiadny nežiaduci vplyv na vitálne funkcie, a boli akceptovanými pre udržiavanie anestézie u koní trvajúcej do 60 minút. Kvalita anestézie bola celkovo v oboch skupinách excelentná u piatich koní a uspokojivá u jedného, ktorý mierne reagoval na bolestivý stimul. Kvalita zotavenia v skupine A bola mierne prolongovaná, ale u 5 koní hladká a pacienti vstali na prvý pokus bez ataxie. Iba jeden pacient zo skupiny A prejavoval po postavení krátkodobú ataxiu. Kvalita zotavenia v skupine B bola hladká a dĺžka mierne kratšia u 3 pacientov, u zvyšných troch pacientov došlo k postaveniu až pri druhom pokuse s následnou krátkodobou ataxiou.

ÚVOD

Celková injekčná anestézia koní predstavuje v porovnaní s inhalačnou anestéziou jednoduchšie riešenie pre niektoré operačné výkony, a do istej miery znižuje riziko morbidity a mortality spojené s anestéziou, ktoré je u koní vyššie než u malých zvierat (Johnston a kol., 1995; Martínez a kol., 2012). Cieľom každého anesteziologického plánu je uviesť zviera do bezvedomia, zabezpečiť myorelaxáciu, analgéziu, neuro-vegetatívnu ochranu, bezpečnosť, predvídateľnosť a rýchly návrat motorickej aktivity pacienta, bez excitácie a možných následkov pre pacienta i personál. Výskyt komplikácií spojených so zotavovaním pacienta je u koní vyšší než u iných domestikovaných zvierat. Tento pokus bol vykonaný kvôli porovnaniu kvality anestézie a rekonvalescencie u pacientov podstupujúcich kontinuálnu a diskontinuálnu celkovú injekčnú anestéziu kombináciou anestetík: diazepam – ketamín – xylazín (DKX).

MATERIÁL A METODIKA

Anesteziologické sledovanie bolo vykonané na pacientoch Kliniky koní na UVLF v Košiciach. Celkovo 12 koní bolo náhodne rozdelených do dvoch skupín po 6 pacientov. Skupina A obsahovala kone, ktorí podstúpili kontinuálnu prolongáciu anestézie infúziou (tzv. „triple drip“) a skupina B kone s diskontinuálnou prolongáciou tzn. aplikáciou bolusov zmesi anestetík. Všetkých 12 koní vyžadovalo chirurgický zákrok s odhadom trvania do 60 minút (sutura tržnej rany distálnej končatiny, kastrácie kryptorchidov, artroskopie, chirurgické odstránenie sarkoidov). Hmotnosť pacientov sa pohybovala medzi 500-600 kg. Sedácia bola prevedená podaním xylazínu 1,1mg/kg iv, po nastúpení sedácie boli kone uvedené do celkovej anestézie v skupine A podaním 2 ml 5% diazepamu, v skupine B podaním diazepamu 0,02 mg/kg iv a následne v oboch skupinách aplikáciou ketamínu 2,2 mg/kg iv. V skupine A bola anestézia pacientov udržiavaná kontinuálnou aplikáciou anestetík v zmesi triple drip, tzn. xylazín 500 mg, ketamín 2000 mg, diazepam 40 mg v 1 litri fyziologického roztoku, zmes bola aplikovaná rýchlosťou individuálnou pre každého koňa podľa kontroly hĺbky anestézie. V skupine B bola anestézia udržiavaná diskontinuálnou aplikáciou zmesi

xylazínu 0,5 mg/kg a ketamínu 1,1 mg/kg v jednej injekčnej striekačke a každých 4-7 minút bola aplikovaná 1/3 tejto zmesi. V polovici operácie boli pacientom v tejto skupine podané dodatočné 2 ml 5% diazepamu kvôli dosiahnutiu kvalitnejšej myorelaxácie.

Sledované anesteziologické parametre modifikované podľa Kloppel a kol. (2011) a Pitlawar a kol. (2019) zahŕňali posúdenie kvality a hĺbky celkovej anestézie, svalovú relaxáciu, reagovanie na bolestivé stimuly, dĺžku, kvalitu zotavenia z anestézie a spotrebu anestetík.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dávky použité v tomto pokuse odpovedajú literárnym údajom (Kerr a kol., 1996). Kombinácia xylazínu a ketamínu sa bežne používa na indukciu a udržiavanie anestézie u koní (Muir a kol., 1977), zatiaľ čo diazepam pomáha v udržiavaní bezvedomia a svalovej relaxácie (Muir a kol., 1978). Diazepam je centrálné pôsobiace ataraktikum a myorelaxans, ktoré zvyšuje sedáciu vyvolanú xylazínom a tlmí svalové spasmy spôsobené ketamínom (Nanda a kol., 2014).

Kvalita anestézie

Posudzovali sme kvalitu celkovej injekčnej anestézie, a to kontrolou výskytu hltacieho reflexu, palpebrálneho a korneálneho reflexu, lakrimácie, nystagmu, pohybu končatín a hlavy, apnoe, tepovej frekvencie, saturácie kyslíkom a reakcií na bolestivé podnety. Kvalita anestézie bola posudzovaná podľa 4 stupňov (Pitlawar a kol., 2019).

V tomto pokuse bola anestézia excelentná u 8 koní, u štyroch bola uspokojivá. V skupine A 5 koní vykazovalo excelentnú anestéziu, 1 uspokojivú. Pacient s uspokojivou kvalitou anestézie nepodliehal predoperačnej hladovke, nakoľko sa jednalo o akútny chirurgický zákrok. Bol zaznamenaný nystagmus, rýchly palpebrálny a korneálny reflex, vyššia spotreba anestetík, pri bolestivom stimule jemný pohyb končatinou, tieto znaky povrchovej anestézie boli vyblokované vyššími dávkami anestetík. V skupine B 5 koní vykazovalo excelentnú anestéziu a jeden uspokojivú. Uspokojivá kvalita anestézie sa vyskytla u žrebca, ktorý bol pred anestéziou značne excitovaný. Pozorovali sme rýchly palpebrálny a korneálny reflex, nystagmus, zvýšenú frekvenciu dýchania, mierny pohyb končatinou pri bolestivom stimule a vyššiu spotrebu anestetík. Rovnako aj v tomto prípade bola povrchová anestézia prehĺbená dodatočnou aplikáciou anestetík.

Kvalita myorelaxancie bola v skupine A výraznejšia kvôli vyšším dávkam diazepamu. V skupine B bolo nutné zopakovať dávku diazepamu 0,01 mg/kg približne v polovici vykonávaného chirurgického zákroku. Ďalšej aplikácii diazepamu predchádzali mierne svalové záškľby v oblasti hlavy.

Dĺžka anestézie

Dĺžka udržiavania anestézie závisí od trvania chirurgického zákroku a od skúsenosti chirurga. Dĺžka trvania chirurgických zákrokov bola u oboch skupín 44 ± 7 minút. V skupine A bol priemerný čas od ukončenia chirurgického zákroku po zotavenie 41 ± 5 minút. V skupine B 36 ± 7 minúty.

Medzi skupinami sme zistili dlhší čas zotavovania v skupine A v porovnaní so skupinou B.

Zotavovanie

Pri zotavovaní koní z anestézie sme pozorovali kedy sa vyskytol prvý pohyb uší, hltací reflex, nystagmus, ustálenie dychovej frekvencie do fyziologickej normy, erdžanie, pohyby hrudníkových a panvových končatín, prvý pokus o nadobudnutie sternálnej polohy, postavenie koňa. V skupine A došlo k prvým známkam zotavovania z anestézie po 13 ± 3 minútach, v skupine B 12 ± 3 minútach. Kone v tejto fáze mali prítomný výrazný nystagmus. Prvý pokus o nadobudnutie sternálnej polohy v skupine A po 35 ± 5 minútach a v skupine B po 31 ± 4 minútach. Počas zotavovania boli kone v laterálnej polohe držané jednou osobou za ventrálnu časť mandibuly. Keď sa kôň pohol bol použitý tlak v dorzálnom a laterálnom smere z dôvodu tlačenia hlavy proti pokusom koňa o flexiu krku. Táto metóda čiastočnej fixácie zabráni predčasným pokusom o vstávanie, a minimalizuje riziko poranenia pacienta i

personálu (Michou a kol., 2010). Ako náhle boli pacienti schopní flexie panvových končatín, mali vymiznutý nystagmus a nadobudli dostatočnú silu, aby pretlačili silu vyvinutú fixatórom, boli ponechaní k spontánnemu postaveniu. Podľa päťstupňového skóre zotavovania^[3] 6 koní zo skupiny A splnilo kritérium 1 a vstalo na prvý pokus, z toho 1 kôň prejavoval krátkodobú ataxiu. Všetky kone zo skupiny A boli po postavení schopné kráčať. Tri kone zo skupiny B splnili kritériá 2/5 keďže sa postavili s pokľaknutím na karpus. Po postavení 3 kone prejavovali krátkodobú ataxiu. Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že kone zo skupiny A sa zotavovali dlhšie, avšak kvalita zotavenia bola u týchto koní lepšia, než v skupine B.

Spotreba anestetík

Je potrebné podotknúť, že pri udržiavaní celkovej anestézie zmesou triple drip je spotreba xylazínu v porovnaní s diskontinuálnou aplikáciou xyl/ket zmesi polovičná, a spotreba ketamínu v skupine A je o 1/3 nižšia než pri aplikácii bolusov v skupine B. Vyššia koncentrácia diazepam v triple dripe spôsobuje mierne prolongovaný čas zotavovania, ale podľa výsledkov uľahčuje pacientom zvládnutie excitačnej fázy v stave relatívneho pokoja a postavenie koňa bolo kvalitnejšie než pri použití diskontinuálnej anestézie. Prolongácia anestézie za použitia zmesi triple drip je náročnejšia na monitoring, a vyžaduje personálny dozor. Ak je chirurg zvyknutý anestéziu koňa vykonávať sám počas chirurgického zákroku, bude preferovať diskontinuálne podávanie anestetík, pri ktorom je jednoduchšie a menej časovo náročné monitorovať pacienta.

Limity práce

Náš pokus bol limitovaný počtom pacientov, a tým, že všetkých 12 koní nepodstúpilo jeden typ chirurgického zákroku, rovnako kone neboli rovnakej plemennej príslušnosti, pohlavia a vekovej kategórie.

Medzi kontinuálnou a diskontinuálnou prolongáciou anestézie boli zaznamenané rozdiely v dĺžke a kvalite zotavovania. S ohľadom na skutočnosť, že zotavenie pol tony ťažkého pacienta je najrizikovejšou fázou anestézie, považujeme kontinuálnu aplikáciu anestetík za bezpečnejšiu. Obe kombinácie anestetík nemali žiadne vedľajšie nežiaduce účinky na fyziologické funkcie a obidve metódy sa v tomto pokuse preukázali ako vhodné anesteziologické techniky na udržiavanie celkovej injekčnej anestézie koní do 60 minút.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Johnston GM et al. Confidential enquiry of perioperative equine fatalities (CEPEF-1): preliminary results, *Equine Vet J* 1995; 27:193-200.
- Kerr CL et al. A comparison of romifidine and xylazine when used with diazepam / ketamine for short duration anesthesia in the horse. *Can. Vet. J.* 1996; 73:601-609.
- Kloppel H et al. Comparison of ketamine and alfaxalone for induction and maintenance of anaesthesia in ponies undergoing castration, *VAA*, 2011; 38; 37-43, doi:10.1111/j.1467-2995.2010.00584.x.
- Martinez EA et al. ACVA guidelines for anesthesia in horses, 2012, dostupné na: <http://www.acva.org/docs/Equine>
- Michou J, *Practical Equine Field Anaesthesia*, 2010, dostupné na: <https://vetgrad.com/show10MinuteTopUp.php?type=Equine&Entity=10MinuteTopUps&ID=18>
- Muir WW et al. Evaluation of xylazine and ketamine hydrochloride for anesthesia in horses. *Am J Vet Res.* 1977; 38(2):195-201.
- Muir WW et al. Evaluation of xylazine, guaifenesin, and ketamine hydrochloride for restraint in horses. *Am. J Vet Res.* 1978; 39(8):1274-8.
- Nanda VS et al. Continuous maintenance anaesthesia using guaifenesin or diazepam combined with xylazine and ketamine in horses. *Indian J Vet. Surg.* 2014; 35(2):89-92.
- Pitlawar SS et al. Evaluation of guaifenesin-ketamine-xylazine and diazepam-ketamine-xylazine triple drip for gelding in equines, *IJCS* 2019; 7(1): 975-979 2019.

VPLYV OCHORENÍ PAZNECHTOV DOJNÍC NA MNOŽSTVO BIELKOVÍN A MOČOVINY V MLIEKU

Slovák P., Mudroň P., Hisira V.
Klinika prežívavcov, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv ochorenia paznechtov dojníc na množstvo bielkovín a močoviny v mlieku. Sledovanie bolo vykonané na 198 dojniciach, z ktorých polovica krívala. Zvieratá boli rozdelené podľa aktuálnej fázy laktácie na tri skupiny. Príčina krívania bola diagnostikovaná klinickým vyšetrením vo fixačnej klietke. Všetkým zvieratám bola odobraná vzorka mlieka, v ktorej bol stanovený obsah bielkovín a močoviny. U krívajúcich dojníc v prvej fáze laktácie bol obsah bielkovín o 9,55 % a obsah močoviny o 29,93 % nižší ako u nekrívajúcich dojníc. Krívajúce dojnice v druhej fáze laktácie mali obsah bielkovín o 6,94 % a obsah močoviny o 18,87 % nižší ako nekrívajúce zvieratá. Dojnice v tretej fáze laktácie mali tieto hodnoty tak isto nižšie a to o 10,3 % v prípade bielkovín a 18 % pri močovine. Tieto výsledky poukazujú na fakt, že bolestivé ochorenia paznechtov majú vplyv na obsah bielkovín a močoviny v mlieku.

ÚVOD

Väčšina farmárov venuje pozornosť celkovému množstvu nadojeného mlieka a nevníma si jednotlivé mliečne zložky, no konzumenti a odberatelia mlieka sa zameriavajú práve na tieto kvalitatívne parametre. Kvalita mlieka je v hlavnej miere závislá na správnej výžive, preto nedostatok vedomostí o vzťahu medzi výživou a produkciou mlieka vyúsťuje do nízkeho pôdoja a zníženej kvality nadojeného mlieka (Tyasi a kol., 2015). Mlieko dojníc je zložené z vody, proteínov, tuku, minerálnych látok a ostatných zložiek ako vitamíny a biele krvinky. Percentuálne zastúpenie jednotlivých zložiek mlieka sa líši od plemena ku plemenu, ale vo všeobecnosti môžeme povedať, že mlieko je zložené z vody 87,7 %, proteínov 3,3 %, tuku 3,4 %, laktózy 4,9 %, a minerálnych solí 0,7 % (Haug a kol., 2007). Obsah a produkcia bielkovín v mlieku je ovplyvnená genetickým potenciálom a úrovňou výživy dojníc. Denný príjem a pomerné zastúpenie bachorovo degradovateľných (BDB) a bachorovo nedegradovateľných (BNB) bielkovín je podmienený výberom krmív a celkovým príjmom sušiny krmnej dávky (Vajda a kol., 2016). Krívanie je závažný celosvetový problém v mnohých stádach dojníc. Krívanie má vplyv na welfare, produkciu mlieka a výnosnosť stáda (Bradley a kol., 2012). Väčšina krívania sa prejavuje na panvových končatinách a je spôsobené léziami paznechtov (~90 %). Fakt, že kravy menia svoju chôdzu indikuje bolestivosť. Krívanie vedie k rôznym behaviorálnym zmenám, ako napríklad zníženie aktivity (O'Callaghan a kol., 2003), kratšiemu času strávenému kŕmením, čo spôsobuje znížený príjem sušiny, viac času trávia ležaním a menej sa pohybujú (Bach a kol., 2007). Väčšinou sa jedná o dlhodobú bolesť a u väčšiny prípadov ubehne dlhší čas od prejavu krívania po jeho identifikáciu a následné ošetrenie (Mudroň, 2015).

MATERIÁL A METODIKA

Do pokusu bolo zaradených 198 dojníc z ktorých 99 bolo krívajúcich a 99 predstavovalo kontrolnú skupinu zdravých zvierat. Zvieratá boli rozdelené do troch skupín podľa aktuálnej fázy laktácie a to nasledovne: 1. fáza laktácie – do 80 dní po pôrode (72 kusov), 2. fáza laktácie – 81 - 160 dní po pôrode (70 kusov), 3. fáza laktácie – 161 – 305 dní po pôrode (56 kusov). V každej skupine bola polovica zvierat krívajúca a polovica predstavovala kontrolnú skupinu. Krívajúcim zvieratám bola vykonaná diagnostika príčiny krívania vo fixačnej klietke a boli klinicky vyšetrené pre vylúčenie ochorenia iných orgánových sústav. Kontrolné zvieratá neprejavovali príznaky žiadneho ochorenia. Všetkým zvieratám bola pri dojení

odobraná vzorka mlieka z ktorej bolo následne stanovené množstvo bielkovín a močoviny. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Prism použitím Studentovho t-testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V skupine zvierat v prvej fáze laktácie bolo priemerné množstvo bielkovín u nekrívajúcich zvierat 3,35 % a u krívajúcich 3,03 % čo predstavuje pokles o 9,55 % ($P < 0,0001$) (Tab. 1.). U zvierat v druhej fáze laktácie bola koncentrácia bielkovín u krívajúcich zvierat o 6,94 % nižšia ako u nekrívajúcich ($P = 0,0005$) (Tab. 2.). Zvieratá v tretej fáze laktácie mali množstvo bielkovín znížené až o 10,3 % ($P < 0,0001$) (Tab. 3). Rovnako bol pozorovaný aj pokles množstva močoviny v mlieku dojníc vo všetkých fázach laktácie a to o 29,93 % ($P < 0,0001$) v prvej fáze laktácie, 18,87 % ($P = 0,0025$) v druhej fáze laktácie a 18 % ($P = 0,0109$) v tretej fáze laktácie (Tab. 1., 2., 3.). Všetky výsledky boli štatisticky signifikantné.

Tab 1. Prvá fáza laktácie

	Bielkoviny (%)	Močovina (mg/100ml)
Nekrívajúce zvieratá (36)	3,35 ($\pm 0,28$)	26,8 ($\pm 5,57$)
Krívajúce zvieratá (36)	3,03 ($\pm 0,23$)	18,78 ($\pm 8,29$)
t-test	$P < 0,0001$	$P < 0,0001$

Tab 2. Druhá fáza laktácie

	Bielkoviny (%)	Močovina (mg/100ml)
Nekrívajúce zvieratá (35)	3,46 ($\pm 0,27$)	28,93 ($\pm 6,36$)
Krívajúce zvieratá (35)	3,22 ($\pm 0,28$)	23,47 ($\pm 8,07$)
t-test	$P = 0,0005$	$P = 0,0025$

Tab 3. Tretia fáza laktácie

	Bielkoviny (%)	Močovina (mg/100ml)
Nekrívajúce zvieratá (28)	3,69 ($\pm 0,31$)	29,32 ($\pm 6,59$)
Krívajúce zvieratá (28)	3,31 ($\pm 0,23$)	24,04 ($\pm 8,29$)
t-test	$P < 0,0001$	$P = 0,0109$

O'Callaghan a kol. (2003) vo svojej štúdií na 345 laktujúcich dojniciach zistili zníženú dennú aktivitu krívajúcich dojníc spôsobenú bolesťou paznechtov. Bach a kol. (2007) pozorovali zníženie času venovaného príjmu krmiva s narastajúcim stupňom krívania. Krívajúce zvieratá sa v práci Grimm a kol. (2019) krmili menej často a kratší čas so zníženým príjmom počas jedného krmenia. Kratší čas krmenia spôsobuje znížený príjem sušiny čo má za následok zníženú saturáciu prekursorov tvorby mliečnych proteínov. Hodnoty močoviny v mlieku odrážajú vyváženosť príjmu bielkovín krmnej dávky a zastúpenie neštruktúrnych sacharidov dôležitých pre optimálny rast bachorovej mikroflóry. Nízke koncentrácie močoviny v mlieku sú následkom nevyváženého príjmu dusíkatých látok a nízkeho podielu NH_3 v bachore potrebného pre rast mikroflóry (Vajda a kol., 2016). V našej práci sme zaznamenali pokles v hodnotách koncentrácií bielkovín aj močoviny vo všetkých fázach laktácie u krívajúcich dojníc, čo môže byť spôsobené zníženým príjmom sušiny spôsobeným bolestivými ochoreniami paznechtov, ktoré výrazne negatívne ovplyvňujú správanie a welfare zvierat.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bach A, et al., Associations between lameness and production, feeding and milking attendance of Holstein cows milked with an automatic milking system. *Journal of Dairy Research*. 2007; 74(1): 40-46.
 Bradley A, et al., Control of mastitis and enhancement of milk quality. *Dairy herd health*. 2012; 117-168.

- Grimm K, et al., New insights into the association between lameness, behavior, and performance in Simmental cows. *Journal of dairy science*. 2019; 102.3: 2453-2468.
- Haug A, et al., Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in health and disease*. 2007; 6(1): 25.
- Mudroň P. Zdravie paznechtov a úspešný chov dojníc. *Slovenský veterinársky časopis*. 2015; 40(1-2): 77-80.
- O'Callaghan KA, et al., Subjective and objective assessment of pain and discomfort due to lameness in dairy cattle. *Animal Welfare*. 2003; 12(4): 605-610.
- Tyasi TL, et al., Assessing the effect of nutrition on milk composition of dairy cows: A review. *International journal of current science*. 2015; 17: 2250-1770.
- Vajda V, Maskaľová I, Hodnotenie kvality krmív a tvorba produkčného zdravia zvierat, Košice 2016, ISBN: 978-80-8077-526-1

VPLYV MOLEKULOVÝCH HYBRIDOV NA INHIBÍCIU AMYLOIDNEJ AGREGÁCIE

Spodniaková B.¹, Bednáríková Z.¹, Tvrdoňová M.², Gažová Z.¹

¹Ústav experimentálnej fyziky, Oddelenie biofyziky, SAV, Košice

²Katedra organickej chémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Konformačné zmeny a premena prirodzene rozpustných proteínov na nerozpustné proteínové amyloidné agregáty je proces spojený s viacerými neliečiteľnými degeneratívnymi ochoreniami. Súčasný výskum sa preto zameriava na bližšie porozumenie procesu tvorby amyloidných agregátov s cieľom identifikovať možné terapeutické prístupy. Jedným z nich je inhibícia tvorby amyloidných agregátov pomocou malých molekúl. Zamerali sme sa na látky pripravené molekulovou hybridizáciou, ktorá umožnila spojenie sacharidovej zložky s jednou aminokyselinou (1. generácia) alebo dipeptidom (2. generácia), ktoré obsahovali aromatické jadro. Sledovali sme ich potenciál inhibovať amyloidnú agregáciu lyzozýmu. Na základe viazania tioflavínu T sme zistili, že hybridné molekuly obsahujúce tryptofán majú najvyššiu inhibičnú aktivitu. Táto aktivita sa zvýšila v prípade, že hybridné molekuly obsahovali aromatický dipeptid a cyklickú sacharidovú zložku, pričom samostatné zložky hybridnej molekuly (dipeptid a sacharidová zložka) neboli natoľko účinné. Inhibičný efekt molekulových hybridov bol potvrdený aj pomocou atómovej silovej mikroskopie.

ÚVOD

Mnohé neurodegeneratívne, ale aj systémové ochorenia sú spojené s konformačnou zmenou prirodzene rozpustných poly/peptidov a tvorbou patologických amyloidných agregátov. Medzi tieto ochorenia patrí Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, diabetes II. typu, systémová lyzozýmová amyloidóza a iné. Presný mechanizmus konformačných zmien proteínov a následného formovania amyloidných štruktúr nie je zatiaľ presne známy. Predpokladá sa, že monoméne formy proteínov menia svoju natívnu štruktúru na nenatívnu konformáciu za vzniku nukleačného jadra, ktoré tvorí základ pre vznik amyloidných oligomérov, protofibríl a zrelých fibríl bohatých na krížovú β štruktúru (Re a kol., 2010). Súčasný výskum amyloidnej agregácie poly/peptidov sa zameriava na bližšie porozumenie procesom vedúcim k vzniku amyloidných agregátov, ako aj na identifikáciu a dizajn látok, ktoré sú schopné interagovať s amyloidnými agregátmi a efektívne inhibovať ich tvorbu. Novým prístupom pri dizajne efektívnych inhibítorov amyloidnej agregácie je molekulová hybridizácia. Je to stratégia založená na kombinácii dvoch alebo viacerých molekúl s cieľom zvýšenia ich anti-amyloidnej aktivity. Súčasný poznatky poukazujú na to, že efektívne inhibitory obsahujú aromatické jadro. Rozsiahla *in silico* a *in vitro* štúdia ukázala, že tripeptidy s obsahom aspoň troch aromatických aminokyselín majú vysokú väzobnú afinitu k amyloidným fibrilám A β peptidu, čo vedie k ich efektívnej deštrukcii (Viet a kol., 2015). Levy-Sakin a kol. (2019) zistili, že nielen aromatické aminokyseliny, ale aj kombinácia aminokyselín s inou molekulou obsahujúcou aromatický kruh účinne inhibuje amyloidnú agregáciu. V našej štúdii sme sa zamerali na štúdium účinku molekulových hybridov tvorených aromatickou aminokyselinou alebo aromatickým dipeptidom a cyklickou sacharidovou zložkou na amyloidnú agregáciu lyzozýmu z vaječného bielka (HEWL). HEWL je globulárny proteín pozostávajúci zo 129 aminokyselín. Je štruktúrnym homológom ľudského sérového lyzozýmu, ktorého agregácia a akumulácia je spojená so systémovou lyzozýmovou amyloidózou.

MATERIÁL A METODIKA

Hybridné molekuly: hybridné molekuly boli syntetizované na Katedre organickej chémie, PF UPJŠ v Košiciach. Základ molekúl tvoril modifikovaný glukofuranózový kruh, ku ktorému

bola naviazaná peptidová zložka obsahujúca jednu aromatickú aminokyselinu (hybridy prvej generácie) alebo dipeptid obsahujúci tryptofán, fenylalanín a prolín v rôznych kombináciách (hybridy druhej generácie). Molekuly boli dodané vo forme lyofilizovaného prášku a rozpúšťané v dimetylsulfoxide (DMSO).

Chemikálie: lyozým z vaječného bielka (HEWL) (molekulová hmotnosť 14 307 Da) , tioflavín T (ThT) boli zakúpené od spoločnosti Sigma Aldrich vo forme lyofilizovaného prášku. Chemikálie použité na prípravu tlmivých roztokov (glycín, chlorid sodný, kyselina chlorovodíková) a DMSO boli zakúpené od spoločnosti Sigma Aldrich.

Tvorba amyloidných agregátov: HEWL bol rozpustený v tlmivom roztoku (70 mM glycín s prídavkom 80 mM NaCl, pH 2.7) do výslednej 10 μ M koncentrácie a inkubovaný pri teplote 65 °C počas 2 hodín za konštantného miešania (1200 rpm). Tvorba amyloidných fibríl bola sledovaná pomocou viazania ThT a atómovou silovou mikroskopiou (AFM).

Viazanie ThT: Prítomnosť lyozýmových amyloidných fibríl bola stanovená charakteristickým nárastom fluorescenčnej intenzity ThT po interakcii s križovou β štruktúrou fibríl. ThT rozpustený v ultračistej vode bol pridaný k vzorkám v konečnom koncentračnom pomere 1:2 (proteín:ThT), ktoré boli inkubované 40 min pri teplote 37 °C v tme. Následne bola meraná fluorescenčná intenzita ThT pomocou fluorimetra Synergy Mx pri excitačnej vlnovej dĺžke $\lambda_{ex} = 440$ nm a emisnej vlnovej dĺžke $\lambda_{em} = 465 - 550$ nm.

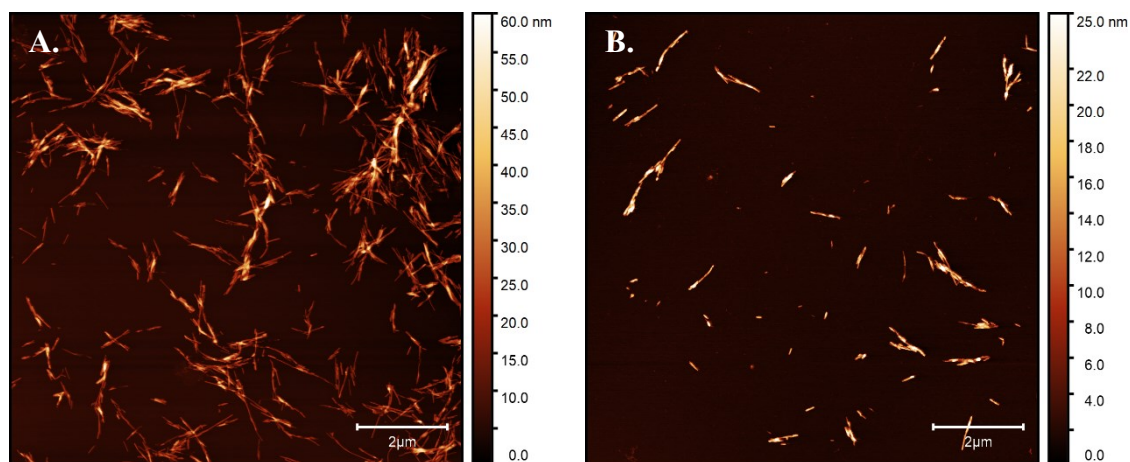
Sledovanie účinku hybridných molekúl na tvorbu lyozýmových amyloidných agregátov - stanovenie hodnôt IC_{50} : Študované hybridné molekuly rozpustené v DMSO boli pridané k 10 μ M roztoku HEWL v koncentračnom rozsahu 500 μ M – 100 pM, pričom obsah DMSO bol menší ako 2 %. Následne boli vzorky vystavené podmienkam vedúcim k tvorbe amyloidných agregátov, ktoré sú popísané vyššie. Hodnoty IC_{50} , t.j. koncentrácia látky potrebná na 50 % inhibíciu tvorby amyloidných agregátov, boli stanovené zo závislosti intenzity fluorescencie od koncentrácie študovaných látok a normalizované na fluorescenciu amyloidných agregátov tvorených bez prítomnosti hybridných molekúl. Všetky merania boli uskutočnené v troch opakovaníach a výsledné hodnoty predstavujú priemer týchto meraní.

Atómová silová mikroskopia (AFM): Amyloidné agregáty vytvorené v prítomnosti 100 μ M hybridnej molekuly (proteín:hybridná molekula = 1:10) boli nanosené na hladký povrch sľudy, kde sa adsorbovali po dobu 7 min. Následne boli vzorky premyté ultračistou vodou a vysušené prúdom stlačeného dusíka. AFM obrázky boli získané v „tapping“ móde pomocou zariadenia Veeco di Innova (Bruker AXS, Inc., Medison, U.S.A.) v rozlíšení 1024x1024 pixelov s použitím SNL-10 hrotu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Sledovali sme účinok hybridných molekúl na amyloidnú agregáciu lyozýmu zo slepačieho bielka. Prvá generácia hybridných molekúl obsahovala aromatickú aminokyselinu (tryptofán, fenylalanín a prolín) a modifikovanú cyklickú sacharidovú zložku. Na základe dát získaných z viazania ThT sme zistili, že hybridné molekuly tvorené tryptofánom (Trp) mali najvyššiu inhibičnú aktivitu spomedzi všetkých molekúl prvej generácie. Na základe týchto údajov, ako aj našich predchádzajúcich výsledkov o anti-amyloidnom efekte tripeptidov (Viet a kol., 2015), sme pripravili druhú generáciu hybridných molekúl, ktoré obsahovali cyklický sacharid a dipeptid s rôznou kombináciou dvoch aromatických aminokyselín (Trp-Trp, Phe-Trp). Inhibičná aktivita hybridných molekúl 2. generácie bola vyššia v porovnaní s prvou generáciou. Molekuly obsahujúce dipeptid tvorený dvoma tryptofánmi boli najúčinnnejšie s IC_{50} hodnotou v mikromolárnych koncentráciách. Zaujímavým zistením bolo, že samotné zložky hybridných molekúl, t.j. cyklický sacharid, aromatické aminokyseliny ani dipeptidy Trp-Trp, Phe-Trp neboli schopné účinne inhibovať amyloidnú agregáciu lyozýmu. Inhibičný efekt látok bol sledovaný aj pomocou AFM, ktorá potvrdila výsledky viazania ThT. V prítomnosti účinných inhibítorov bola pozorovaná tvorba výrazne menšieho množstva fibríl

v porovnaní s amyloidnou agregáciou samotného lyzozýmu (Obr. 1.). Naše výsledky poukazujú na zvýšenie inhibičnej aktivity cyklických molekúl v dôsledku ich spojenia do hybridných molekúl, ktoré majú potenciál byť použité na liečbu amyloidných ochorení.



Obr. 1. AFM obrázky 10 μM HEWL fibríl vytvorených bez (A) a v prítomnosti hybridnej molekuly tvorenej sacharidovou zložkou a dipeptidom Trp-Trp (B) pri koncentrácii 100 μM. Mierka reprezentuje 2 μm.

Práca vznikla za podpory projektov APVV-18-0284, VEGA2/0145/17 a ITMS 313011T533 (DIAGNAD).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Re F, et al. Beta Amyloid Aggregation Inhibitors: Small Molecules as Candidate Drugs for Therapy of Alzheimers Disease. *Curr Med Chem*. 2010; 17(27): 2990–3006.
- Viet MH, et al. In Silico and in Vitro Study of Binding Affinity of Tripeptides to Amyloid β Fibrils: Implications for Alzheimer's Disease. *J Phys Chem B*. 2015; 119(16): 5145–5155.
- Levy-Sakin M, et al. Targeting insulin amyloid assembly by small aromatic molecules: Toward rational design of aggregation inhibitors, *Islets*. 2009; 1(3): 210-215.

DISTRIBÚCIA BAKTERIÁLNYCH DRUHOV V RÁMCI MIKROBIÓMU KOŽE PSOV

Štempelová L.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Nedostatok poznatkov o „normálnom“ zložení kožnej mikrobioty u zdravých psov nás viedol k úsiliu zmapovať výskyt bakteriálnych druhov na jednotlivých častiach tela týchto zvierat. Hodnota pH povrchu kože, ako výsledok fyziologických procesov organizmu, reguluje kožnú mikrobiotu, preto bolo našim ďalším cieľom stanovenie pH hodnôt kože zdravých psov a posúdenie faktorov, ktoré ho najviac ovplyvňujú. Kožné stery boli odobraté z 8 oblastí tela každého skúmaného psa. Na rovnakých miestach kože bolo zmerané jej pH a následne bol vyplnený dotazník týkajúci sa vstupnej charakteristiky jedinca. Stery boli inokulované na selektívne a neselektívne živné média a kultivované za aeróbnych podmienok. Na identifikáciu reprezentatívnych izolátov sme použili MALDI-TOF hmotnostnú spektrometriu. Zistili sme, že pH kože bolo predovšetkým ovplyvnené anatomickým miestom na tele psa, pričom najvyššie hodnoty boli namerané na nose a najnižšie na vnútornej strane ušnice. Z kožných sterov sme identifikovali pestrú škálu bakteriálnych druhov. Najčastejšie identifikovaným kožným izolátom bol *Staphylococcus pseudintermedius*, ktorý bol prítomný u 74% psov aspoň na jednom mieste tela. Tiež sme zachytili výskyt koaguláza-negatívnych stafylokokov, gramnegatívnych baktérií a ojedinele aj streptokokov.

ÚVOD

Aj napriek tomu, že koža predstavuje nehostinné prostredie pre mikroorganizmy (nižšia teplota, kyslé pH, antibakteriálne peptidy, neustále sa obnovujúce vrstvy pokožky) je osídlená komplexnou mikrobiálnou populáciou. Kožná mikrobiota môže byť rozdelená do dvoch skupín: stála a prechodná. Stála mikrobiota tvorí stabilný základ mikrobioty, ktorý sa po narušení rýchlo obnovuje a dá sa pokladať za pravých komenzálov kože. Prechodná mikrobiota je stále sa meniacia, závisiaca od prostredia a ostatných vonkajších faktorov jedinca a pretrváva na koži hodiny, prípadne dni (Weese, 2013). Počty stálych baktérií na koži sa medzi jedincami líšia, zatiaľ čo u niektorých je prítomné väčšie množstvo mikroorganizmov, u iných len zopár. Celkové počty aeróbnych mikroorganizmov na normálnej pokožke sa podľa doterajších štúdií pohybujú od 100 do 1000/cm² (Miller a kol., 2012). V rámci štúdie kožnej mikrobioty ľudí bolo pozorované, že jej zloženie je ovplyvnené fyziologickými rozdielmi kože na rôznych častiach tela. V oblastiach so zvýšenou tvorbou mazu u ľudí dominujú lipofilné druhy propionibaktérií, zatiaľ čo na vlhkých častiach tela ako sú ohyby laktov alebo chodidlá prevažujú druhy rodu *Staphylococcus* a *Corynebacterium* (Byrd a kol., 2018). Informácií o zložení kožnej mikrobiálnej populácie psov a jej zmenách vplyvom rozličných faktorov je menej. Z prvotných štúdií bolo pozorované, že hlavnými zástupcami tvoriacimi mikrobiálnu populáciu kože psov sú kmene *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria* a *Bacteroidetes* (Cuscó a kol., 2017). Udržiavanie adekvátneho pH pokožky je súčasťou obranného systému kože zameraného na zabránenie kolonizácie patogénnymi baktériami a je zásadné pri regulovaní stálej kožnej mikrobioty (Rippke, 2018).

MATERIÁL A METODIKA

Kožné stery boli odobraté od 23 klinicky zdravých psov rôzneho plemena a veku. Stery boli odobraté z 8 oblastí tela každého psa (vnútorná strana ušnice, nos, brada, axila, chrbát, brucho, perianálna oblasť a medziprstový priestor). O každom jedincovi bol vyplnený dotazník, ktorý obsahoval informácie o spôsobe kŕmenia, plemene, pohlaví, veku, spolužitia s iným zvieratkom, sfarbení a dĺžke srsti. Psom bolo zmerané pH kože na rovnakých miestach

tela ako boli odobraté kožné stery pomocou prenosného pH metra pH 7+ DHS použitím sondy určenej na meranie pH kože. Stery boli inokulované na selektívne a neselektívne živné média: Brain Heart Infusion, Mannitol Salt Agar, MacConkey Agar (Becton Dickinson, USA) Pseudomonas Agar (Himedia, India) a kultivované za aeróbných podmienok. Izoláty boli identifikované pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie (Bruker Daltonics MALDI Biotyper, Nemecko), ktorej predchádzala izolácia proteínov podľa metodiky autorov Bessède a kol. (2011).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hodnoty pH kože boli najviac ovplyvnené anatomickým miestom na tele (Tab.1.). Pohlavie, sfarbenie a dĺžka srsti hodnoty pH kože výrazne neovplyvnili (sučky: $7,14 \pm 0,75$; psy: $7,0 \pm 0,58$; tmavá srst': $7,12 \pm 0,65$; svetlá srst': $7,02 \pm 0,64$; krátka srst': $7,23 \pm 0,36$; dlhá srst': $6,95 \pm 0,78$). U ľudí je fyziologické pH povrchu kože na väčšine tela kyslé v rozmedzí 4,1–5,8, pričom najvyššie pH je zaznamenané na brade (5,6) a najkyslejšími oblasťami je čelo (4,4) a horné viečko (4,6) (Proksch, 2018).

Tab. 1. Priemerné namerané hodnoty pH kože psov

Oblasť tela	Minimum	Maximum	Priemer	±SD
Vnútorná ušnica	5,18	7,88	6,67	0,79
Brada	5,67	8,81	7,13	0,88
Nos	6,87	8,67	7,92	0,50
Chrbát	5,53	8,62	7,10	0,96
Axila	5,55	8,65	6,88	0,87
Brucho	5,55	8,75	6,95	0,86
Medziprstový priestor	5,67	8,32	6,85	0,74
Perianálna oblasť	5,54	8,62	7,12	0,89

Z koaguláza-pozitívnych stafylokokov sme zachytili a identifikovali druhy *Staphylococcus pseudintermedius* a *Staphylococcus aureus*. Druh *S. pseudintermedius* sme identifikovali u 74 % psov, kedy bol prítomný aspoň na jednom mieste tela. Najčastejším miestom izolácie bola brada, nos, perianálna oblasť a vnútorná strana ušnice. Na chrbte bol *S. pseudintermedius* prítomný len u jedného psa. *S. pseudintermedius*, ktorý patrí medzi najnovšie stafylokokové druhy, bol po prvý krát popísaný v roku 2005, dovtedy dochádzalo k jeho zámene za *S. intermedius*, ktorý má veľmi podobné fenotypové vlastnosti. Odvtedy sa podľa viacerých štúdií *S. pseudintermedius* považuje za komenzála kože psov, je najčastejším patogénom izolovaným z klinických vzoriek psov a v posledných rokoch sa čoraz viac zvažuje jeho zoonotický potenciál (Petráš a kol., 2010; Bannoehr, 2012; Somayaji a kol., 2016;). Druh *S. aureus* sme identifikovali u 26% psov, pričom miestami výskytu boli nos, brada a ušnica. U ľudí patogénny *S. aureus* osídľuje kožu 10-20% zdravých jedincov ako neškodný komenzál, avšak až v 90% prípadov kolonizuje poškodenú kožu pri atopickej dermatitíde (Yamazaki a kol., 2017). Z koaguláza-negatívnych stafylokokov, ktoré sú súčasťou bežnej mikrobioty kože ľudí (Byrd a kol., 2018) sme u psov identifikovali druhy: *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* a *S. warneri*, čo môže súvisieť aj so spolunažívaním psov s ľuďmi. *S. hominis* bol prítomný u 11 psov, *S. haemolyticus* u 5 psov, *S. epidermidis* a *S. warneri* rovnako u 4 psov a *S. capitis* u 3 psov na rôznych častiach tela. *S. epidermidis*, ako bežný komenzál kože človeka, tvorí u ľudí pravdepodobne viac ako 90% aeróbnej mikrobioty nachádzajúcej sa na koži a slizniciach, ale u niektorých ľudí môže spôsobiť vážne systémové ochorenia (Cogen, 2007). Z koaguláza-negatívnych stafylokokov sme identifikovali aj druh *S. xylosus*. Z gramnegatívnych baktérií sme vyizolovali druh *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý bol prítomný u 5 psov, a to predovšetkým v oblasti brady. *Streptococcus canis* sa vyskytoval v oblasti axily, chrbta a brucha. Zriedkavý výskyt *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis* predovšetkým v perianálnej oblasti sa dá považovať za prechodnú mikrobiotu/kontamináciu. Najväčšiu druhovú pestrosť sme zaznamenali na brade a v perianálnej oblasti (Tab.2.).

Tab. 2. Identifikované bakteriálne druhy na jednotlivých častiach tela s Maldi skóre nad 2,0

Brada	Vnútroštrana ušnice	Interdigitálna oblasť	Brucho
Staphylococcus pseudintermedius	8*	5	4
Pseudomonas aeruginosa	4	4	1
Staphylococcus aureus	3	2	1
Staphylococcus haemolyticus	1	1	1
Staphylococcus warneri	1	1	1
Staphylococcus xylosum	1	1	1
Staphylococcus capitis	1	1	1
Staphylococcus succinus	1	1	1
Klebsiella oxytoca	1	1	1
Enterobacter cloacae	1	1	1
Nos	Perianálna oblasť	Chrbát	Axila
Staphylococcus pseudintermedius	6	5	2
Staphylococcus aureus	4	3	1
Staphylococcus epidermidis	3	2	1
Staphylococcus haemolyticus	1	2	1
Pseudomonas aeruginosa	1	1	1
Bacillus megaterium	1	1	1
Neisseria weaveri	1	1	1
Escherichia coli	1	1	1
	1	1	1

*Počet psov od ktorých bol izolovaný daný bakteriálny druh na určitom mieste tela

Izoláty, ktoré boli identifikované s maldi skóre od 1,7 – 1,999 sme zaradili do rodov. Najrozličnejšie rody sme pozorovali v oblasti brady a nosa, čo môže súvisieť s prirodzeným správaním psov a ich návykom mať nos v tesnom kontakte s rôznymi povrchmi. Naopak, na osrstených častiach tela sme zaznamenali nižšiu rodovú pestrosť (Tab.3.).

Tab. 3. Identifikované bakteriálne rody na jednotlivých častiach s Maldi skóre 1,7 – 1,999

Brada	Vnútroštrana ušnice	Interdigitálna oblasť	Brucho
Staphylococcus	Staphylococcus	Staphylococcus	Staphylococcus
Neisseria	Bacillus	Pseudomonas	Bacillus
Enterococcus	Corynebacterium	Bacillus	
Enterobacter			
Bacillus			
Nos	Perianálna oblasť	Chrbát	Axila
Staphylococcus	Staphylococcus	Staphylococcus	Staphylococcus
Bacillus	Bacillus	Bacillus	Bacillus
Kocuria	Enterococcus		
Neisseria			

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0006/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bannoehr J, Guardabassi L. Staphylococcus pseudintermedius in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol* 2012; 23: 253-e52.
- Bessède E, et al. Matrix-assisted laser-desorption/ionization BIOTYPER: experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:533-8.
- Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16(3):143-155.
- Cogen AL, et al. Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol* 2008; 158(3): 442-455.
- Cuscó A, et al. Individual Signatures Define Canine Skin Microbiota Composition and Variability. *Front Vet Sci* 2017; 4(6): 1-12.
- Miller WH, E. Griffin CE, Campbell. KL. Muller&Kirk's Small Anim. Dermatol. 7th edition. 2012. ISBN: 978-1-4160-0028-0. 938s.
- Petráš P, Švec P, Machová I. První záchyt Staphylococcus pseudintermedius z humánneho klinického materiálu v České republice. *Informace z NRL a odborných pracovišť SZU*. 2010; 19(3): 65 – 67.
- Proksch E. pH in nature, humans and skin. *J Dermatol* 2018. 45: 1044-1052.
- Somayaji R, et al. Human infections due to Staphylococcus pseudintermedius, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016; 471-476.
- Rippke F, Berardesca E, Weber TM. pH and microbial infections. *Curr Probl Dermatol* 2018; 54: 87-94.
- Weese Scott J. The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Vet Dermatol* 2013; 24: 137-e31.
- Yamazaki Y, Nakamura Y, Núñez G. Role of themicrobiota in skin immunity and atopic dermatitis. *Allergol Inter* 2017. 66(4): 539-544.

KOMPARATÍVNA GENOMIKA IZOLÁTU *ACINETOBACTER JOHNSONII* RB2-047 ZÍSKANÉHO Z HLBINNÉHO PROSTREDIA BANE

Timková I., Maliničová L., Kisková J., Nosáľová L., Pristaš P.

Katedra mikrobiológie, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Životné prostredie znečistené kovmi v dôsledku banských aktivít predstavuje potenciálne závažnú medicínsku hrozbu nielen vďaka schopnosti iónov kovov selektovať baktérie rezistentné voči antibiotikám, ale aj kvôli väzbe medzi génmi rezistencie voči kovom a antibiotikám.

Predkladaná práca na základe výsledkov sekvenovania novej generácie technológiou Illumina HiSeq analyzuje genóm baktérie *Acinetobacter johnsonii* RB2-047 environmentálneho pôvodu z pohľadu výskytu génov rezistencie voči antibiotikám a porovnáva ho s ďalšími genómami tohto druhu. Analýzami sa nedetegovali výraznejšie rozdiely medzi analyzovaným izolátom a ostatnými izolátmi, genómová kompozícia študovaných baktérií bola veľmi podobná, pričom najvýznamnejším faktorom prispievajúcim ku genetickej variabilite bola prítomnosť mobilných génových elementov.

ÚVOD

V posledných dekádach dochádza k rapidnému nárastu znečistenia životného prostredia, pričom znečistenie kovmi narastá nielen lokálne, ale aj v celosvetovom meradle (Beveridge, 2014). Kontaminácia pôdy kovmi sa stala závažným problémom, nakoľko kovy zohrávajú dôležitú úlohu v šírení a udržiavaní antibiotickej rezistencie (Song a kol., 2017). Ko-rezistencia voči antibiotikám a kovom vyvolaná prítomnosťou kovov v prostredí je medzi mikroorganizmami bežným javom. Predpokladá sa preto, že oblasti kontaminované kovmi predstavujú ideálne miesta pre prítomnosť antibioticky rezistentných mikroorganizmov a rezervoár génov tejto rezistencie v prírodnom prostredí (Chen a kol., 2019). Takéto miesta predstavujú aj banské prostredia, ktoré sa vyznačujú vysokou koncentráciou kovov a len minimálnym antropogénnym vplyvom. V októbri 2017 bol preto uskutočnený odber vzoriek priamo z bane Rozália v Hodruši-Hámroch, kde bolo kultivačnými metódami získaných viacero bakteriálnych izolátov. Pre našu prácu sme z tejto kolekcie izolátov vybrali izolát *A. johnsonii* RB2-047, ktorý sa vyznačoval vysokou toleranciou voči viacerým antibiotikám (napr. minimálna inhibičná koncentrácia pre ampicilín – 400 µg/ml v porovnaní s 8 µg/ml stanovenými EUCAST štandardom). U baktérií rodu *Acinetobacter* sú gény zapojené do rezistencie voči antibiotikám často kódované plazmidovo. Takto kódované gény môžu byť následne prenášané prostredníctvom horizontálneho prenosu medzi rôznymi rodmi a druhmi baktérií (Leungtonkam et al., 2018). Navyše, šírenie baktérií tohto rodu rezistentných voči väčšine dostupných antimikrobiálnych látok predstavuje zdravotné riziko, nakoľko v súčasnosti je tento rod spájaný hlavne s infekciami súvisiacimi so zdravotnou starostlivosťou (Manchanda a kol., 2010).

MATERIÁL A METODIKA

Približne 50 g vzorky materiálu z poslednej aktívnej zlatej bane na Slovensku (Rozália v Hodruši-Hámroch, GPS N 48°45.658' E 18° 85.166') bolo za sterilných podmienok odobraných z hĺbky asi 10 cm pod povrchom. 1 g zhomogenizovaného materiálu bol v laboratóriu rozsuspendovaný v 10 ml sterilného fosfátového tlmivého roztoku a intenzívne premiešavaný po dobu 30 minút. Po uplynutí tejto doby bolo na živný agar č. 2 (Nutrient Agar No. 2, Himedia, India) inokulovaných 100 µl z vybraných desatinných riedení, pričom médiá boli následne kultivované 18 hodín pri laboratórnej teplote. Po kultivácii bolo na základe odlišnej morfológie kolónií náhodne vybraných, izolovaných a pomnožených 640

izolátov. Pomocou MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry) boli izoláty identifikované a klasifikované do rodov, pričom pre našu prácu sme z tejto kolekcie izolátov vybrali izolát *A. johnsonii* RB2-047, ktorý sa vyznačoval aj najvyššou toleranciou voči viacerým antibiotikám. Z izolátu bola následne pomocou kitu vyizolovaná genómová DNA (GenElute Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma-Aldrich, Nemecko), ktorá bola zaslaná na sekvenovanie novej generácie technológiou Illumina HiSeq v NovaSeq 6000 móde pomocou S2 PE 150 XP kitu (Eurofins Genomics, Rakúsko). Výsledná sekvencia genómu *A. johnsonii* RB2-047 bola podrobená komparatívnej analýze s piatimi sekvenciami genómovej DNA druhu *A. johnsonii* dostupnými v databáze Genome, GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>, august, 2020): *A. johnsonii* XBB1, *A. johnsonii* M19, *A. johnsonii* IC001, *A. johnsonii* Acsw19 a *A. johnsonii* LXL C1. Genómové sekvencie boli analyzované s využitím ANI (Average Nucleotide Identity), RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology), ResFinder, blastx a blastn analýz.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

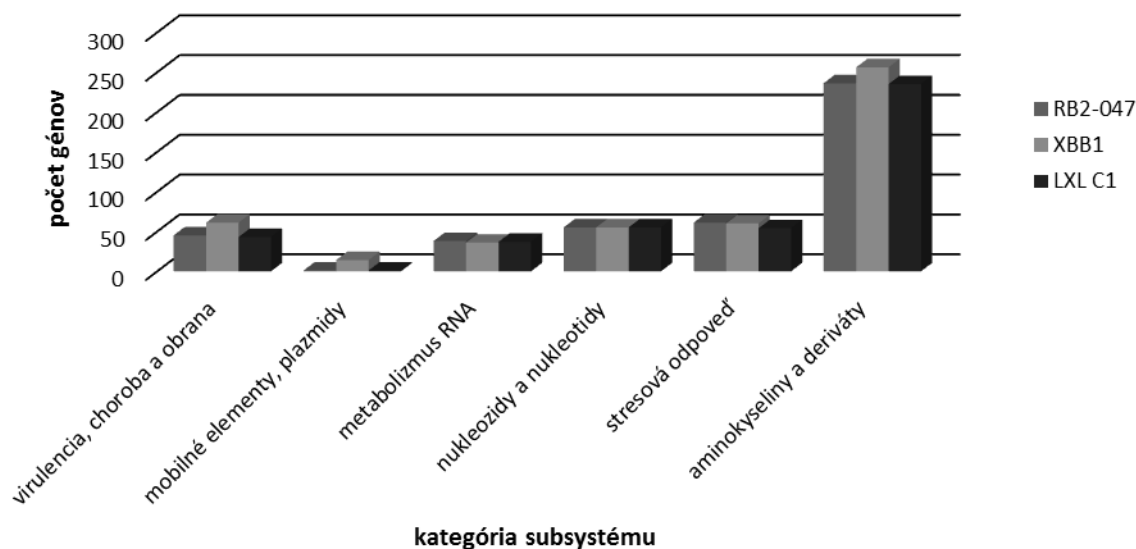
Izolát RB2-047 bol izolovaný zo vzorky z bane Rozália v Hodruši-Hámroch a na základe 16S rDNA analýzy bol identifikovaný ako *A. johnsonii* (99, 93%). Sekvenovaním novej generácie sme získali 7 903 000 čítaní obsahujúcich 2 370 900 000 báz. S použitím programu UGENE sme získali draft genómu pozostávajúci z 518 contigov s mediánom dĺžky N50 - 38 820 bp. Draft genómu študovaného izolátu mal veľkosť 3, 39 Mbp (Tab. 1.) a na základe ANI analýzy vykazoval najvyššiu podobnosť k ostatným genómom *A. johnsonii* (95%).

Tab. 1. Vybrané parametre genómov jednotlivých izolátov (N/A – nie je k dispozícii)

izolát	pôvod	GenBank prístupové číslo	veľkosť genómu (Mbp)	obsah GC párov (%)	počet proteínov	počet rRNA	počet tRNA	počet génov antibiotickej rezistencie
RB2-047	baňa	N/A	3, 39	41, 8	3518	N/A	84	1
XBB1	klinický izolát	NZ_CP010350	3, 51	41, 4	3139	21	83	15
M19	voda	NZ_CP037424	3, 75	41, 4	3450	21	88	1
IC001	voda	NZ_CP022298	3, 61	41, 5	3203	21	88	1
Acsw19	splašky	NZ_CP043307	3, 43	41, 8	3049	21	88	6
LXL C1	pôda	NZ_CP031011	3, 4	41, 3	2975	21	87	1

Pri celkovom porovnaní počtu genetických determinantov zodpovedných za konkrétne vlastnosti či metabolické funkcie sme nedetegovali výraznejšie rozdiely medzi porovnávanými izolátmi. Avšak v niektorých aspektoch, napr. v porovnaní s klinickým izolátom XBB1, sme zaznamenali až o 93 % menej mobilných elementov v študovanom izoláte RB2-047 (Obr. 1.), čo môže byť spôsobené vysokým selekčným tlakom antibiotík v nemocničnom prostredí, ktoré podporujú udržiavanie týchto elementov ako formu selekčnej výhody. Pri podrobnejšom analyzovaní nešpecifických determinantov rezistencie voči antibiotikám sme zistili zhodu naprieč porovnávanými genómami, konkrétne v genetických determinantoch efluxných púmp, kde pumpy identifikované v genómoch patrili do rodiny MATE (multidrug and toxic compound extrusion) a MacA (macrolide ATP-binding cassette

efflux pump). Naopak, v študovanom izoláte RB2-047 bol detegovaný len jediný špecifický determinant antibiotickej rezistencie – blaOXA₂₁₂ zabezpečujúci rezistenciu voči β -laktámom.



Obr. 1. Porovnanie počtu génov vybraných subsystémov vo vybraných genómoch (RB2-047 – študovaný izolát, XBB1 – klinický izolát, LXL C1 – environmentálny izolát)

Analýzami sme nedetegovali výraznejšie rozdiely medzi študovaným izolátom a ostatnými izolátmi *A. johnsonii*. Aj napriek skutočnosti, že študovaný izolát vykazoval vysokú mieru antibiotickej rezistencie, analýzami sme detegovali prítomnosť len jediného génu antibiotickej rezistencie v jeho genóme (gén rezistencie voči β -laktámom), čo naznačuje, že zatiaľ čo v klinických izolátoch sú za rezistenciu zodpovedné špecifické gény antibiotickej rezistencie, v environmentálnych izolátoch môže byť rezistencia voči rôznym druhom antibiotík zabezpečená inými, nešpecifickými mechanizmami, napríklad efluxnými pumpami, ktorých prítomnosť v genóme študovaného izolátu bola analýzami potvrdená.

Práca vznikla za podpory grantu VVGS-PF- 2019-1044 a VEGA 1/0229/17.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beveridge J. Uptake and Retention of Metals by cell Walls of *Bacillus*. 2014;127:1–17.
 Chen J, et al. Bacterial heavy-metal and antibiotic resistance genes in a copper tailing dam area in northern China. *Front Microbiol.* 2019;10:1–12.
 Leungtonkam U, et al. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One.* 2018;13:1–12.
 Manchanda V, Sinha S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *J Glob Infect Dis.* 2010;2:291.
 Song J, et al. Comparison of Metals and Tetracycline as Selective Agents for Development of Tetracycline Resistant Bacterial Communities in Agricultural Soil. *Environ Sci Technol.* 2017;51:3040–30.

ABSORPCIA A STRÁVITEĽNOSŤ STOPOVÝCH PRVKOV V TENKOM ČREVE PRASIAŤ

Tokarčíková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo porovnať účinok dvoch typov vlákniny a dvoch zdrojov Zn na absorpciu stopových prvkov v jednotlivých úsekoch tenkého čreva a ich celkovú stráviteľnosť u mladých prasiat. V experimente bolo použitých 24 odstavčiat plemena Danbred × Duroc (vek 40 dní), rozdelených do 4 skupín, ktoré počas 4 týždňov dostávali bazálnu diét (BD) obohatenú o 10 g/kg hrubej vlákniny vo forme lignocelulózy alebo zemiakovej vlákniny, a 120 mg Zn/kg vo forme ZnSO₄ alebo Zn cheláty s glycinom. 1. sk. (K): celulóza + ZnSO₄, 2. sk. (OrgZn): celulóza + ZnGly, 3. sk. (ZV): zemiaková vláknina + ZnGly, 4. sk. (ZV+OrgZn): ZV + ZnGly. Príjem ZV ovplyvnil celkovú stráviteľnosť Fe a Cu. Zdroj vlákniny ani Zn neovplyvnil relatívnu absorpciu Zn a Cu v žiadnom úseku tenkého čreva prasiat, ale znížil absorpciu Fe v ileu. Suplementácia diét organickým ZnGly znížila stráviteľnosť Zn v porovnaní so ZnSO₄, ale zlepšila absorpciu Mn v duodene. Záverom môžeme konštatovať, že suplementácia krmiva prasiat iba 1% ZV môže výrazne ovplyvniť absorpciu niektorých stopových prvkov, hlavne Fe a Cu, avšak ďalší výskum je nevyhnutný pre objasnenie úloh oboch aditív v transportných mechanizmoch stopových prvkov v GIT.

ÚVOD

Stopové prvky (TEs) sa ako krmné aditíva používajú vo výžive zvierat vo forme premixov, väčšinou ako anorganické oxidy, sírany alebo uhličitaný. V organizme pôsobia ako katalyzátory enzymatických a hormonálnych procesov ovplyvňujúcich udržiavanie homeostázy, rast a vývoj kostí (Thomaz a kol., 2015). V období odstavu sa často u mladých zvierat vyskytuje nerovnováha stopových prvkov, kedy sú zvýšené nároky zvierat na prísun stopových prvkov z diéty, avšak ich nedostatočná funkcia tráviaceho traktu a prítomnosť antagonistických zlúčenín v krmive priamo vplýva na ich vstrebávanie. V snahe zvýšiť absorpciu stopových prvkov a znížiť zaťaženie životného prostredia sa začali používať krmné aditíva stopových prvkov v ich organickej forme, vo forme chelátov alebo organických komplexov. Používanie chelátov by malo zlepšiť absorpciu stopových prvkov z tenkého čreva a tým zvýšiť ich biologickú dostupnosť (Gayathri a Panda, 2018). Zn, Mn, Fe, Cu sú prechodné kovy, ktoré majú podobné chemické vlastnosti a v biologických systémoch vystupujú v oxidačných číslach +1 až +3. Mechanizmus ich absorpcie v tenkom čreve je veľmi podobný, čím dochádza k ich vzájomným interakciám a súpereniu o väzbu na transportné proteíny.

Akákoľvek vláknina v krmive negatívne ovplyvňuje absorpciu a biologickú dostupnosť stopových prvkov. Interakcie stopových prvkov s vlákninou v GIT závisia od mnohých faktorov, vrátane typu vlákniny. Zemiaková vláknina a bielkovina sú rafinované vedľajšie produkty v škrobovom priemysle, ktoré sa používajú na suplementáciu krmív. Zemiaková vláknina má pozitívne účinky na pasáž tráveniny, zloženie črevnej mikrobioty a zvýšenie absorpčného povrchu čreva (Tušnio a kol., 2011).

V našom experimente sme sa zamerali na eliminovanie vzájomných interakcií stopových prvkov v GIT, zvýšenie ich absorpcie z tenkého čreva a ich využiteľnosti u mladých prasiat obohatením krmiva o organický zdroj jedného z najdôležitejších stopových prvkov - zinku a viac fermentovateľnú zemiakovú vlákninu. Relatívnu absorpciu a celkovú stráviteľnosť stopových prvkov sme sledovali v jednotlivých úsekoch tenkého čreva prasiat.

MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu bolo zaradených 24 odstavčiat prasiatok plemena Danbred x Duroc (vek 40 dní, živá hm. $10,8 \pm 0,8$ kg). Zvieratá boli zaradené do 4 skupín/6 replikátov a počas 4 týždňov prijímali experimentálne diéty *ad libitum*. Bazálna diéta (BD) všetkých zvierat obsahovala 5% vlákniny, vo forme celulózy alebo zemiakovej vlákniny, a 150 mg Zn/kg, vo forme anorganického monohydrátu $ZnSO_4$ alebo organického Zn chelátu glycinového hydrátu (ZnGly). 1.sk- kontrolná skupina (K), prijímala BD obsahujúcu celulózu a $ZnSO_4$; 2.sk (OrgZn) dostávala identickú BD obohatenú o ZnGly. 3. sk (ZV) prijímala BD obsahujúcu zemiakovú vlákninu a $ZnSO_4$, a 4. sk. (Zv+OrgZn) mala BD obohatenú o ZV a ZnGly.

1.skupina, KONTROLA (K): celulóza + $ZnSO_4$

2.skupina (OrgZn): celulóza + ZnGly

3.skupina (ZV): zemiaková vláknina + $ZnSO_4$

4.skupina (ZV+OrgZn): zemiakovej vlákniny + ZnGly

Desať dní pred koncom experimentu bol ku každej experimentálnej diéte pridaný Cr_2O_3 (3 g/kg krmiva) ako markér pre odhad stráviteľnosti. Po 4 dňoch adaptácie, sa odoberal trus všetkých zvierat počas 5 dní. Následne boli odstavčatá boli humane usmrtené a odoberatý obsah jednotlivých úsekov tenkého čreva a trus bol uskladnený pri $-20^\circ C$ až do lyofilizácie. Obsah Zn, Fe, Mn a Cu sa analyzoval pomocou plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie použitím atómoveho absorpčného spektrometra (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko). Pred samotným meraním koncentrácie stopových prvkov metódou AAS prešli vzorky mineralizáciou, metódou mikrovlnného mokrého rozkladu pomocou zariadenia Speedware MWS4 (Berghof Company, Nemecko). Obsah Cr_2O_3 sa stanovil kolorimetrickou metódou podľa Kimury a Millera (1957). Relatívna absorpcia/stráviteľnosť stopových prvkov (%) u prasiat bola vypočítaná ako percentuálny podiel koncentrácie Cr_2O_3 v diéte vynásobeného koncentráciou stopových prvkov (TEs) v krmive/truse a koncentráciou Cr_2O_3 v krmive/truse vynásobenou koncentráciou TEs v diéte, odpočítaného od koeficientu 1.

Na štatistické hodnotenie výsledkov a porovnanie jednotlivých skupín ku kontrolnej skupine sme použili analýzu rozptylu- jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testom (štatistický softvér GraphPad Prism 5). Na vyhodnotenie vplyvu dvoch zdrojov Zn a vlákniny na sledované parametre sme použili dvojcestnú ANOVU s Bonferroniho post-testom. Výsledky sú uvedené ako priemer a štandardná chyba priemeru (SEM).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Príjem zemiakovej vlákniny (ZV, ZV+OrgZn) výrazne znížil celkovú stráviteľnosť Fe (Obr. 2, $P < 0,001$), no naopak zvýšil stráviteľnosť Cu u mladých prasiat (Obr. 3, $P < 0,01$). Na celkovú stráviteľnosť Zn mal vplyv zdroj prijímaného Zn (Obr. 1, $P < 0,05$). Nižšiu stráviteľnosť Zn sme zistili u zvierat prijímajúcich diétu obohatenú o organický ZnGly (ZV, ZV+OrgZn). Vzhľadom na nízku absorpciu Mn (1-2%), bola výsledná celková stráviteľnosť Mn u prasiat záporná, a z tohto dôvodu nie je uvedená vo výsledkoch.

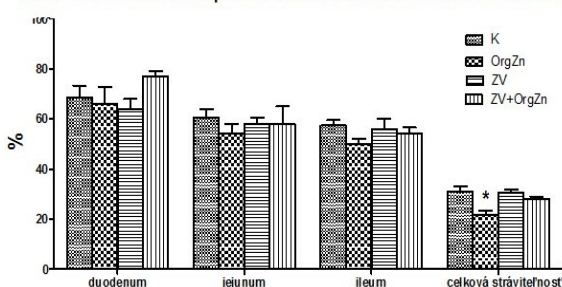
Ošipané získavajú energiu z vlákniny len po jej mikrobiálnej fermentácii v GIT. Vlákna prijímaná krmivom zohráva dôležitú úlohu pri absorpcii stopových prvkov. V GIT zvierat tvorí so stopovými prvkami nerozpustný komplex, čím znižuje ich absorpciu a biovyužitelnosť. Zemiaková vláknina (ZV), hlavne jej rozpustné zložky, pozitívne vplyvajú na fermentáciu, pasáž tráveniny a morfometriu čreva (Tušnio a kol., 2011), čo môže ovplyvniť absorpciu minerálov. Vyššia stráviteľnosť popola, ktorá poukazuje na vyššiu absorpciu prvkov, bola dokázaná u prasiat prijímajúcich diétu obohatenú o ZV (Tušnio a kol., 2011; Barszcz, 2019). Naše výsledky ukázali, že ZV neovplyvňuje stráviteľnosť Zn, ale výrazne vplyva na celkovú stráviteľnosť Fe a Cu.

Zdroj vlákniny ani Zn neovplyvnil relatívnu absorpciu Zn a Cu v žiadnom úseku tenkého čreva prasiat (Obr. 1-4). Príjem ZV znížil absorpciu Fe v ileu oproti kontrole (ZV vs. K,

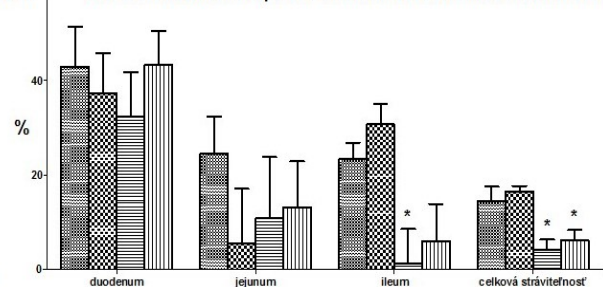
$P < 0,05$), čím bola celková stráviteľnosť Fe znížená u oboch skupín zvierat prijímajúcich ZV diéty (Obr. 2.). Vyššia stráviteľnosť Cu u prasiat prijímajúcich obe diéty so ZV bola zrejme spôsobená vyššou absorpciou Cu z jejuna ($P < 0,05$). Suplementácia diét organickým ZnGly nezmenila absorpciu Zn v žiadnom úseku tenkého čreva prasiat, ale zlepšila absorpciu Mn v duodene (Obr. 4, vplyv zdroja Zn $P < 0,05$).

Naše výsledky ukázali, že suplementácia krmiva prasiat iba 1% ZV môže výrazne ovplyvniť absorpciu niektorých stopových prvkov, hlavne Fe a Cu. Zvýšená koncentrácia Cu v enterocytoch bola zrejme spôsobená naviazaním Cu na metalotioneín, intracelulárny proteín viažuci kovy. Nedostatočná koncentrácia intracelulárneho Cu zrejme mala za následok zníženú absorpciu Fe kvôli Cu-závislému proteínu hephaestínu, ktorý úzko spolupracuje s ich spoločným transportérom, ferroportínom (Yeh a kol., 2009). Stopové prvky Zn, Cu, Fe a Mn sú chemicky podobné prvky a zdieľajú rovnaké transportné mechanizmy, preto dochádza k interakcii medzi týmito prvkami. Ako sa zdá, forma prijímaného Zn má vplyv absorpciu Zn a Mn. Vyššia stabilita organických chelátov Zn by mala zabezpečiť jeho disociáciu v nižších úsekoch čreva, avšak závisí od sily väzby v týchto zlúčeninách. Zdá sa, že väzba Zn v ZnGly cheláte bola silná, čo malo za následok jeho nižšiu absorpciu v GIT. Ďalší výskum je však nevyhnutný pre objasnenie úloh oboch aditív v transportných mechanizmoch stopových prvkov v enterocytoch.

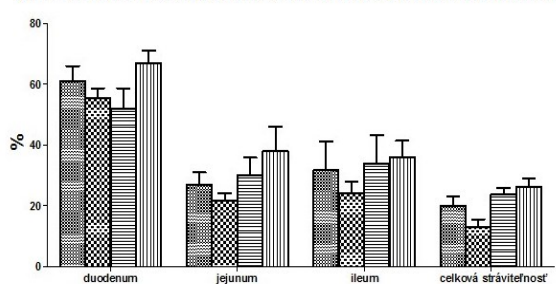
Obr. č. 1: Relatívna absorpcia Zn v tenkom čreve a celková stráviteľnosť Zn



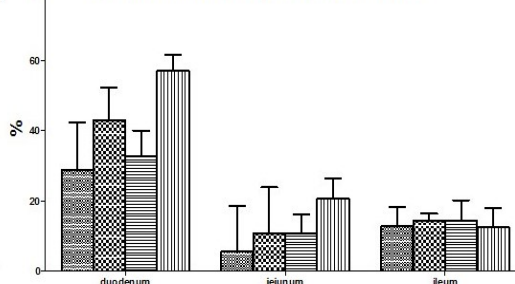
Obr. č. 2: Relatívna absorpcia Fe v tenkom čreve a celková stráviteľnosť Fe



Obr. č. 3: Relatívna absorpcia Cu v tenkom čreve a celková stráviteľnosť Cu



Obr. č. 4: Relatívna absorpcia Mn v tenkom čreve



Práca bola podporená grantmi VEGA 2/0069/17, APVV 17-0297.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barszcz M, et al. The effect of organic and inorganic zinc source, used in combination with potato fiber, on growth, nutrient digestibility and biochemical blood profile in growing pigs. *Livest. Sci.* 2019; 227:37-43
- Gayathri SL, Panda N.. Chelated minerals and its effect on animal production: A review. *Agriculture Reviews.* 2018; 39:314-320.
- Kimura FT, Miller VL. Improved Determination of Chromic Oxide in Cow Feed and Feces. *J. Agric. Food Chem.* 1957; 5: 216.
- Thomaz MC, et al. Inorganic and organic trace mineral supplementation in weanling pig diets. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2015; 87:1071-1081.
- Tušnio A, et al.. Response of zoung to feeding potato protein and potato fibre – nutritional, physiological and biochemical parameters. *J. Anin. Feed Sci.* 2011; 20:361-378.
- Yeh KH, et al. Iron feeding induces ferroportin 1 and hephaestin migration and interaction in rat duodenal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2009; 296:G55-G65.

STRATIFIKÁCIA PACIENTOV S KANÍNNOU KOGNITÍVNOU DYSFUNKCIOU

Vikartovská Z.^{1,3}, Farbáková J.¹, Smolek T.², Hanes J.², Žilka N.², Horňáková Ľ.¹, Humeník F.³, Maloveská M.³, Čížková D.³

¹Univerzitná veterinárna nemocnica, UVLF, Košice

²Neuroimunologický ústav SAV, Bratislava

³Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, UVLF, Košice

ABSTRAKT

V tejto práci sa zameriavame na diagnostiku a histopatologické zmeny pri kanínnej kognitívnej dysfunkcii (CCDS). CCDS patrí medzi neurodegeneratívne ochorenia starých psov. Z 24 starších psov sme vyseletovali 13 trpiacich miernou formou CCDS, ktoré sme porovnávali so psami s fyziologickým starnutím a s mladými kontrolami. Všetky psy podstúpili klinické, neurologické, hematologické a biochemické vyšetrenie. V krvnom sére sme analyzovali biomarkery typické pre demenciu, a to neurofilamentový proteín s ľahkým reťazcom (NFL), beta amyloid (A β) a TAU proteín. Vzorky mozgového tkaniva psov po eutanázii boli histopatologicky vyhodnotené, kde sa dokázala prítomnosť difúzných amyloidných plakov a to najmä vo frontálnom kortexe. Psy trpiace CCDS vykazovali zmeny v interakcii s majiteľom, priestorovej orientácii a v individuálnom správaní. Pozorovali sme vyššie hladiny NFL v krvnom sére oproti kontrolám, pričom pri A β a TAU proteíne sme rozdiely medzi chorými psami a zdravými kontrolami nezaznamenali. Kombinácia kompletného klinického vyšetrenia, spolu so stanovením biochemického a hematologického profilu s analýzou biomarkerov (NFL) v krvnom sére je vhodným postupom pri diagnostike najmä miernej formy CCDS. Včasná detegovanie ochorenia je nutné pre nasadenie terapie, ktorá spomalí progres kognitívnych zmien.

ÚVOD

Kanínna kognitívna dysfunkcia (CCDS) patrí medzi neurodegeneratívne ochorenie postihujúce psov starších ako 8 rokov (Vite a Head, 2014). Medzi klinické príznaky patrí dezorientácia, zmenená sociálna interakcia, zmenený cyklus spánku, zmena v hygienických návykoch, úzkosť alebo agresivita. Dochádza ku narušeniu vzťahu majiteľ - zvierka, prípadne zvierka - zvierka (Landsberg a kol., 2017). Patrí medzi zriedkavo diagnostikované ochorenia, keďže mnoho majiteľov považuje tieto príznaky za normálny proces starnutia a často vyhľadajú veterinárneho lekára až v pokročilejších štádiách ochorenia. Pri diagnostike je nutné vylúčiť iné ochorenia spôsobené stratou zmyslov, bolestivé stavy, gastrointestinálne, urogenitálne, endokrinné ochorenia, infekcie a nedostatočnú výživu (Landsberg a kol., 2017).

Diagnostika CCDS spočíva v dotazníkoch vyplnených v spolupráci s majiteľom zameraných na zmeny v správaní, komplexné klinické, neurologické a oftalmologické vyšetrenie a stanovenie hladín biomarkerov neurofilament light chain (NFL), A β amyloidu a TAU proteínu v krvnom sére (O'Bryant a kol., 2017). Patologické zmeny zahŕňajú atrofiu cortexu, zvýšený objem mozgových komôr, vaskulárne zmeny, hromadenie β amyloidu v cortexu a aktiváciu mikrogliu (Smolek a kol., 2016). Pri terapii sa zameriavame na zmiernenie príznakov ochorenia, a to výživou, doplnením vitamínov E a C, omega 3 mastných kyselín a environmentálnym obohatením (enrichment) (Landsberg a kol., 2017). Medzi účinné látky používané na spomalenie progresie patrí selegiline a propentofyllin. Ako nové možnosti terapie sa ponúkajú mezenchýmové kmeňové bunky, ktoré majú imunomodulačný a parakrinný efekt a sú schopné zabrániť apoptóze neurónov (Cizkova a kol., 2014).

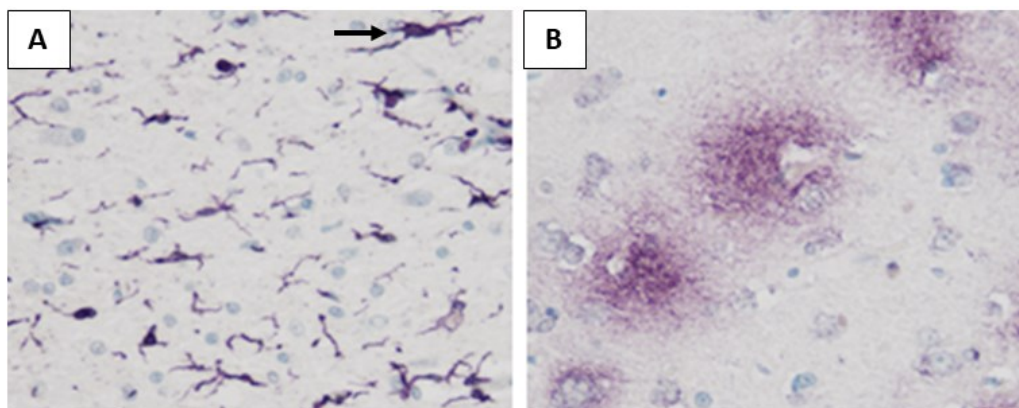
MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrených bolo 30 psov stredných plemien starších ako 8 rokov a 15 mladých psov, ktoré slúžili ako kontroly. Psom bolo spravené kompletné klinické a neurologické vyšetrenie,

hematologický a biochemický profil v Univerzitetnej veterinárnej nemocnici. Majitelia všetkých psov podpísali informovaný súhlas. Cieľom bolo stratifikovať psov s miernou kognitívnou dysfunkciou (MiCI). Na rozlíšenie zdravých a chorých psov sme použili dotazník CADES (CANine DEmentia Scale) vytvorený na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie. Pri hodnotení sa posudzujú domény, a to priestorová orientácia, sociálna interakcia, cyklus spánok-bdenie a domáce špinenie. Dotazník pozostáva zo sedemnástich otázok, každá je bodovaná od 0-5 bodov. Celkové skóre je od 0-95 bodov, pričom 0-7 poukazuje na fyziologické starnutie, 8-23 bodov mierna CCDS, 24-44 bodov priemerná CCDS a 45-95 vážna CCDS. Po vyradení psov so systémovými ochoreniami sme do štúdie zaradili 24 starších psov, z ktorých na základe CADES dotazníka 13 trpelo miernou formou CCDS a 14 mladších psov. Následne bola týmto pacientom odobratá krv z v. *cephalica*, z ktorej sa získalo sérum, ktoré bolo poslané na ďalšie analýzy na Neuroimunologický ústav SAV v Bratislave. Päť starších psov bolo eutanázovaných kvôli iným komorbiditám. Následne boli vykonané pitvy na Ústave anatómie UVLF, vzorky boli konzervované v 4% formaldehide, následne histopatologicky a imunohistochemicky spracované.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Miernou formou CCDS trpelo 13 psov s CADES skóre 8-23. Najviac vykazovali zmeny v interakcii majiteľ - zvier, prípadne zvier - zvier (12/13), zmeny v individuálnom správaní, ako exploračné správanie, ochota hrať sa (8/13) a priestorová orientácia (6/13). Hematologické vyšetrenie neukázalo žiadne odchýlky od fyziologických hodnôt v žiadnej skupine. Biochemické analýzy ukázali drobné zmeny v alanín aminotransferáze (ALT), gama glutamyl transferáze (GGT) a v celkových bielkovinách. Taktiež sme zachytili znížené hodnoty sodíka a chloridov u psov trpiacich MiCI. Biomarkery ukázali zvýšenie NFL v sére MiCI psov, keď hladina v sére dosiahla 103,3 pg/ml v porovnaní s normálne starnúcimi psami (30,2 pg/ml) a mladými kontrolami (13,7 pg/ml). Zároveň sa neukázali žiadne rozdiely v hladinách TAU proteínu a A β peptidu pri porovnaní všetkých troch skupín. Imunohistochemické analýzy ukázali výskyt aktivovanej mikroglie a amyloidných plakov v difúznej forme, a to najmä vo frontálnom kortexe a hipokampe, čiže v štruktúrach zodpovedných za kogníciu.



Obr.1. Aktivovaná mikrogliá (A) a amyloidné plaký (B) v prefrontálnom kortexe psa trpiaceho miernou formou CCDS (CADES skóre:23)

V našej štúdií sme stratifikovali pacientov s kanínnou kognitívnou dysfunkciou. Túto poruchu sme si vybrali z dôvodu vysokej prevalencie medzi staršími psami a malým počtom diagnostikovaných pacientov. Dotazník CADES spolu s kompletných klinickým, hematologickým a biochemickým vyšetrením a stanovením biomarkerov je vhodným diagnostickým prístupom už pri miernych formách CCDS, kedy je možné prípadné

spomalenie progresie ochorenia (Madari a kol., 2015; Smolek a kol., 2016). V našej štúdií sme prvýkrát dokázali, že psy trpiace CCDS majú zvýšený NFL v krvnom sére. Histopatologické zmeny u psov sú podobné ako u ľudí trpiacich Alzheimerovou chorobou (Cummings a kol., 1996). Tie spočívajú v ukladaní amyloidných plakov v difúznej forme, čo má vplyv na kognitívne funkcie (Cummings a kol., 1996; Smolek a kol., 2016). Na rozdiel od ľudí a iných druhov cicavcov, zatiaľ nebola dokázaná prítomnosť TAU proteínu u psov postihnutých CCDS (Härtig a kol., 2000; Smolek a kol., 2016).

IGA 02/2019: "Stratifikácia pacientov s kanínnou kognitívnou dysfunkciou, využitie inovatívnej bunkovej terapie.", APVV 15-0613, APVV-19-0193, APVV-17-0642, VEGA 1/0714/20, VEGA 1/0376/20, VEGA 2/0146/19

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; 4:7514.
- Cummings BJ, et al. The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol. Aging.* 1996; 17: 259–268.
- Härtig W, et al. Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. 2000; 100:305–312.
- Landsberg, G., Madari, A., and Zilka, N. (2017). *Canine and Feline Dementia: Molecular Basis, Diagnostics and Therapy*. ISBN 978-3-319-53219-6
- Lewczuk P, et al. Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 2018; 10:71.
- Madari A, et al. Assessment of severity and progression of canine cognitive dysfunction syndrome using the CANine DEmentia Scale (CADES). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 2015; 171:138–145.
- O'Bryant SE, et al. Blood-based biomarkers in Alzheimer disease: Current state of the science and a novel collaborative paradigm for advancing from discovery to clinic. *Alzheimers Dement.* 2017; 13:45–58.
- Smolek T, et al. Tau hyperphosphorylation in synaptosomes and neuroinflammation are associated with canine cognitive impairment: Synaptic tau in canine dementia. *J. Comp. Neurol.* 2016; 524:874–895.
- Vite CH, Head E. Aging in the Canine and Feline Brain. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2014; 44:1113–1129.

ANALÝZA CIEVNEJ SIETE VO VYVÍJAJÚCEJ SA MIECHE POTKANA POČAS NESKOREJ EMBRYOGENÉZY A V POSTNATÁLNOM OBDOBÍ

Zrubáková J., Alexovič Matiašová A., Ševc J., Daxnerová Z.

Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice

ABSTRAKT

Naše predchádzajúce experimenty popísali prepojenie buniek nervového tkaniva a ciev v postnatálnom období, ale poznanie pomerov v mieche v neskorom embryonálnom období zostávalo stále neobjasnené. Preto cieľom tejto práce bolo popísať distribúciu ciev a zmeny tvaru výstelky centrálného kanála miechy práve v tomto časovom intervale. Pomocou imunofluorescenčných metód sme analyzovali prerastanie ciev a popisovali reorganizáciu buniek výstelky centrálného kanála miechy. Zistili sme, že počas embryonálneho obdobia v koronárnych rezoch miechy dominujú pozdĺžne orientované vetvy ciev, pričom sa ich počet medzi študovanými intervalmi významne nelíši. Naproti tomu v postnatálnom období dochádza v mieche potkana k výraznému rozvoju mikrovaskularizácie tkaniva.

ÚVOD

Vývin nervového tkaniva je úzko prepojený s jeho vaskularizáciou, ktorá začína u hlodavcov pomerne skoro v priebehu embryogenézy (Bautch a James, 2009). Spočiatku je neurálna rúra tvorená nediferencovanými, proliferatívne aktívnymi neuroepitelovými bunkami, ktoré sú vyživované prostredníctvom difúzie z okolitého cievneho plexu (Kurz a kol., 2004). Vaskularizácia nervového tkaniva prebieha procesom angiogenézy, ktorým cievy z periférie vrastajú do vyvíjajúcej sa neurálnej rúry a vytvárajú sieť (Hogan a kol., 2004), ktorá zabezpečuje trofické nároky buniek a bráni hypoxii tkaniva (Kurz a kol., 2004). Početné štúdie popisujú vývin cievneho systému s využitím vtáčích alebo myšiacich modelov (Paredes a kol., 2018), zatiaľ čo dáta o vaskularizácii miechy potkana hlavne v neskorom embryonálnom a skorom postnatálnom období sú pomerne strohé. V tejto práci sme sa zamerali na analýzu distribúcie ciev v mieche potkana v priebehu neskorého embryonálneho obdobia (počas tzv. gliogénnej fázy) a porovnali s vaskularizáciou miechy potkanov vo veku 31 dní.

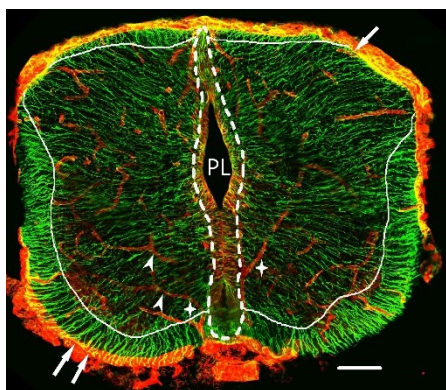
MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol realizovaný na základe povolenia Štátnej veterinárnej a potravinovej správy a v súlade s pravidlami Etickej komisie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ v Košiciach. V experimente boli použité embryá potkanov kmeňa Wistar vo veku 16, 17, 18, 19, 20, 21 a 22 dní (E16-E22) a potkany vo veku 31 postnatálnych dní (P31). V každom študovanom časovom intervale sme použili skupinu 3 embryí, resp. zvierat (n=3). Gravidná samica bola uvedená do terminálnej anestézy a miecha izolovaná z embryí bola prenesená do fixačného roztoku 4% paraformaldehydu. Potkany vo veku P31 sme uviedli do terminálnej anestézy a vykonali transkardiálnu perfúziu fyziologickým roztokom a roztokom 4% paraformaldehydu. Z miech P31 potkanov bola izolovaná oblasť 3.-4. lumbálneho segmentu a postfixovaná cez noc. Tkanivo miech embryí a P31 potkanov bolo infiltrované kryoprotektívom a nakrájané pomocou zmrazovacieho mikrotómu na 60 µm hrubé koronárne rezy. Pre imunofluorescenčné značenie boli použité kombinácie primárnych protilátok voči markerom ciev (mouse anti-RECA, mouse anti-NG2, rabbit anti-Laminin, goat anti-CD31) a fenotypovým markerom buniek radiálnej glie a ependýmu (mouse anti-Nestin) a sekundárnymi protilátok konjugovaných s fluorescenčnými značkami AlexaFluor 488, 555 a 594. Všetky tkanivové rezy boli analyzované pomocou konfokálneho mikroskopu Leica SP5 TCS X. Všetky úpravy snímok boli obmedzené na úpravu jasu a kontrastu a spracované do obrázkov pomocou

softvéru ImageJ (NIH, USA). Na analýzu distribúcie ciev v tkanive miechy sme v každom časovom intervale vyšetřili 30 koronárnych rezov značených pomocou protilátky voči laminínu. Celkový počet priečne a pozdĺžne orientovaných vetiev ciev v z-stacku, ako aj plocha nasnímaných miech v koronárnych rezoch boli vyhodnotené pomocou programu ImageJ (NIH, USA) a vyjadrené ako priemerná hodnota so smerodajnou odchýlkou. Distribúcia ciev v tkanive miechy bola následne prepočítaná na $1\mu\text{m}^3$ objemu tkaniva.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

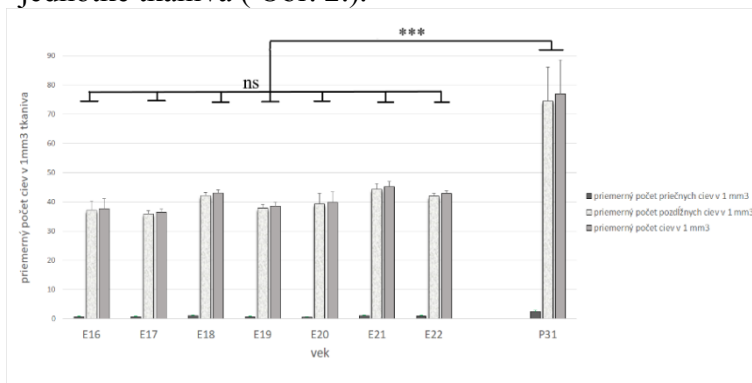
Na identifikáciu cievnej siete v mieche potkana sme v každom študovanom časovom intervale aplikovali imunofluorescenčné značenie markerov endotelových buniek (RECA-1), pericytov (CD31, NG2) a bazálnej laminy ciev (laminín). Imunofluorescenčný signál všetkých vyššie uvedených markerov sme identifikovali v cievach miechy v priebehu celého študovaného obdobia. V období medzi E16 – E17 formujú sa miechu pokrytá laminín⁺ *membrana limitans externa*. Sivá hmota miechy je tvorená denznou populáciou buniek, zatiaľ čo biela hmota miechy je formovaná v oblasti ventrálnych a laterálnych funikulov. Ventrikulárna zóna má vo ventro-dorzálnom smere podlhovastý tvar a je tvorená Nestin⁺ bunkami radiálnej glie s dlhým bazálnym výbežkom ukotveným v *membrana limitans externa* na povrchu miechy (Obr. 1.). V oblasti tzv. alárnych platničiek ventrikulárnej zóny je primitívny lúmen dilatovaný, zatiaľ čo v oblasti bazálnych platničiek sú bočné steny ventrikulárnej zóny v blízkej apozícii. Na stene ciev možno v tomto období identifikovať fluorescenčný signál laminínu, čo indikuje prítomnosť bazálnej laminy (Obr. 1.), ktorá sa v mieche myši zakladá v období medzi E15-E16 (Nakao a kol., 1988). Cievky vstupujúce do miechy na jej ventrálnom póle prebiehajú popri bunkách spodinovej platničky dorzálnym smerom pozdĺž ventrikulárnej zóny, pričom vo svojom priebehu vytvárajú vetvy, ktoré sa spájajú s cievami vstupujúcimi do miechy z jej laterálneho a dorzálneho povrchu. V oblasti ventro-laterálnej sivej hmoty miechy cievky vytvárajú cirkulárne prepojenia.



Obr. 1. Miecha potkana na E17. Laminín⁺ cievky (hlavičky šípok) prerastajú tkanivo miechy. Cievky vstupujúce popri spodinovej a klenbovej platničke prebiehajú pozdĺž ventrikulárnej zóny a vytvárajú vetvy, ktoré sa spájajú s cievami vstupujúcimi do miechy z jej laterálneho povrchu (hviezdčky). Nestin⁺ radiálna glia ukotvená do laminín⁺ laminy pokrývajúcej povrch miechy (biele šípky), PL – primitívny lúmen, ventrikulárna zóna - prerušovaná čiara, hranica sivej a bielej hmoty – plná čiara, mierka 100 μm .

V období medzi E18-E19 dochádza k formovaniu dorzálnych funikulov miechy. Bočné steny výstelky primitívneho lúmenu sú v blízkej apozícii, pričom lúmen podstupujúci transformáciu na centrálny kanál (Ševc a kol., 2009) je v centrálnej časti ventrikulárnej zóny mierne dilatovaný. V tomto období možno pozorovať výraznú vaskularizáciu v oblasti predných rohov miechy, kde cievky vytvárajú početné cirkulárne prepojenia. V období medzi E19 – E20 je výstelka primitívneho lumenu v oblasti alárnych platničiek redukovaná, pričom v oblasti bazálnych platničiek sú steny výstelky v tesnej apozícii a centrálny kanál je dorzálne mierne dilatovaný. V období medzi E21 – E22 miecha nadobúda svoj charakteristický tvar. V tomto období sú bunky alárnej platničky značne redukované a sivá hmota miechy je bohato vaskularizovaná. Guérit a kol. (2014) na základe vyhodnotenia počtu bodov vetvenia CD31⁺ ciev v tkanivových rezoch miechy uvádzajú, že denzita ciev v mieche myši počas neskorého embryonálneho obdobia narastá. Analýza laminín⁺ cievnej siete v z-stackoch miech potkana

nedokázala signifikantný nárast v počte cievnych vetiev v embryonálnom období, pričom signifikantný nárast počtu ciev nebol zaznamenaný ani pri vyjadrení ich denzity v objemovej jednotke tkaniva (Obr. 2.).



Obr. 2. Vaskularizácia miechy v embryonálnom a postnatálnom období. Analýza počtu laminin⁺ ciev v priebehu embryonálneho a postnatálneho obdobia odhalila, že v priebehu gliogénnej fázy nedochádza k výraznému nárastu počtu ciev v mieche potkana, no po narodení nastáva expanzia cievnej siete.

Počas embryonálneho obdobia sme v koronárnych rezoch miechy potkana pozorovali dominanciu pozdĺžnych vetiev ciev, ktoré sú orientované kolmo k dlhej osi miechy. Výrazne rozvinuté priečne vetvy ciev prebiehajúce paralelne s dlhou osou miechy sme nezaznamenali ani v jednom zo študovaných časových intervalov počas embryogenézy. Naproti tomu analýza vaskularizácie miechy u P31 potkana dokázala, že podobne, ako pri vaskularizácii mozgovej kôry (Bär, 1980), dochádza v období po narodení v mieche potkana k masívnemu rozvoju mikrovaskularizácie tkaniva. Pri porovnaní nameraných hodnôt celkového počtu ciev, ako aj hodnôt počtu pozdĺžne a priečne orientovaných vetiev ciev na P31 a embryonálnych intervalov sme v každej kategórii a v každom časovom intervale zaznamenali signifikantný rozdiel. Naše dáta naznačujú, že aj napriek dynamickým dejom spojeným s prebiehajúcou gliogénozou v mieche potkana v neskorom embryonálnom období dochádza k výraznému rozvoju vaskularizácie miechy až v období po narodení.

Experiment bol realizovaný s finančnou podporou grantov VEGA 1/0820/17 a APVV-15-0239.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bautch VL, James JM. Neurovascular development: The beginning of a beautiful friendship. *Cell Adh Migr.* 2009; 3.2:199–204.
- Bär T. The vascular system of the cerebral cortex. Berlin; New York : Springer-Verlag. 1980 vi, 62p.: ill.; 24 cm. ISBN 0387096523.
- Guérit S, et al. VEGF modulates synaptic activity in the developing spinal cord. *Dev Neurobiol.* 2014; 74(11):1110-1122.
- Hogan KA, et al. The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling Pathway. *Development.* 2004; 131:1503–1513.
- Kurz H, Korn J, Christ B. Morphogenesis of embryonic CNS vessels. *Cancer Treat Res.* 2004; 117:33–50.
- Nakao T, Akimitsu I, Ogawa R. Observations of the vascularization in the spinal cord of mouse embryos, with special reference to development of boundary membranes and perivascular spaces. *Anat. Rec.* 1988; 221:663–677.
- Paredes I, Himmels P, Ruiz de Almodovar C. Neurovascular Communication during CNS Development. 2018 *Dev Cell.* 9.45.1:10-32.
- Ševc J, Daxnerová Z, Miklošová M. Role of Radial Glia in Transformation of the Primitive Lumen to the Central Canal in the Developing Rat Spinal Cord. *Cell Mol Neurobiol.* 2009; 29:927–936.

Názov:

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2020

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XV. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2020

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 978-80-971428-6-5