

# **VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2021**

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

**XVI. ročník**

**Košice, 11. a 12. november 2021**

**Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný  
pamiatke akademika Bod'u  
11. a 12. november 2021  
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:**

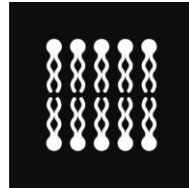
doc. MVDr. Radoslava Vlčková, PhD., UVLF v Košiciach  
MVDr. Jana Koščová, PhD., UVLF v Košiciach

**Organizačný a programový výbor:**

MVDr. Dušan Fabian, DrSc., ÚFHZ CBv SAV  
Prof. MVDr. Juraj Pistl, PhD., UVLF v Košiciach  
RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

*Neprešlo jazykovou úpravou*

**ISBN 978-80-972752-9-7**



CENTRUM  
**BIOVIED**  
SLOVENSKÁ  
AKADÉMIA VIED

## OBSAH

### MOLEKULÁRNE ZMENY ANGIOGENÉZY ŽENSKÝCH REPRODUKČNÝCH ORGÁNOV

Abrahamovská M., Klepcová Z., Toporcerová S., Rabadajová, M. ....7

### TESTOVANIE EFEKTÍVNOTI FEKÁLNEJ MIKROBIÁLNEJ TRANSPLANTÁCIE NA PRIEBEH AKÚTNEJ KOLITÍDY SLEDOVANEJ NA PREDKLINICKOM MODELI

Adamková P., Hradická P., Kupcová Skalníková H., Demečková V. ....10

### VPLYV MIKROVLNNÉHO ŽIARENIA NA ŠTRUKTÚRU A ULTRAŠTRUKTÚRU SEMENNÍKOV PRENATÁLNE OŽAROVANÝCH POTKANOV

Andrašková S., Almášiová V., Holovská K. ....13

### MULTIFUNKČNÉ RNA-DNA NANOČASTICE V PERSONALIZOVANEJ ONKOTERAPII

Bilá D., Panigaj M. ....16

### ÚLOHA HYPERICÍNU V MODULÁCI REZISTENTNÉHO FENOTYPU BOČNEJ POPULÁCIE ZA HYPOXICKÝCH PODMIENOK

Bul'ková V., Vargová J., Jendželovský R., Babinčák M., Roudnický P., Zdráhal Z., Fedoročko P. ....19

### ANTIHELMINTICKÁ TERAPIA FASCIOLÓZY U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Burcáková L., Königová A., Babják M., Urda Dolinská M., Komáromyová M., Várady M. ....22

### POROVNANIE ÚČINNOSTI HUMÁNNEHO DLE PO RÔZNYCH SPÔSOBOCH APLIKÁCIE U MYŠÍ S ALVEOLÁRNOU ECHINOKOKÓZOU

Ciglanová D., Jurčacková Z., Mudroňová D., Hrčková G. ....25

### REZISTENCIA VOČI ŤAŽKÝM KOVOM U FYLOGENETICKY A GEOGRAFICKY VZDIALENÝCH IZOLÁTOV *STREPTOMYCES* SPP.

Cimermanová M., Willner J., Saternus M., Pristaš P., Píknová M. ....28

### ŠTÚDIUM TERAPEUTICKÉHO EFEKTU MEZENCHYMÁLNYCH BUNIEK NA NIEKTORÉ CHOROBNÉ PROCESY KOSTÍ A KLBOV

Domaniža M., Trbolová A., Hluchý M., Čížková D. ....31

### BAKTERIOCÍNOVÝ POTENCIÁL FEKÁLNYCH KMEŇOV *ENTEROCOCCUS MUNDII* Z KONÍ

Focková V., Styková E., Maďar M., Kačírová J., Lauková A. ....34

### POROVNANIE DIAGNOSTICKEJ EFEKTÍVNOTI DVOCH ZOBRAZOVACÍCH METÓD PRI OCHORENIACH CHRBTICE

Fuchs J., Ledecký V., Kuricová M. ....37

### URČENIE VPLYVU KAROTICKEJ ENDARTEREKTÓMIE NA NAVODENIE ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE

Furman M., Mačáková L., Némethová M., Virág M., Sihotský V., Kopolovets I., Mucha R. ....40

### POTENCIÁL NANOČASTÍC CeO<sub>2</sub> PRE BIOAPLIKÁCIE

Garčárová I., Šipošová K., Shlapa Y., Belous A., Musatov A. ....43

### ANALÝZA VÝSKYTU CHRONICKEJ LAMINITÍDY V CHOVE DOJNÍC

Gomulec P., Mudroň P. ....47

### OVPLYVNENIE RASTU VYBRANÝCH KMEŇOV LAKTOBACILOV HUMÍNOVÝMI LÁTKAMI

Chomová N., Nemicová, R., Fečkaninová A., Koščová, J., Popelka P., Mudroňová D. ....50

### PROBIOTICKÝ POTENCIÁL BAKTÉRIÍ Z TRÁVIACEHO TRAKTU VČIEL

Ivorová S., Gul'ášová A., Kopčáková A. ....53

## **EKOLOGICKÉ ASPEKTY CIRKULÁCIE PŮVODCOV PARAZITÁRNÝCH OCHORENÍ V ŠPECIFICKÝCH PODMIENKACH TATRANSKÉHO NÁRODNÉHO PARKU**

Jászayová A., Režnarová J., Chovancová G., Luptáčík P., Kostygov A., Yurchenko V., Hurníková Z. .... 56

## **ÚČINOK ASTAXANTÍNU A JEHO ESTEROV NA LYMFOCYTY ZDRAVÝCH MYŠÍ *IN VITRO***

Jurčacková, Z., Ciglanová, D., Mačák Kubašková, T., Mudroňová, D., Hrkčková, G. .... 59

## **MIKRORNA PRI ŠTÚDIU NEPLODNOSTI**

Kalinová K., Abrahamovská M., Toporcerošová S., Křoc M., Špaková I., Mareková M., Rabajdová M. .... 62

## **ŠTANDARDIZÁCIA PROTOKOLU REPRODUKOVATELNEJ GENERÁCIE Z MONOCYTOV DERIVOVANÝCH DENDRITOVÝCH BUNIEK PRE ĎALŠIE *EX VIVO* VYUŽITIE**

Kiššová Z., Tkáčiková Ľ., Mudroňová D., Schusterová P., Link R. .... 65

## **DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL NEKÓDUJÚCICH RNA Z KULTIVAČNÉHO MÉDIA V PROCESE IVF**

Klepcová Z., Toporcerošová S., Křoc M., Šoltys K., Mareková M., Rabajdová M. .... 68

## **SYNANTROPNÉ VTÁKY AKO REZERVOÁRE GÉNOV VIRULENCIE TYPICKÝCH PRE EXTRAINTESTINÁLNE PATOGÉNNE *E. COLI***

Kocúreková T., Bujňáková D. .... 71

## **ANTIOXIDAČNÝ POTENCIÁL MEDICINÁLNYCH RASTLÍN *IN VITRO* A *IN VIVO***

Kucková K. .... 74

## **ERBB2 AMPLIKÓN V ŠTÚDIU NEPLODNOSTI**

Lamancová P., Urdzik P., Toporcerošová S., Kuncová B., Špaková I., Rabajdová M. .... 77

## **POTENCIÁL TRANSPLANTÁCIE FEKÁLNEJ MIKROBIOTY NA DSS-INDUKOVANÚ KOLITÍDU U PGF ANIMÁLNEHO MODELU**

Lauko S., Gancarčíková S., Hrkčková G., Hajdučková V., Kolesár Fecskeová L., Štrkolcová G., Marešová S., Ambro Ľ., Janičko M., Hijová E., Strojný L., Kvaková M., Kamlárová A., Guľašová Z., Maďar M., Nemcová R., Bertková I. .... 80

## **IZOLÁCIA A KVANTIFIKÁCIA EXOZÓMOV Z MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK Z PLODOVÝCH OBALOV**

Morávek M., Slovinská L., Špaková T., Matejová J., Janočková J., Rosocha J. .... 83

## **DIVERZITA BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z HALDY BÝVALEJ STRIEBORNEJ BANE V TARNOWSKIE GORY (POĽSKO) A ICH REZISTENCIA VOČI ŤAŽKÝM KOVOM A ANTIBIOTIKÁM**

Nosáľová L., Píknová M., Saternus M., Willner J., Pristaš P. .... 86

## **VPLYV PELETOVANÉHO VIČENCA VIKOLISTÉHO (*ONOBRYCHIS VICIIFOLIA*) NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A HEMATOLOGICKÝ PROFIL U JAHNIAT S HAEMONCHÓZOU**

Petrič D. .... 89

## **MORFOLOGICKÝ DŮKAZ NEURONÁLNEJ REGULÁCIE POSTNATÁLNEJ NEUROGENÉZY V ČUCHOVOM SYSTÉME POTKANA**

Popovičová, A., Fabianová, K., Martončíková, M., Raček, A., Račeková. .... 92

## **MECHANIZMY REGULÁCIE TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP V NÁDOROVÝCH BUNKÁCH OVPLYVNENÝCH HYPERICÍNOM**

Romanovová M., Jendželovská Z., Jendželovský R., Majerník M., Fedoročko P. .... 95

## **DISTRIBÚCIA A CHARAKTERIZÁCIA STAFYLOKOKOV KOLONIZUJÚCICH KOŽU KLINICKY ZDRAVÝCH PSOŤ**

Štempelová L. .... 98

<b>DOKÁŽE 3D FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA ODHALIŤ GYNEKOLOGICKÉ ZÁPALOVÉ OCHORENIE?</b>	
Švecová M., Lešová D., Dubayová K., Karabinoš A. ....	101
<b>BIODOSTUPNOSŤ STOPOVÝCH PRVKOV Z KŔMNYCH ADITÍV</b>	
Tokarčíková K. ....	104
<b>VPLYV PRAŽENIA NA OBSAH POLYFENOLOV, KOFEÍNU A AKRYLAMIDU V ZRNÁCH VÝBEROVEJ KÁVY</b>	
Várady M., Popelka P. ....	107
<b>MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY OPTIKOU DVOCH ROZLIČNÝCH METODICKÝCH PRÍSTUPOV</b>	
Večurkovská, I., Kaľuchová, J., Mašlanková, J., Stupák, M. ....	110

# MOLEKULÁRNE ZMENY ANGIOGENÉZY ŽENSKÝCH REPRODUKČNÝCH ORGÁNOV

Abrahamovská M.<sup>1</sup>, Klepcová Z.<sup>1</sup>, Toporcerová S.<sup>2</sup>, Rabajdová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta

<sup>2</sup>Gynekologicko-pôrodná klinika, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta

## ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo identifikovať molekuly bielkovín v ženskom sére ako dôležité podporné prediktívne biomarkery biologickej pripravenosti žien na transfer embrya do maternice v *in vitro* fertilizačnom procese (IVF). Štúdia identifikovala 4 proteíny, ktoré prognosticky určujú pripravenosť žien na prenos embryí s presnosťou predikcie 70%, pričom predikujú úspešnosť IVF procesu. Za posledných 5 rokov sa zlyhanie implantácie takmer nemení, pohybuje sa pod hranicou 29% úspešne implantovaných embryí. Súčasné štúdie o non-perceptívnom endometriu dospeli k záveru, že nesprávna expresia určitých biomolekúl vedie k poruchám vnímania endometria. V implantačnom okne dochádza k posunu, alebo v horšom prípade k jeho zániku a tým aj nepripravenosti matky na prenos embryí. Do štúdie boli zaradené ženy (n = 263), ktoré boli zahrnuté do procesu IVF. Z toho u 129 pacientok IVF proces zlyhal. Úspech IVF bol hodnotený u 134 pacientok, u ktorých bola hladina hCG zaznamenaná viac ako 30 IU/l deň 10 po prenose blastocysty, deň 11 po prenose zhutnenej moruly. U týchto pacientok bola v deň prenosu embrya detegovaná expresia 15 proteínov metódou ELISA. K spracovaniu získaných dát bola využitá bioinformatická analýza a metódy strojového učenia. Hlavným výsledkom štúdie je konkrétna identifikácia molekúl s významnými rozdielmi v jednotlivých skupinách pacientok v proteíne Angiopoietin 1 so S (štatistické) 3,376, p-hodnota 0,003, v proteíne Notch 3 so S (štatistickým) 2,721, p-hodnotovým 0,012 a v proteíne NRF2 s negatívnou hodnotou S -2,669, p-hodnota 0,014. Doteraz neexistujú žiadne špecifické materské sérové angio molekuly, ktoré by bolo možné použiť na predpovedanie úspechu IVF.

## ÚVOD

Angiogenéza je definovaná ako novotvorba ciev z už existujúcich ciev. U dospelého človeka sa vyskytuje pri patologických stavoch (ako napr: artritída, diabetická retinopatia, svalová hypertrofia, chronický zápal, hojenie rán, rast solídnych tumorov) alebo pri klinických zmenách v ženskom reprodukčnom systéme (Zambuto a kol., 2019). Najnižšia angiogénna aktivita bola pozorovaná v neskoršej proliferáčnej fáze menštruačného cyklu (Karizbodagh a kol., 2017). V regulácii angiogenézy a zabezpečení fyziologických procesov v organizme zohráva dôležitú úlohu rovnováha medzi pro-angiogénnymi faktormi (VEGF, FGF, HIF- $\alpha$ , PDGF, IL-8, Angiopoetin-1, TGF- $\alpha$ , $\beta$ , atď.) a inhibítormi angiogenézy (Angiostatin, Trombospondín, Endostatin, Prolaktin, Vasostatin, TIMPs, atď.) (Berger a kol., 2020). Pre vytvorenie vnímavého endometria je okrem iného nevyhnutný aj vývoj vaskulatury v endometriu. Existujú početné signálne dráhy a molekuly, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu pri implantácii.

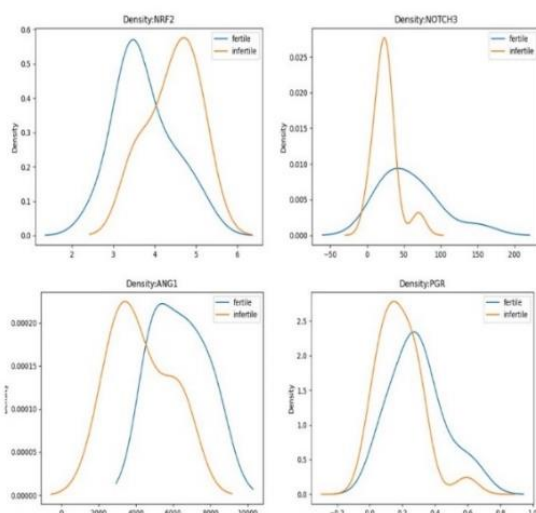
## MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie boli zaradené ženy (n = 263), ktoré boli zahrnuté do procesu IVF. V experimentálnej skupine 129 (49,05%) pacientiek IVF proces zlyhal (potvrdená negativita séra hCG 10. deň po prenose blastocysty, 11. deň po prenose zhutnenej moruly). Úspech IVF bol hodnotený v druhej experimentálnej skupine, u 134 (49,05%) pacientiek, u ktorých bola hladina hCG zaznamenaná viac ako 30 IU/l deň 10 po prenose blastocysty, deň 11 po prenose zhutnenej moruly. V sére pacientiek bola v deň prenosu embrya detegovaná expresia 15 proteínov metódou ELISA. Krv bola odobratá do skúmavky BD Vacutainer s aktivátorom na báze trombínu. Skúmavka bola centrifugovaná pri 3500 rpm 3 minúty pri laboratórnej teplote a odobraté séra boli uskladnené pri -70 °C. Na kvantitatívne enzymaticko-imunologické stanovenie proteínov bola použitá ELISA metóda na základe využitia komerčne dostupných

diagnostických kitov, a to Angiopoietin 1 (ANG1) (abcam), Endoglin (CD105) (abcam), ERBB2 (abcam), Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) (MyBioSource), Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) (MyBioSource), Human FSHR (MyBioSource), Human Growth Factor Receptor Bound Protein 7 (GRB7) (MyBioSource), Human Zinc Finger Protein Aiolos (IKZF3) (MyBioSource), Migration And Invasion Enhancer 1 (MIEN1) (MyBioSource), PLGF (abcam), Human progesterone receptor (PGR) (MyBioSource), TGF beta 1 (abcam), VEGF (abcam), Human COUP Transcription Factor 2 (NR2F2) (MyBioSource), Human Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 3 (NOTCH3) (MyBioSource). Detekcia bola uskutočnená readrom Synergy H4. Pri vyhodnocovaní výsledkov bola vytvorená štandardná krivka závislosti priemerných hodnôt absorbancie od koncentrácie štandardov. Príslušné koncentrácie sledovaných proteínov, boli štatisticky vyhodnotené po zohľadnení riediaceho faktora. Získané údaje boli spracované voľne dostupnými bioinformatickými nástrojmi a strojovým učením. Pre metódy s rôznymi modelmi bolo vybraných niekoľko prediktívnych biomarkerov a špecifické prognosticko-prediktívne molekuly. Na základe analýzy údajov o expresii jednotlivých proteínov pomocou strojového učenia pomocou Random Forest Classifier, Support Vector Machine, K Nearest Neighbors klasifier a GausnanNB Classifier models, angiopetin 1, Notch3, NRF2 a PGR boli vybrané ako prediktívne biomarkery určenia úspešného výsledku IVF procesu - alebo zlyhania v procese IVF.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na určenie presnosti každého modelu boli použité ukazovatele presnosti, vybavenosti a skóre F1. Klasifikátor KNN potvrdil prediktívnu funkciu vybraných proteínov vo vzťahu k predikcii úspechu IVF a teda pripravenosti žien s presnosťou 71% a klasifikátor GausnanNB potvrdil predikciu s presnosťou 70%. Hlavnými výsledkami štúdií sú konkrétne identifikácia molekúl s významnými rozdielmi u jednotlivých pacientov v proteíne Angiopoietin 1 so S (statistic) 3, 376, p-hodnota 0,003, v proteíne Notch 3 so S (statistic) 2, 721 a hodnotou p-value 0,012 a v proteíne NRF2 s negatívnou hodnotou S -2, 669. Z analyzovaných proteínov štatistickú významnosť vykazovali proteíny ANG1, PGR, NOTCH3 a NRF, ktoré hrajú dôležitú úlohu v angiogénnych procesoch v endometriu (Tab. 1).



Obr. 1. Graf distribúcie denzity údajov v experimentálnych skupinách

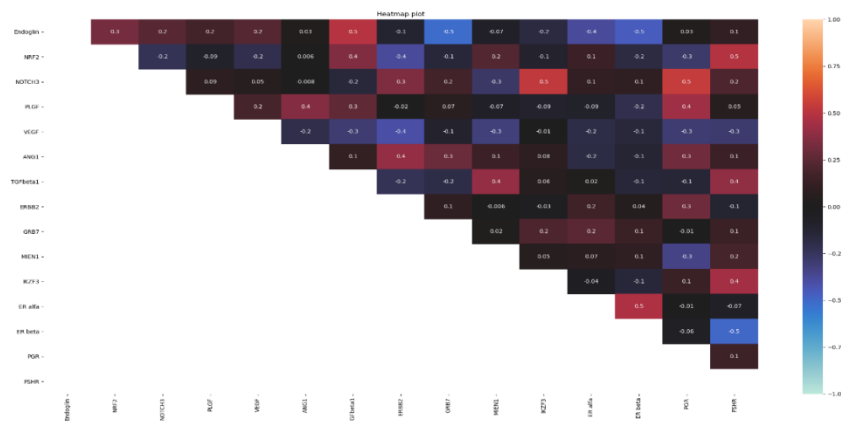
Tab. 1. Štatisticky významné proteíny

Protein	Statistics (S)	p-value
Endoglin	0,686	0,494
<b>NRF2</b>	<b>-2,669</b>	<b>0,014</b>
<b>NOTCH3</b>	<b>2,721</b>	<b>0,012</b>
PLGF	1,721	0,089
VEGF	0,015	0,988
<b>ANG1</b>	<b>3,376</b>	<b>0,003</b>
TGFbeta1	-0,456	0,653
ERBB2	1,231	0,222
GRB7	0,022	0,982
MIEN1	0,795	0,431
IKZF3	0,272	0,787
ER alfa	-0,091	0,928
ER beta	-0,863	0,394
<b>PGR</b>	<b>2,327</b>	<b>0,025</b>
FSHR	1,07	0,291

Na potvrdenie významnosti rozdielov medzi skupinami pacientiek s úspešným versus neúspešným výsledkom IVF bol použitý test zobrazenia denzity údajov (Obr.1). Charakterizácia vybraných



proteínov (Ang-1, Notch3, NRF2 a PGR) naznačuje významné zmeny v skupinách v expresii jednotlivých proteínov, čo indikuje ich význam ako prediktívno-prognostických biomarkerov vo vzťahu k úspešnému uchyteniu embrya, kvôli ich zásadným úlohám v angiogénnych signálnych dráhach endometria matrice. Pri charakterizácii vzájomných korelačných interakcií proteínov, pomocou Pearsonovho korelačného koeficientu (PMCC *product-moment correlation coefficient*), boli medzi angiogénnymi markermi identifikované nevýznamné korelácie, ktoré sú zobrazené na obrázku č.2. Slabo pozitívny korelačný vzťah bol zaznamenaný medzi expresiou endoglinu a TGF  $\beta$  (PMCC 0,5), rovnako ako aj slabo pozitívny korelačný vzťah medzi hladinou expresie Notch3 a PGR (PMCC 0,5) ako aj korelačné vzťahy receptorov pre estrogén  $ERR\alpha$  a  $ERR\beta$  (PMCC 0,5). Tieto výsledky korelujú s tvrdením, že angiogénna aktivita je zásadná pre receptivitu endometria a úspešnú implantáciu embra v *in vitro* fertilizačnom procese. Progesterón stimuluje angiogénu endometria, ako aj maturáciu ciev prostredníctvom progesterónového receptora (PGR), cez stimuláciu buniek hladkého svalstva ciev, z ktorých je exprimovaný proangiogénny faktor Angiopoetin 1 (Ang-1) (Karizbodagh a kol., 2017). Dysregulované signálne molekuly Notch počas obdobia implantácie môžu byť spojené s obtiažnou, neúspešnou implantáciou a s patologickými stavmi pozorovanými pri ochoreniach endometria (Zeinab a kol., 2019). NRF2F má špecifickú úlohu pri adhézii, angiogéne, inflamácii, lymfagenéze ako aj v metabolizme rôznych ochorení. Taktiež reguluje gény, ktoré sú zodpovedné za progresiu endometriózy matrice (Yilmaz a Bulun, 2019). Táto neintervenčná štúdia bola schválená etickou komisiou košického samosprávneho kraja 24.4.2018 ako aj Etickou komisiou UNLP v Košiciach.



Obr. 2. Korelačné vzťahy a interakcie expresie proteínových biomarkerov angiogézy uteru

Získané údaje je potrebné validovať v rozsiahlejšej štúdiu na väčšom počte pacientok. Študované proteíny môžu byť v budúcnosti využité v iných formách diagnostických testov a nových testoch predikcie úspešnosti, respektíve zlyhania IVF procesu. Rovnako ich je možné inkorporovať ako potencionálne biomarkery hodnotenia predikcie biologickej pripravenosti žien na prenos embryí do matrice.

Práca bola podporovaná z projektu VEGA 1/0873/18, VEGA 1/0620/19 a VEGA 1/0540/2021

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Berger A, Dao F, Levine DA. Angiogenesis in endometrial carcinoma: Therapies and biomarkers, current options, and future perspectives. *Gynecologic Oncology*. 2020
- Karizbodagh MP, et al. Implantation Window and Angiogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2017; 118(12): 4141–4151.
- Zambuto SG, Clancy KB, Harley BA. A gelatin hydrogel to study endometrial angiogenesis and trophoblast invasion. *Interface Focus*. 2017; 9(5): 20190016.
- Zeinab L, a kol. Dual Role of TGF- $\beta$  in Early Pregnancy: Clues From Tumor Progression. *Biology of reproduction*, 2019; 100(6): 1417-1430.

# TESTOVANIE EFEKTÍVNOSTI FEKÁLNEJ MIKROBIÁLNEJ TRANSPLANTÁCIE NA PRIEBEH AKÚTNEJ KOLITÍDY SLEDOVANEJ NA PREDKLINICKOM MODELI

Adamková P.<sup>1</sup>, Hradická P.<sup>1</sup>, Kupcová Skalníková H.<sup>2</sup>, Demečková V.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, Liběchov, Česká republika

## ABSTRAKT

Zmeny v črevnom mikrobiálnom zložení sa podieľajú na rôznych patológiách, vrátane zápalového ochorenia čriev (IBD). Transplantácia fekálnej mikrobioty (FMT) predstavuje sľubný prístup pri liečbe IBD, pomocou ktorého je možné zvrátiť zmeny v mikrobióme a obnoviť črevnú homeostázu. Z dôvodu čo najbližšie imitovať situáciu v klinickej praxi, sme sa s cieľom zachovať druhovú komplementaritu podávaného transplantátu, rozhodli preskúmať vplyv potkanieho fekálneho transplantátu na priebeh akútnej ulceróznej kolitídy (UK) indukovanej na modeli potkana. Naša štúdia preukázala významné zmeny v druhovom zastúpení mikrobioty pri zápalových stavoch v organizme po indukcii kolitídy a evidentný prospešný účinok testovaného transplantátu na črevné mikrobiálne zloženie. Tieto mikrobiálne zmeny u potkanov po podávaní FMT viedli súčasne k relatívnej obnove dĺžky hrubého čreva a signifikantnému poklesu závažnosti ochorenia, čo sa odrazilo na významne nižšom skóre zdravotného stavu, ako aj na nižších hladinách zápalových chemokínov v črevnom tkanive. Pretože terapeutiká cielené na moduláciu črevného ekosystému predstavujú v súčasnosti veľmi sľubnú stratégiu v prevencii/terapii IBD, cieľom tejto štúdie bolo otestovať vhodnosť chemicky indukovaného potkanieho modelu akútnej kolitídy pre predklinické analýzy mikrobiálnej dysbiózy a následnej terapie prostredníctvom FMT.

## ÚVOD

Zápalové ochorenia čriev predstavujú chronické zápalové poruchy gastrointestinálneho traktu (GIT), ktoré sú najčastejšie diagnostikované v období dospievania a mladej dospelosti (Rosen a kol., 2015). Rastúca frekvencia tohto ochorenia sa vyskytuje na celom svete, pričom pribúda hlavne v detskej populácii a v rozvojových krajinách. Dôvody zvýšenej frekvencie v priemyselných krajinách sú pravdepodobne multifaktorálne a medzi možné príčiny vedúce k nárastu výskytu IBD sa radí zvýšené užívanie antibiotík a znížené vystavovanie parazitom a iným pôvodcom infekcií. IBD je spôsobené dysreguláciou slizničnej imunitnej odpovede na črevnú mikrobiotu u jedincov s genetickou predispozíciou. Cieľom liečby je odstránenie príznakov, normalizácia kvality života a prevencia komplikácii pri minimalizácii nepriaznivých účinkov (Rosen a kol., 2015). Za úspešný alternatívny terapeutický prístup sa považuje FMT, ktorá je definovaná ako prenos fekálneho materiálu od zdravého darcu do GIT príjemcu, za účelom rýchlej obnovy normálnej funkcie a zloženia črevnej mikrobioty (Shen a kol., 2018). FMT je v súčasnosti odporúčaná v klinickej praxi len na liečbu rekurentnej infekcie spôsobenej *Clostridioides difficile* (CDI) (Bibbò a kol., 2020). Predpokladá sa, že táto terapia sa môže použiť aj pri liečbe obezity, sklerózy multiplex, autizmu či IBD. Aj keď sa v klinickej praxi FMT ukázala ako vysoko úspešná pri liečbe CDI, s mierou vyliečenia až 90% (Quraishi a kol., 2017), klinická odpoveď FMT u pacientov s IBD preukázala mieru vyliečenia len 24 až 50% (Colman a Rubin, 2014). Niektoré štúdie navyše uviedli aj zhoršenie aktivity IBD u pacientov po FMT (Qazi a kol., 2017). Rozdiely v klinickej odpovedi na FMT môžu byť spôsobené tým, že CDI je spôsobená klostridiálnou infekciou, zatiaľ čo IBD je komplexná, mikrobiómom riadená imunologická zápalová porucha, ktorá sa prejavuje prevažne v črevnej stene geneticky citlivých hostiteľov. Variabilita odozvy FMT môže byť tiež dôsledkom rozdielov v zložení mikrobioty medzi darcami a príjemcami z dôvodu odlišnej stravy a prostredia. Pretože terapeutiká cielené na moduláciu črevného ekosystému predstavujú v súčasnosti veľmi sľubnú stratégiu v prevencii/terapii ochorenia IBD, vhodne

zvolené experimentálne modely IBD môžu významne napomôcť lepšie pochopiť mechanizmus spojitosti črevnej mikrobioty s patogenézou IBD.

## MATERIÁL A METODIKA

Samce potkanov kmeňa Sprague Dawley (SD) vo veku 5 týždňov boli rozdelené do 3 skupín: skupina DSS (n=16), FMT (n=16) a kontrolná skupina INT (n=6). Zvieratám zo skupiny DSS a FMT bola indukovaná akútna forma kolitídy 5%-ným dextrán sulfátom sodným (DSS) p.o. po dobu 7 dní. Po skončení indukcie UK bolo skupine FMT orálne podávaných 200 µl potkanieho fekálneho transplantátu po dobu 5 dní. Na prípravu FMT bola použitá fekálna vzorka od zdravých potkanov, ktorí podstúpili skriningové testy krvi a stolice podľa určených kritérií. Denne sa okrem kontroly ich zdravotného stavu zaznamenávala aj spotreba potravy a DSS a hmotnosť zvierat. Vzorky trusu boli odoberané v období pred a po podaní DSS a po FMT terapii. Potkany boli usmrtené po 12 dňoch experimentu, následne bola odmeraná dĺžka čreva a časť tkaniva bola odobraná pre stanovenie hladín chemokínov (Luminex® 100/200™, USA). Zloženie mikrobiómu vo fekálnych vzorkách bolo analyzované metódou NGS (Novogene, UK). Všetky štatistické analýzy boli uskutočnené pomocou softvéru Minitab verzia 16 (Minitab Inc., 2013, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Medzi skupinami DSS a FMT nebol pozorovaný štatisticky významný rozdiel v celkovom prírastku hmotnosti ani v efektívnosti využitia potravy. V skupinách s podaným DSS, aj napriek nesignifikantnému zvýšeniu príjmu potravy, zvieratá vykazovali nižší prírastok hmotnosti v porovnaní so zdravou kontrolnou skupinou. Pri UK je prítomné skrakovanie hrubého čreva, ku ktorému dochádza vplyvom pôsobenia zápalu. Dĺžka čreva sa z tohto dôvodu môže považovať za nepriamy marker zápalu, ktorý je prítomný v hrubom čreve (Lavi a kol., 2010). V našom experimente bolo preukázané, že podávanie FMT malo pozitívny účinok na skrakovanie hrubého čreva. Sledovanie hladín chemokínov v tkanive hrubého čreva preukázalo zvýšené hladiny MCP-1 a 3 a RANTES v skupine bez podania FMT (Tab. 1), ktoré sú tiež prítomné v mukózných tkanivách hrubého čreva u pacientov s UK, ale aj v experimentálnych modeloch kolitídy a sú považované za markery aktívnej UK. Zníženie chemokínov MCP-1 a 3, GRO $\alpha$  a RANTES v skupine s podaným FMT preto mohlo prispieť k zlepšeniu priebehu ochorenia.

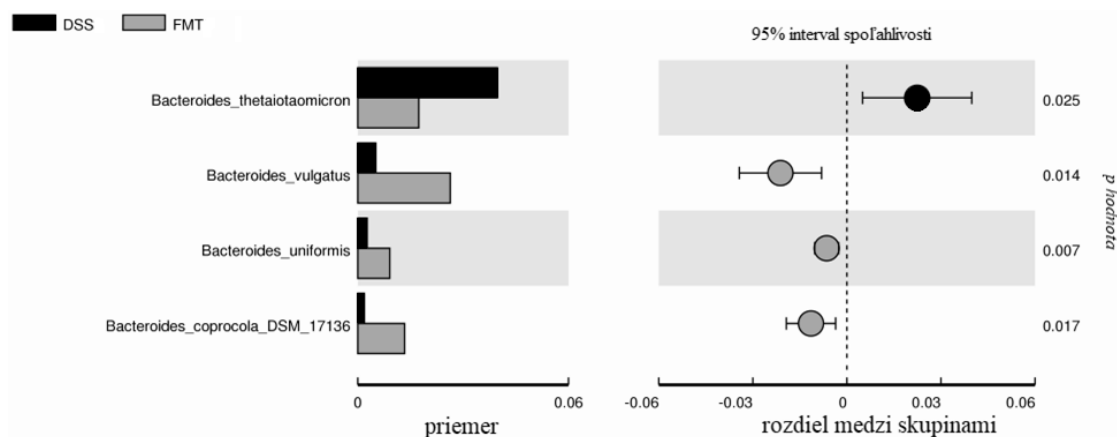
Tab. 1. Hladiny chemokínov v tkanive hrubého čreva

skupiny	chemokíny (pg/mg celkového proteínu tkaniva)			
	GRO $\alpha$	MCP-1	MCP-3	RANTES
DSS	112,70 $\pm$ 31,50 <sup>a</sup>	119,60 $\pm$ 19,50 <sup>a</sup>	25,64 $\pm$ 5,10 <sup>a</sup>	48,51 $\pm$ 4,46 <sup>a</sup>
FMT	57,20 $\pm$ 11,80 <sup>ab</sup>	92,90 $\pm$ 19,70 <sup>ab</sup>	17,63 $\pm$ 2,13 <sup>ab</sup>	31,66 $\pm$ 7,55 <sup>ab</sup>
INT	3,22 $\pm$ 1,15 <sup>b</sup>	23,31 $\pm$ 3,02 <sup>b</sup>	8,37 $\pm$ 0,62 <sup>b</sup>	16,07 $\pm$ 5,76 <sup>b</sup>

Hodnoty v tabuľke sú vyjadrené ako priemer  $\pm$  SEM. Štatistická významnosť je určená rôznymi znakmi v hornom indexe, kde  $p < 0,05$  (a,b). Údaje, medzi ktorými nie je štatistická významnosť sú vyjadrené rovnakými znakmi. GRO $\alpha$  – rastovo regulovaný onkogén alfa; MCP-1 – monocytový chemoatraktantový proteín 1; MCP-3 – monocytový chemoatraktantový proteín 3.

*Bacteroides thetaiotaomicron*, ktorý patrí do rodu *Bacteroides*, môže prispieť k patogenéze ľudskej IBD a aj experimentálnej kolitíde indukovanej na myšiach (Hansen a kol., 2012). Vo fekálnej vzorke sme po liečbe FMT pozorovali výrazne znížené hladiny tejto baktérie oproti neliečenej skupine DSS. *B. vulgatus* a rovnako *B. uniformis* sa vyskytuje u zdravých pacientov vo zvýšenej miere. Hodnoty *B. vulgatus* sú významne znížené u pacientov s aktívnou kolitídou. *B. vulgatus* môže tiež chrániť pred kolitídou spojenou s výskytom *Escherichia coli* (Noor a kol.,

2010). Tieto zistenia potvrdzuje aj naša štúdia, ktorá preukázala zvýšené hladiny *B. vulgatus* a *B. uniformis* po liečbe FMT.



**Obr. 1. Signifikantné rozdiely v zastúpení vybraných bakteriálnych druhov vo vzorkách trusu potkanov v deň ukončenia experimentu (T-test). DSS – kolitída vyvolaná dextrán sulfátom sodným; FMT – kolitída vyvolaná dextrán sulfátom sodným a liečená FMT**

Naše výsledky demonštrujú, že FMT je schopná zlepšiť celkový zdravotný stav zvierat a pozitívne ovplyvniť črevný imunitný systém, čím predstavuje sľubný terapeutický prístup v liečbe aktívnej UK. Štúdia potvrdzuje vhodnosť tohto modelu nielen pre štúdium ulceróznej kolitídy, ale aj pre výskum dysbiotických stavov a navrátenia normobiózy. Avšak na pochopenie všetkých účinkov FMT je nevyhnutné uskutočniť viac *in vivo* experimentov pre objasnenie kľúčových mechanizmov, ktorými FMT pozitívne vplýva na priebeh ochorenia.

Práca bola podporená projektom APVV-16-0176. Experiment bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (č. schválenia: Ro-1222-3/2020-220).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bibbò S., et al. Fecal microbiota transplantation: screening and selection to choose the optimal donor. *Journal of clinical medicine*. 2020; 9.6:1757.
- Colman R.J., and Rubin D.T. Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *J Crohns Colitis*. 2014; 8:1569–1581.
- Hansen J. J., et al. The colitis-associated transcriptional profile of commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* enhances adaptive immune responses to a bacterial antigen. *PloS one*. 2012; 7.8:e42645.
- Lavi I., et al. Orally administered glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* reduce acute inflammation in dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *British journal of nutrition*. 2010; 103.3:393-402.
- Noor S. O., et al. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC gastroenterology*. 2010; 10.1:1-9.
- Qazi T., et al. The risk of inflammatory bowel disease flares after fecal microbiota transplantation: Systematic review and meta-analysis. *Gut Microbes*. 2017; 8:574–588.
- Quraishi M.N., et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017; 46:479–493.
- Rosen M. J.; et al. Inflammatory bowel disease in children and adolescents. *JAMA pediatrics*. 2015; 169.11:1053-1060.
- Shen Z-H., et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World journal of gastroenterology*. 2018; 24.1:5.

# VPLYV MIKROVLNNÉHO ŽIARENIA NA ŠTRUKTÚRU A ULTRAŠTRUKTÚRU SEMENNÍKOV PRENATÁLNE OŽAROVANÝCH POTKANOV

Andrašková S., Almášiová V., Holovská K.

*Katedra morfológických disciplín, UVLF, Košice*

## ABSTRAKT

Rádiofrekvenčné žiarenie (100 kHz - 300 GHz) je súčasťou elektromagnetického spektra a hoci je klasifikované ako "neionizujúce" žiarenie, početné výskumy poukazujú na mnohé s ním spojené zdravotné riziká. Cieľom našej experimentálnej práce bolo sledovať morfológické zmeny tkaniva semenníkov peripubertálnych potkanov po ich prenatalnej expozícii neionizujúcim mikrovlnným žiarením. Gravidné samice potkanov boli celotelovo vystavené pulznému mikrovlnnému žiareniu s frekvenciou 2.45 GHz a výkonovou hustotou  $2.8 \text{ mW/cm}^2$  dve hodiny denne počas celej dĺžky gravidity. V tejto štúdií sme následne použili samčie potomstvo potkanov vo veku 5 týždňov. Vzorky tkaniva semenníkov kontrolných a experimentálnych zvierat boli spracované pre svetelnú a transmisnú elektrónovú mikroskopiu a následne podrobené histopatologickému vyšetreniu a morfometrickej analýze vybraných parametrov. Výsledky preukázali nepriaznivý účinok mikrovlnného žiarenia na testikulárny vývoj, ktorý sa prejavil zmenami v štruktúre a ultraštruktúre semenníkov v skupine "in utero" exponovaných potkanov.

## ÚVOD

Prudký nárast používania bezdrôtových technológií a zariadení v súčasnej modernej dobe vyvoláva obavy z možných zdravotných rizík. Tie sú spájané hlavne s dlhodobou expozíciou neionizujúcemu elektromagnetickému žiareniu, ktoré je v poslednej dobe predmetom záujmu mnohých vedeckých štúdií. Osobitnou, doposiaľ málo študovanou kategóriou je vplyv mikrovlnného žiarenia na vyvíjajúce sa plody a novorodencov. Prenatálne obdobie je z dôvodu rýchlej proliferácie a diferenciácie tkanív považované za extrémne citlivé na mnohé environmentálne faktory (Dietert a Piepenbrink, 2008). Vďaka svojej organizačnej zložitosti je vývoj samčích reprodukčných orgánov obzvlášť náchylný na poškodenie vyvolané neionizujúcim žiarením (Hanci a kol., 2013). Rozsiahle–elektromagnetické znečistenie tak môže mať určitý súvis s narastajúcimi prípadmi čiastočnej alebo úplnej infertility u mužov v reprodukčnom veku (Agarwal a kol., 2008; Deepinder a kol., 2007). V našej práci sme na celulárnej a subcelulárnej úrovni študovali morfológický obraz tkaniva semenníkov u 5-týždňových samcov potkanov vystavených pulznému mikrovlnnému žiareniu v priebehu ich celého intrauterinného vývoja.

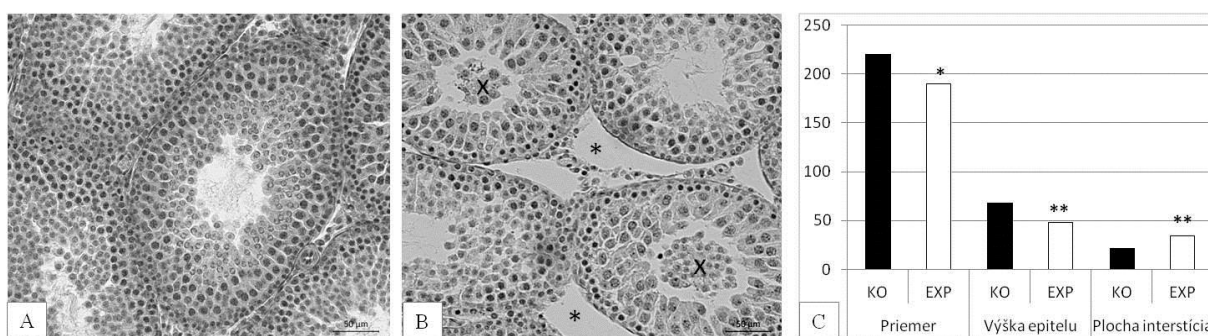
## MATERIÁL A METODIKA

Gravidné samice potkanov (*Wistar albino*) boli rozdelené do dvoch skupín. Experimentálnu skupinu sme vystavili mikrovlnnému pulznému žiareniu s frekvenciou 2,45 GHz a s priemernou výkonovou hustotou  $2,8 \text{ mW/cm}^2$  dve hodiny denne počas celej dĺžky gravidity. Kontrolné gravidné samice sme držali za rovnakých podmienok v klietkach s voľným pohybom, prístupom k vode a potrave, avšak bez aplikácie žiarenia. Po narodení sme potomstvo samčieho pohlavia nechali prežívať 5 týždňov. Po usmrtení boli odobraté vzorky tkaniva semenníkov experimentálnym potkanom (EXP; n=6) ako aj potkanom v kontrolnej skupine (KO; n= 6). Pre účely svetelnej mikroskopie boli vzorky ( $0,5 \text{ cm}^3$ ) fixované v mDF médiu (Modified Davison's fluid médium) a zaliate do paraplastu. Následne z nich boli zhotovené cca  $5 \mu\text{m}$  hrubé rezy a ofarbené hematoxilín – eozínom (H&E). Histopatologické zmeny boli vyhodnotené a zdokumentované svetelným mikroskopom Zeiss Axio Lab A1 s digitálnym zariadením Axio Cam ICc 5. Morfometrické parametre ako sú priemer semenotvorných kanálikov, výška semenotvorného epitelu a plocha interstícia boli štatisticky

vyhodnotené pomocou párového t-testu a dáta boli vyjadrené ako priemer  $\pm$ SD. Pre účely transmisnej elektrónovej mikroskopie boli odobraté vzorky semenníka ( $1 \text{ mm}^3$ ) fixované v 3% glutaraldehyde a postfixované 1%  $\text{OsO}_4$ . Následne boli odvodnené v acetóne a zaliate do Durkupanu. Ultratenké rezy boli kontrastované a zdokumentované pomocou elektrónového mikroskopu Tesla BS 500.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V kontrolnej skupine potkanov bola štruktúra a ultraštruktúra tkaniva semenníkov zachovaná a charakteristická pre peripubertálne obdobie. S nástupom spermatogenézy dochádzalo k nárastu výšky semenotvorného epitelu a zväčšovaniu priemeru semenotvorných kanálikov. Podlhovasté spermatídy v tomto štádiu vývoja semenníkov boli prítomné len ojedinele (Obr. 1A). V experimentálnej skupine bol tvar semenníkov nepravidelný a v ich lúmene boli často prítomné masy odlúpnutých nezrelých foriem zárodočných buniek. V semenotvornom epiteli bolo možné pozorovať výrazné sektorové straty zárodočných buniek a ojedinelý výskyt gigantických mnohjadrových buniek. Plocha intersticiálneho väziva bola v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat výrazne zväčšená (Obr. 1B). Intersticiálne Leydigove bunky mali na úrovni svetelnej mikroskopie relatívne zachovanú štruktúru. Morfometrická analýza v skupine exponovaných zvierat odhalila zmenšený priemer semenotvorných kanálikov ( $p < 0,05$ ); signifikantne zníženú výšku semenotvorného epitelu ( $p < 0,01$ ), a výrazné rozšírenie plochy interstícia ( $p < 0,01$ ) v porovnaní s kontrolnou skupinou potkanov (Obr. 1C). Na úrovni elektrónovej mikroskopie vykazovala bazálna membrána semenotvorných kanálikov experimentálnych zvierat na niektorých miestach nepravidelnosti a prítomnosť prázdnych elektrónlucentných priestorov. V rámci medzibunkových spojení boli medzi podpornými Sertolihovými bunkami a zárodočnými bunkami pozorované prerušenia a prázdne priestory. Cytoplazma Sertolihovych buniek často obsahovala elektrónlucentné vakuoly rôznej veľkosti, zvýšený počet lyzozómov a poškodených mitochondrií. Všetky štádiá zárodočných buniek semenotvorného epitelu vykazovali vakuolizovanú cytoplazmu a poškodené organely. Množstvo zárodočných buniek s výraznou elektónendenznou cytoplazmou, kondenzovaným jadrovým chromatínom a rozpadnutými organelami bolo početnejšie v experimentálnej skupine. Intersticiálne Leydigove bunky mali relatívne zachovaný tvar a štruktúru jadra, avšak cytoplazma obsahovala okrem zvýšeného počtu elektrónlucentných vakuol a tukových kvapôčok nižšie zastúpenie mitochondrií a agranulovaného endoplazmatického retikula.



**Obr.1.** Priečný rez nepoškodenými semenotvornými kanálikmi zdravého 5 týždňového potkana (A). (B) Semenník potkana prenatálne vystaveného mikrovlnnému žiareniu s odlúpnutými zárodočnými bunkami (x) a výrazne rozšíreným intersticiom (\*); 200x, H&E. (C) Porovnanie vybraných testikulárnych parametrov v kontrolnej (KO) a v experimentálnej skupine potkanov (EXP). Dáta sú vyjadrené ako priemer  $\pm$ SD; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$

Rádiofrekvenčné elektromagnetické žiarenie emitované z dnes veľmi populárnych bezdrôtových zariadení zostáva znepokojujúcou časťou elektromagnetického spektra v

dôsledku ich každodenného používania. Mnohé z nich pracujú na frekvencii 2,45 GHz a sú používané čoraz mladšou časťou populácie. Neionizujúce žiarenie v závislosti od fyzikálnych vlastností ovplyvňuje rôzne bunkové procesy ako je syntéza proteínov a transkripcia DNA (Del Re a kol., 2019), transport iónov cez cytoplazmatickú membránu a jej permeabilitu (Lange, 2000), zmeny v organizácii cytoskeletu (Glade a Tabony, 2005), ako aj zvýšenú produkciu voľných radikálov a ich následnú dlhodobú perzistenciu v tkanivách, čo môže viesť k oxidačnému stresu (Yurekli a kol., 2006). Túto štúdiu sme vykonali s cieľom vyhodnotiť účinky každodennej 2-hodinovej intrauterinnej expozície pulzným mikrovlnným žiarením na tkanivo semenníkov peripubertálnych potkanov. Nami pozorované morfológické zmeny v semenníkoch potkanov potvrdzujú, že tento typ žiarenia vplýva na jedinca nepriaznivo už počas jeho vnútro maternicového vývinu a môže negatívne ovplyvniť vývoj reprodukčného systému. Toto môže mať za následok narušenie nástupu prvej vlny spermatogenézy a ohroziť normálnu reprodukčnú schopnosť samcov v postnatálnom období. V dnešnej technologicky vyspelej dobe nie je možné úplne eliminovať vplyvy tohto typu žiarenia, avšak z dlhodobého hľadiska je nevyhnutné si uvedomiť s ním spájané zdravotné riziká a podľa možností obmedziť používanie týchto zariadení a technológií na čo najnižšiu možnú mieru.

Experiment bol uskutočnený na Neurobiologickom ústave, BMC, SAV v Košiciach. Pri manipulácii so zvieratami boli dodržané všetky zásady etiky podľa pravidiel Komisie na ochranu zvierat pri NbÚ SAV ako aj Štátnej veterinárnej správy SR (Ro. 2246/18-221/3).

*Práca bola podporená grantovým projektom VEGA č. 1/0060/18.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Agarwal A, et al. Effect of cell phone usage on semen analysis in men attending infertility clinic: a observational study. *Fertil Steril*. 2008; 89:124-8.
- Deepinder F, Makker K, Agarwal A. Cell phones and male infertility: dissecting the relationship. *Rep Bio Online*. 2007; 15:266-70.
- Del Re B, Bersani F, Giorgi G. Effect of Electromagnetic Field Exposure on the Transcription of Repetitive DNA Elements in Human Cells. *Electromagn Biol Med*. 2019; 38:262-70
- Dietert R, Piepenbrink M. The managed immune system: protecting the womb to delay the tomb. *Hum Exp Toxicol*. 2008; 27:129
- Glade N, Tabony J. Brief exposure to high magnetic fields determines microtubule self-organisation by reaction-diffusion processes. *Biophys Chem*. 2005; 115:29-35.
- Hanci H, et al. The effect of prenatal exposure to 900-MHz electromagnetic field on the 21-old-day rat testicle. *Rep Toxicol*. 2013; 42:203-9.
- Lange K. Microvillar ion channels. Cytoskeletal modulation of ion fluxes. *J Theor Biol*. 2000; 206:561-84.
- Yurekli AI, et al. GSM base station electromagnetic radiation and oxidative stress in rats. *Electromagn Biol Med*. 2006; 25:177-88.

# MULTIFUNKČNÉ RNA-DNA NANOČASTICE V PERSONALIZOVANEJ ONKOTERAPII

Bilá D., Panigaj M.

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

## ABSTRAKT

Cieľom predkladanej práce bola syntéza imunostimulačnej RNA (aptamér C19) a testovanie schopnosti reasociácie RNA-DNA hybridnej nanočastice v *in vitro* podmienkach. Syntéza RNA aptaméra C19 pozostávala z amplifikácie DNA templátu pomocou PCR reakcie a následnej *in vitro* transkripcie s použitím T7 RNA polymerázy. Kvalita a kvantita DNA/RNA produktov bola overená pomocou agarózovej a denaturačnej elektroforézy. Pre testovanie schopnosti reasociácie RNA-DNA hybridnej nanočastice boli jednotlivé zložky (aptamér, siRNA, DNA vlákna a protektor) zostavené v ekvimolárnom pomere a následne inkubované pri 37 °C. Pre vizualizáciu aktivity RNA-DNA nanočastice bola použitá natívna elektroforéza. Na základe výsledkov bolo možné pozorovať, že za prítomnosti protektora k reasociácii nanočastice nedochádza. Reasociácia nanočastice nebola detegovaná ani bez prítomnosti protektora a to pravdepodobne kvôli aptaméru, ktorý ostáva naviazaný na ssDNA. Z tohto dôvodu je nutná optimalizácia skladania nanočastice.

## ÚVOD

Neustály pokrok v oblasti onkomedicínskeho výskumu zlepšuje kvalitu diagnostiky a liečby nádorových ochorení. Významným terapeutickým problémom naďalej zostáva vysoká heterogenita nádorov (El-Sayes a kol., 2021). Jedným z možných terapeutických prístupov je použitie nukleových kyselín. Unikátne vlastnosti nukleových kyselín, akými sú vysoká úroveň biokompatibility a programovateľnosti, umožňujú tvorbu nanočastíc pre priamu, selektívnu a kombinovanú terapiu (Harrison a kol., 2018). Súčasný model je založený na rozdelení funkčných molekúl medzi dve funkčne závislé štruktúry, pričom pre opätovné zostavenie a uvoľnenie funkčných molekúl je potrebná iba ich vzájomná prítomnosť. Okrem súčasnej prítomnosti a fyzickej interakcie príbuzných párov nie je k funkčnej aktivácii potrebná žiadna iná molekula. Takáto aktivácia nie je špecifická a často vedie k nežiadúcim vedľajším účinkom (Chandler, Afonin, 2019). Vyššou úrovňou regulácie je aktivácia pomocou molekulárneho spúšťača (Zakrevsky a kol., 2017). Cieľom našej práce je testovanie takéhoto modelu funkčnej aktivácie. Naša nanočastica pozostáva z dvoch funkčne na sebe závislých DNA-RNA hybridov (Hybrid 1 a Hybrid 2). Súčasťou jedného z hybridných párov je komplementárne viazaný DNA oligonukleotid tzv. protektor, ktorý bráni akejkoľvek interakcii medzi hybridnými párami. K uvoľneniu protektora by malo dochádzať iba v prítomnosti špecifickej komplementárnej sekvencie, ktorá je súčasťou sekvencie mRNA asociovannej s nádorovým ochorením. Po uvoľnení protektora dôjde k reasociácii nanočastice a následne k odvinutiu hybridizovaných funkčných RNA. Pre tento model sme si za funkčné molekuly zvolili imunostimulačnú RNA a siRNA, ktoré sa zamerajú na odlišné molekuly s cieľom dosiahnuť synergický účinok. Použitie prístupu umlčania génov sprostredkovaného siRNA umožňuje zasiahnutie génov, ktoré sú dôležité pre rast a prežívanie nádorov (Bcl-2, Axl, SMG, survivín, Myc, STAT3). Stimulácia bunkových receptorov rozpoznávajúcich nukleové kyseliny je jednou z nových stratégií, ktorá vedie k indukcii vrodenej imunitnej odpovede (Iurescia, a kol., 2018). Pre náš experiment sme si zvolili ako cieľový receptor cytosolický senzor RIG-I, ktorý rozpoznáva krátku dvojláknovú RNA s tupými koncami a jednoláknovú RNA s trifosfátom na 5'-konci. Po jeho aktivácii dochádza k spusteniu kaskády signálnych dráh vedúcich k zvýšenej expresii génov vyvolávajúcich imunitnú odpoveď (Yoneyama a kol., 2004). Mnohé štúdie poukazujú na potenciál RIG-I receptora ako vhodného terapeutického cieľa. Bolo potvrdené, že inhibíciou aktivity RIG-I dochádza k zvýšeniu rezistencie nádorových buniek voči rádioterapii a mnohým chemoterapeutickým



liekom (Staley a kol., 2016). Okrem toho, RIG-I signalizácia podporuje aktiváciu imunitných buniek zodpovedných za imunogénnu smrť nádorových buniek (Ellermeier a kol., 2013). Taktiež bola pozorovaná zvýšená úroveň apoptózy u nádorových buniek spôsobená aktiváciou RIG-I receptora (Wu a kol., 2017). V našom experimente sme si pre aktiváciu RIG-I vybrali niekoľko RNA iniciujúcich RIG-I signalizáciu a to buď 5'-trifosfátom nezávislým (aptamér C19) alebo závislým spôsobom (5'ppp-dsRNA, SLR14). Účinnosť týchto RNA budeme testovať na modelových bunkových líniiach a pre zostavenie hybridnej nanočastice použijeme RNA s najlepšimi imunostimulačnými vlastnosťami.

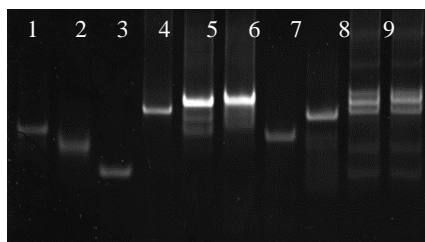
## MATERIÁL A METODIKA

Pre prípravu RNA aptaméra CL9 bol použitý DNA templát, ktorý bol amplifikovaný pomocou PCR reakcie. Pri PCR boli použité primery obsahujúce špecifický promótor pre T7 RNA polymerázu a Taq 2X Master Mix (NEB). PCR produkty boli vizualizované na agarózovom 2% gély. Po prečistení PCR produktov pomocou NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Mini kit (Macherey-Nagel) bola prevedená *in vitro* transkripcia za použitia T7 RNA polymerázy. Produkty *in vitro* transkripcie boli nanosené na denaturačný 8% gél a po elektroforéze (200V/35min) s vyžitím UV shadowingu vyrezané z gélu. Po extrakcii a následnej precipitácii bola kvantita a kvalita RNA aptaméra overená pomocou denaturačnej elektroforézy (200V/30min). Schopnosť reasociácie RNA-DNA hybridnej nanočastice bola testovaná v *in vitro* podmienkach. Jednotlivé zložky (aptamér C19, siRNA, DNA vlákna a protektor) boli na základe ich koncentrácie zmiešané v ekvimolárnom pomere a následne inkubované pri 37°C (Afonin a kol., 2014). Pre vizualizáciu aktivity RNA-DNA nanočastíc bola použitá natívna elektroforéza (200V/40min).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

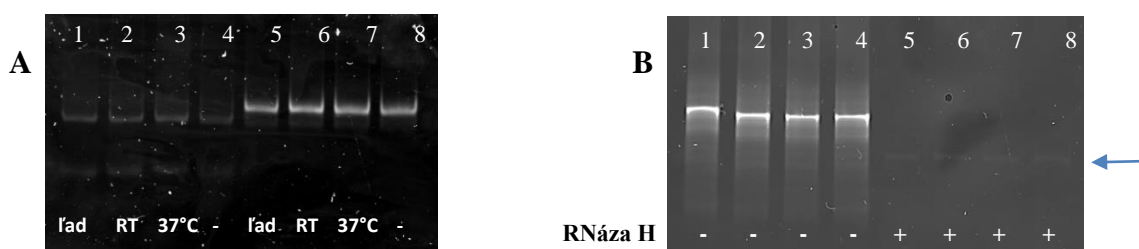
RNA aptamér CL9 bol pripravený *in vitro* transkripciou z DNA templátu amplifikovaného pomocou PCR reakcie. Pre *in vitro* transkripciu bola použitá T7 RNA polymeráza, ktorá je charakteristická svojou špecificitou pre promótor a vysokou transkripčnou aktivitou. Produkty PCR boli vizualizované pomocou agarózovej elektroforézy. Naším ďalším cieľom bolo testovanie schopnosti reasociácie nanočastice *in vitro*. Jednotlivé komponenty hybridnej nanočastice (DNA vlákno, aptamer, siRNA a protektor) boli zmiešané v ekvimolárnom pomere a inkubované pri 37°C (Afonin a kol., 2014). Následne bola aktivita nanočastice vizualizovaná pomocou natívnej elektroforézy. Schopnosť reasociácie RNA-DNA hybridnej nanočastice bola detegovaná na základe zmeny pozície bandov v porovnaní s kontrolou. Ako kontroly slúžili pozície jednotlivých zložiek nanočastice (ssDNA, samotný aptamér, siRNA a dsDNA). Aktivita nanočastice bola monitorovaná v prítomnosti protektora, kedy by nemalo dochádzať k žiadnej interakcii, ale aj bez prítomnosti protektora, kedy by malo dôjsť k reasociácii nanočastice za vzniku dsDNA a uvoľnenia funkčných RNA. V prípade, keď bol protektor prítomný, nebola detegovaná reasociácia nanočastice. Reasociácia nanočastice však nebola pozorovaná ani bez prítomnosti protektora (Obr. 1). Z tohto dôvodu sme sa rozhodli otestovať vplyv rôznych teplôt (ľad, laboratórna teplota, 37°C) na reasociáciu nanočastíc. Výsledok natívnej elektroforézy ukázal, že zmena teploty nemala vplyv na schopnosť reasociácie. Na druhej strane, na základe tohto výsledku bolo možné pozorovať, že k reasociácii nanočastice nedochádza iba v prítomnosti aptamérového vlákna (Obr. 2A). Aby sme potvrdili vplyv aptaméra na reasociáciu nanočastice, rozhodli sme sa použiť RNÁzu H štiepiacu RNA v RNA-DNA hybridoch. Po pridaní RNÁzy H sme detegovali iba prítomnosť DNA vlákien (Obr. 2B). Na základe výsledkov sme prišli k záveru, že dôvodom prečo nedochádza k reasociácii nanočastice je pravdepodobne aptamér, ktorý ostáva naviazaný na ssDNA. Z tohto dôvodu bude potrebná ďalšia optimalizácia skladania nanočastice. Okrem toho bude naším najbližším cieľom aj testovanie schopnosti aptaméra C19 a ďalších

vybraných imunomodulačných RNA (napr. 5'ppp-dsRNA, 3p-hpRNA, SLR14) aktivovať RIG-I receptor.



**Obr.1 Monitorovanie aktivity nanočastíc in vitro (natívna elektroforéza)**

1- ssDNA; 2- aptamér; 3- siRNA; 4- dsDNA; 5- ssDNA+ aptamér + ssRNA; 6- ssDNA+ aptamér + ssRNA + protektor; 7- ssDNA; 8- ssDNA + ssRNA; 9- ssDNA+ aptamér + ssRNA + ssDNA + ssRNA; 10- ssDNA+ aptamér + ssRNA + protektor + ssDNA + ssRNA



**Obr.2 Vplyv rôznych teplôt a RNázy H na reasociáciu nanočastíc (natívna elektroforéza)**

**A: Vplyv rôznych teplôt na reasociáciu nanočastíc.** 1 až 4 – ssDNA + ssRNA + ssDNA + ssRNA; 5 až 8- ssDNA+ aptamér + ssRNA + ssDNA + ssRNA;

**B: Vplyv RNázy H na reasociáciu nanočastíc.** 1- ssDNA + aptamér; 2- ssDNA + aptamér + ssRNA; 3- ssDNA + aptamér + protektor; 4- ssDNA + aptamér ssRNA + protektor; 5- ssDNA + aptamér; 6- ssDNA + aptamér + ssRNA; 7- ssDNA + aptamér + protektor; 8- ssDNA + aptamér ssRNA + protektor;

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0869/21.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Afonin, K.A, et al. Multifunctional RNA nanoparticles. *Nano Lett.* 2014; 14, 5662-5671.
- Ellermeier, J, et al. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2013; 73, 1709-1720.
- El-Sayes N, Vito A, Mossman K. Tumor Heterogeneity: A Great Barrier in the Age of Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel).* 2021;13, 4:806.
- Harrison EB, Azam SH, Pecot CV. Targeting Accessories to the Crime: Nanoparticle Nucleic Acid Delivery to the Tumor Microenvironment. *Front Pharmacol.* 2018; 9:307.
- Chandler M, Afonin KA. Smart-Responsive Nucleic Acid Nanoparticles (NANPs) with the Potential to Modulate Immune Behavior. *Nanomaterials (Basel).* 2019; 9, 4:611.
- Iurescia S, Fioretti D, and Rinaldi M. Nucleic Acid Sensing Machinery: Targeting Innate Immune System for Cancer Therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2018; 13, 2-17.
- Staley JP, Satoh T, et al. Cancer therapies activate RIG-I-like receptor pathway through endogenous non-coding RNAs. *Oncotarget.* 2016; 7, 26496-26515.
- Wu Y, et al. The anticancer functions of RIG-I-like receptors, RIG-I and MDA5, and their applications in cancer therapy. *Transl Res.* 2017;190:51-60.
- Yoneyama M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004;5 7:730-7
- Zakrevsky P, et al. Preparation of a Conditional RNA Switch. *Methods Mol Biol.* 2017;1632:303-324.

# ÚLOHA HYPERICÍNU V MODULÁCIÍ REZISTENTNÉHO FENOTYPU BOČNEJ POPULÁCIE ZA HYPOXICKÝCH PODMIENOK

Buľková V.<sup>1</sup>, Vargová J.<sup>1</sup>, Jendželovský R.<sup>1</sup>, Babinčák M.<sup>1</sup>, Roudnický P.<sup>2</sup>, Zdráhal Z.<sup>2</sup>, Fedoročko P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra bunkovej biológie, ÚBEV, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovensko  
<sup>2</sup>Stredoeurópsky technologický inštitút, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika

## ABSTRAKT

Nádorová hypoxia je spájaná so zvýšenou rezistenciou a metastázovaním nádorových buniek. Odrazom rezistencie sú SP bunky (z angl. side population) s nadmernou aktivitou ABC transportných proteínov, ktoré sa môžu prednostne akumulovať v hypoxických oblastiach a tam nadobúdať ďalšie nežiaduce vlastnosti. Prírodná bioaktívna látka hypericín (HY) redukuje veľkosť SP frakcie nádorových buniek, a zároveň interaguje s kľúčovým transkripčným faktorom hypoxie, HIF-1 $\alpha$ . Cieľom práce bolo zistiť, či HY dokáže eliminovať výskyt a ovplyvniť vybrané vlastnosti SP buniek v hypoxii prostredníctvom degradácie HIF-1 $\alpha$ . Naše výsledky z proteomickej analýzy preukázali, že samotná hypoxia ovplyvňuje široké spektrum proteínov nádorových buniek, predovšetkým tých, ktoré sú zapojené do prestavby extracelulárneho matrixu, no zároveň znižuje výskyt SP buniek. Redukcia zastúpenia SP populácie korelovala s poklesom hladiny BCRP, ktorú sme stanovili pomocou metódy Western blot. Zníženie veľkosti SP populácie v dôsledku hypoxie sa ešte viac zvýraznilo vplyvom HY, čo naznačuje, že aplikáciou HY je možné zvýšiť účinnosť chemoterapie v hypoxických nádoroch, a to prostredníctvom kompetitívnej inhibície BCRP. Na druhej strane, HY v hypoxii stimuloval migračnú aktivitu SP buniek, čo indikuje možnú selekciu malej, no najviac agresívnej populácie nádorových buniek.

## ÚVOD

Chemoterapeutiká dnes predstavujú zlatý štandard v liečbe onkologických pacientov. Rezistencia nádorových buniek však stále zostáva závažnou prekážkou v liečbe. Jedným z mechanizmov chemorezistencie nádorových buniek je zvýšený eflux liečiv sprostredkovaný proteínmi z rodiny ABC transportných proteínov, predovšetkým P-gp, MRP1 a BCRP. Je známe, že práve BCRP je determinantom tzv. SP fenotypu. Populácia SP buniek je obohatená o nádorové kmeňové bunky a vyznačuje sa zvýšenou rezistenciou.

V nádorovom tkanive hrá podstatnú úlohu prítomnosť hypoxických oblastí, ktorá môže takisto významným spôsobom prispievať k zlyhaniu onkoterapie. Hypoxia a s ňou spojená akumulácia transkripčného faktora HIF-1 $\alpha$  podľa viacerých výskumov vedie ku zvýšenej transkripcii génov kódujúcich P-gp a BCRP, a tým k zvýšenému vyplavovaniu liečiv, ktoré sú ich substrátmi. Hypoxia tiež podporuje invazívne šírenie nádorových buniek a vznik metastáz. Snaha zvrátiť negatívny dopad hypoxie na rezistenciu, ale aj ďalšie vlastnosti nádorových buniek, najlepšie prostredníctvom prírodných a pre zdravé bunky netoxických látok, je tak aj naďalej aktuálna.

Naša predošlá práca (Vargová a kol., 2018) sa venovala skúmaniu účinku HY, sekundárneho metabolitu ľubovníka bodkovaného (*Hypericum perforatum* L.), na nádorové kmeňové bunky, kde sa preukázalo, že HY je schopný reverzibilne znížiť veľkosť SP frakcie, a to predpokladanou kompetitívnou inhibíciou BCRP. HY sa akumuluje prednostne v nádorovom tkanive, používa sa pri fotodynamickej terapii a diagnostike (zhrnuté v Jendželovská a kol., 2016) a dokáže degradovať HIF-1 $\alpha$  (Barliya a kol., 2011), čo ho predurčuje pre aplikáciu v onkoterapii solídnych nádorov. Otázkou ostáva, či hypoxia ovplyvňuje akumuláciu HY v nádorových bunkách, nakoľko je HY sám substrátom BCRP (Jendželovský a kol., 2019) a či HY bude vykazovať žiaduce účinky aj za hypoxických podmienok.

## MATERIÁL A METODIKA

*Kultivácia buniek.* V experimentoch boli použité bunkové línie A549 (adenokarcinóm pľúc), HT-29 (kolorektálny adenokarcinóm) a A2780 (ovariálny karcinóm). Bunky boli štandardne kultivované v inkubátore pri 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> a 95% vlhkosti v médiu RPMI-1640 doplnenom o 10% fetálne hovädzie sérum (FBS) a antibiotiká. Pre účely nižšie popísaných experimentov boli bunky po nasadení kultivované 24 hodín v zariadení s presne riadenou atmosférou (Coy Laboratory Products), a to buď v hypoxickej komore pri 1 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C alebo v normoxickej komore pri 20 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> a 37 °C. K bunkám bol následne pridaný HY o rôznych koncentráciách (0,1 μM, 0,5 μM, 1 μM a 5 μM), s ktorým boli bunky inkubované v tme po dobu ďalších 16 hodín.

*Intracelulárna akumulácia HY.* Bunky kultivované v 6-jamkových platniach boli zozbierané trypsinom, prepláchnuté ľadovým PBS a centrifugované. Intracelulárna akumulácia HY v bunkách bola analyzovaná prietokovým cytometrom BD FACSCalibur a vyhodnotená softvérom FlowJo ako medián fluorescencie HY v FL-2 kanáli (585/42 nm BP filter) po excitácii modrým laserom (488 nm).

*Western blot analýza.* Bunky kultivované v Petriho miskách boli zozbierané zoškrabaním na ľade, prepláchnuté PBS a lyzované v lyzačnom roztoku (100 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1% SDS; 10% glycerol) doplnenom o proteázový a fosfatázový inhibítor. Bunkové lyzáty boli sonikované a koncentrácia proteínov bola stanovená Lowryho metódou. Vzorky (každá po 30 μg proteínov) boli separované na 8% SDS-polyakrylamidovom géli a prenesené na PVDF membránu. Membrány boli po vyblokovaní inkubované cez noc pri 4 °C s primárnymi protilátkami: BCRP, HIF-1α, HIF-2α, P-gp, AhR a β-aktínom. Následne boli k membránam pridané príslušné sekundárne protilátky s naviazanou chrenovou peroxidázou. Po premytí membrán bola reaktivita protilátok vizualizovaná prostredníctvom chemiluminiscenčného kitu. Densitometria proteínov bola vyhodnotená softvérom ImageLab.

*Side population analýza a fluorescenciou aktivované triedenie buniek (FACS).* Analýza SP populácie bola uskutočnená podľa štandardného protokolu s modifikáciami (Vargová a kol., 2018). Bunky (1x10<sup>6</sup>/ml) boli 90 minút inkubované s farbivom Hoechst33342 (5μg/ml) v SP pufri (HBS, 2% FBS, 2 mM HEPES). Ako negatívna kontrola bol použitý inhibítor BCRP, Ko143 (50 μM). Pred samotným meraním, prípadne FACS triedením prístrojom BD FACSAriaII SORP, bol ku každej vzorke pridaný propídium jodid (1 μg/ml) pre oddelenie mŕtvych buniek.

*Migrácia.* Po FACS triedení SP/nonSP buniek do 96-jamkovej platničky (8000 buniek/jamku) boli bunky inkubované niekoľko dní kvôli adherencii. „Rana“ (scratch) bola vytvorená v konfluentnej vrstve buniek v médiu s 1% FBS zariadením WoundMaker™ a zatváranie „rany“ bolo vyhodnocované automatizovaným softvérom prístroja IncuCyte.

*Proteomická analýza SP a nonSP buniek.* SP a nonSP bunky kultivované v normoxii alebo hypoxii boli triedené pomocou FACS (minimálne 200 000 buniek), prepláchnuté a lyzované v SDT pufri (4% SDS, 0.1% DTT v Tris/HCl, pH 7,6) a homogenizované 2 hod pri 95 °C. Vzorky boli následne analyzované v spolupráci s Centrálnym laboratóriom Proteomiky, CEITEC MU, Brno, ČR. Peptidy boli analyzované pomocou hmotnostného spektrometra Q Exactive HF-X s Ultimate 3000 RSLCnano systémom (Thermo Scientific). Dáta boli vyhodnotené pomocou softvéra MaxQuant a zoznam proteínov bol spracovaný v analytickom rozhraní KNIME.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vplyvom hypoxie, ako typickej črty nádorového mikroprostredia, dochádza prostredníctvom transkripčného faktora HIF-1α k stimulácii expresie ABC transportných proteínov a formovaniu rezistentnejších nádorových fenotypov. Viaceré syntetické inhibitory ABC transportných proteínov vykazujú toxické účinky na zdravé bunky, a preto sa mnoho štúdií

snaží nájsť iné, prírodné inhibítory s menej škodlivými účinkami na organizmus, ktoré by zvýšili efektivitu chemoterapie. Na základe týchto predpokladov, ale aj mnohých ďalších, sa HY javí ako sľubný modulátor transportného proteínu BCRP.

Pri analýze intracelulárneho obsahu HY sme nepozorovali výrazné zmeny v akumulácii HY v bunkách kultivovaných v hypoxii oproti ich náprotivkom v normoxii, avšak HY dokázal znížiť veľkosť SP populácie vo všetkých troch bunkových líniiach s výraznejším efektom v hypoxii. Vzájomné pôsobenie HY a hypoxie súbežne viedlo k zníženiu hladiny BCRP v ovplyvnených bunkách. Naše výsledky tak naznačujú, že HY by mohol inhibíciou BCRP zvýšiť intracelulárnu akumuláciu takých chemoterapeutík, ktoré sú substrátmi BCRP (napríklad mitoxantrón), a to aj v reálnom mikroprostredí nádoru.

Prekvapivo, redukcia veľkosti SP populácie bola pozorovaná aj vplyvom samotnej hypoxie, čo korelovalo so zníženou hladinou BCRP. Možným vysvetlením je regulácia BCRP iným transkripčným aktivátorom ako HIF-1 $\alpha$ , napríklad receptorom pre aromatické uhl'ovodíky, AhR (Francois a kol., 2017). Sledovaním hladín týchto transkripčných faktorov sme preukázali, že v hypoxii narastá hladina HIF-1 $\alpha$  aj HIF-2 $\alpha$ , a naopak, znižuje sa hladina AhR. Z literatúry je známe, že v hypoxii môže dochádzať k inhibícii transkripčnej aktivity AhR v dôsledku kompetície s HIF-1 $\alpha$  o ich spoločného väzbového partnera ARNT (HIF-1 $\beta$ ) a následne k poklesu expresie cieľových génov AhR (Francois a kol., 2017). HY je navyše v hypoxických podmienkach schopný degradovať HIF-1 $\alpha$  (Barliya a kol., 2011), čím by mohol uvoľniť podjednotku ARNT pre AhR. V našej práci HY znížil hladinu HIF-1 $\alpha$ , ale aj HIF-2 $\alpha$ , čo dosiaľ nebolo publikované v žiadnej vedeckej práci. Asociácia medzi HY a AhR a ich potenciálny vzájomný účinok na rezistentný, príp. agresívny fenotyp nádorových buniek bude predmetom nášho ďalšieho výskumu. Proteomická analýza tiež odhalila masívny dopad pôsobenia hypoxie na nádorové bunky A549, keď došlo k významnému zvýšeniu hladín proteínov asociovaných s bunkovým cyklom, metabolizmom a s prestavbou extracelulárneho matrixu, ktorá podporuje metastázovanie. Na základe týchto výsledkov sme overili vplyv hypoxie, HY a ich vzájomnej kombinácie na migračné vlastnosti SP buniek. Hypoxia preukázateľne stimulovala migráciu SP, ale aj nonSP buniek, pričom tento efekt bol ďalej posilnený pôsobením HY.

Hoci HY v hypoxii preukázateľne zredukoval zastúpenie SP populácie a znížil hladinu BCRP v nádorových bunkách, zostávajúca SP populácia disponovala zvýšenou migračnou schopnosťou, čo poukazuje na pleiotropné pôsobenie prírodných látok.

*Táto štúdia vznikla za finančnej podpory grantových agentúr VEGA 1/0022/19, VVGS-2020-1650 a EPIC-XS (č.p. 823839) financované programom Európskej Únie Horizon 2020.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barliya T, et al. Degradation of HIF-1 $\alpha$  under hypoxia combined with induction of Hsp90 polyubiquitination in cancer cells by hypericin: a unique cancer therapy. *PLoS One*. 2011; 6(9):e22849.
- Francois LN, et al. Down-regulation of the placental BCRP/ABCG2 transporter in response to hypoxia signaling. *Placenta*. 2017; 51:57-63.
- Jendželovská Z, et al. Hypericin in the light and in the dark: Two sides of the same coin. *Front Plant Sci*. 2016; 6:7:560.
- Jendželovský R, et al. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed Pharmacother*. 2019; 109:2173-2181.
- Vargová J, et al. Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP. *Biomed Pharmacother*. 2018; 99:511-522.

## ANTIHELMINTICKÁ TERAPIA FASCIOLÓZY U HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Burčáková Ľ.<sup>1,2</sup>, Königová A.<sup>1</sup>, Babják M.<sup>1</sup>, Urda Dolinská M.<sup>1</sup>, Komáromyová M.<sup>1</sup>, Várady M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie experimentálnej farmakológie, SAV, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Fasciolóza na základe klinického obrazu a produkčných strát patrí k najzávažnejším pasterým parazitózam hovädzieho dobytká. S prihliadnutím na opakovanú reinfekciu je účinná terapia kľúčovým faktorom. Cieľom našej štúdie bolo sledovať účinok vybraných druhov antihelmintík na vylučovanie vajíčok *F. hepatica* u prirodzene infikovaného hovädzieho dobytká štandardizovanou sedimentačnou metódou a *in vivo* FECR testom (test redukcie počtu vajíčok v truse) na 21. deň po terapii. Experimentálne zvieratá (n=48) boli rozdelené do 4 skupín podľa druhu podaného antihelmintika: Kontrola/neliečená skupina, Skupina 1 – albendazol (ABZ) 7,5 mg/kg ž.h. *per os*, Skupina 2 – ivermektín 10 mg/kg ž.h. (IVM) + klorsulon (100 mg/kg ž. h.) subkutánne, Skupina 3 – levamizol hydrochlorid 30 mg/kg ž.h.m. + oxyklozanid 60 mg/kg ž.h.m. (LEV+OXY) *per os*. Na základe percentuálnych hodnôt redukcie počtu vajíčok v truse (%FECR) bola stanovená účinnosť ABZ (92%), IVM+klorsulon (87,60%) a LEV+OXY (100%). Výsledky našej štúdie potvrdzujú zníženú účinnosť ABZ a IVM+klorsulon na vylučovanie vajíčok *F. hepatica* u prirodzene infikovaného hovädzieho dobytká, kým najefektívnejšia terapia bola stanovená pri kombinácii LEV+OXY. Štúdia dopĺňa absentujúce údaje o účinnosti terapie pastervej fasciolózy na Slovensku.

### ÚVOD

Fasciolóza je celosvetovo rozšírené parazitárne ochorenie hospodárskych zvierat spôsobené parazitmi *Fasciola hepatica*, ktoré sú lokalizované v pečňovom parenchýme. V dôsledku priebehu vývinového cyklu tohto parazita a klinického obrazu fasciolózy boli zaznamenané vysoké ekonomické straty v rámci chovu hovädzieho dobytká (Schweizer a kol., 2005). Kontrola a prevencia fasciolózy je založená na použití cielej terapie so zameraním na prerušenie vývinového cyklu parazita a elimináciu vylučovania vajíčok v truse (Sargison a Scott, 2011). K najpoužívanejším antihelmintikám s rôznymi mechanizmami účinku na jednotlivé vývinové štádiá *F. hepatica* patria albendazol (ABZ), oxyklozanid (OXY) a levamizol (LEV), ako aj klorsulon (Martínez-Valladares a kol., 2014; Novobilský a kol., 2016). Pri terapii fasciolózy je najvhodnejšie zvoliť kombináciu dvoch alebo viacerých antihelmintík (Khan a kol., 2017). Na stanovenie účinnosti antiparazitárnych liečiv je používaný *in vivo* test na redukciu počtu vajíčok v truse (FECRT). Percento redukcie (%FECR) zaznamenáva počet *F. hepatica* vajíčok v truse infikovaných zvierat pred a po terapii (Coles a kol., 1992). Cieľom našej štúdie bolo porovnať účinok kombinácií antihelmintík IVM/klorsulon, LEV/oxyklozanid a ABZ s rôznymi mechanizmami účinku používaných na terapiu fasciolózy u prirodzene infikovaného hovädzieho dobytká pomocou *in vivo* FECRT.

### MATERIÁL A METODIKA

Do našej štúdie bolo zaradených 48 kusov hovädzieho dobytká plemena Charollais (3 – 7 rokov, 400 – 900 kg) z farmy lokalizovanej v endemickej oblasti výskytu fasciolózy na severovýchodnom Slovensku (Sulín) s poloextenzívnym spôsobom chovu, bez striedania pastvy. Zvieratá zaradené do experimentu neboli liečené 12 mesiacov pred začiatkom nášho výskumu. Na základe pozitívneho nálezu *F. hepatica* boli zvieratá rozdelené do 4 skupín po 12 kusov: neliečená kontrolná skupina (Kontrola), Skupina 1 (ABZ), *per os* 7,5 mg/kg ž.h. (Albendavet 10%<sup>®</sup>, DIVASA-FARMAVIC S.A., Španielsko, 1 ml/10 kg ž.h.), Skupina 2 (IVM+klorsulon), subkutánne s dávkou ivermektínu 10 mg/kg ž.h. a klorsulonu 100 mg/kg ž.

h. (Ivomec Super<sup>®</sup>, Merial SAS, Francúzsko, 1 ml/50 kg ž. h.), Skupina 3 (LEV+OXY), *per os* levamizol hydrochlorid 30 mg/kg ž.h. a oxyklozanid 60 mg/kg ž.h. (Interzan Gold Oral<sup>®</sup>, Interchemie, Nórsko, 2.5 ml/10 kg ž.h.). Vzorky trusu boli odobrané *per rectum* individuálne v deň podania terapie (D0), na 7. (D7) a 21. deň (D21) po podaní terapie. Počty vajíčok v truse (FEC) boli vyšetrené modifikovanou sedimentačnou metódou podľa Graham-Brown a kol., 2019. Na základe odporúčaní Asociácie pre pokrok vo veterinárnej medicíne (WAAVP) bola vyhodnotená účinnosť terapie (%FECR) pomocou *in vivo* FECRT podľa Coles a kol., 1992: %FECR = 100 - [(EPG pred terapiou / EPG po terapii) × 100]. Za neúčinnú terapiu sú považované hodnoty %FECR < 95%. Rozdiely v hodnotách FEC pred a po terapii na deň D0, D7 a D21 boli štatisticky vyhodnotené pomocou nepárového Student's t-testu (P < 0,01).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prehľad hodnôt počtu vajíčok *F. hepatica* vyjadrených priemerné FEC hodnotami pred a po podaní terapie kombinácií antihelmintík na deň D0, D7 a D21 je znázornený v Tab. 1.

**Tab. 1. Priemerné hodnoty počtu vajíčok *F. hepatica* v truse (FEC) vylúčených pred a po terapii u prirodzene infikovaného hovädzieho dobytku**

	D0	D7	D21
Kontrolná skupina			
Počet vajíčok u pozitívnych zvierat/počet zvierat v skupine	9/12	9/12	9/12
Priemerné hodnoty FEC	64.11	42.22	61.89
Rozpätie FEC	10-187	5-160	11-226
Skupina 1 ABZ			
Počet vajíčok u pozitívnych zvierat/počet zvierat v skupine	7/12	7/12	4/12
Priemerné hodnoty FEC	40.86	37.86	5.50
Rozpätie FEC	5-131	5-90	0-20
Group 2 IVM+klorsulon			
Počet vajíčok u pozitívnych zvierat/počet zvierat v skupine	8/12	8/12	4/12
Priemerné hodnoty FEC	66.50	57.50	7.75
Rozpätie FEC	30-192	20-165	0-25
Group 3 LEV+OXY			
Počet vajíčok u pozitívnych zvierat/počet zvierat v skupine	8/12	4/12	0/12
Priemerné hodnoty FEC	43.13	10.25	00.00
Rozpätie FEC	10-80	0-25	00.00

Výsledky *in vivo* FECR testu u liečených skupín zvierat sú zhrnuté v Tab. 2.

**Tab. 2. Percento redukcie (%FECR) antihelmintík vyhodnotené pomocou *in vivo* FECR testu podľa Coles a kol. (1992) na 21. deň po terapii**

Deň po podaní terapie	FECR (%)		
D21	ABZ Skupina 1	IVM+klorsulon Skupina 2	LEV+OXY Skupina 3
Coles a kol. (1992)	92,00	87,60	100,00

Porovnávanie účinku antihelmintík na 21. deň od podania terapie je odporúčané WAAVP. Tento časový interval je dostatočný na elimináciu dospelých a nezrelých vývinových štádií, ako aj vajčiek *F. hepatica* (Arafa a kol., 2015). Aj v našej štúdií sme najvyššiu účinnosť (100 %) zaznamenali pri kombinácii antihelmintík LEV+OXY na D21, podobne, ako autori Khan a kol., 2017 a Shokier a kol., 2013. Na druhej strane, sme na D21 v rámci Skupiny 2 liečenej kombináciou IVM + klorsulon detekovali najnižší účinok (87,60 %). Aj keď IVM nemá terapeutický účinok na parazity *F. hepatica*, kombinácia IVM+klorsulon je komerčne dostupná kvôli širšiemu spektru použitia nielen proti trematódom, ale aj nematódom tráviaceho traktu. Martínez-Valladares a kol., 2014 zaznamenali účinok klorsulonu na vylučovanie vajčiek *F. hepatica* 85,15 % (15. deň) a 44,91 % (30. deň) použitím FECRT. Stanovené hodnoty korelujú s nedostatočným účinkom klorsulonu v našej štúdií. Znížený účinok terapie bol pozorovaný aj v prípade ABZ (92 %). Znížená aktivita antihelmintík mohla súvisieť s nedostatočným účinkom na nezrelé vývinové štádiá *F. hepatica* (Arafa a kol., 2015). Na liečbu fasciolózy u hovädzieho dobytku sú dostupné antitrematodiká s rôznymi mechanizmami účinku so selektívnym pôsobením na jednotlivé vývinové štádiá *F. hepatica*. Je potrebné poznať farmakologickú povahu týchto liečiv a zvoliť kombinácie antihelmintík s obsahom dvoch alebo viacerých účinných látok s cieľom potencovania ich účinku.

*Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 2/0099/19 a APVV-18-0131.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arafa WM, Shokeir KM, Khateib AM. Comparing an *in vivo* egg reduction test and *in vitro* egg hatching assay for different anthelmintics against *Fasciola* species, in cattle. *Veterinary Parasitology*. 2015; 152-158.
- 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. *Veterinary Parasitology*. 1992; 44(1-2), 35-44.
- Graham-Brown J, et al. Composite *Fasciola hepatica* faecal egg sedimentation test for cattle. *Veterinary Record*. 2019; 184(19), 589-589.
- Khan MN, et al. Comparative efficacy of six anthelmintic treatments against natural infection of fasciola species in sheep. *Pak Vet J*. 2017; 37(1), 65-68.
- Martínez-Valladares M, Cordero-Pérez C, Rojo-Vázquez F. A. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Experimental parasitology*. 2014; 136, 59-62.
- Novobilský A, et al. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2016; 141-147.
- Sargison ND, Scott PR. Anthelmintic resistance: potential benefits of 'over-diagnosis'. *The Veterinary Record*. 2011; 168(24), 646.
- Shokier KM, Aboelhadid SM, Waleed MA. Efficacy of five anthelmintics against a natural *Fasciola* species infection in cattle. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2013; 2(1), 41-45.
- Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record*. 2005; 157(7), 188-193.



# POROVNANIE ÚČINNOSTI HUMÁNNEHO DLE PO RÔZNYCH SPÔSOBOCH APLIKÁCIE U MYŠÍ S ALVEOLÁRNOU ECHINOKOKÓZOU

Ciglanová D.<sup>1,2</sup>, Jurčacková Z.<sup>1,2</sup>, Mudroňová D.<sup>2</sup>, Hrčková G.<sup>1</sup>,

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

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

## ABSTRAKT

Alveolárna echinokokóza (AE) spôsobená larválnym štádiom *Echinococcus multilocularis* patrí medzi najzávažnejšie parazitárne ochorenia prenosné zo zvierat na ľudí a je spojená s významnou moduláciou imunitnej odpovede hostiteľa. Ochorenie sa prejavuje tvorbou cystických útvarov na pečeni alebo iných orgánoch. V experimente sme porovnávali vplyv podania dialyzovateľného leukocytárneho extraktu (DLE) na vývoj larvocysty a vybraných imunologických parametrov po intraperitoneálnej, subkutánnej a perorálnej aplikácii u myší s AE. V skupine myší, kde bol DLE podávaný perorálne, sme zaznamenali najvyššiu redukciu váhy cýst. V skupinách kde bolo liečivo podané perorálne a subkutánne dochádzalo k zvýšeniu podielu lymfoidných buniek v porovnaní s infikovanými neliečenými zvieratami. Pri sledovaní jednotlivých subpopulácií buniek sme zistili nárast CD3+ buniek u infikovaných a intraperitoneálne a subkutánne liečených zvierat. LPS stimulované myeloidné bunky sleziny z infikovaných myší produkovali signifikantne vyššie množstvá NO oproti zdravým zvieratám a výrazné potlačenie produkcie sme zaznamenali vo všetkých troch skupinách liečených DLE. Pri stanovení proliferácie konkanavalínom A stimulovaných T-lymfocytov sme najvyššiu inhibíciu proliferácie zaznamenali v skupine so subkutánnym podaním, opačný trend bol pozorovaný v skupine s intraperitoneálnym podaním. Výsledky potvrdzujú, že DLE z hľadiska modulácie imunitnej odpovede pôsobí normalizačne a perorálna cesta aplikácie sa javí ako najefektívnejšia.

## ÚVOD

Štádium infekcií vyvolaných metacestódami rodom *Echinococcus* v prirodzených medzihostiteľoch alebo aberantných hostiteľoch je aktuálna problematika, kvôli závažnosti ochorenia a komplikovanej liečbe. Cysty *E. multilocularis*, na rozdiel od cýst *E. granulosus*, nie sú ohraničené od okolitého tkaniva, ich rast je infiltratívny a pripomína malígnu neopláziu (Vuitton a Gottstein, 2010). Patogénne larvocysty majú na organizmus medzihostiteľa mechanický, toxický aj alergický vplyv. Vysoká úmrtnosť je u neliečených a neskoro diagnostikovaných pacientov, pričom liečba je nákladná, a pozostáva z chirurgického odstránenia cýst a dlhodobej chemoterapie (Gottstein, 1992; Kern a kol., 2003). Dialyzát homogenátu leukocytov (DLE) je frakcia bielych krviniek s nízkou molekulovou hmotnosťou do 12 kDa získaných od ľudí a zvierat (Arnaudov a Kostova 2010). Liek obsahuje biologicky aktívne látky, schopné normalizovať špecifickú bunkovú imunitu príjemcu (Krishnaveni 2013). Účinné látky obsiahnuté v lieku ovplyvňujú proliferáciu a diferenciáciu rôznych druhov buniek t.j. dozrievanie do funkcie schopných štádií. Ide napr. o progenitory krvných buniek kostnej drene, kde pôsobia najmä na ich schopnosť reagovať na rad cytokínov. U rôznych ochorení pôsobia normalizačne na T lymfocyty a na ich podskupiny CD4+T pomocné a CD8+cytotoxické T-lymfocyty (Demečková a kol., 2017). V našej práci sme sa zamerali na testovanie jednotlivých spôsobov aplikácie DLE s cieľom porovnať účinnosť na redukciu infekcie v súvislosti so zmenami vybraných markerov bunkovej imunity.

## MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol vykonaný na samcoch kmeňa myši BALB/c, ktoré boli rozdelené do štyroch skupín: zdravé (neinfikované a neliečené), infikované neliečené, infikované a liečené DLE a to podaním *per os*, intraperitoneálne, respektíve subkutánne. Infekcia bola vyvolaná intraperitoneálnou inokuláciou 2000 prototskokov *E. multilocularis*. DLE bol podávaný 2 krát týždenne od začiatku 2. mesiaca po infekcii v 9 dávkach po 0,2 ml/myš. Použili sme prípravok IMMODIN (IMUNA PHARM, a.s.). Po skončení terapie sa odobrala krv, v ktorej sme stanovili počet celkových leukocytov počítaním v Bürkerovej komôrke použitím Turkovho roztoku. Následne bola krv spracovaná na prietokovú cytometriu na stanovenie podielu lymfocytov z leukocytov krvi. Fagocytárna aktivita krvných leukocytov bola stanovená pomocou komerčne dostupného kitu prostredníctvom prietokovej cytometrie. Po usmrtení, sme z peritoneálnej dutiny izolovali cesty a pečene a účinnosť terapie sme stanovili ich zvážením. Boli izolované bunky sleziny (splenocyty) z ktorých časť sa použila na fenotypickú analýzu podielu lymfoidných a myeloidných buniek prietokovou cytometriou. Imunofenotypizácia lymfocytov bola vykonaná metódou priamej imunofluorescencie použitím monoklonálnych protilátok voči povrchovým markerom lymfocytov CD3, B220, CD4, CD8. Zvyšné splenocyty sme nasadili do kultivačných fliaš a nechali adherovať 24 hod. v termostate pri 37°C. Neadherentná frakcia obsahujúca lymfocyty sa odobrala a použila na stanovenie ich proliferatívnej aktivity. Adherentné bunky boli odlepené, spočítané a nasadené do 24 jamkovej platničky a stimulované LPS 1 µg/ml. Po 72 hodinách kultivácie sme stanovili množstvo oxidu dusnatého (NO) pomocou Griessovho činidla. Celkové bunkové proteíny v týchto bunkách sme stanovili kolorimetricky pomocou Bradford činidla. Proliferačia splenocytov stimulovaných konkanavalínom A resp. LPS bola meraná kolorimetrickou metódou pomocou kitu Brdu Cell Proliferation ELISA Kit.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri testovaní rôznych spôsobov podania Immodinu na redukciu váhy cýst sme zaznamenali najnižšiu váhu pri perorálnej ceste podania (1,577 g) v porovnaní s infikovanými neliečenými kde priemerná hodnota bola 4,261 g. Najvyššia váha cýst bola zaznamenaná v skupine kde liečivo bolo podávané intraperitoneálne (4,816 g). Stanovením celkových leukocytov v krvi sme zistili signifikantne nižšie hodnoty v skupine infikovaných neliečených oproti zdravej skupine. Pri stanovení podielu lymfocytov v krvi prietokovou cytometriou naše výsledky ukázali, že počet lymfocytov z celkovej populácie leukocytov sa u infikovaných myši znížil na 32,27% v porovnaní so zdravými (66,96%) na úkor nárastu myeloidných buniek. Pozorovaná imunosupresia je hlavným znakom infekcií cestódami a antigény vylučované *E. multilocularis* spôsobujú nárast nezrelých myeloidných buniek so supresorickými vlastnosťami (Wang a Gottstein 2016). Imunosupresia súvisí aj s potlačením nadmernej prozápalovej reakcie a zmierneniu imunopatológie. Ďalej sme sledovali vplyv terapie na zmeny v zastúpení lymfoidných a myeloidných buniek (v %) na systémovej úrovni v slezinách. Podiel lymfoidných buniek bol signifikantne nižší u infikovaných zvierat v porovnaní so zdravými. Po podaní DLE intraperitoneálne ostal podiel lymfoidných buniek približne na úrovni neliečených zvierat. Naopak, v skupinách kde bolo liečivo podané perorálne a subkutánne dochádzalo k zvýšeniu podielu lymfoidných buniek v porovnaní s infikovanými neliečenými zvieratami, čo poukazuje, že prípravok pravdepodobne znížil infiltráciu slezín myeloidnými bunkami, čo zrejme prispelo k posilneniu antiparazitickej imunity. Pri sledovaní jednotlivých subpopulácií buniek sme zistili, že dochádza k nárastu percenta T lymfocytov (CD3+) u infikovaných neliečených zvierat oproti skupine zdravých. V skupine s perorálne podaným liečivom sme zaznamenali pokles CD3 buniek smerom k normalizácii. Zistilo sa, že infekcia *E. multilocularis* indukuje nárast supresorických lymfocytov s markerom Foxp3 s tolerogénnymi vlastnosťami voči infekcii, ktoré produkujú

hlavne IL-10 (Nono a kol., 2020). Predpokladáme, že DLE ovplyvnil jednotlivé podtriedy T lymfocytov, čo bude predmetom nášho ďalšieho štúdia. Zároveň sme zistili, že infekcia je sprevádzaná poklesom percenta B lymfocytov v porovnaní so zdravými zvieratami. Pokles je pravdepodobne spôsobený diferenciaciou týchto buniek na plazmocyty a následne zvýšenou protilátkovou odpoveďou sprevádzajúcou tieto ochorenia (Reyes a kol., 2007). Nárast B-lymfocytov sme pozorovali v skupine s perorálne podaným liečivom. Zvýšené percentuálne zastúpenie CD4+ T-pomocných lymfocytov sme zaznamenali pri subkutánnom a intraperitoneálnom podaní liečiva v porovnaní so skupinou infikovaných neliečených zvierat. Zaznamenali sme rozdiely pri perorálnej a intraperitoneálnej aplikácii liečiva, kde podiel cytotoxických lymfocytov CD8+ u oboch skupín bol nižší v porovnaní s infikovanými neliečenými zvieratami. Zaznamenané rozdiely do určitej miery korelovali s veľkosťou cýst, čo poukazuje, že DLE stimuluje antiparazitickú aktivitu viacerými imunologickými mechanizmami. NO je významná signalizačná molekula Th1 typu imunity produkovaná hlavne monocytmi/makrofágmi a pri vyšších koncentráciách prispieva k imunopatológii a sepe. Zistili sme, že LPS stimulované myeloidné bunky sleziny z infikovaných myší produkovali signifikantne vyššie množstvá NO oproti zdravým zvieratám a výrazné potlačenie produkcie sme zaznamenali vo všetkých troch skupinách liečených DLE. Výsledky poukázali, že DLE prispieva k normalizácii NO pri nadmernej aktivácii LPS, čo bolo zistené aj inými autormi *in vitro* (Franco-Molina a kol., 2007). Proliferačný index sme stanovili pomocou inkorporácie jadrového markera BrdU. Zvýšenie proliferácie sa pozorovalo u infikovaných zvierat v porovnaní so skupinou zdravých a najvyšší proliferatívny index T-lymfocytov sme zachytili po subkutánnej aplikácii DLE. Proliferačia B-lymfocytov bola inhibovaná u infikovaných neliečených v porovnaní so zdravými zvieratami. Výsledky fagocytárnej aktivity monocytov krvi ukázali, že infekcia ani podávanie liečiva výrazne neovplyvňuje percento buniek schopných fagocytárnej aktivity ale výrazne ovplyvnila index fagocytárnej aktivity (IFA), ktorý bol znížený u infikovaných zvierat v porovnaní so zdravými. Najvyšší IFA sme zaznamenali pri intraperitoneálnom podaní liečiva v porovnaní s infikovanou neliečenou skupinou. Predpokladáme, že fagocytóza krvných monocytov sa priamo nepodieľala v komplexnej antiparazitickej imunitnej odpovedi po aplikácii DLE, pretože nekorelovala s redukciou cýst.

*Projekt bol financovaný z prostriedkov projektu APVV 17-1410.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arnaudov A, Kostova Z. Dialysable leukocyte extracts in immunotherapy. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015, 29.6: 1017-1023.
- Demečková V, et al. Immodin and its immune system supportive role in paclitaxel therapy of 4T1 mouse breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 245-256.
- Franco-Molina MA, et al. Bovine dialyzable leukocyte extract modulates cytokines and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated human blood cells. *Cytotherapy*, 2007, 9.4: 379-385.
- Gottstein B, et al. Susceptibility versus resistance in alveolar echinococcosis (larval infection with *Echinococcus multilocularis*). *Veterinary parasitology*, 2015, 213.3-4: 103-109.
- Kern P, et al. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982–2000. *Emerging infectious diseases*, 2003, 9.3: 343.
- Krishnaveni M. A review on transfer factor an immune modulator. *Drug Invention Today*, 2013, 5.2: 153-156.
- Nono JK, Lutz MB, Brehm K. Expansion of host regulatory T cells by secreted products of the tapeworm *Echinococcus multilocularis*. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 798.
- Nunnari G, et al. Hepatic echinococcosis: clinical and therapeutic aspects. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2012, 18.13: 1448.
- Reyes JL, Terrazas LI. The divergent roles of alternatively activated macrophages in helminthic infections. *Parasite immunology*, 2007, 29.12: 609-619.
- Wang, J, Gottstein B. Immunoregulation in larval *Echinococcus multilocularis* infection. *Parasite immunology*, 2016, 38.3: 182-192.

# REZISTENCIA VOČI ŤAŽKÝM KOVOM U FYLOGENETICKY A GEOGRAFICKY VZDIALENÝCH IZOLÁTOV *STREPTOMYCES* SPP.

Cimermanová M.<sup>1</sup>, Willner J.<sup>2</sup>, Saternus M.<sup>2</sup>, Pristaš P.<sup>1</sup>, Píknová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra Mikrobiológie, UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Silesian University of Technology, Katowice, Poland

## ABSTRAKT

Znečistenie životného prostredia ťažkými kovmi predstavuje v súčasnosti celosvetový problém. V procese remediácie sa čoraz častejšie využívajú biologické metódy, pričom vhodným organizmom sú vďaka svojim vlastnostiam baktérie rodu *Streptomyces*. Cieľom práce bola analýza diverzity streptomycét z rôznych banských oblastí vo vzťahu k ich rezistencii voči ťažkým kovom. Izoláty *Streptomyces* spp. vykazovali zvýšenú rezistenciu voči Zn a Pb. Pozorovala sa výrazná fenotypová aj genotypová variabilita streptomycét medzi lokalitami, ale aj v rámci jednej lokality. Fylogenetické analýzy naznačujú, že dominantnými predstaviteľmi streptomycét v prostrediach so zvýšeným obsahom ťažkých kovov sú druhy z okruhu *S. pratensis*, *S. microflavus* a *S. globisporus*.

## ÚVOD

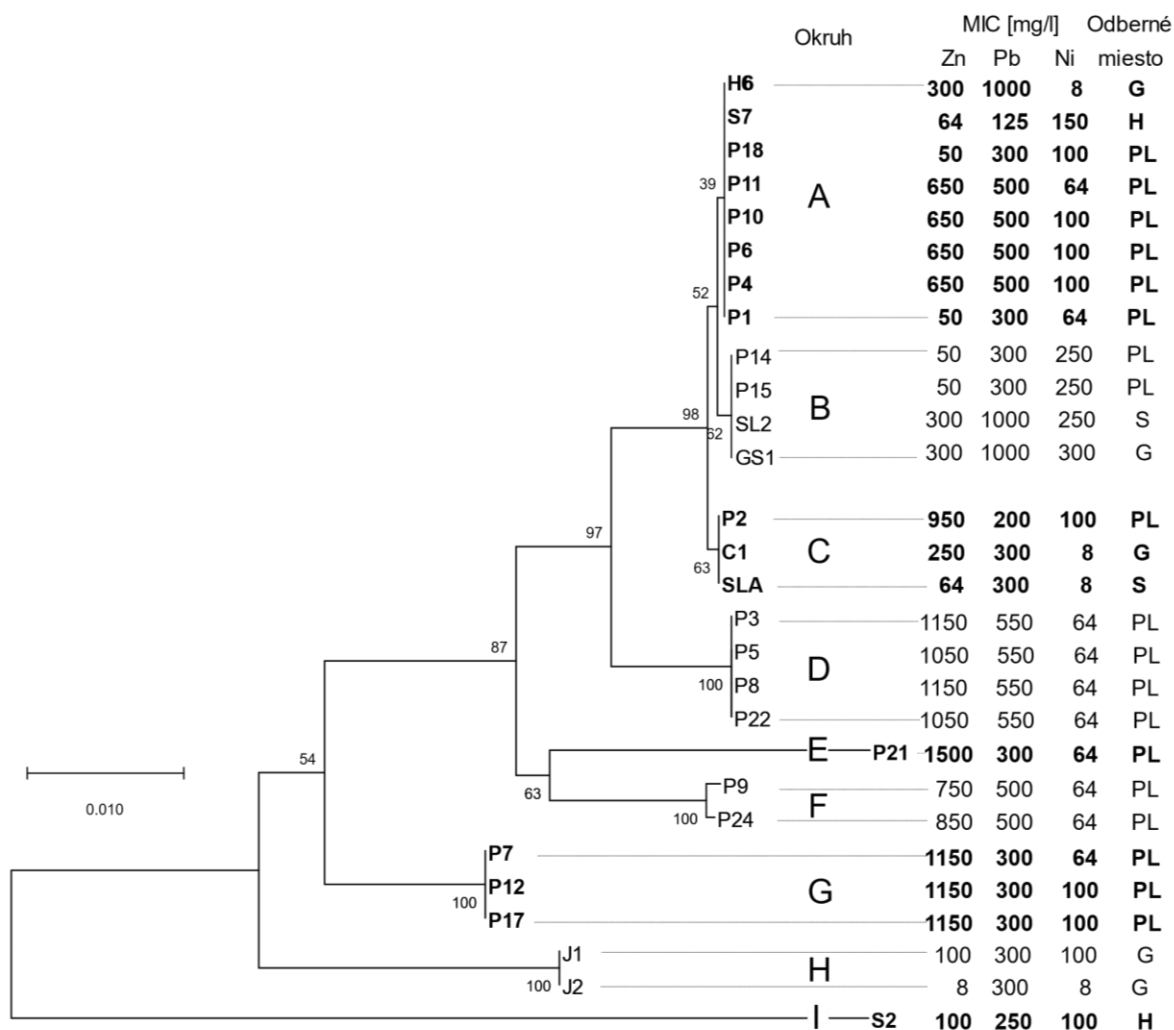
Kontaminácia kovmi v dôsledku ich ťažby, spracovania a následnej likvidácie odpadu má celosvetovo negatívny dopad na životné prostredie. Vzniknuté haldy a odpadové vody sa vyznačujú vysokou koncentráciou toxických ťažkých kovov, ktoré sa odtiaľ dostávajú do prostredia a hromadia sa v potravinovom reťazci (Baz a kol., 2015). Prevládajúcou skupinou organizmov v takomto prostredí sú práve aktinobaktérie (Hur a kol., 2019), najmä rod *Streptomyces*, ktorý patrí medzi významných producentov bioaktívnych látok ako sú napr. antibiotiká. Predpokladá sa, že mikroorganizmy z banských prostredí vykazujú vlastnosti vhodné pre ich bioremediáciu (Baz a kol., 2015). Skúmanie bakteriálnej diverzity kovmi kontaminovaných prostredí je teda dôležité pre zistenie a následné využitie autochtónnych druhov na sanáciu znečistenia. Mnohé druhy streptomycét sa vyznačujú vysokou rezistenciou a schopnosťou sorpcie a akumulácie kovov, čo má potenciál pre sanáciu kontaminovaných oblastí (Álvarez a kol., 2012). V našej práci sme sa zamerali na diverzitu izolátov z banských oblastí a ich rezistenciu voči vybraným ťažkým kovom.

## MATERIÁL A METODIKA

Izoláty streptomycét sme získali zo vzoriek substrátov odobraných v Slovinkách, Gelnici, Hnúšti a Tarnowských Górach (Cimermanová a kol., 2020; 2021). Rezistenciu izolátov voči Pb, Zn a Ni sme stanovili určením minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) na modifikovanom Duxbury médiu (Baz a kol., 2015) pri koncentráciách kovových iónov 8 až 2000 mg/l pre Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> a 8 až 300 mg/l pre Ni<sup>2+</sup>. Rast izolátov testovaný v duplikátoch bol porovnávaný s kontrolou. Izoláty sme identifikovali na základe sekvencií génu pre 16S rRNA, po izolácii DNA, PCR amplifikácii (Cimermanová a kol., 2021) a sekvenovaní PCR produktov (Eurofins Genomics, Nemecko). Sekvencie sme analyzovali pomocou BLAST analýzy (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) voči databáze NCBI a pre fylogenetické analýzy sme použili program MEGA X (Kumar a kol., 2018).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Odborné miesta, odkaliská v Slovinkách a haldy v Gelnici, Hnúšti a Tarnowských Górach (Poľsko), sa vyznačovali vysokým obsahom ťažkých kovov, najmä olova a zinku. Celkovo sme pracovali s 28 izolátmi s morfológiou typickou pre streptomycéty. 27 izolátov sme identifikovali na základe analýzy génu pre 16S rRNA ako druhy *Streptomyces* sp. a 1 izolát bol zaradený k rodu *Crossiella*. Z analýzy sekvencií sa ukázalo, že získané izoláty patria do 9 okruhov blízko príbuzných druhov označených A – I (Obr. 1).



**Obr. 1** Fylogenetické vzťahy izolátov *Streptomyces* spp. na základe porovnania sekvencií génu pre 16S rRNA, okruhy (A – I). Minimálne inhibičné koncentrácie  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  a  $Ni^{2+}$  a odborné miesto (G – Gelnica, H – Hnúšťa, PL – Poľsko, S – Slovinky) sú uvedené pri každom izoláte. Fylogenetický strom bol skonštruovaný metódou Neighbor-Joining, pomocou programu Mega X (Kumar a kol., 2018). Čísla pri vetviach stromu sú bootstrap hodnoty po 500 opakovaníach.

Prvé tri okruhy (A, B a C), ktoré sú najpočetnejšie (54% izolátov), sa nachádzali vo viacerých lokalitách a celkovo zahŕňajú všetky 4 odborné miesta. Okruh A pozostáva z izolátov fylogeneticky príbuzných *S. pratensis*, *S. griseus*, *S. anulatus* a *S. cyaneofuscatus* so 100% sekvenčnou identitou pre gén 16S rRNA. Izoláty z okruhu B sú fylogeneticky príbuzné druhom *S. microflavus* a *S. fulvissimus*, izoláty z okruhu C s druhmi *S. rubiginosohelvolus*, *S. parvus*, *S. pluricologescens*, *S. badius*, *S. sindenensis* a *S. globisporus*. Ostatné okruhy (D, E, F, G, H a I) sú špecifické pre jednu lokalitu. Izoláty z okruhu D boli blízko fylogeneticky príbuzné s druhmi *S. spororaveus*, *S. nojiriensis*, *S. avidinii*, *S. subutilus* a *S. xanthophaeus* (identita sekvencií génu 16S rRNA väčšia ako 99%). Do okruhu E bol zaradený izolát, fylogeneticky príbuzný so *S. phaeochromogenes*. Okruh F pozostával z dvoch izolátov fylogeneticky príbuzných so *S. narbonensis*. Okruh G vykazoval so známymi druhmi streptomycét identitu nižšiu ako 99%, čo je hraničná hodnota pre druhovú identifikáciu na základe 16S rRNA streptomycét (Mohammadipanah a kol., 2014), preto predpokladáme, že ide o nové druhy fylogeneticky vzdialene príbuzné so *S. flavofungini*, *S. violarius*, *S. arenae* a *S. zinciresistens*. Do okruhu H patria dva izoláty príbuzné so *S. albidoflavus*, *S. griseochromogenes*, *S. resistomycificus* a *S. coelicolor*. Do okruhu I bol zaradený izolát

*Crossiella sp.* Z prostredia kontaminovaných ťažkými kovmi bolo doteraz izolovaných viacero druhov streptomycét (Cimermanová a kol., 2021). Napr. Baz a kol. (2015) izolovali z opustených banských lokalít v okolí Marakešu streptomycéty rezistentné voči kovom včítane druhov príbuzných *S. parvus*, *S. pluricologrescens* a *S. albidoflavus*. Z pôdy v bani na zinok a meď v severozápadnej Číne Lin a kol. (2011) izolovali nový druh streptomycét *S. zincirestens*.

Všetky získané izoláty sa vyznačovali rezistenciou voči Pb, pričom maximálne hodnoty MIC boli 1000 mg/l. Vysoká tolerancia u všetkých izolátov zrejme súvisí s jeho vysokým obsahom v odberných lokalitách a so skutočnosťou, že olovo patrí medzi najrozšírenejšie kontaminanty. Voči Zn vykazovalo rezistenciu 68% izolátov (rast pri  $c(\text{Zn}^{2+}) > 110$  mg/l (Duxbury, 1981)). Najtoxickejším kovom bol nikel, keď rezistentné izoláty tvorili len 18 % izolátov (rast pri  $c(\text{Ni}^{2+}) > 100$  mg/l (Duxbury, 1981)). V porovnaní s prácou autora Baz a kol. (2015) sme získali izoláty s podobnými hodnotami MIC pre Pb a s vyššími hodnotami MIC pre Zn. Porovnanie MIC s ďalšou dostupnou literatúrou je kvôli širokej škále používaných médií náročné, pretože zloženie média značne vplyva na biologickú dostupnosť kovov pre mikroorganizmy (Baz a kol., 2015). Rezistentné izoláty sa považujú za vhodné bioremediátory, avšak v niektorých prípadoch môžu aj izoláty s nízkou rezistenciou vykazovať pozoruhodnú adsorpciu kovov (Rho a kol., 2002).

Pozorovali sme rozdielne hodnoty MIC medzi lokalitami, ale aj v rámci jednotlivých lokalít, čo potvrdzuje aj zistenie autorov Álvareza a kol. (2012), ktorí poukázali na vznik rezistencie na kovy v priebehu evolúcie streptomycét nezávislými rôznymi mechanizmami.

*Práca vznikla za podpory grantu VEGA 1/0779/21, VVGS-PF-2021-1766 a APVV SK-PL-18-0012.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Álvarez A, et al. Heavy Metal Resistant Strains Are Widespread along Streptomyces Phylogeny. *Mol. Phylogenet.* 2013, 66, 1083–1088.
- Baz SE, et al. Resistance to and Accumulation of Heavy Metals by Actinobacteria Isolated from Abandoned Mining Areas. *Sci. World J.* 2015; 761834.
- Cimermanová M, et al. Genetická a morfológická diverzita streptomycét z prostredia banskej haldy. Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu 2020: 13-15.
- Cimermanova M, Pristas P, Piknova M. Biodiversity of Actinomycetes from Heavy Metal Contaminated Technosols. *Microorganisms* 2021, 9, 1635.
- Duxbury T. Toxicity of Heavy Metals to Soil Bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1981;11, 217–220. Hur M, Park SJ. Identification of Microbial Profiles in Heavy-Metal-Contaminated Soil from Full-Length 16S rRNA Reads Sequenced by a PacBio System. *Microorganisms* 2019, 7, 357.
- Kumar S, et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution.* 2018; 35:1547-1549.
- 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, 616–620.
- Mohammadipanah F, et al. *Streptomyces zagrosensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64(Pt 10):3434-40.
- Rho JY, Kim JH. Heavy Metal Biosorption and Its Significance to Metal Tolerance of Streptomyces. *J. Microbiol.* 2002, 40, 51–54.

# ŠTÚDIUM TERAPEUTICKÉHO EFEKTU MEZENCHYMÁLNYCH BUNIEK NA NIEKTORÉ CHOROBNÉ PROCESY KOSTÍ A KLBOV

Domaniža M.<sup>1</sup>, Trbolová A.<sup>1</sup>, Hluchý M.<sup>1</sup>, Čížková D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika malých zvierat, UVLF, Košice

<sup>2</sup>Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, UVLF, Košice

## ABSTRAKT

Osteoartróza je degeneratívne ochorenie kĺbov, charakterizované zápalom, chronickou bolesťou a krívaním. Osteoartróza (OA) je najčastejší dôvod krívania u psov starších ako 1 rok. Patogenéza osteoartrózy zahŕňa zmeny vo všetkých tkanivách v synoviálnom kĺbe. Patria sem zmeny v metabolizme a morfológii kĺbovej chrupky, zmeny v metabolizme a architektúre subchondrálnej kosti, tvorba osteofytov a enteziofytov, synoviálny zápal a fibróza. Osteoartróza je degeneratívne ochorenie kĺbov, charakterizované zápalom, chronickou bolesťou a krívaním. Tento stav je ireverzibilný a momentálne konvenčné metódy nie sú schopné zabezpečiť regeneráciu poškodeného tkaniva. Kmeňové mezenchymové bunky sú moderným postupom pri liečbe osteoartrózy vďaka ich schopnosti sa diferencovať na rôzne bunkové línie a ich protizápalovému účinku. Cieľom našej štúdie je aplikovanie mezenchymových kmeňových buniek na rozvíjajúce sa degeneratívne ochorenia kĺbov a následné vyhodnotenie ich terapeutického účinku analýzou synoviálnej tekutiny, analýzou pohybu, klinickým a röntgenologickým vyšetrením pacientov. (Johnston a Tobias, 2018).

## ÚVOD

Nesteroidné protizápalové liečivá (NSAIDs) sú stále hlavným stavebným kameňom terapie miernej až silnej OA u psov. Avšak farmakokinetické vlastnosti NSAIDs vyžadujú denné alebo opakované dávkovanie počas dlhého obdobia, pričom ich nežiaduce účinky môžu obmedzovať dlhodobé užívanie (Walton a kol., 2014). Terapia mezenchymovými kmeňovými bunkami (MSCs) vo veterinárnej medicíne patrí medzi inovatívne terapeutické prístupy (Bogers a kol., 2018). Liečba je charakterizovaná vysokým terapeutickým indexom s dlhodobým účinkom, napriek relatívne krátkej životnosti MSCs *in vivo* (van Buul a kol., 2012). Mechanizmus účinku spočíva v prechodnej interakcii s hostiteľským mikroprostredím vplyvom sekrécie širokého spektra molekúl (cytokíny, rastové faktory, miRNA, lipidy a mikrovezikuly).

## MATERIÁL A METÓDY

### BUNKOVÁ TERAPIA

Kmeňové bunky (MSCs) sú telové progenitórne bunky z ktorých sú derivované ďalšie bunky. Momentálne štúdie poukazujú na to že kmeňové bunky sú schopné regenerovať a hojiť poranené tkanivo, znižovať zápal, stimulovať krvné zásobovanie tkaniva na podporu hojenia, vytvárať stavebný podklad pre hojace sa tkanivo, chrániť bunky pred deštrukciou a rozkladať jazvovité tkanivo (Wolfstadt a kol., 2015). MSCs sú multipotentné bunky s vysokou obnovovacou kapacitou. Hoci sa ako zdroje na izoláciu MSCs najčastejšie používajú kostná dreň (BM) a tukové tkanivo (AT), tieto kmeňové bunky možno získať zo všetkých postnatálnych tkanív vrátane kostrových svalov, periostu (De Bari a kol., 2001) a synoviálnej membrány (De Bari a kol., 2003). Súčasná dostupná bunková terapia zahŕňa deriváty krvných produktov, ako sú autológne/alogénne kondicionované médium (ACS), autológny proteínový roztok (APS), plazma bohatá na trombocyty (PRP) a taktiež produkty, ktoré obsahujú MSCs, ako sú napríklad aspirát kostnej drene (BMAC), kultivované kmeňové bunky z tukového tkaniva (AdMSCs) a kultivované bunky kostnej drene (BMSCs). Všetky bunkové produkty sú multimodálne, obsahujúce množstvo rastových faktorov a cytokínov. Kombinácia týchto

faktorov spúšťa anabolickú, chemotaktickú, protizápalovú alebo imunitne sprostredkovanú odpoveď (Bogers a kol., 2018).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### VYHODNOTENIE TERAPIE

#### *KINETIKA A KINEMATIKA POHYBU*

Analýza pohybu na vyhodnotenie normálneho a abnormálneho pohybu je vykonávaná pomocou prístrojov na vyhodnotenie kinetiky (sily ovplyvňujúce pohyb) a kinematiky (časové a geometrické charakteristiky pohybu). Kinetická analýza pohybu je vykonávaná využitím platní zachytávajúcich veľkosť sily vyvinutej končatinou na platňu vo fáze podpory počas chôdze. Dáta relatívne k fáze kmitu nie sú zaznamenávané a merané. Kinematická analýza je vykonávaná sériou kamerových systémov a reflexných objektov umiestnených na psej koži na špecifických anatomických bodoch. Počítačový systém meria flexiu a extenziu kĺbov počas pohybu a ich časové a vzdialenostné premenné psieho pohybu počas prechodu testovacou plochou. Táto metóda nám poskytne informácie relatívne k fáze podpory a kmitu počas psej chôdze (Anderson a kol., 1994).

#### *APLIKOVANIE KONDICIOVANÉHO MÉDIA*

Pretože MSCs majú protizápalový účinok, akákoľvek súbežná liečba s NSAID, aj keď nie je účinná, skresľuje výsledky terapie (van der Weegen a kol., 2015). Štúdie využívajúce alogénne MSC v OA všeobecne používajú bunky od jedného darcu (Hiroaki a kol., 2008).

MSCs kondiciované médium je substancia extrahovaná z MSCs kultúry obsahujúca množstvo cytokínov a rastových faktorov ako regeneračné činidlo. Skupine psov s artrotickými zmenami v kĺboch bude v našom protokole aplikované MSCs-CM v intervale každých 10 dní v prvom mesiaci. Počas aplikácie sú pacienti sedovaní alebo v celkovej anestézii. Miesto na aplikáciu je asepticky pripravené. Pacientom je po aplikovaní MSCs-CM monitorovaný celkový zdravotný stav ako aj miesta aplikácie (opuch, zápal, bolestivosť). Odber a následné vyšetrenia synoviálnej tekutiny, ako aj ďalšie vyšetrenia kĺbu sú vykonané po uplynutí doby minimálne jeden týždeň od aplikovania poslednej dávky MSCs-CM.

#### *ODBER SYNOVIÁLNEJ TEKUTINY*

Pre vyhodnotenie účinku terapie je dôležité analyzovať nielen pohyb pacienta ale aj vyšetriť synoviálnu tekutinu, v ktorej získame objektívne informácie o zápalovom procese v kĺbe. Porovnanie koncentrácie vybraných biomarkerov sa vykoná pred a po začatí terapie. Artrocentéza zahŕňa vpich ihly do kĺbu a odsávanie kĺbovej tekutiny. Synoviálna tekutina sa môže podrobiť kultivácii alebo cytologickému vyšetreniu, vyšetreniu obsahu bielkoviny, hodnotenia viskozity a vyšetreniu obsahu glukózy. Najčastejšie sú ochorenia kĺbov spojené so zvýšeným množstvom synoviálnej tekutiny a odber je jednoduchšie realizovateľný. (Decamp a kol., 2016).

Pacient je polohovaný končatinou z ktorej bude odobratá synoviálna tekutina smerom nahor. Pacienti sú sedovaní alebo v celkovej anestézii. Koža na kĺbe bude asepticky pripravená na sterilný odber. Synoviálna tekutina je aspirovaná do striekačky s objemom 3 ml. Vzorka synoviálnej tekutiny je uskladnená pri teplote  $-80^{\circ}\text{C}$  až do vyšetrenia (Allen a kol., 2012). Analýza synoviálnej tekutiny je vykonávaná pred terapiou MSCs-CM ako aj na konci terapie. Medzi markery ktoré budeme analyzovať zo synoviálnej tekutiny patria GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-15, IL-10, MCP-1, TNF- $\alpha$  (Milliplex Canine Cytokine Magnetic Bead Panel, 96-Well Plate Assay). Analýzu vykonáme systémom Magpix System, Luminex Corporation.

Priama bunková interakcia (cell-to cell) vedie k predĺženým imunomodulačným, trofickým, anti-fibrotickým, anti-apoptitickým a protizápalovým účinkom (Saulnier a kol., 2015), preto je cieľom podrobnejšie skúmanie výsledkov experimentálnej liečby MSCs.



## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Allen PI, et. al. Correlation between synovial fluid cytokine concentrations and limb function in normal dogs and in dogs with lameness from spontaneous osteoarthritis. *Veterinary Surgery*. 2012;
- Bogers, S.H. Cell-based therapies for joint disease in veterinary medicine: what we have learned and what we need to know. *Front Vet Sci*. 2018; 5:70.
- Anderson MA, Mann F.A., Force plate analysis: A noninvasive tool for gait analysis. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1994;16:857-867
- Decamp CE, Johnston SA, Dejardin LM, Sheaffer SL. Handbook of small animal orthopedics and fracture repair. Missouri:Elsevier. 2016; 24 – 33 s..
- De Bari, Dell'accio F, Luyten FP. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum*. 2001; 44 (1) : 85-95.
- Johnston SA, Tobias KM. *Veterinary surgery: small animal, second edition*. 2018, inkling ISBN: 978-0-323-51020-2
- Saulnier N, et. al. Intra-articular administration of xenogeneic neonatal mesenchymal stromal cells early after meniscal injury down-regulates metalloproteinase gene expression in synovium and prevents cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis. *Osteoarthr Cartilage*. 2015; 23:122–33.
- Humenik F, Cizkova D, Cikos S. Canine Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells: Genomics, Proteomics and Functional Analyses of Paracrine Factors. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2019; 18 (9), 1824-1835
- Van Buul GM, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20(10):1186–96.
- Van der weegen W, et. al. No difference between intra-articular injection of hyaluronic acid and placebo for mild to moderate knee osteoarthritis: a randomized, controlled, double-blind trial. *J Arthroplasty*. 2015; 30:754–7.
- Walton MB, Cowdero EC, Wustefeld-janssens B. Mavacoxib and meloxicam for canine osteoarthritis: a randomised clinical comparator trial. *Vet Rec*. 2014; 175:280.
- Wolfstadt JI, et al. Current concepts: the role of mesenchymal stem cells in the management of knee osteoarthritis. *Sports Health*. 2015; 7(1):38–44.

# BAKTERIOCÍNOVÝ POTENCIÁL FEKÁLNYCH KMEŇOV *ENTEROCOCCUS MUNDTII* Z KONÍ

Focková V<sup>1</sup>., Styková E.<sup>2</sup>, Maďar M.<sup>2</sup>, Kačírová J.<sup>2</sup>, Lauková A<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

## ABSTRAKT

Viacerí zástupcovia rodu *Enterococcus* sú v súčasnosti využívaní ako prospešné baktérie, pretože vykazujú antimikrobiálne účinky cez produkciu bakteriocínov. Táto štúdia bola zameraná na detegovanie a testovanie inhibičnej aktivity substancií produkovaných kmeňmi *Enterococcus mundtii* izolovaných z trusu koní s cieľom ich ďalšieho aplikačného využitia. Výraznú inhibičnú aktivitu vykazovali bakteriocínové substancie produkované 4 kmeňmi *E. mundtii*, keď bola detegovaná inhibícia rastu indikátorových kmeňov listérií, enterokokov, či stafylokokov.

## ÚVOD

Enterokoky (rod *Enterococcus*, kmeň/fylum Firmicutes) sú 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 potravín (Gilmore a kol., 2002). Na jednej strane sú enterokoky považované za mikroorganizmy, ktoré môžu spôsobovať ochorenia, avšak na druhej strane sú to tiež baktérie, ktoré môžu mať prospešné vlastnosti, medzi ktoré patrí napr. produkcia bakteriocínov (resp. enterocínov). Prostredníctvom týchto látok dokážu inhibovať rast iných baktérií vrátane vyvolávajúcich ochorenia. Vďaka tomu sú viacerí zástupcovia rodu *Enterococcus* využívaní ako prospešné baktérie (Lauková a kol., 1993; Franz a kol., 2007). Najčastejšie detegovanými a podrobne študovanými druhmi sú *Enterococcus faecium* a *E. faecalis*. Druh *E. mundtii* patrí do skupiny *E. faecium*, na základe analýzy podobnosti génov 16S rRNA (Zhong a kol., 2017).

U kmeňov druhu *E. mundtii* bol popísaný inhibičný účinok na rast zástupcov rodu *Listeria* (Kawamoto a kol., 2002; Ferreira a kol., 2007), ale popísaný bol aj antivirotický účinok substancie produkovanej kmeňom *E. mundtii* ST4V (izolovaný zo sóje, Todorov a kol., 2005). Stále však nie je k dispozícii dostatok informácií o biologickej/inhibičnej aktivite zástupcov *E. mundtii*, najmä kmeňov izolovaných zo zvierat. Táto štúdia je zameraná na fekálne kmene *E. mundtii* z koní a testovanie ich bakteriocínovej aktivity s cieľom možného využitia v chove, keďže o mikrobiote koní ako takej a schopnosti niektorých jej zástupcov produkovať antimikrobiálne bakteriocínové substancie sú len limitované informácie.

## MATERIÁL A METODIKA

Kmene *E. mundtii* boli izolované z trusu koní plemena Norik muránsky odchovávaných tradičným spôsobom. Spracovaný bol trus (47 vzoriek) od 47 koní rôzneho veku a pohlavia. Vzorky boli spracované štandardnou mikrobiologickou metódou podľa ISO s použitím M-Enterococcus agaru (Difco™, USA). Odpichnuté boli viaceré kolónie z najvyššieho riedenia danej vzorky, ktoré boli taxonomicky zaradené na základe analýzy MALDI-TOF identifikačným systémom (Bruker Daltonics, Billerica, Maryland, USA). Kmene boli následne postúpené sekvenačnej analýze, identifikované pomocou BLASTn analýzy. Boli aj fenotypizované (BBL identifikačný kit, Cockeysville, USA). Inhibičná (bakteriocínová) aktivita kmeňov *E. mundtii* bola najprv testovaná kvalitatívnou metódou podľa Skalku a kol. (1983) pri použití hlavného indikátorového kmeňa *Enterococcus avium* EA5 (kmeň z nášho laboratória). Inhibičné zóny boli merané a vyjadrené v milimetroch (mm). Následne boli pripravené supernatanty z kmeňov *E. mundtii* po ich 18 h kultivácii v MRS bujóne (Merck, Nemecko) a centrifugácii (10 000 × g) 30 minút. Inhibičná aktivita supernatantov bola testovaná kvantitatívnou metódou tzv. agar spot testom (De Vuyst a kol., 1996) opäť na

indikátorový kmeň *E. avium* EA5. Inhibičná aktivita bola vyjadrená v Arbitrárných jednotkách na ml (AU/ml), čo zodpovedá najvyššiemu riedeniu substance, ktorá ešte spôsobí inhibíciu rastu indikátorového kmeňa (AU/ml). Supernatanty boli následne 10 x zahustené s použitím koncentrátora - Concentrator Plus (Eppendorf) a opäť bola testovaná ich inhibičná aktivita na indikátorový kmeň *E. avium* EA5 vyjadrená v AU/ml. Ako indikátorové kmene boli použité aj kmene *Listeria monocytogenes* (Univerzita v As, Nórsko – LM(P) 7223, LM(P) 6301 a LMB 320N).

Následne boli pripravené čiastočne purifikované substance tzv. precipitáty zo štyroch kmeňov *E. mundtii* vykazujúcich inhibičnú aktivitu (EM DK-KD 38/1, EM DK-KD 34/2, EM DK-KD 41/3 a EM DK-KD 40/2). Po ich 18 h kultivácii v MRS bujóne (Merck, Nemecko) a centrifugácii (10 000 x g) 30 minút 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 používajúc indikátorový kmeň *E. avium* EA5 a kmene listérií. Pre testovanie bakteriocínovej (inhibičnej) aktivity precipitátov EM boli použité ešte aj kmene *Escherichia coli* z trusu kačíc (8), koní (10) a pštrosov (13), salmonely (4), kmene *E. hirae* z bažantov (7) a pštrosov (15), enterokoky z trusu koní a z kozieho mlieka (9 a 1), enterokoky z trusu bobrov (5), jeleňov a srn (7), a kmene stafylokokov izolovaných z rôznych zdrojov (ovčí hrudkový syr, trus koní, srny, psa, črevo bobrov alebo rýb; počet 61).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

MALDI-TOF identifikácia, fenotypizácia ako aj BLASTn analýza (genotypizácia) preukázali taxonomickú príslušnosť 14 kmeňov ku druhu *Enterococcus mundtii*. Pri kvalitatívnej metóde testovania inhibičnej aktivity kmeňov bol rast hlavného indikátorového kmeňa *E. avium* EA5 inhibovaný dosahujúc inhibičné zóny o veľkosti 7 až 10 mm. Pri kvantitatívnej metóde bol rast indikátorového kmeňa *E. avium* EA5 inhibovaný supernatantmi 4 kmeňov *E. mundtii* EM DK-KD 38/1, EM DK-KD 34/2, EM DK-KD 41/3 a EM DK-KD 40/2 s inhibičnou aktivitou 100 AU/ml. Pri testovaní inhibičnej aktivity koncentráta bol najaktívnejší koncentrát kmeňa *E. mundtii* DK-KD 34/2, ktorý dosiahol inhibičnú aktivitu 800 AU/ml pri použití indikátorového kmeňa *E. avium* EA5. Ostatné koncentráty dosiahli inhibičnú aktivitu 200 - 400 AU/ml. Precipitát kmeňa EM DK-KD 41/3 ako jediný vykazoval inhibičnú aktivitu na kmeň *E. avium* EA5 (800 – 1600 AU/ml), zatiaľ čo v rámci indikátorových kmeňov listérií, precipitáty zo všetkých štyroch kmeňov *E. mundtii* inhibovali len rast kmeňa *L. monocytogenes* LM(P) 7223 pri inhibičnej aktivite 3200 až 12 800 AU/ml. Rast indikátorových kmeňov *E. coli* a salmonel nebol inhibovaný po ošetrení s precipitátmi EM DK-KD. Rast kmeňov *E. hirae* z bažantov a pštrosov bol inhibovaný všetkými precipitátmi EM DK-KD s inhibičnou aktivitou 800 až 6400 AU/ml; podobne tak boli inhibované enterokoky z trusu koní, vysokej zvere aj z kozieho mlieka. Inhibičná aktivita precipitátov EM DK-KD bola otestovaná aj na kmene stafylokokov z rôznych zdrojov. Dosahovala hodnotu 100-800 AU/ml. Kmene SA Os 2/1 (ovčí hrudkový syr), *Staph. vitulinus* K9PL/1, *Staph. capitis* K2PL/1, *Staph. succinus* subsp. *cohnii* K15PL/3 (trus-kôň), *Staph. hominis* SHo52, *Staph. xylosus* SX 1SL1, *Staph. hominis* SHo 15L2 (intestinálny trakt bobra), *Staph. aureus* DARKY, *Staph. arlettae* SARl (trus-pes) boli inhibované všetkými precipitátmi z kmeňov *E. mundtii* (100 – 800 AU/ml). Mundticíny z kmeňov izolovaných z trusu koní popísané doposiaľ neboli, preto sú prezentované výsledky originálnym prínosom do tejto oblasti mikrobiológie. Významné je zistenie inhibičnej aktivity bakteriocínovej substance zo 4 kmeňov *E. mundtii* na rast klinických kmeňov listérií, ale i na enterokoky a stafylokoky z rôznych zdrojov. Podobné inhibičné spektrum bolo popísané u mundticínu QU2 z kmeňa *E. mundtii* QU2 izolovaného zo sóje (Zendo a kol. 2005). Mundticíny svojimi vlastnosťami zaraďujeme medzi tzv. teplo-stabilné bakteriocíny-enterocíny, ktoré sa väčšinou vyznačujú

širokým inhibičným spektrom účinku (Lauková a kol. 1993, Franz a kol. 2007). Mundticíny v tejto štúdií síce mali širšie inhibičné spektrum, ale inhibovali len rast Gram-pozitívnych baktérií (medzi také patrí i druh *E. mundtii*) a neinhibovali rast Gram-negatívnych salmonel a *E. coli*. V testovaní a štúdiu ďalších vlastností pokračujeme. Avšak už tieto preliminárne výsledky poukazujú na sľubné aplikačné možnosti testovaných substancií napr. v chove koní.

Práca bola podporená projektami VEGA 2/0005/21 a SK-PL (2019-2021).

## 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.
- Ferreira AE, et al. Characterization of enterocins produced by *Enterococcus mundtii* isolated from humans feces. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2007; 50: 249-258.
- Franz CHMAP, et al. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31: 293-310.
- Gilmore MS, et al. Enterococcal Virulence In: *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance.* ASM Press, Washington, DC. 2002; 301–354.
- Kawamoto S, Shima J, Sato R. Biochemical and genetic characterization of mundticin KS, an antilisterial peptide produced by *Enterococcus mundtii* NFRI 7393. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68: 3830-3840.
- 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.
- Todorov SD, et al. An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soya beans. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 25: 508-513.
- 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.
- Zendo T, et al. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *Journal of Applied Microbiology.* 2005; 99: 1181-1190.
- Zhong Z, Zhang W, Song Y, Liu W, Xu H, Xi X, Menghe B, Zhang H, Sun Z. Comparative genomic analysis of the genus *Enterococcus*. *Microbiol. Res.* 2017; 196: 95-105.

# POROVNANIE DIAGNOSTICKEJ EFEKTÍVNOSTI DVOCH ZOBRAZOVACÍCH METÓD PRI OCHORENIACH CHRBTICE

Fuchs J., Ledecký V., Kuricová M.

*Klinika malých zvierat, Pracovisko chirurgie, ortopédie, röntgenológie a reprodukcie,  
Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

## ABSTRAKT

V predloženom príspevku sa venujeme vyhodnoteniu použitia a efektivity zobrazovacích metód pri neurologických ochoreniach vychádzajúcich z poškodenej miechy psov. S neurologickými ochoreniami sa stretávame v dnešnej dobe pomerne často, jedná sa pri tom o život ohrozujúce stavy nesúce so sebou mnohokrát nepriaznivú prognózu, ak nie sú manažované dostatočne rýchlo a adekvátne. Najčastejšími diagnózami sú u našich pacientov ochorenia medzistavcových platničiek a poranenia chrbtice a miechy externými traumami. Diagnostika ochorení je založená na kompletnom klinickom a neurologickom vyšetrení a zobrazovacej diagnostike. Myelografia je dnes bežne používanou röntgenologickou metódou, prevažne kompresných ochorení miechy. Sofistikované diagnostické metódy, ako magnetická rezonancia (MRI) indikujeme v prípadoch multifokálnych lézií a všetkých nekompresných ochorení miechy.

## ÚVOD

Neurologické ochorenia patria v súčasnosti medzi najnáročnejšie klinické prípady vo veterinárnej medicíne. V poslednom desaťročí došlo k zvýšeniu dostupnosti nových diagnostických metód ako napr. magnetická rezonancia (MRI) a pokrok v možnostiach tejto zobrazovacej metódy vytvoril lepšie podmienky pre pochopenie zložitých neurologických problémov a diagnostiku neurologických prípadov (Platt a Olby 2012). Medzi najčastejšie ochorenia chrbtice, ktoré môžeme pozorovať u psov, okrem fraktúr a luxácií/subluxácií patria atlantoaxiálna nestabilita (AAN), ochorenie medzistavcových platničiek (IVDD), spondylosis deformans/DISH, kaudálna cervikálna spondylomyelopatia (CSM) a vrodené anomálie stavcov. Na základe stupňa poškodenia a miesta patológie miechy pozorujeme rôzne klinické príznaky, ako bolesť pri dotyku postihnutej oblasti, abnormálny postoj, zmeny správania, strata funkcie končatín (paréza alebo paralýza). Tieto klinické príznaky majú rôzny stupeň závažnosti a môžu výrazne znížiť kvalitu života zvierat'a. Pomocou dôkladného neurologického vyšetrenia, dostupných zobrazovacích metód a stanovenia rýchlej a presnej diagnózy možno tieto ochorenia liečiť a mnohé zvieratá sa môžu úplne zotaviť. Diagnostika neurologických ochorení pozostáva nielen zo základného klinického, neurologického a laboratórneho vyšetrenia, ale aj zo špecifických metód, ako je röntgenológia (RTG), počítačová tomografia (CT), MRI, elektromyografia, biopsia svalov a nervov (Dewey a Fossum 2019).

Myelografia je zobrazovacia metóda, ktorá pozostáva z aplikácie kontrastného média do subarachnoidálneho priestoru okolo miechy na identifikáciu odchýlok, ktoré môžu poukazovať na miesto lézie miechy. Myelografia sa podľa miesta aplikácie rozdeľuje na kraniálnu (*cisterna magna*) a kaudálnu (lumbálnu L4/L5 alebo L5/L6). Pre väčšie plemená psov sa kontrastná látka aplikuje do priestoru L5/L6 a pre kaudálne umiestnenie *conus medullaris* u menších psov priestor L6/L7 (Diaz 2005). Táto technika spočíva v aplikácii kontrastnej látky založenej na báze jódu, ako je Iohexol alebo Iopamidol, ktorá sa v subarachnoidálnom priestore zmiešava s mozgovomiechovým mokom a vizualizuje patologické zmeny, ako napr. kompresiu alebo expanziu miechy. Indikácie pre použitie myelografie zahŕňajú suspektné lézie, ktoré nie sú viditeľné na konvenčných röntgenogramoch, zistenie prítomnosti multipočetných lézií, určenie miesta a závažnosti

kompresie miechy, určenie presnej neurolokalizácie, ako aj voľba chirurgických postupov (Lewis 1991, Wisner 2004, Schwarz a Holloway 2016).

Magnetická rezonancia je diagnostická metóda, ktorej základom je usporiadanie protónov v tele pomocou silného magnetického poľa, ktoré sú následne vyradené z usporiadania aplikovaním vysokofrekvenčného prúdu. Tieto protóny generujú svoj vlastný rádiový signál, ktorého kinetika rozpadu je analyzovaná počítačom a použitá na vytvorenie obrazu. Táto metóda poskytuje vynikajúce kontrastné rozlíšenie mäkkých tkanív v ľubovoľnej rovine, nevyžaduje použitie ionizujúceho žiarenia a je metódou voľby pri diagnostike ochorení zasahujúcich mozog, miechu, mozgomiechový mok, extradurálny tuk, medzistavcové platničky či periférne nervy (Olby a Thrall 2012, Kirberger 2016).

Výhodou MRI je schopnosť vizualizovať miechu bez využitia kontrastnej látky priamo vizualizáciou mozgomiechového moku v subarachnoidálnom priestore, vďaka čomu sa vyhneme invazívnej punkcii subarachnoidálneho priestoru. V štúdiách porovnávajúcich myelografiu a MRI sa ukázalo, že MRI je presnejšia pri predpovedaní miesta, závažnosti a povahy kompresie miechy (Robertson a Thrall 2011). Naším cieľom bolo vyhodnotiť úspešnosť získania diagnóz pomocou dvoch zobrazovacích metód – myelografie a magnetickej rezonancie. Výsledky sme vyhodnotili pomocou deskriptívnej štatistiky.

## MATERIÁL A METODIKA

Do práce boli zahrnuté všetky prípady ochorení chrbtice psov, ktoré boli diagnostikované na Pracovisku chirurgie, ortopedie, röntgenológie a reprodukcie Kliniky malých zvierat, Univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach v období od januára 2019 do augusta 2021. Pacientov sme klinicky a neurologicky vyšetrili a následne diagnostikovali pomocou zobrazovacích metód – röntgenológia a myelografia, v prípade indikácie magnetickej rezonancia.

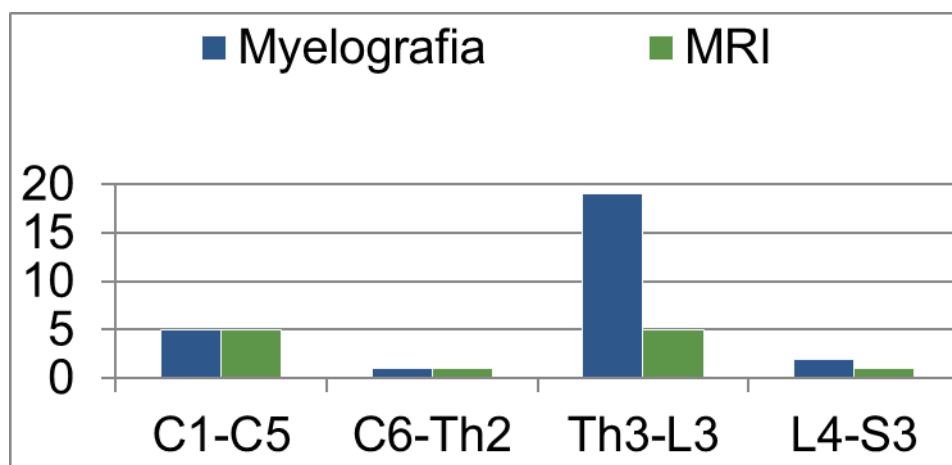
Do našej štúdie sme zahrnuli 30 psov s kompletnými diagnostickými záznamami. Psov, u ktorých neboli záznamy kompletne sme zo štúdie vylúčili. Zastúpenie plemien bolo nasledovné: 4x maltézsky psík, 4x yorkshirsky teriér, 4x francúzsky buldoček, 2x slovenský kopov, 3x jazvečík, 2x nemecký ovčiak, 3x veľký švajčiarsky salašnícky pes, doberman, pudel, lhasa apso, čivava, anglický kokeršpaniel a 3 krížence. Jednalo sa pri tom prevažne o samce v pomere 70:30(%) voči samiciam. Priemerný vek postihnutých psov bol 7,4 rokov  $\pm$  2,77 (od 3 – do 13).

U 27 psov bola vykonaná myelografia. Z 27 psov sme u 19 získali definitívnu diagnózu a títo pacienti boli liečení následne chirurgickou dekompresiou. Magnetickú rezonanciu celkovo podstúpilo 11 psov z 30, deväť z 27 psov po myelografii podstúpilo MRI. Podľa lokalizácie sme segmenty miechy rozdelili do štyroch oblastí: C1-C5 (cervikálna časť), C6-T2 (cervikotorakálna), T3-L3 (torakolumbarová) a L4-S3 (lumbosakrálna) na základe skutočnosti, že poškodenie segmentov miechy patriacich do každej z týchto oblastí dáva podobné klinické príznaky. Cervikálny segment bol postihnutý u 6 pacientov (20%), z toho sme definitívnu diagnózu získali pomocou myelografie u 1 pacienta a u 5 pacientov bolo potrebné vyšetrenie MRI.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cervikotorakálna oblasť bola diagnostikovaná u 2 pacientov (6,66%) pomocou myelografie a MRI v pomere 1:1. Torakolumbárna oblasť bola postihnutá u 20 psov (66,6%), kde sme pomocou myelografie získali definitívnu diagnózu u 15 pacientov a u 5 bola indikované vyšetrenie MRI. Myelografické vyšetrenie bolo u 2 psov (6,66%) dostačujúce pre vyslovenie diagnózy postihnutej lumbosakrálnej oblasti.

**Graf 1 Porovnanie efektívnosti zobrazovacích metód v závislosti od postihnutého segmentu**  
 Počty pacientov vyšetrených jednotlivými zobrazovacími metódami s léziami prislúchajúcimi jednotlivým segmentom.  
 C1-C5 – cervikálny segment, 6-Th2 – cervikotorakálny segment, Th3-L3 - torakolumbálny segment, L4-S3 -  
 lumbosakrálny segment



Zo získaných výsledkov vyplýva, že pri suspektných léziách v cervikálnej a cervikotorakálnej oblasti môže byť myelografia využitá, avšak nevykazuje dostatočnú efektívnosť pre vyslovenie definitívnej diagnózy. Pri torakolumbálnych léziách je myelografia hodnotnou zobrazovacou metódou (záchytnosť 50%) hlavne na pracovištiach, ktoré nedisponujú sofistikovaným diagnostickým vybavením. Je však potrebné podotknúť, že zistenie sa nedá považovať za všeobecné, pretože v našom prípade sa pri cervikálnych léziách jednalo prevažne o nekompresívne intramedulárne lézie parenchýmu miechy (ANNPE, GME, a i.) diagnostikovateľné len pomocou MRI.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dewey WC, Fossum, WT. Neurodiagnostic overview for the small animal surgeon. *Small Animal Surgery* (Fifth edition), ELSEVIER, 2019, p: 1313 - 1322, ISBN: 978-0-323-44344-9
- Diaz FL. Practical contrast radiography 4. Myelography. [Online]. In Practice. 2005; 27 (10), 502-510
- Kirberger RM, McEvoy FJ. In Kirberger (editors) *BSAVA Manual of Canine and Feline Musculoskeletal Imaging*, 2nd edition, 2016. BSAVA, 333-346. ISBN 978-1-905319-78-7
- Lewis DG. Myelography in the dog. [Online]. In Practice, 1991. [03.02.2020]
- Olby N, Thrall DE. Neuroimaging. In Platt (editors) *BSAVA Manual of Canine and Feline Neurology* (Fourth edition). BSAVA, 2014, p: 77-92, ISBN 978-1-905319-34-3
- Robertson I, Thrall DE. Imaging dogs with suspected disc herniation: Pros and cons of myelography, computed tomography, and magnetic resonance. *Veterinary Radiology and Ultrasound* 52 (Suppl. 1) 2011, 81–84
- Schwarz T, Holoway A. Radiology of the Vertebral Column. In Platt (Editors) *BSAVA Manual of Canine and Feline Radiography and Radiology*. BSAVA 2013, p: 355-380, ISBN 978-1-905319-44-2
- Wisner E. Diagnostic Imaging of the Spine--Radiography, Myelography, CT & MRI. [Online]. World Small Animal Veterinary Association World Congress Proceedings 2004

## URČENIE VPLYVU KAROTICKEJ ENDARTEREKTÓMIE NA NAVODENIE ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE

Furman M.<sup>1</sup>, Mačáková L.<sup>1</sup>, Némethová M.<sup>1</sup>, Virág M.<sup>2</sup>, Sihotský V.<sup>2</sup>, Kopolovets I.<sup>2</sup>, Mucha R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra, SAV, Košice

<sup>2</sup>Klinika cievnej chirurgie, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, Košice

### ABSTRAKT

Ischémia mozgu je závažný stav vznikajúci redukciou krvného prietoku mozgovým tkanivom. Toto akútne poškodenie patrí celosvetovo k najčastejším príčinám úmrtí či invalidity. Ischemická tolerancia (IT) je neuroprotektívny fenomén schopný redukcie ischemického poškodenia. Pre svoju komplexnosť stále nie je známy presný mechanizmus účinku IT. IT je možné navodiť aplikáciou rôznych stresorov na subletálnej úrovni, a to vrátane ischémie samotnej. Cieľom tejto práce je objasniť vplyv karotickej endarterektómie na navodenie ischemickej tolerancie. Úspešnosť navodenia IT sme detegovali na základe modifikácie génovej expresie *TM4SF1*. *TM4SF1* je špecifickým markerom ischémiického poškodenia. Reguluje vývoj, rast, pohyblivosť buniek, bunkový cyklus a apoptózu. Vďaka rovnakej miere expresie v krvi a mozgu je tiež korelačným markerom medzi nimi. Pacientov podstupujúcich karotickú endarterektómiu sme rozdelili do skupín podľa toho či už ischemickú cievnu mozgovú príhodu prekonali, a ako dávno. Krvné vzorky im boli odobraté pred endarterektómiou a po nej. Z krvných buniek sme izolovali RNA, reverznou transkripciou ju prepísali do cDNA a tú následne analyzovali pomocou kvantitatívnej RT-PCR. Naše výsledky potvrdili vplyv indukcie endarterektómie na navodenie ischemickej tolerancie, pričom štatisticky najvýznamnejší efekt bol pozorovaný u pacientov po ischémi. Uvedené výsledky môžu prispieť k detailnejšiemu objasneniu týchto mechanizmov na molekulárnej úrovni. Predkladaná práca je súčasťou širšieho výskumného projektu, ktorý je zameraný na popisovanie mechanizmov kondicionovania na molekulárno-proteomickej úrovni.

### ÚVOD

Cievna mozgová príhoda (CMP) sa definuje ako akútne poškodenie buniek v určitej oblasti mozgového tkaniva. Až 80% všetkých prípadov CMP je ischemického typu. Ischémia vzniká ako následok nedokrvenia postihnutej oblasti mozgového tkaniva z dôvodu prekážky blokujúcej prísun okysličenej krvi k bunkám mozgu (Donnan a kol., 2008). Z molekulárneho pohľadu pozostáva ischémia z celého radu biochemických kaskád, ktoré vedú až ku smrti postihnutých buniek. Terapeutické postupy zamerané len na jeden mechanizmus z celkovej komplexnej patofyziologickej odpovede sa doposiaľ nepreukázali ako účinné, a tak sa pri liečbe ischémie pozornosť obracia k využitiu telu vlastných endogénnych neuroprotektívnych mechanizmov, akým je aj navodenie ischemickej tolerancie, pre ktorú je charakteristická zvýšená bunková odolnosť voči ischemickému poškodeniu. Molekulárny mechanizmus navodzujúci toleranciu však z dôvodu vysokej miery komplexnosti a zložitosti jednotlivých dráh stále nepatrí k úplne prebádaným fenoménom. Doposiaľ je známe, že pôsobením stimulu indukujúceho toleranciu dochádza k vytvoreniu efektorových molekúl spôsobujúcich zmeny v génovej expresii, alebo posttranslačné úpravy v už existujúcich proteínoch. Proces navodenia tolerancie (kondicionovanie) je možné previesť pôsobením rôznych stimulov za použitia viacerých kondicionačných stratégií. Jedným z takýchto toleranciu indukujúcich stimulov je aj aplikácia subletálneho ischemického ataku (Kirino, 2002; Gidday, 2006; Lehotský a kol., 2009; Koch a kol., 2014; Wang a kol., 2015). V tejto práci sme sa zamerali na karotickú endarterektómiu (CEA), ako na chirurgický zákrok spĺňajúci kritérium jemného ischemického ataku (pri endarterektómii sa karotida, z ktorej má byť odstránený arteroskerotický plát, dočasne uzavrie a mozog je tak zásobovaný krvou len prostredníctvom jednej karotidy) a jej vplyv na stimuláciu neuroprotektívnych kaskád s následným navodením ischemickej tolerancie (Howell, 2007). Tento vplyv sme detegovali na základe zmien



v expresii génu *TM4SF1*. Ten okrem toho, že plní funkciu regulátora rastu a vývoja, má vplyv na pohyblivosť buniek, bunkový cyklus a apoptózu, je tiež špecifickým markerom ischemického poškodenia. Keďže miera jeho expresie je rovnaká v mozgu aj v krvi, je možné jeho využitie ako korelačného markeru medzi krvou a mozgovým tkanivom (Ramsay a kol., 2019). Cieľom nášho experimentu bolo študovať modifikáciu expresie ischemického markeru (*TM4SF1*) u pacientov, ktorí podstúpili chirurgické odstránenie arterosklerotického plátu z karotidy (karotickú endarterektómiu).

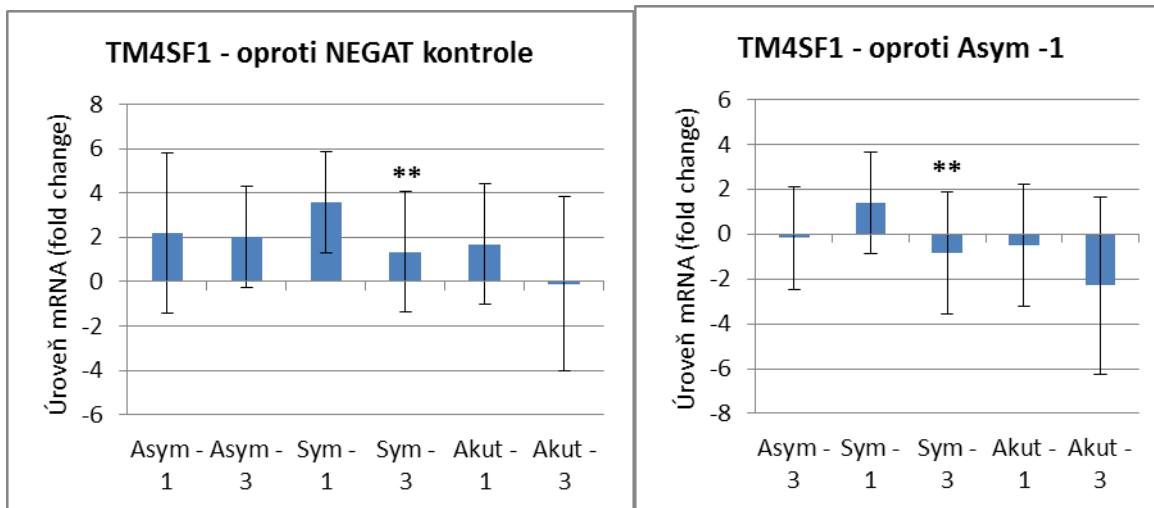
## MATERIÁL A METODIKA

Pacientov podstupujúcich chirurgický zákrok karotickej endarterektómie sme rozdelili do troch skupín podľa toho, či už v minulosti prekonali ischemickú CMP a ak áno, ako dávno. Asymptomatická skupina (Asym) prekonala CMP v období 6 a viac mesiacov pred CEA, resp. neprekonala CMP vôbec, Symptomatická skupina (Sym) prekonala CMP 7 dní až 6 mesiacov pred CEA a Akútna skupina (Akut) prekonala CMP do 7 dní pred týmto zákrokom. Každé skupine pacientov bola odobraná vzorka krvi pred karotickou endarterektómiou (Obr. 1; označené ako 1) a následne 48 hodín po nej (Obr. 1; označené ako 3). Ďalšiu samostatnú skupinu tvorila negatívna kontrola (NEGAT) so vzorkou krvi od zdravých ľudí.

Po odobratí krvných vzoriek sme z krvných buniek izolovali RNA. Procesom reverznej transkripcie sme túto RNA prepísali do cDNA s využitím High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). V programe Geneious (Biomatters, Ltd., New Zealand) sme si nadizajnovali sekvencie forward a revers primerov pre nami zvolený marker ischemického poškodenia (*TM4SF1*) a pre housekeeping gén (*18S*). Pripravili sme reakčnú zmes podľa pokynov výrobcu kitu (PowerUp SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific, USA). qRT-PCR bola vykonaná s využitím prístroja BioRad CFX96. Podmienky reakcie boli: UDG aktivácia (50°C 2 minúty) iniciačná denaturácia (95°C 2 minúty), nasledovalo 60 cyklov (95°C 15 sekúnd, 62°C 1 minúta). Namerané dáta sme následne štatisticky analyzovali s využitím štandardných vzorcov pre výpočet smerodajnej odchýlky pri miere spoľahlivosti 95% a štatistického významu pomocou T-testu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Gén *TM4SF1*, ktorého modifikáciu úrovne expresie pôsobením endarterektómie sme pozorovali, bol zvolený kvôli jeho funkcii špecifického markera ischemického poškodenia. Mieru jeho expresie (Obr. 1) oproti negatívnej (NEGAT) kontrole sme pozorovali vo všetkých skupinách pred aj 48 hodín po CEA, pričom najvyššia úroveň expresie bola zaznamenaná u Sym-1 a najnižšia u Akut-3. Taktiež sme pozorovali, že miera expresie *TM4SF1* je vždy vo vzorkách 48 hodín po CEA (3) nižšia ako pred ňou (1). To platí pre každú skupinu, pričom štatisticky najvýznamnejší rozdiel sa prejavil u Sym a štatisticky najviac zanedbateľný rozdiel mala Asym skupina. Pri normalizácii voči Asym skupine, u ktorej sme predpokladali vymiznutie/nepřítomnosť aktivovaného neuroprotektívneho mechanizmu, sme pozorovali najvyššiu mieru expresie *TM4SF1* u Sym-1 a najnižšiu mieru expresie u Akut-3.



**Obr. 1. Expresia génu *TM4SF1* oproti negatívnej kontrole (*NEGAT*) – vľavo, Expresia génu *TM4SF1* oproti *Asymptomatickej* skupine pred endarterektómiou (*Asym-1*) - vpravo**

Z výsledkov je viditeľné, že po CEA dochádza ku zníženiu miery expsie *TM4SF1*. CEA teda plní účel kondicionovania. Tento neuroprotektívny efekt bol pozorovaný v najvýraznejšej miere u *Sym* skupiny a v o niečo menšej miere u *Akut* skupiny. U *Asym* skupiny bola zmena expsie *TM4SF1* štatisticky nevýznamná. U *Akut* skupiny, ktorá prekonala ischemickú CMP do 7 dní pred CEA, sa miera expsie *TM4SF1* po CEA dostala dokonca na úroveň zdravých jedincov negatívnej kontroly.

*Publikácia vznikla realizáciou SK-VEGA grantu 2/0054/20 ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a s podporou operačného programu Integrovaná infraštruktúra, IMTS: 313011V344, spolufinancovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Donnan G, et al. Hemorrhagic stroke. *The Lancet*. 2008; 371:1612-1623.
- Gidday J. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006; 7:437-448.
- Howell SJ. Carotid endarterectomy. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2007; 99:119–131.
- Kirino T. Ischemic Tolerance. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2002; 22:1283-1296.
- Koch S, et al. Biomarkers for Ischemic Preconditioning: Finding the Responders. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2014; 34:933-941.
- Lehotský J, et al. Ischemic Tolerance: The Mechanisms of Neuroprotective Strategy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2009; 292:2002-2012.
- Ramsay L, et al. Blood transcriptomic biomarker as a surrogate of ischemic brain gene expression. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2019; 6:1681-1695.
- Wang Y, et al. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. *Experimental Neurology*. 2015; 272:26-40.

# POTENCIÁL NANOČASTÍC CeO<sub>2</sub> PRE BIOAPLIKÁCIE

Garčárová I.<sup>1</sup>, Šipošová K.<sup>1</sup>, Shlapa Y.<sup>2</sup>, Belous A.<sup>2</sup>, Musatov A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice

<sup>2</sup>Katedra chémie tuhých látok, V. I. Vernadskii Ústav všeobecnej a anorganickej chémie NASU, Kyjev, Ukrajina

## ABSTRAKT

Nanočastice CeO<sub>2</sub> NPs majú vďaka svojim jedinečným vlastnostiam potenciál dokázať alebo vyvrátiť hypotézu, že oxidačný stres zohráva dôležitú úlohu vo vývoji chorôb súvisiacich s vekom a patologickou agregáciou proteínov. V rámci tejto práce sme analyzovali vplyv CeO<sub>2</sub> NP vyznačujúcich sa rôznou veľkosťou a pomerom Ce<sup>4+</sup>/Ce<sup>3+</sup> na fibrilogenézu inzulínu a ich anti-oxidačný potenciál vyjadrený ako *pseudo*-katalázová a *pseudo*-superoxid dismutázová aktivita. Monitorovaním anti-amyloidnej aktivity fluorescenčnou ThT analýzou a atómovou silovou mikroskopiou sme preukázali, že nanočastice pripravené precipitáciou vo vodno-alkoholovom roztoku dokázali účinne ovplyvniť amyloidnú agregáciu inzulínu v závislosti od ich veľkosti. Navyše, študované nanočastice vykazujú vlastnosti podobné enzýmom; bola potvrdená ich katalázová a superoxid dismutázová aktivita, ktorá závisí od valencie. Naše výsledky môžu prispieť k lepšiemu porozumeniu mechanizmu amyloidogenézy a prepojeniu s oxidačným stresom, čím je možné dosiahnuť pokrok v hľadaní sľubnej stratégie pri modulácii amyloidnej agregácie proteínov.

## ÚVOD

Jedna z teórií uvádza, že oxidačný stres patrí k hlavným mechanizmom, ktoré sa podieľajú na poškodení kľúčových zložiek bunky, ako sú DNA, biologické membrány a proteíny, čo môže viesť až k bunkovej smrti (Lévy a kol. 2019). To nepriamo naznačuje na možné prepojenie oxidačného stresu a amyloidnej agregácie proteínov, spájanej s mnohými, prevažne neurodegeneratívnymi ochoreniami, vrátane Alzheimerovej, Parkinsonovej choroby, ale aj starnutia (Lévy a kol. 2019). Rýchlo sa rozvíjajúca oblasť nanotechnológií ponúka inovatívne aplikácie nielen v lekárskom a priemyselnom sektore. Obzvlášť významné je postavenie nanočastíc oxidu ceričitého, CeO<sub>2</sub> NPs. Unikátne optické, magnetické a chemické vlastnosti prvkov vzácnych zemín, vrátane céru pramenia z prítomnosti tienených 4f elektrónov (Taguchi a kol. 2009). Nízky redoxný stav páru Ce<sup>4+</sup>/Ce<sup>3+</sup> (~ 1.52 V) umožňuje koexistenciu oxidačných stavov III a IV, ktoré sú navzájom ľahko prepínateľné v závislosti na prostredí. Na druhej strane, tento nestechiometrický pomer Ce<sup>4+</sup>/Ce<sup>3+</sup> na povrchu častíc môže byť vyjadrený ako funkcia veľkosti častíc, a veľkosť častíc je možné počas syntézy riadiť (Dowding a kol. 2013). Vďaka koexistencii oxidačných stavov Ce<sup>4+</sup>/Ce<sup>3+</sup> na svojom povrchu, disponujú CeO<sub>2</sub> NPs „*pseudo*“-enzymatickou aktivitou, hlavne schopnosťou eliminovať reaktívne formy kyslíka. Okrem toho, bolo preukázané, že dokážu ovplyvniť aj amyloidnú agregáciu proteínov (Linse a kol. 2007; Sipošová a kol. 2019).

V prezentovanej práci sme sa zamerali na analýzu anti-amyloidnej aktivity a anti-oxidačných schopností vyjadrených ako *pseudo*-katalázová a superoxid dismutázová aktivita (SOD) v závislosti na fyzikálno-chemických vlastnostiach CeO<sub>2</sub> NPs.

## MATERIÁL A METODIKA

### Syntéza a charakterizácia CeO<sub>2</sub> NPs

Nanočastice CeO<sub>2</sub> NPs boli pripravené precipitáciou (roztok Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>4</sub> + NH<sub>3</sub>(aq)) v reakčnom médiu tvorenom destilovanou vodou a izopropanolom (IPA) v presne určených pomeroch: 0 % IPA - 100 % H<sub>2</sub>O (vzniknuté nanočastice boli označené ako **Ce1**); 25 % IPA - 75 % H<sub>2</sub>O (**Ce2**); 50 % IPA - 50 % H<sub>2</sub>O (**Ce3**); 75 % IPA - 25 % H<sub>2</sub>O (**Ce4**); 90 % IPA - 10 % H<sub>2</sub>O (**Ce5**). Častice boli syntetizované kolektívom Prof. A. Belousa z Ústavu anorganickej chémie, NASU v Kyjeve (v rámci spolupráce). Jednotlivé postupy prípravy a charakterizácie nanočastíc sú detailne opísané v práci Shlapa a kol. (2021).

### *Vplyv CeO<sub>2</sub> NPs na amyloidnú agregáciu inzulínu*

Pri štúdiu anti-amyloidnej aktivity CeO<sub>2</sub> NPs sme monitorovali: i) *inhibičnú aktivitu*, t.j. schopnosť zabrániť tvorbe amyloidných fibríl; ii) *disagregačnú aktivitu*, t.j. schopnosť disagregovať amyloidné fibrily. CeO<sub>2</sub> NPs v koncentračnom pomere 1:0.02 - 1:10 (proteín:NPs) boli pridané k roztoku 25 µM inzulínu (čo zodpovedá 145 µg/ml) v 100 mM NaCl tlmivom roztoku, pH 1,6 a vzorky boli následne inkubované pri 65 °C, 2 hod. a konštantnom miešaní v termomixéri Eppendorf (inhibičné merania), resp. častice boli pridané k vopred vytvoreným fibrilám a inkubované 24 hod. pri 37 °C bez miešania (disagregačné meranie). Pri štúdiu časovej závislosti tvorby fibríl bez a v prítomnosti CeO<sub>2</sub> NPs boli jednotlivé nanočastice Ce1-Ce5 pridané do roztoku natívneho inzulínu (25 µM). Vzorky boli vystavené podmienkam fibrilizácie a odoberané v presne určených časových intervaloch. Rozsah inhibičnej/disagregačnej aktivity a časový priebeh formovania fibríl bol hodnotený ThT fluorescenčnou analýzou a potvrdený atómovou silovou mikroskopiou (AFM) (detailný opis jednotlivých postupov a analýz je opísaný v práci Šipošovej a kol. (2019).

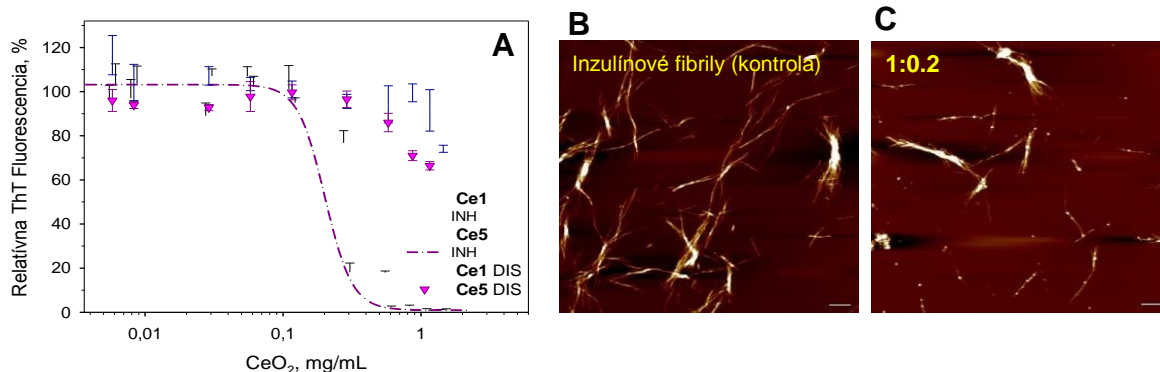
### *Štúdium pseudo-enzymatickej aktivity CeO<sub>2</sub> NPs*

Na štúdium anti-oxidačného potenciálu CeO<sub>2</sub> NPs sme zvolili metódu monitorovania pseudo-katalázovej aktivity a pseudo-SOD aktivity. Katalázová aktivita CeO<sub>2</sub> NPs bola študovaná kolorimetricky metódou oxidácie N, N-dietyl-p-fenyléndiamínsulfátu (DPD) (Bader a kol. 1988; Shlapa a kol. 2021). Pseudo-SOD aktivita CeO<sub>2</sub> NPs bola študovaná pomocou komerčnej SOD kit súpravy (Sigma Aldrich, 19160).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

CeO<sub>2</sub> NPs boli syntetizované v reakčnom médiu tvorenom rôznymi pomermi H<sub>2</sub>O a IPA. Následná detailná charakterizácia odhalila, že v závislosti od pomeru medzi zložkami média boli formované častice s veľkosťou od 13.4 nm (Ce1) po 2.8 nm (Ce5). S tým súvisí aj rôzny podiel Ce<sup>3+</sup> iónov na povrchu častíc, ktorý stúpa s klesajúcou veľkosťou postupne od 23 % (Ce1) až na 44 % (Ce5). Meraniami zeta-potenciálu bola potvrdená ich stabilita ( $\zeta$ -potenciál = +41 - +43 mV). Je potrebné poznamenať, že nanočastice si stabilitu zachovali nielen v kyslom pH ( $\zeta$  = +33.4 - +37.8 mV), ale aj v prítomnosti inzulínu ( $\zeta$  = +25 - +29.5 (mV).

V rámci štúdia účinku Ce1-Ce5 častíc na amyloidnú agregáciu inzulínu sme sa zamerali na: i) monitorovanie účinku na tvorbu amyloidných fibríl, t.j. inhibičné merania a kinetiku formovania amyloidných fibríl, a ii) na analýzu efektu častíc na už vytvorené amyloidné fibrily. Na kvantifikáciu anti-amyloidného účinku sme použili fluorescenčnú ThT analýzu. Intenzita ThT vo vzorkách inzulínových fibríl formovaných samostatne (kontrolné vzorky) bola vzatá ako 100 %. Voči tejto hodnote boli následne prepočítané hodnoty relatívnej intenzity ThT fluorescencie vzoriek obsahujúcich nanočastice. Získané údaje boli vynesené do grafu ako funkcia relatívnej ThT fluorescencie (%) od koncentrácie nanočastíc Ce1-Ce5 (Obr. 1A, stĺpce). Sigmoidálny pokles ThT fluorescencie so stúpajúcou koncentráciou nanočastíc je možné interpretovať ako pokles množstva fibríl vo vzorke, t.j. inhibíciu procesu fibrilizácie, čo sme potvrdili aj AFM. V prítomnosti častíc sme pozorovali pokles tvorby fibrilárnych útvarov v porovnaní s kontrolnou vzorkou (Obr. 1B-C). Experimentálne získané údaje boli fitované v programe SigmaPlot a následne sme určili hodnoty IC<sub>50</sub>, koncentráciu častíc, ktorá odráža 50%-ný pokles ThT fluorescencie a teda, schopnosť CeO<sub>2</sub> NPs inhibovať proces fibrilizácie o 50%. Hodnoty IC<sub>50</sub> pre Ce1-Ce5 častice boli v rozpätí od 200 - 400 µg/mL (najnižšia hodnota pre Ce5 častice, najvyššia pre Ce1). Na druhej strane pridanie CeO<sub>2</sub> NPs k vopred vytvoreným fibrilám nevedla k výraznému poklesu ThT fluorescencie (Obr. 1A trojuholníky). Disagregačná aktivita dosiahla len max. 35%. Toto zistenie naznačuje nízku disagregačnú aktivitu všetkých Ce1-Ce5.



**Obr. 1.** Monitorovanie anti-amyloidnej aktivity CeO<sub>2</sub> NPs fluorescenčnou ThT analýzou (A) a vizualizácia amyloidných fibril formovaných bez (kontrola) (B) a v prítomnosti Ce5 nanočastíc (C) pomocou atómovej silovej mikroskopie. Biela čiara reprezentuje 1  $\mu$ m (B, C).

V rámci monitorovania anti-oxidačnej aktivity novo-syntetizovaných CeO<sub>2</sub> NPs sme testovali ich pseudo-katalázovú aktivitu bez a v prítomnosti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kolorimetricky s využitím oxidácie substrátu DPD. Z nami uskutočnených experimentov je možné určiť „skutočnú“ katalázovú aktivitu odpočítaním kinetických kriviek získaných bez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od kinetických kriviek s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Najvyššiu katalázovú aktivitu vykazovali najväčšie častice, ktoré majú menšie percentuálne zastúpenie Ce<sup>3+</sup> iónov na povrchu; a naopak, najnižšiu katalázovú sme pozorovali pre najmenšie, Ce5 častice s najvyšším obsahom Ce<sup>3+</sup> iónov. Pre ucelený pohľad na anti-oxidačné vlastnosti pripravených nanočastíc sme monitorovali aj ich pseudo-SOD aktivitu. Podľa očakávania sme zistili, že rozsah SOD-aktivity závisí od pomeru Ce<sup>3+</sup>/Ce<sup>4+</sup> na povrchu. Na záver môžeme zhrnúť že novo-pripravené CeO<sub>2</sub> NPs sa vďaka svojim fyzikálno-chemickým vlastnostiam vyznačujú duálnym efektom, t.j. sú schopné nielen ovplyvňovať procesy amyloidnej agregácie, ale majú aj anti-oxidačný potenciál vyjadrený ako pseudo-katalázová a pseudo-SOD aktivita.

Táto práca vznikla za podpory projektov NATO G5683, VEGA 2/0094/21 a Programu grantov pre doktorandov SAV (APP0164).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Lévy E, et al. Causative Links between Protein Aggregation and Oxidative Stress: A Review. *Int J Mol Sci.* 2019;20(16):3896.
- Taguchi M, et al. Mechanism and Surface Chemical Characteristics of Dicarboxylic Acid-Modified CeO<sub>2</sub> Nanocrystals Produced in Supercritical Water: Tailor-Made Water-Soluble CeO<sub>2</sub> Nanocrystals. *Crystal Growth & Design.* 2009;9(12):5297-03.
- Dowding JM, et al. Cellular interaction and toxicity depend on physicochemical properties and surface modification of redox-active nanomaterials. *ACS Nano.* 2013;7(6):4855-68.
- Linse S, et al. Nucleation of Protein Fibrillation by Nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104(21):8691-96.
- Siposova K, et al. Advances in the Study of Cerium Oxide Nanoparticles: New Insights into Anti-amyloidogenic Activity. *ACS Appl. Bio Mater.* 2019;2(5):1884-96.
- Shlapa Y, et al. Structural and physical-chemical characterization of redox active CeO<sub>2</sub> nanoparticles synthesized by precipitation in water-alcohol solutions. *Nanotechnology.* 2021;32:315706.
- Bader H, et al. Photometric method for the determination of low concentrations of hydrogen peroxide by the peroxidase catalyzed oxidation of N,N-diethyl-p-phenylenediamine (DPD). *Water Res.,* 1988;22(9):1109-1115.
- Wang X, et al. Emergence of Colistin resistance Gene *mcr-8* and its variant in *Raoultella ornithinolytica*. *Front. Microbiol.* 2019; 10:228.
- Weill FW, et al. Extended- spectrum- $\beta$ -Lactamase (TEM-52) producing strains of *Salmonella enterica* of various serotypes isolated in France. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:3359–3362.
- 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.

# ANALÝZA VÝSKYTU CHRONICKEJ LAMINITÍDY V CHOVE DOJNÍC

Gomulec P., Mudroň P.

*Klinika prežívavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

## ABSTRAKT

Chronická laminitída u hovädzieho dobytku sa zvyčajne označuje ako „papučové chodidlo“, pretože tvarom rohoviny pripomína perzskú papuču. Obvykle sa vyskytuje u starších kráv, kvôli chronicite procesu a zvyčajne postihuje malé percento zvierat v chove. Zhoršuje pohybové schopnosti zvierat a zvyšuje ich citlivosť na iné choroby paznechtov. Cieľom predkladanej štúdie bolo zistiť výskyt chronickej laminitídy a jej potenciálnu dedičnosť na väčšej farme dojníc na východnom Slovensku. Údaje boli získané počas ortopedickej a funkčnej úpravy paznechtov, ktorá bola vykonávaná v týždenných intervaloch v období od septembra 2020 až do júna 2021. Chronická laminitída bola diagnostikovaná na základe typických vonkajších zmien na paznechte, medzi ktoré patrí sploštenie dorzálnej steny, ktorá sa stáva konkávnou a orientácia hrotu paznechtu dorzo-kraniálnym smerom. Údaje pre posúdenie dedičnosti boli získané z Plemenárskeho informáčneho systému a zo záznamov ortopedických výkonov kliniky za roky 2017, 2018, 2019 a 2020. V ortopedickej klieťke bolo počas obdobia 2020 – 2021 vyšetrených 444 dojníc, najmä holštajnského plemena. Výskyt chronickej laminitídy bol zaznamenaný v 34 prípadoch. Analýza potenciálnej dedičnosti ukázala, že 9 dojníc trpiacich chronickou laminitídou má rovnakého otca, ale taktiež bolo zaznamenaných 5 dojníc, ktorých matky v minulosti taktiež trpeli chronickou laminitídou. Vek jednotlivých zvierat sa pohyboval v rozmedzí od 3 rokov až po 9 rokov, pričom priemer u jednotlivých zvierat v rámci plemien bol 5,04 rokov u krížencov, 5,8 rokov u slovenského strakatého dobytku a 5,67 rokov u čiernostrakatého holsteinského dobytku. Záverom možno konštatovať, že výskyt chronickej laminitídy nepostihol viac ako 10 % stáda a dôležitú úlohu pri jej vzniku môže hrať dedičnosť.

## ÚVOD

Laminitída je multifaktoriálne ochorenie, ktoré v konečnom dôsledku poškodzuje suspenzný aparát rohového puzdra. To vedie k posunu paznechtovej kosti smerom nadol a jej následnú deformáciu (Cook, 2003). Abnormality rastu paznechtovej rohoviny sú typické pre chronickú laminitídu (Bergsten, 1994 a Webster, 2001). Rohovina pri tom rastie tak, že dorzálna stena sa stáva konkávnejšou. Tento abnormálny tvar rohovinového puzdra je spôsobený rotáciou a poklesom paznechtovej kosti vo vnútri paznechtu (Greenough, 2007). Cieľom tejto práce bol monitoring výskytu chronickej laminitídy a jej potenciálnej dedičnosti na farme dojníc.

## MATERIÁL A METODIKA

Hlavná časť práce sa vykonávala na farme dojníc na východnom Slovensku v období od 9.9.2020 do 9.6.2021. V tomto období bolo ošetrených v rámci ortopedickej alebo funkčnej úpravy paznechtov 444 dojníc. Na fixáciu zvierat sa použili ortopedické fixačné klieťky, ktoré umožňujú dôsledné vyšetrenie telesnej kondície zvierat'a, a taktiež vyšetrenie a funkčnú úpravu paznechtov. Funkčná úprava paznechtov bola vykonávaná pomocou uhlovej brúsky (MAKITA) so špeciálnymi ortopedickými brúsnymi kotúčmi. Počas funkčnej úpravy paznechtov boli zaznamenané ušné čísla zvierat'a, BCS hodnoty a zaznamenané boli aj patologické procesy lokalizované na paznechtach dojníc.

Údaje o dojniciach (plemenná skladba, vek zvierat'a a údaje o rodičoch zvierat'a) boli získané pomocou Plemenárskeho informáčneho systému ([www.plis.sk](http://www.plis.sk)). Záznamy kliniky boli využité na zistenie prítomnosti chronickej laminitídy u matiek. Výsledky boli spracované deskriptívnou štatistikou a jednorozmernou ANOVA (BCS a vek medzi plemenami).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab 1. Údaje o dojniciach s chronickou laminitídou (n=34).

Plemeno	Čiernostrakaté holsteinské čistokrvné	Slovenské strakaté zošľachtené	Krížence (X)	ANOVA
Počet	6 (17,7 %)	5 (14,7 %)	23 (67,6 %)	
BCS $\bar{x}\pm s$	3,04 $\pm$ 0,30	3,7 $\pm$ 0,25	3,17 $\pm$ 0,50	NS
Vek $\bar{x}\pm s$	5,67 $\pm$ 1,37	5,8 $\pm$ 1,17	5,04 $\pm$ 1,46	NS
A - laterálny/mediálny P	0/0	0/0	0/4	
B - laterálny/mediálny P	4/1	5/0	18/0	
C - laterálny/mediálny P	0/0	0/0	0/5	
D - laterálny/mediálny P	4/2	4/0	15/0	

A – pravá hrudníková končatina, B – pravá panvová končatina, C – ľavá hrudníková končatina, D – ľavá panvová končatina, P – paznecht, BCS – kondičné skóre

Charfeddine a Peréz-Cabal (2014) a van der Waaij a kol. (2005) vo svojich prácach potvrdili istú koreláciu medzi dedičnosťou a ochoreniami paznechtov (okrem iných aj u chronickej laminitídy), viazanú na plemeno holštajnského dobytku. V našej práci najpočetnejšiu skupinu dojníc tvorili krížence viacerých plemien (23 zvierat – 67,64 %), čo túto teóriu nepotvrďuje, ale ani nevyvracia, pretože krížence dojníc majú vo svojej plemennej skladbe značné zastúpenie holštajnského plemena. Toto tvrdenie z časti potvrďuje aj fakt, že 16 otcov z 22 zaznamenaných (72,7%) pomocou Plemenárskeho informačného systému, sú čistokrvné holštajnské býky. V 9 prípadoch (26,5%) je otcom jeden konkrétny býk tohto plemena. Mudroň a kol. (2017) vo svojej práci potvrďujú asociáciu medzi neinfekčnými ochoreniami paznechtov a BCS < 3. Výsledky hodnotenia BCS u dojníc s chronickou laminitídou v našej práci korelujú v priemere od 3,04 po 3,7 ( $p \geq 0,05$ ). Dojnice zaznamenané v našej štúdiu, u ktorých bola diagnostikovaná chronická laminitída, však boli v rôznych vekových kategóriách, a taktiež v rôznych fázach laktácie, preto ich BCS bolo v priemere vyššie (BCS > 3). Boosman a kol. (1988) vo svojej štúdiu skúmal vzťah veku hovädzieho dobytku s rozvojom histopatologických zmien prebiehajúcich v paznechtach u dojníc, postihnutých chronickou laminitídou. Skupina dojníc v jeho štúdiu bola vo veku od 2 do 5 rokov života. Potvrdil, že rozvoj chronickej laminitídy nie je viazaný na určitú vekovú skupinu, avšak rozvoj histopatologických zmien, hlavne v súvislosti s rozvojom artério-venózných anastomóz a artériosklerózných procesov, stúpa s vekom zvierat'a. Dojnice s chronickou laminitídou mali v našej štúdiu od 3 do 9 rokov, čo v priemere znamenalo rozsah od 5,04 po 5,8 rokov v rámci jednotlivých plemien ( $p \geq 0,05$ ). Kloosterman (2007) vo svojej práci tvrdí, že vyššia incidencia výskytu chronickej laminitídy je na laterálnych paznechtach panvových končatín. V našej štúdiu sa toto tvrdenie potvrdilo, pretože frekvencia výskytu makroskopických zmien na paznechte bola najvyššia na laterálnych paznechtach panvových končatín ( B – 27x a D – 23x), pričom výskyt chronickej laminitídy na hrudníkových končatinách bol najčastejší na mediálnych paznechtach ( A – 4x a C – 5x). Výsledky našej práce poukazujú na to, že nepostihol viac ako 10 % stáda a dôležitú úlohu pri jej vzniku môže hrať dedičnosť. Okolnosti vzniku chronickej laminitídy si vyžadujú ďalšiu a podrobnejšiu štúdiu, aby bolo možné vypracovať dôslednejšie preventívne protokoly, pretože neinfekčné ochorenia paznechtov spôsobujú diskomfort zvierat'a počas chôdze a vystavujú zvierat'a zvýšenému riziku vzniku ďalších chorôb paznechtov.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bergsten C. Haemorrhages of the sole horn of dairy cows as retrospective indicator of laminitis: an epidemiological study. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1994; 35:55-66
- Boosman R, Koeman J, Nap R. Histopathology of the bovine pododerma in relation to age and chronic laminitis.



- Journal of Veterinary Medicine. 1989; 36:438-446
- Cook NB. Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2003; 223:1324-1328
- Greenough PR. *Bovine laminitis and lameness: a hands on approach*. 2007. W. B. Saunders. London, UK. pp. 29-35
- Charfeddine N, Pérez-Cabal MA. Genetic parameters of claw health traits in Spanish dairy cow. *Proceeding of the 2014 Interbull Meeting*. 2014; 48
- Kloosterman P. Laminitis – Prevention, diagnosis and treatment. *Western Canadian Dairy Seminar Advances in Dairy Technology*. 2007
- Mudroň P, Hoskuldsson T, Mihajlovičová X. Prevalence of claw diseases in dairy cows with different body condition. *Folia Veterinaria*. 2017; 3:19-22
- Van der Waaij EH, Holzhauser M, Ellen E, Kamphuls C, de Jong G. Genetic parameters for claw disorders in dutch dairy cattle and correlations with conformation traits. *Journal of Dairy Science*. 2005; 88:3672-3678
- Webster AJ. Effects of housing and two forage diets on the development of claw horn lesions in dairy cows at first calving and in first lactation. *Veterinary Journal*. 2001; 162:56-65

# OVPLYVNENIE RASTU VYBRANÝCH KMEŇOV LAKTOBACILOV HUMÍNOVÝMI LÁTKAMI

Chomová N.<sup>1</sup>, Nemcová, R.<sup>1</sup>, Fečkaninová A.<sup>2</sup>, Koščová, J.<sup>1</sup>, Popelka P.<sup>3</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, UVLF, Košice, Slovensko

<sup>3</sup>Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice, Slovensko

## ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo skúmanie vplyvu humínových látok (HL) na rast piatich rôznych kmeňov laktobacilov a na patogénny kmeň *Escherichia coli*. Do rastových médií boli pridané HL v koncentráciách 0%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%. Z výsledkov vyplýva, že vyššie koncentrácie (0,8% a 1 %) inhibovali rast väčšiny testovaných kmeňov, najvýraznejšie však patogénneho *E. coli*, ktorého rast bol signifikantne potlačený aj v prítomnosti 0,4% HL. Koncentrácie 0,4% a 0,6% HL štatisticky významne neovplyvnili rast probiotických laktobacilov, iba v prípade jedného kmeňa (*L. plantarum* R2) došlo k signifikantnému zníženiu počtov v prítomnosti 0,4 % HL. Výsledky potvrdili, že vplyv HL na rast mikroorganizmov je závislý ako od ich koncentrácie, tak aj od bakteriálneho kmeňa. Na základe tejto štúdie bolo možné stanoviť vhodnú koncentráciu HL a vybrať vhodný probiotický kmeň pre následné *in vivo* experimenty.

## ÚVOD

Humínové látky (HL) sú definované ako skupina látok s vysokou molekulovou hmotnosťou, hnedým až čiernym zafarbením, ktoré majú pôvod v rozklade rastlinných a živočíšnych zvyškov (MacCarthy 2001). Tieto látky sú veľmi rozšírené a nájsť ich môžeme v pôde, vode a v sedimentoch. Predstavujú takmer 75 % celkovej organickej hmoty v pôdach a 50 % uhlíka v povrchových vodách (Filella, Buffle, Parthasarathy 2005). Zafarbenie humínových látok umožňuje absorpciu UV žiarenia a ich rozmanitá štruktúra je zodpovedná za možné interakcie s biopolymérmi, nízkomolekulárnymi organickými a anorganickými látkami, či s kovmi a ich iónmi, s ktorými vytvárajú chelátové komplexy (Klöcking a Helbig 2005). Štúdium týchto látok siaha ďaleko do minulosti a v poslednej dobe pozorujeme ich zintenzívnené skúmanie, avšak výsledky štúdií sú ambivalentné. Na jednej strane štúdie odhaľujú mnoho prínosných účinkov HL ako detoxikačný, analgetický, antimikrobiálny, či imunostimulačný. U niektorých foriem humínových kyselín je preukázaný aj antivírusový účinok v prípade infekcie vírusom herpes simplex alebo vírusom ľudskej imunodeficiencie (Rath, Huff, Huff 2006). HL nachádzajú využitie aj v chove zvierat vo forme prídavkov do krmiva pre zlepšenie rastu a zdravia (Vetvička a kol. 2010). Na druhej strane, vysoké dávky HL vedú k inhibícii aktívacie nukleárneho faktora  $\kappa$ B, stimulácii týmusu a neutrofilov, a taktiež k oxidačnému poškodeniu DNA, čo spôsobuje chromozomálne abnormality v črevných bunkách (Vetvička a kol. 2010). Vzťahy medzi HL a baktériami sú veľmi zložité. Na jednej strane podporujú rast širokého spektra baktérií, a to najmä pôdnych, na druhej strane boli popísané ich antimikrobiálne účinky. Cieľom tejto práce je preto preskúmať vplyv HL na rast vybraných probiotických, ale aj patogénnych kmeňov baktérií, čo môže v budúcnosti prispieť k podpore a ochrane zdravia u hospodárskych zvierat, ale aj u ľudí.

## MATERIÁL A METÓDY

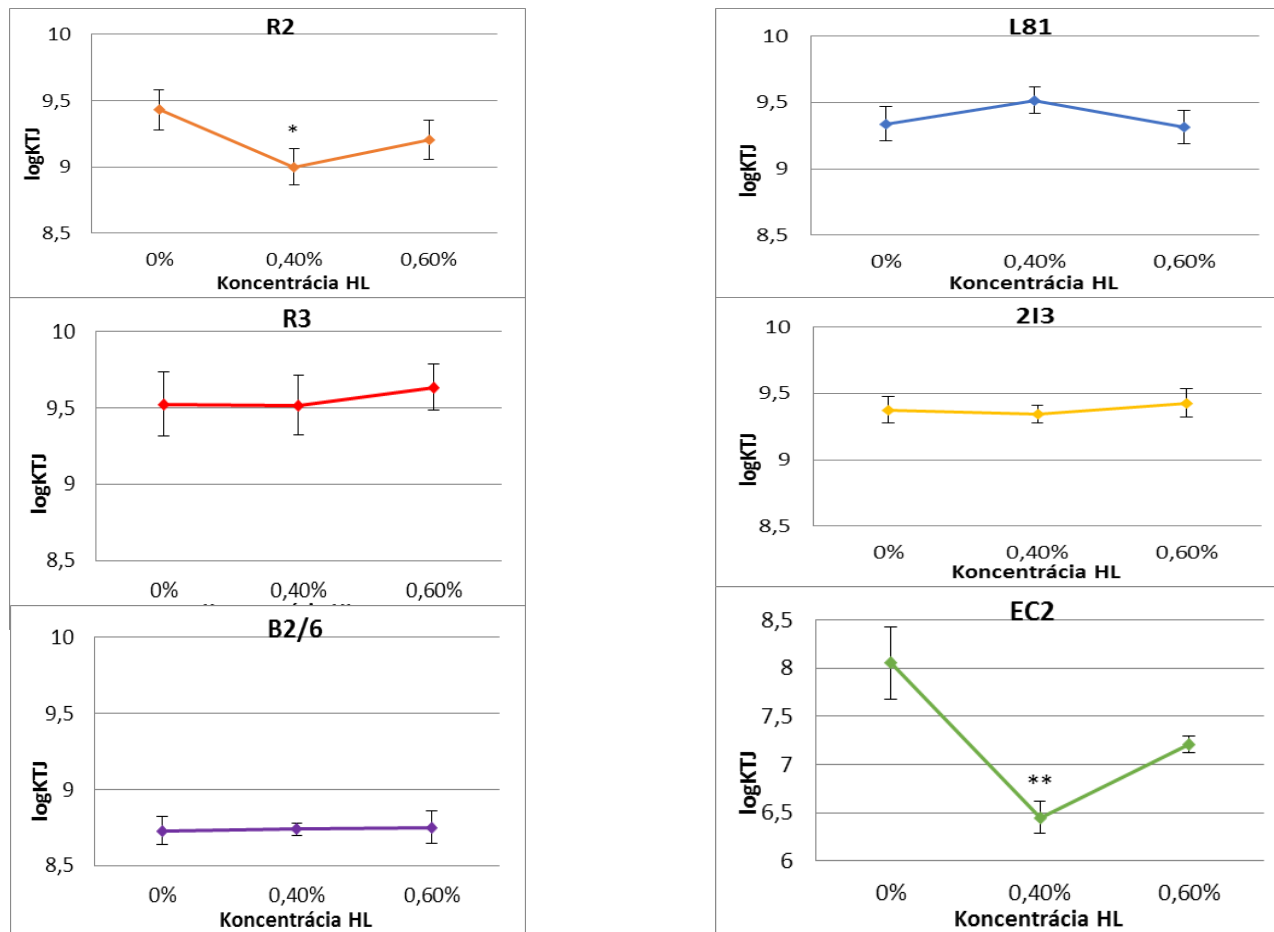
V experimente boli použité kmene *Lactiplantibacillus plantarum* (R2 BiocenoI™ CCM 8674 a L81 BiocenoI™ CCM 7512), *Limosilactobacillus fermentum* (R3 BiocenoI™ CCM 8675 a 213 BiocenoI™ CCM 7514), *Limosilactobacillus reuteri* (B2/6) a *Escherichia coli* (EC2 O199) izolované z rôznych zdrojov. Laktobacily boli kultivované v MRS bujóne (Biolife, Taliansko), do ktorého boli po autoklavovaní pridané radiačne sterilizované (Bioster, Veverská Bítýška) HL (Humac Mycotoxsorb, Humac, Slovensko) v koncentráciách 0%,

0,4%, 0,6%, 0,8%, 1%. *E.coli* bola kultivovaná v PYG bujóne zloženom z peptónu (HiMedia, India), kvasničného extraktu (pronadisa, Španielsko) a glukózy (SLAVUS, Slovensko), ktorý mal pH 6,8 s prídavkom uvedených koncentrácií HL. Pre inokuláciu bolo z každého kmeňa pripravené inokulum vo fyziologickom roztoku s denzitou 1,0 McFarland (Biosan SIA, Lotyšsko). Následne bolo do každých 20 ml bujónu naočkovaných 200  $\mu$ l bakteriálnej suspenzie príslušného kmeňa. Kultivácia prebiehala na trepačke 18 hodín pri 37 °C. Po ukončení inkubácie bolo z jednotlivých suspenzií odobratých 500  $\mu$ l na decimálne riedenie. Zvyšok suspenzie slúžil pre zmeranie hodnoty pH ako ďalšieho ukazovateľa rastu. Počty boli stanovené platňovou metódou na MRS agare (Biolife, Taliansko) v prípade laktobacilov a na MacConkey agare (HiMedia, India) v prípade *E.coli*. Kultivácia probiotických kmeňov prebiehala 48 h v anaeróbnom prostredí (Becton, Dickinson and Company, USA) pri 37 °C a kultivácia *E.coli* 24 h za aeróbnych podmienok takisto pri 37 °C. Počty boli vyjadrené ako log KTJ (kolónie tvoriacich jednotiek)/ml. Na základe získaných výsledkov z tohto pilotného experimentu boli koncentrácie 0,4% a 0,6% vyhodnotené ako najvhodnejšie pre ďalšie testovania. Z tohto dôvodu bol pokus urobený v troch opakovaniach pri týchto koncentráciách humínových látok a výsledky boli štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Prism pomocou jednorozmernej analýzy rozptylu s doplnkovým post-hoc Tukeyho testom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mnohé štúdie naznačujú, že HL interagujú so živými organizmami a ovplyvňujú ich rast. Je preukázané, že tieto substancie sa môžu stať zdrojom výživných látok pre mikroorganizmy a zároveň byť nimi modifikované (Tikhnov a kol., 2010). Z pozorovania antimikrobiálnej aktivity HL sa predpokladá, že stimulujú rast najmä prospešných mikroorganizmov, a naopak rast patogénnych mikróbov je potlačený, avšak účinok je závislý od koncentrácie HL. Toto potvrdili aj naše pilotné štúdie, kedy koncentrácie 0,8 a 1 % potláčali rast väčšiny sledovaných kmeňov, pričom iba kmeň *L. plantarum* L81 vykazoval určitý stupeň rezistencie. Z tohto dôvodu boli na ďalšie testovania vybrané koncentrácie 0,4% a 0,6% (Graf 1). Z našich výsledkov môžeme vidieť, že HL pôsobia rôzne v závislosti od kmeňa. U kmeňa R2 bol pozorovaný signifikantný pokles počtov KTJ v prípade 0,4 % koncentrácie HL ( $p < 0,05$ ), avšak v prípade 0,6% sa tieto hodnoty vrátili takmer na počty zistené pri kontrole. Naopak, v prípade kmeňa L81 bol pri 0,4% koncentrácii pozorovaný mierny nárast, avšak bez štatistickej významnosti. U ostatných kmeňov laktobacilov, HL v týchto koncentráciách ich rast neovplyvnili. Naopak, u patogénneho kmeňa *E.coli* bol zaznamenaný signifikantný pokles KTJ pri 0,4% koncentrácii HL ( $p < 0,01$ ) a nesignifikantný v prípade 0,6% koncentrácie HL. Z výsledkov môžeme konštatovať, že prídavok HL do potravy môže stimulovať rast istých kmeňov zdraviu prospešných baktérií a naopak inhibovať niektoré patogénne kmene, avšak dôležité je zohľadniť konkrétne zloženie črevnej mikrobioty, ako aj použitú koncentráciu HL. Využitie HL je možné aj v prípade prítomnosti kmeňov, ktorých rast nie je HL negatívne ovplyvnený, keďže prídavok týchto látok do potravy môže mať iné zdraviu prospešné účinky.

**Graf 1. Vplyv prídavku 0,4% a 0,6% HL na rast vybraných kmeňov baktérií**



Hviezdička označuje štatisticky významný rozdiel oproti kontrole; \* -  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektu podporovaného Agentúrou pre podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-19-0234.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Filella M., Buffle, J., Parthasarathy, N. Humic and fulvic compounds. Encyclopedia of Analytical. 2005. 5000 p. ISBN 978-0-12-369397-6. 288 – 298
- Klöcking R, Helbig B. Medical aspects and applications of humic substances. Biopolymers for medical and pharmaceutical applications. 2005,1: 3 – 16
- MacCarthy P. The principles of humic substances. Soil Science. 2001, 166(11): 738 - 751
- Rath NC, Huff WE, Huff GR. Effects of humic acids on broiler chickens. Poultry Science. 2006, 85 (3): 410 – 414
- Tikhonov VV. et al. Effects of Humic Acids on the Growth of Bacteria. Eurasian Soil Science. 2010, 43 (3): 305 – 313
- Vetvička V. et al. Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. Journal of Medicinal Food. 2010, 13 (4): 863 – 869

# PROBIOTICKÝ POTENCIÁL BAKTÉRIÍ Z TRÁVIACEHO TRAKTU VČIEL

Ivorová S.<sup>1,2</sup>, Guľašová A.<sup>1</sup>, Kopčáková A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum biovied SAV, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, Košice 04001

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

## ABSTRAKT

Doposiaľ neexistuje žiaden účinný liek voči moru včelieho plodu (pôvodcom ktorého je Gram-pozitívna sporulujúca baktéria *Paenibacillus larvae*). Použitie antibiotík je neúčinné a navyše reziduá týchto látok sa dostávajú do medu, čo je nežiadúce a prispieva k rozvoju rezistencie. V súčasnosti sa výskum zameriava na hľadanie alternatívnych spôsobov liečby, ako je napríklad použitie probiotických baktérií s cieľom stimulovať imunitný systém hostiteľa, a tak predchádzať ochoreniam, prípadne zmierňovať ich dopad. Cieľom našej práce bolo kultivačným spôsobom zachytiť baktérie mliečneho kvasenia v tráviacom trakte včiel, študovať ich probiotický potenciál a využitie pri prevencii moru včelieho plodu. Z tráviacich traktov včiel boli selektované 3 druhy baktérií mliečneho kvasenia, ktoré boli MALDI-TOF hmotnostnou spektrometriou a sekvenovaním 16S rRNA génu identifikované ako *Lactobacillus plantarum* (17L3), *Lactobacillus kunkeei* (3SV2L) a *Lactococcus lactis* (3-1). Štúdium fenotypových vlastností pomocou BIOLOG Gen III MicroPlate potvrdilo identifikáciu genotypu. Schopnosť prežívania a rastu študovaných kmeňov v podmienkach simulujúcich prostredie tráviaceho traktu bola testovaná v prítomnosti 0,4% fenolu, žlčových solí a pri pH 2,0. *Lactobacillus plantarum* (17L3) a *Lactobacillus kunkeei* (3SV2L) boli schopné prežívať a rásť v takýchto podmienkach na rozdiel od *Lactococcus lactis* (3-1), ktorý nebol schopný rásť pri pH 2,0 a v prítomnosti žlčových solí a 0,4% fenolu bola pozorovaná mierna inhibícia rastu. Agarovou difúznou metódou bola zaznamenaná antimikrobiálna aktivita voči *Paenibacillus larvae* z našej zbierky, a taktiež voči ďalším vybraným patogénnym baktériám (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella oxytoca* a *Staphylococcus aureus*). Pri štúdiu rezistencie pomocou antibiotických MIC stripov bola u všetkých kmeňov detegovaná citlivosť voči vybraným antibiotikám. Doterajšie výsledky preukázali probiotický potenciál študovaných bakteriálnych kmeňov s inhibičným účinkom voči *Paenibacillus larvae*. Pre ich využitie v prevencii moru včelieho plodu sú potrebné ďalšie štúdie.

## ÚVOD

Včely, ale aj včelí plod, postihuje množstvo ochorení, ktoré môžeme rozdeliť do dvoch hlavných skupín: nenákazlivé a nákazlivé ochorenia. Medzi nenákazlivé ochorenia patrí úhyn plodu v dôsledku hladu, zimy, prehriatia, hnačka a zápcha včiel. Skupinu nákazlivých ochorení tvorí množstvo chorôb, ktoré členíme na parazitárne (napr. roztočiková nákaza včiel alebo varroáza), vírusové (napr. vreckovitost' včelieho plodu alebo paralýza včiel), mykotické (napr. zväpenatenie alebo skamenenie včelieho plodu) a bakteriálne ochorenia (napr. hniloba včelieho plodu alebo mor včelieho plodu) (Veselý, 2003). Za jedno z najzávažnejších ochorení postihujúce včelí plod na celom svete sa považuje bakteriálne ochorenie s názvom mor včelieho plodu. Agensom tohto ochorenia je Gram-pozitívna sporulujúca baktéria *Paenibacillus larvae*. Zatiaľ neexistuje žiaden liek, ktorým by sa dalo toto ochorenie liečiť, pretože antibiotiká nie sú účinné voči spóram *P. larvae* (Genersch, 2003). V mnohých krajinách je použitie antibiotík na liečbu tohto ochorenia zakázané, pretože reziduá týchto látok sa dostávajú do včelích produktov, a takisto by mohlo dôjsť k rozvoju antibiotickej rezistencie. Nakoľko sa za jediný spôsob predchádzania šíreniu tohto ochorenia považuje spaľovanie úľov, v rámci prevencie a kontroly moru včelieho plodu sa začali hľadať a študovať ďalšie možnosti, napríklad použitie esenciálnych olejov, rastlinných extraktov, propolisu, materskej kašičky, ale aj bakteriocínov a probiotík (Forsgren, 2018). O

probiotických baktériách v tráviacom trakte hmyzu je známe, že sú schopné potláčať rast patogénnych baktérií (Elzeini, 2020). Niektoré baktérie mliečneho kvasenia, ako napríklad rody *Lactobacillus* alebo *Bifidobacterium*, sa používajú ako probiotiká pre ľudí, ale aj zvieratá (Forsgren, 2010). Cieľom našej práce bolo kultivačným spôsobom zachytiť a selektovať baktérie mliečneho kvasenia v tráviacom trakte včiel, študovať ich probiotický potenciál a možné využitie v prevencii moru včelieho plodu.

## MATERIÁL A METODIKA

Vzorky včiel pochádzali z experimentálnych úľov včelníc nachádzajúcich sa na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach a v Rozhanovciach. Pri odbere bolo zakaždým odobratých 10 včiel z každého experimentálneho úľa. Vypreparované tráviace trakty včiel boli rozsuspendované vo fyziologickom roztoku a následne homogenizované. Získaný homogenizát bol riedený metódou desatinného riedenia a inokulovaný na selektívne a neselektívne agarové pôdy: MYPGP (Mueller Hinton Broth, Yeast extract,  $K_2HPO_4$ , Glucose, Sodium pyruvate; Las, CZ), NA (Nutrient Agar; Laboratorios Conda, Španielsko), MRS (De Man, Rogosa, Sharpe; Merck, Nemecko) a TSA (Tryptone Soya Broth; Sigma-Aldrich, USA). Po kultivácii pri 37°C boli zachytené a selektované izoláty identifikované pomocou MALDI-TOF HS a následne sekvenčnou analýzou, ktorej predchádzala izolácia DNA pomocou GenElute Bacterial Genomic DNA kitu (SIGMA-ALDRICH, USA) a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifikácia 16S rRNA génu. Biochemické vlastnosti boli testované pomocou BIOLOG Gen III MicroPlate (Biolog Inc., USA). Rezistencia voči prítomnosti fenolov bola testovaná s pridaním 0,4% fenolu do tekutého média a kultúry boli inokulované na agarovú pôdu v časových intervaloch po 0 a po 24 hodinách od pridanej 0,4% fenolu. Schopnosť prežít a rásť v prítomnosti žlčových solí bola testovaná pridaním 0,25-0,5% žlčových solí do tekutého média. Vzorky boli inkubované pri 37°C a v časových intervaloch po 0, 1, 2 a 3 hodinách bolo 100  $\mu$ l kultúry inokulovanej na agarovú pôdu. Vplyv nízkeho pH (2,0) na bakteriálnu kultúru bola testovaná upravením pH tekutého média pomocou HCl. V časových intervaloch po 0, 1, 2 a 3 hodinách bola testovaná životaschopnosť kultúry prežiť pri nízkom pH. Antimikrobiálna aktivita voči *P. larvae* a vybraným patogénom (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella oxytoca* a *Staphylococcus aureus*) bola testovaná agarovou difúznou metódou, po uskutočnení ktorej boli merané veľkosti inhibičných zón. Citlivosť na antibiotiká bola u získaných izolátov testovaná pomocou antibiotických MIC stripov (Liofilchem, Nemecko) a výsledky boli vyhodnotené podľa EFSA Journal (2018).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V posledných rokoch dochádza k celkovému poklesu včiel dôsledkom rôznych faktorov, medzi ktoré patria aj ochorenia včiel. Mor včelieho plodu je jedno z najzávažnejších ochorení postihujúce včely na celom svete. Nakoľko nie je dostupná žiadna liečba a použitie antibiotík je neúčinné, a v mnohých krajinách zakázané, začali sa hľadať alternatívne spôsoby liečby. Použitie probiotických baktérií patrí medzi jeden z alternatívnych spôsobov prevencie/liečby, čomu sa venujeme aj v tejto práci s cieľom selektovať baktérie mliečneho kvasenia z tráviaceho traktu včiel a študovať ich probiotický potenciál v prevencii voči ochoreniam, konkrétne moru včelieho plodu. Doposiaľ bolo analyzovaných 750 gastrointestinálnych traktov včiel, z ktorých využitím klasických kultivačných metód boli zachytené rôzne druhy baktérií. Pomocou MALDI-TOF HS a sekvenčnej analýzy boli následne identifikované a selektované tri potenciálne kmene baktérií mliečneho kvasenia: *Lactobacillus plantarum* (17L3), *Lactobacillus kunkeei* (3SV2L) a *Lactococcus lactis* (3-1), ktoré boli v ďalšom kroku študované. Štúdium fenotypových vlastností ukázalo, že všetky testované kmene boli schopné utilizovať rôzne typy cukrov, u *Lactococcus lactis* (3-1) bol pozorovaný rast v prítomnosti

(1%, 4% a 8%) NaCl a *Lactobacillus plantarum* (17L3) v prítomnosti 1% NaCl. Dôležitou vlastnosťou probiotických baktérií je tolerovať prítomnosť žľových solí a rásť pri nízkom pH (Kim, 2019). Naše výsledky preukázali, že *Lactobacillus plantarum* (17L3) a *Lactobacillus kunkeei* (3SV2L) boli schopné tolerovať prítomnosť žľových solí a rásť pri nízkom pH (2,0) na rozdiel od *Lactococcus lactis* (3-1), ktorý nebol schopný rásť pri nízkom pH (2,0) a prítomnosť žľových solí mala mierny inhibičný účinok. Črevné baktérie deaminujú prijaté aminokyseliny pričom vznikajú fenoly. Ďalšou vlastnosťou probiotických baktérií je preto schopnosť tolerovať prítomnosť fenolov (Yadav, 2016). Výsledky ukázali, že *Lactobacillus plantarum* (17L3) a *Lactobacillus kunkeei* (3SV2L) boli schopné rásť v prítomnosti fenolov (0,4%), čo korešponduje s výsledkami Yadav a kol. (2016), ktorí testovali probiotické vlastnosti baktérií mliečného kvasenia izolovaných z fermentovaného nápoja s názvom Raabadi, oproti rastu a životaschopnosti *Lactococcus lactis* (3-1), ktorá bola mierne inhibovaná v prítomnosti fenolov. Všetky študované kmene vykazovali inhibičnú aktivitu voči zbierke *P. larvae*, čo korešponduje aj so štúdiou publikovanou v roku 2010 od Forsgren a kol., kde preukázali inhibičnú aktivitu fylotypov *Lactobacillus* pochádzajúcich z tráviaceho traktu včiel na rast *P. larvae*. U *L. kunkeei* (3SV2L) a *L. plantarum* (17L3) bola detegovaná antimikrobiálna aktivita voči ďalším testovaným patogénom. Žiaden z kmeňov nevykazoval rezistenciu voči vybraným antibiotikám podľa návodu na hodnotenie antimikrobiálnej citlivosti baktérií od EFSA (2018), čo predurčuje ich možné využitie v prevencii moru včelieho plodu, alebo ako podporná liečba pri iných ochoreniach.

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed), Rychen G a kol. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA Journal 2018; 16(3):5206.
- Elzeini HM, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from the intestinal tracts of honey bees, *Apis mellifera* L., in Egypt. Journal of Apicultural Research. 2020; 60:349-357.
- Forsgren E, et al. Novel lactic acid bacteria inhibiting *Paenibacillus larvae* in honey bee larvae. Apidologie. 2010; 41: 99–108.
- Forsgren E, et al. Bacterial Diseases in Honeybees Current Clinical Microbiology Reports. 2018; 5:18–25.
- Genersch E, Otten CH. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae subsp. larvae*. Apidologie, 2003; 34 (3): 195-206.
- Kim JA, et al. Investigating the probiotic characteristics of four microbial strains with potential application in feed industry. PLoS ONE. 2019; 14(6): e0218922. 2019.
- Veselý V. a kol. Včelařství. 2003.
- Yadav R, Puniya AK, Shukla P. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. Front. Microbiol. 2016; 7:1683.

# Ekologické aspekty cirkulácie pôvodcov parazitárnych ochorení v špecifických podmienkach Tatranského národného parku

Jászayová A.<sup>1</sup>, Režnarová J.<sup>2</sup>, Chovancová G.<sup>3</sup>, Luptáčik P.<sup>4</sup>, Kostygov A.<sup>2</sup>, Yurchenko V.<sup>2</sup>,  
Hurníková Z.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Katedra biológie a ekológie, Prírodovedecká fakulta, Ostravská univerzita

<sup>3</sup>Štátne Lesy TANAPu, Tatranská Lomnica

<sup>4</sup>Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

## ABSTRAKT

Parazitologický výskum v Tatranskom národnom parku v ostatnom období potvrdil prítomnosť pásomnic čeľade Anoplocephalidae u endemických druhov živočíchov kamzíka vrchovského tatranského (*Rupicapra rupicapra tatrica*) a svišťa vrchovského tatranského (*Marmota marmota latirostris*). Medzihostiteľmi pásomnic sú pôdne roztoče radu Oribatida. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť percentuálne zastúpenie infikovaných roztočov, identifikovať ich molekulárnymi metódami a morfológicky určiť druhové zastúpenie panciernikov na štyroch študovaných lokalitách Lomnické sedlo, Velická dolina, Tomanova dolina a Dolina Waksmundzka a koprologickými metódami určiť výskyt intestinálnych parazitov kamzíkov a svišťov. Celkovo bolo identifikovaných 97 druhov panciernikov (9500 ex.) z 32 čeľadí a z toho molekulárnymi metódami bolo spracovaných 146 zmiešaných vzoriek panciernikov (2532 ex.). Sekvenačnými analýzami sa potvrdili dve pozitívne vzorky, v prvej bola identifikovaná prítomnosť larválneho štádia pásomnice *Andrya cuniculi* a v druhej *Andrya cuniculi* a *Anoplocephaloides dentata*, ako medzihostiteľ bol v oboch prípadoch potvrdený panciernik druhu *Tectocephus velatus sarakensis*. Koprologickými metódami bolo vyšetrených 161 vzoriek trusu kamzíkov a 22 vzoriek trusu svišťov. U kamzíkov boli zaznamenané oocysty *Eimeria* spp., vajíčka *Moniezia* spp. a čeľade Trichostrongylidae, pľúcne červy *Protostrongylus* spp., *Muellerius* spp., *Dictyocaulus* spp. a u svišťov *Eimeria* spp., *Ctenotaenia marmotae* a druhy čeľade Trichostrongylidae.

## ÚVOD

Na nízku početnosť a izolovanosť populácií kamzíka vrchovského tatranského (*Rupicapra rupicapra tatrica*) majú najzávažnejší vplyv klimatické faktory, potrava, zdravotný stav, vrátane parazitárnych infekcií a predátori (Mituch 1969). Na zdravotný stav a mortalitu svišťa vrchovského tatranského (*Marmota marmota latirostris*) vplyvajú rôzne faktory, ku ktorým patria aj parazitické červy, ktoré sa môžu stať sekundárnou príčinou úmrtnosti (Novacký a Chovancová 2010). Z nášho územia bol u kamzíkov potvrdený výskyt pásomnic *Taenia hydatigena* a *Moniezia benedeni* (Sattlerová-Štefančíková 2005). U svišťov bola potvrdená prítomnosť *Ctenotaenia marmotae* a *Paranoplocephala transversalis* (Mituch, 1970). Pancierniky (Oribatida) majú epidemiologický význam, pretože niektoré druhy pôsobia ako medzihostitelia v životnom cykle pásomnic z čeľade Anoplocephalidae (Roczeń-Karczmaz a Tomczuk 2016).

## MATERIÁL A METODIKA

Materiál pôdnych živočíchov sme získali odberom pôdy (počas 5 mesiacov) zo 4 lokalít v Tatranskom národnom parku: Lomnické sedlo, Velická dolina, Tomanová dolina, Dolina Waksmundzka. Odobratý organický materiál sa presušoval v Berleseho-Tullgrenovom aparáte po dobu 4 dni. Na determináciu získaných pôdnych roztočov sme použili determinačné kľúče Kunst (1971) a Weigmann (2006). Chetotaxia a malé kutikulárne morfológické znaky sú rozhodujúce pre identifikáciu druhov panciernikov, ktorá však nie je možná bez predchádzajúceho presvetlenia v kyseline mliečnej, ktorá ale degraduje DNA.



Preto sa optimalizoval protokol pre nedeštruktívnu izoláciu gDNA podľa Katz (2018). S použitím DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) bola izolovaná DNA zo zmiešaných vzoriek panciernikov, ktorá bola použitá pre amplifikáciu 18S rRNA génu s použitím primerov 2256F a 323R (Kostygov & Režnarová) (generujúcich ~ 300 bp fragment) pre genotypizáciu pásomnic a MbRF a MeR na detekciu panciernikov. Získané PCR produkty boli následne sekvenované s použitím rovnakých primerov a výsledné sekvencie boli porovnané s databázou NCBI.

Pre fylogenetickú analýzu bolo použitých celkovo 18 sekvencií 18S rRNA (získaných z GenBank), vrátane 2 našich vzoriek. Alignment bol vytvorený použitím MAFFT v. 7.4 (Katoh a Standley 2013). Fylogenetická inferencia (maximum likelihood) pomocou programu RA×ML verzia 8.2.11 s modelom GTR+G+I. Podpory vetiev boli hodnotené pomocou ultrafast bootstrap s 1000 replikátmi (Minh a kol. 2013). Na koprologické analýzy sme použili štandardnú flotačnú a sedimentačnú metódu na dôkaz oocýst koccídií a vajčiek helmintov a Vajdovu larvoskopickú metódu na zistenie prítomnosti pľúcnych červov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### *Molekulárne analýzy*

Molekulárnymi metódami bolo spracovaných 146 zmiešaných vzoriek panciernikov (2532 ex.) zo 4 lokalít TANAPu zozbieraných počas sezóny 2020. Z vyšetrených vzoriek boli potvrdené dve pozitívne vzorky, čo predstavuje pozitivitu 0,07 %. Vo vzorke č.198 bola identifikovaná prítomnosť larválneho štádia pásomnice *Andrya cuniculi*. Druh bol popísaný u králika divého *Oryctolagus cuniculus* (Tenora a kol. 2002). V druhej pozitívnej vzorke č.178 bola zistená DNA *Andrya cuniculi* a *Anoplocephaloides dentata*. V prípade tejto vzorky pokračuje fylogenetická analýza za použitia ďalších markerov, ako je napr. ITS1 a 5.8S rRNA gén, pre detailné určenie príbuzenských vzťahov. Obidve pozitívne vzorky boli zmiešané z jedincov druhu *Tectocephus velatus sarakensis*, ktorý nebol doteraz potvrdený ako medzihostiteľ anoplocefalidných pásomnic. Známymi medzihostiteľmi pásomnic sú druhy z rodov *Scheloribates*, *Achipteria*, *Galumna*, *Liebstadia*, *Zygoribatula*, *Ceratozetes*, *Pergaulmna* a *Oppiella* (Roczeń-Karczmarz a Tomczuk, 2016).

### *Ekologické analýzy*

Na 4 študovaných lokalitách v Tatranskom národnom parku sa zistilo 97 druhov oribatidných roztočov z 32 čeľadí v celkovom počte 9050 exemplárov. Najviac zastúpenými rodmi boli *Tectocephus* (2189 ex.), *Oppiella* (1147 ex.), *Scheloribates* (1061 ex.) a *Fuscozetes* (615 ex.). Z alpínskeho stupňa existuje veľmi málo faunistických údajov, skladbu fauny vieme porovnať s výsledkami prác z nižších nadmorských výšok. Výsledky zastúpenia fauny panciernikov zistené autormi Lóšková a kol. (2013), ktorí sa venovali štruktúre spoločenstiev pôdných roztočov po veternej kalamite v Tatrách, korešpondujú s našimi pilotnými údajmi z vysokohorského prostredia. Výskumami sa potvrdilo najpočetnejšie zastúpenie rodov *Tectocephus* a *Fuscozetes*, čo potvrdzujeme aj našou štúdiou, počas ktorej boli odbery uskutočnené v nadmorskej výške 1107 – 2249 m n.m. v porovnaní so štúdiou Lóšková a kol. (l. c.). To potvrdzuje fakt, že oba rody sú eurytopné, so širokou ekologickou valenciou, nájdeme ich tiež v extrémnych podmienkach. Druh *Tectocephus velatus* sa považuje za xerotolerantný a doteraz nebol potvrdený ako medzihostiteľ pásomnic. Naša štúdia poukázala na rodovú rozmanitosť skupiny panciernikov vzhľadom k vyššej nadmorskej výške. Keďže údajov z týchto polôh je nedostatok, vzniká tu priestor pre budúce faunistické a ekologické výskumy s cieľom detailne determinovať skupinu Oribatida zo subalpínskeho a alpínskeho stupňa Vysokých Tatier.

Koprologickými metódami bolo vyšetrených 161 vzoriek trusu kamzíkov a 22 vzoriek trusu svišťov. 40,99% vzoriek trusu kamzíkov bolo pozitívnych na *Eimeria* spp., v 35,65% boli zaznamenané vajčká čeľade Trichostrongylidae, 29,81 % vzoriek bolo pozitívnych na vajčká

*Moniezia* spp. Larvoskopickým vyšetrením trusu kamzíkov sa potvrdila prítomnosť *Protostrongylus* spp. (25,21%), *Muellerius* spp. (35,65%) a *Dictyocaulus* spp. (11,30%). Naše výsledky korešpondujú s výsledkami predchádzajúcich štúdií Mitucha (1969) a Štefančíkovej a kol. (1999). U svišťov sme diagnostikovali *Eimeria* spp. (59,09%), *Ctenotaenia marmotae* (68,18%) a 9,5% vzoriek bolo pozitívnych na vajíčka čeľade Trichostrongylidae. Druhy, ktoré sme zistili sa zhodujú s výsledkami autorov Mituch (1970) a Chovancová (1993), ktorí taktiež potvrdili u svišťov na našom území aj prítomnosť druhov *Paranoplocephala transversalis*, *Strongyloides papillosus*, *Ostertagia circumcincta*, *O. trifurcata* a *Trichuris* sp.

Práca bola financovaná projektom VEGA/1/0043/19.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chovancová B. Súčasná situácia a perspektívy svišťa vrchovského tatranského v TANAP-e. In Malá zver a jej životné prostredie : zborník z konferencie. Košice. 1993; s. 111-116.
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 772–780.
- Katz AD, Taylor SJ, Davis MA. At the confluence of vicariance and dispersal: Phylogeography of carnicolous springtails (Collembola: Arrhopalitidae, Tomoceridae) codistributed across a geologically complex karst landscape in Illinois and Missouri. *Ecology and Evolution*. 2018; 00: 1-20.
- Kunst M. Nadkohorta pancírnici – Oribatei. Klíč zvířeny ČSSR, díl IV. (Daniel M., Černý V., eds). Praha : Academia. 1971; s. 531–580.
- Lóšková J, et al. The effect of clear-cutting and wildfire on soil Oribatida (Acari) in windthrown stands of the High Tatra Mountains (Slovakia). *European Journal of Soil Biology*. 2013; 55: 131-138.
- Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30: 1188–1195.
- Mituch J. K helmintofaune raticovej zveri prežúvavej v TANAPe. In Československá ochrana prírody. 1969; 8: 239-250.
- Mituch J. Správa o helmintologickom vyšetrení niektorých cicavcov z oblasti TANAP-u : záverečná správa. Tatranská Lomnica : Výskumná stanica a múzeum. 1970; s. 2. Helminologický ústav SAV, Košice.
- Novacký M, Chovancová B. Symboly Tatier. Tatry – príroda (Koutná A., Chovancová B., eds.). Praha : Baset. 2010; s. 617- 639.
- Roczeń-Karczmarz M, Tomczuk K. Oribatid mites as vectors of invasive diseases. *Acarologia*. 2016; 56(4): 613-623.
- Sattlerová-Štefančíková A. Kamzík a jeho parazitárne ochorenia. Košice : Press Print, Parazitologický ústav SAV. 2005; s. 124.
- Štefančíková A, et al. Lung nematodes of chamois, *Rupicapra rupicapra tatrica*, from the Tatra National Park, Slovakia. *Journal of Helminthology*. 1999; 73: 259-263.
- Tenora F, Koubkova B, Feliu C. Redescription of *Andrya cuniculi* (Blanchard, 1891) (Cestoda: Anoplocephalidae), a parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha) in Spain. 2002; 49: 50-54.
- Weigmann G. Acari, Actinochaetida: Hornmilben (Oribatida). Goecke & Evers, Kelttern. 2006; s. 520.

# ÚČINOK ASTAXANTÍNU A JEHO ESTEROV NA LYMFOCYTY ZDRAVÝCH MYŠÍ *IN VITRO*

Jurčacková, Z.<sup>1,2</sup>, Ciglanová, D.<sup>1,2</sup>, Mačák Kubašková, T.<sup>1</sup>, Mudroňová, D.<sup>2</sup>, Hřčková, G.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice

## ABSTRAKT

Astaxantín je xantofylový karotenoid s významnými antioxidačnými vlastnosťami. Cieľom predloženej štúdie bolo porovnať účinky nižších dávok (2,5; 5; 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a vyšších dávok (20 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) extraktu astaxantínu (AXT) a jeho monoesterov (ME) a diesterov (DE) na fyziologický stav lymfocytov izolovaných zo sleziny zdravých Balb/c myší. Hodnotením životaschopnosti buniek testom viability s trypanovou modrou, ako aj sledovaním metabolickej aktivity MTT testom sa nám podarilo zistiť, že koncentrácie astaxantínu a jeho monoesterov a diesterov do 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  nevykazovali významnú cytotoxickú aktivitu na imunitné bunky. Testom absorpcie neutrálnej červenej, ktorá závisí od schopnosti živých buniek aktívne transportovať neutrálnu červenú cez membrány a od schopnosti udržiavať pH gradient v bunke prostredníctvom produkcie ATP sa nám podarilo potvrdiť, že nižšie koncentrácie účinných látok (2,5; 5 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  AXT, ME, DE) nie sú pre bunky toxické. Kultivácia splenocytov s AXT a jeho esterami viedla k zvýšeniu mitochondriálneho membránového potenciálu T-buniek a vyvolala prechod splenocytov do skorej fázy apoptózy a rovnako viedla aj k zvýšenej produkcii oxidu dusnatého lymfocytmi. AXT (40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) úplne vychytil všetky reaktívne formy kyslíka, čo korelovalo s indukciou neskorej apoptózy a zníženou viabilitou. Z výsledkov vyplýva, že zatiaľ čo monoestery majú najvýznamnejšie cytotoxické účinky pri vysokých koncentráciách, diestery potláčajú základné fyziologické procesy v bunkách pri nízkych koncentráciách. Účinky astaxantínového extraktu sú pravdepodobne výsledkom kombinovaného pôsobenia monoesterov a diesterov. Nízke koncentrácie extraktu pôsobili na imunitné bunky skôr stimulačne a cytoprotektívne. Vysoké koncentrácie účinných látok nie sú pre organizmus prospešné, avšak dosiahnuť takéto hladiny *in vivo* pomienkach nie je možné.

## ÚVOD

Mechanizmy účinku prírodných látok závisia od ich chemickej štruktúry. Počas narušeného fyziologického stavu organizmu pri ochoreniach je ich pôsobenie nasmerované k úprave, resp. obnoveniu homeostázy. Výskum imunomodulačného potenciálu látok izolovaných z vyšších a nižších rastlín, húb, rias a lišajníkov viedol k objaveniu a následnej syntéze veľmi účinných látok s komerčnou aplikáciou v humánnej a veterinárnej medicíne. Neliečené infekcie a traumy však vedú k zápalovým reakciám a následne k produkcii cytotoxických látok, ktoré sú uvoľňované v ohnisku poranenia. Tieto látky zahŕňajú vysoko reaktívne formy kyslíka (ROS) a dusíka (RNS), ktoré majú deštruktívne účinky nie len pre patogén, ale aj pre hostiteľa (O'Connor a O'Brien, 1998). V boji proti ROS a oxidačnému poškodeniu sa organizmy spoliehajú na pomerne zložitý antioxidačný systém zložený z endogénne produkovaných zlúčenín, vrátane nízkomolekulových antioxidantov a enzýmov. Organizmy sú schopné produkovať množstvo endogénnych antioxidantov, ktoré vychytávajú škodlivé voľné radikály a zabraňujú nerovnováhe medzi prozápalovým a protizápalovým stavom. V prípade značného oxidačného stresu je schopnosť antioxidantov eliminovať voľné radikály prekročená, a preto sú potrebné ďalšie zdroje antioxidantov prijaté zo stravy (Chew a Park, 2004).

Astaxantín patrí do skupiny xantofylových karotenoidov. V prírode je syntetizovaný len malým množstvom organizmov, ako mikroorganizmy, zelené a kvasinky. Účinky astaxantínu vychádzajú z jeho jedinečnej molekulárnej štruktúry, ktorú tvoria dve karbonylové skupiny, dve hydroxylové skupiny a 11 konjugovaných dvojitých etylénových väzieb. Práve vďaka

hydroxylovým (OH) a keto- (C=O) zvyškom na každom iónovom kruhu môže byť esterifikovaný a z jeho štruktúry následne vyplývajú aj antioxidačné vlastnosti. Astaxantín je donorom elektrónov reagujúcich s ROS, ktoré ukončia reťazovú reakciu a premenia reaktívne molekuly na stabilnejšie, pre organizmus neškodlivé produkty. Zistilo sa, že astaxantín má tlmiaci efekt na singletový kyslík, vychytáva superoxydy, peroxidy vodíka a hydroxylové radikály (Miki, 1991). Štúdie účinkov tejto prírodnej látky navyše dokázali, že je silnejší antioxidant ako  $\beta$ -karotén, účinnejšie inhibuje peroxidáciu lipidov ako kataxantín,  $\beta$ -karotén a zeaxantín, a na rozdiel od lykopenú,  $\beta$ -karoténu a luteínu nemá prooxidačný účinok. Potenciál astaxantínu bol dokázaný aj pri ochrane ľudského organizmu proti širokému spektru chorôb vrátane zápalu, žalúdočných lézií, kardiovaskulárnym ochoreniam ako aj ochoreniam pečene, cukrovke, rakovine a neurodegeneratívnym chorobám (Ambati a kol., 2014).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente boli použité samce zdravých Balb/c myší vo veku 8 – 10 týždňov, z ktorých boli sterilne izolované sleziny. Astaxantín bol izolovaný z riasy *Haematococcus pluvialis*, v ktorej bol prítomný vo forme ME, DE a v neesterifikovanej forme ako voľný AXT. Suspenzia splenocytov bola kultivovaná v dvoch médiách s odlišným zložením s príslušnými koncentraciami AXT, ME a DE (2,5; 5; 10; 20 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Viabilita buniek po kultivácii bola stanovená použitým Trypánovej modrej. Metabolická aktivita splenocytov bola hodnotená MTT testom a na kvantitatívne stanovenie životaschopnosti buniek a sledovanie toxických účinkov látok bol použitý test absorpcie neutrálnej červenej. Neadherentné populácie buniek boli použité na meranie mitochondriálneho membránového potenciálu s použitím farbiva Rhodamin 123, ktoré je zachytávané v mitochondriách živých buniek. Rovnaké suspenzie buniek boli použité aj na detekciu apoptózy pomocou kitu. Stimulované bunky po kultivácii s AXT boli použité na detekciu vnútrobunkových ROS. Analýzy boli vykonané prietokovou cytometriou a údaje boli analyzované pomocou softvéru. Množstvo oxidu dusnatého v supernatantoch po kultivácii buniek bolo stanovené Griessovým reagentom. Výsledky boli analyzované použitím jednosmerného ANOVA testu a post-hoc Tukey testu. Štatisticky významný rozdiel v porovnaní s kontrolnou skupinou bol zaznamenaný na hladine významnosti \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  a \*\*\*  $p < 0,001$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej štúdií sme sa zamerali na porovnanie účinkov nižších dávok (2,5; 5; 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a vyšších dávok (20 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) astaxantínu a jeho esterov na T-lymfocyty izolované zo sleziny zdravých Balb/c myší. Hodnotením koncentračne závislého účinku AXT a jeho esterov na viabilitu buniek sme zistili, že koncentrácie do 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  mali v prípade kultivácie s AXT a DE stimulačný účinok, nízke koncentrácie ME naopak vykazovali vysokú mieru cytotoxicity na bunky. Viabilita buniek bola overená aj prostredníctvom stanovenia účinkov sledovaných látok na metabolickú aktivitu pomocou MTT testu. Výsledky potvrdili, že AXT, ME a DE majú pri koncentráciách 5 a 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  stimulačný účinok na metabolizmus imunitných buniek, avšak vyššie dávky pôsobili na bunky mierne cytotoxicky. Predpokladá sa, že redukcia MTT, ale aj iných tetrazoliových farbív závisí od metabolickej aktivity bunky v dôsledku toku NAD(P)H (Berridge a Tan, 1993). Bunky s nízkym metabolizmom, ako sú splenocyty, ale aj tymocyty, sú schopné redukovať menšie množstvá MTT v porovnaní s rýchlo sa deliacimi bunkami. Účinky látok na životnosť splenocytov sme hodnotili aj na základe aktívneho transportu molekúl cez cytoplazmatickú membránu prostredníctvom prijímania neutrálnej červenej. Týmto testom sa nám opäť podarilo potvrdiť, že najpriaznivejší vplyv na aktivitu buniek mali nízke koncentrácie účinných látok. Nízke koncentrácie DE sa však ukázali ako mierne nepriaznivé na aktívny transport molekúl. Odchýlky zaznamenané v našich výsledkoch v prípade testu viability, ale aj aktívneho

transportu farbiva po kultivácii s esterifikovanými formami astaxantínu môžu byť spôsobené mechanizmom inkorporácie farbiva do bunky, ako aj ich chemickou štruktúrou. Giuffrida a kol. (2010) skúmali esterifikáciu skupiny karotenoidov – xantofylov, ktoré sa v prírode vyskytujú v neesterifikovanej forme, alebo v stabilnejšej esterifikovanej forme mastnými kyselinami ako monoestery a polyhydroxylované xantofyly. Vo svojej štúdií zistili, že esterifikácia nemení chromoforové vlastnosti molekuly karotenoidov, ale upravuje ich štruktúru, a preto môže ovplyvňovať aj chemické vlastnosti v závislosti od druhu mastnej kyseliny naviazanej na molekulu karotenoidu. Esterifikácia tiež zvyšuje rozpustnosť karotenoidov v lipidoch, čím sa zvýši ich biologická dostupnosť. Na základe týchto výsledkov predpokladáme, že nižšie dávky ME a DE, ktoré pôsobili mierne cytotoxicky, boli rozpustené v membránových a bunkových lipidoch, a z toho dôvodu aj dostupnejšie pre spracovanie metabolizmom bunky. Vysoká antioxidačná aktivita astaxantínu tiež mohla zapríčiniť vychytenie všetkých ROS vzniknutých počas bazálneho metabolizmu bunky, alebo v dôsledku stresu vzniknutého kultiváciou a narušiť homeostázu. Početné výskumy dokázali, že reaktívne formy kyslíka fungujú ako dôležité fyziologické regulátory intracelulárnych dráh a narušenie redoxnej rovnováhy môže ovplyvniť signálne dráhy, čo vedie až k dysfunkcii bunky. Zmeny v mitochondriálnej dynamike boli posúdené pomocou mitochondriálneho membránového potenciálu ( $\psi_m$ ), ktorý je kľúčovým faktorom mnohých chorôb. V porovnaní s kontrolnou skupinou viedla inkubácia buniek po dobu 24 hodín za štandardných podmienok s AXT, ME, DE ( $10, 40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) k miernemu zvýšeniu potenciálu mitochondriálnej membrány. V našej štúdií kultivácia splenocytov počas 24 hodín zvýšila  $\psi_m$  a vyvolala aj prechod buniek do skorej fázy apoptózy (~60%) a neskorej fázy apoptózy (~11%). Kultivácia imunitných buniek so sledovanými látkami viedla tiež k zvýšenej produkcii oxidu dusnatého, pričom signifikantné zvýšenie bolo pozorované v prípade kultivácie s AXT ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). V poslednej časti nášho experimentu sme sledovali účinky AXT na hladinu vnútrobunkových ROS po stimulácii. Z výsledkov vyplýva, že kultivácia buniek s AXT ( $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) v kompletnom médiu spôsobila vychytenie všetkých ROS, čo korelovalo s indukciou neskorej apoptózy a rovnako so zníženou viabilitou. Pokus bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, Č.k. Ro-660/17-221a, dňa 16.3.2017.

*Výsledky prezentované v tejto štúdií boli získané v rámci riešenia projektu APVV 17-0410, a tiež bilaterálneho projektu SAV-AV ČR No. 18-24.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ambati RR, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications – a review. *Marine drugs*. 2014; 12 (1): 128 – 152.
- Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993; 303 (2): 474 – 482.
- Chew BP, Park JS. Carotenoid action on the immune response. *J. Nutr.* 2004; 134 (1): 257S – 261S.
- Giuffrida D, et al. Free carotenoid and carotenoid ester composition in native orange juices of different varieties. *Fruits*. 2010; 65 (5): 277 – 284.
- Miki W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 1991; 63 (1): 141 – 146.
- O'Connor I, O'Brien N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by beta-carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 1998; 16 (3): 226 – 230.
- Palozza P, Krinsky NI. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 297 (2): 291 – 296.

## mikroRNA PRI ŠTÚDIU NEPLODNOSTI

Kalinová K.<sup>1</sup>, Abrahamovská M.<sup>1</sup>, Toporcerová S.<sup>2</sup>, Kl'oc M.<sup>1</sup>, Špaková I.<sup>1</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>, Rabajdová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, UPJŠ LF, Košice

<sup>2</sup>Gynekologicko-pôrodnická klinika, UPJŠ LF a UNLP, Košice, Centrum pre asistovanú reprodukciu Gynicare v Košiciach

### ABSTRAKT

Neplodnosť v súčasnosti postihuje významnú časť populácie a na základe vysokej prevalencie je zaraďovaná Svetovou zdravotníckou organizáciou medzi populačné ochorenia. Za fyziologických okolností sú v reprodukcii kľúčovými procesmi okno implantácie a receptivita endometria, od ktorých sa odvíja úspešnosť *in vitro* fertilizácie. Tieto procesy podliehajú regulácii na génovej úrovni. Hlavnými faktormi, ktoré ovplyvňujú reguláciu génovej expresie sú nekódujúce RNA, ktoré modifikujú génovú expresiu najmä na posttranskripčnej úrovni. Objasnením mechanizmu pôsobenia konkrétnych nekódujúcich RNA - mikroRNA, v rámci infertility sa ukazuje ako možnosť ich využitia v diagnostike. Cieľom tejto práce bolo pomocou sekvenovania novej generácie (NGS) a bioinformatických analýz diferencovať mikroRNA, ktoré by predikovali pripravenosť pacientky v *in vitro* fertilizačnom procese na implantáciu embrya do uteru. Molekuly mikroRNA vybrané na základe bioštatistických analýz a metód strojového učenia v predkladanej štúdií sa zdajú byť sľubné prognosticko-prediktívne molekuly, ktoré by mohli hrať kľúčovú úlohu v predikcii pripravenosti ženy na IVF proces ako aj v predikcii úspešnosti resp. zlyhania IVF procesu.

### ÚVOD

Neplodnosť je v poslednom období považovaná za poruchu postihujúcu približne 10% populácie a kvôli relatívne vysokej prevalencii je zaraďovaná Svetovou zdravotníckou organizáciou (WHO) medzi populačné ochorenia (Boivin a kol., 2007). Existuje niekoľko príčin spôsobujúcich problémy s plodnosťou, ktoré sú vysoko individuálne. Okrem typických abnormalít, spojených s defektami reprodukčných orgánov, môžu byť za neplodnosťou hormonálne poruchy, genetické defekty alebo faktory životného prostredia. V dnešnej dobe sú čoraz častejšie vyhľadávané služby asistovanej reprodukcie – *in vitro* fertilizačný proces (Szamatowicz, 2016). Hlavnými príčinami ženskej neplodnosti obvykle býva napr. anovulácia, anatomické zmeny orgánov panvového dna, endometrióza, syndróm polycystických ovárií. Pri týchto poruchách je zvyčajne narušené tzv. „okno implantácie“, obdobie, počas ktorého je ženské endometrium schopné prijať embryo a môže dôjsť k jeho implantácii do steny maternice. Okno implantácie (WOI, Window of implantation) a ďalšie fyziologické procesy v reprodukčnom systéme podliehajú regulácii na základe molekulových zmien genómu a transkriptómu (Ruiz-Alonso a kol., 2020). Narušením tejto regulácie, môže následne dôjsť k patologickým zmenám. Úlohou nekódujúcich RNA molekúl je, okrem iného, regulácia biologických procesov v organizme. Jednotlivé ncRNA sa líšia jednak biogenezou, tkanivovou špecifickosťou, ale aj cieľovými molekulami, ktoré efektorovo alebo regulačne modifikujú. Bunkové procesy a expresiu génov regulujú ncRNA najmä na posttranskripčnej úrovni, ktorá je považovaná za kľúčovú v udržiavaní homeostázy (Salmasi a kol., 2021). mikroRNA sú endogénne nekódujúce RNA zložené z 19 až 23 nukleotidov, zamerané na post-transkripčnú reguláciu cieľových génov naviazaním sa na 3' neprekľadanú oblasť (UTR) cieľovej mRNA. Následne dochádza k degradácii mRNA alebo špecifickej inhibícii translácie, ktorá v konečnom dôsledku vedie k regulácii fyziologických procesov alebo signálnych dráh. Molekuly miRNA regulujú viac ako 30% génovej expresie *in vivo* a ich funkcia úzko súvisí s bunkovou proliferáciou, diferenciáciou, apoptózou, embryonálnym vývojom, diferenciáciou tkanív a orgánov a, v neposlednom rade, aj s vývojom rôznych ochorení (Zhao 2020). Objasnením špecifického pôsobenia konkrétnych nekódujúcich RNA v

rámci infertility sa ukazuje potenciál využitia týchto RNA ako biomarkerov (Hale a kol., 2015).

Identifikácia odlišných krátkych nekódujúcich RNA prítomných v cirkulácii by mohla slúžiť ako nástroj na diagnostiku a potenciálne aj na liečbu ochorení spojených s infertilitou. Prehľad miRNA molekúl asociovaných s neplodnosťou sumarizuje tabuľka 1.

**Tab. 1: Prehľad mikroRNA, ich cieľových génov a mechanizmu účinku pri vybraných diagnózach spájaných s neplodnosťou**

Regulácia	miRNA	Cieľové gény	Mechanizmus regulácie	Diagnóza
<b>up</b>	miR-135a, miR-186, miR-145, miR-155, miR-93, miR-222, miR-223, miR-146a, let-7i-3p, miR-5706, miR-4463, miR-3665, miR-638, miR-124-3p, miR-128, miR-29a-3p, let-7c, miR-27a, miR-301, miR-130b, miR-592	IL8, SYT1, IRS2, ER beta, IGF-1R, SMAD2, BCL2, NGF, HGF, GLUT4, ER1, PPAR, IGF-1, angiopoietín, SMAD5, PPAR- $\gamma$ , PPAR- $\gamma$ , DENNDA1, LHCGR	znižovanie hladiny progesterónu a testosterónu; zvýšená proliferácia granulárnych buniek ovárií; represia apoptózy; narušenie receptivity endometria; narušenie implantácie embrya; rast kumulárnych buniek; vývoj folikulu; maturácia oocyty; downregulácia inzulín senzitívneho glukózového transportéru 4; súvislosť so zvýšenou sekréciou estradiolu; inzulínová rezistencia; hyperandrogenizmus; endometriálna receptivita; dozrievanie ováriálneho folikulu; inhibícia syntézy progesterónu, androgénov, estrogénu; zvýšenie hladiny progesterónu, testosterónu	PCOS
<b>down</b>	miR-17-5p, miR-20a, miR-22, Let-7, miR-135a, miR-154-5p, miR-200a, miR-200b	BCL2, CDKN1A/p21, TGF beta, IL-8, HIF-1 alfa, VEGF, KRAS, HOXA10, ZEB1/2, E-kadherín	zvýšené prežívanie buniek; potlačenie proliferácie; zvýšená indukcia lokálneho zápalu; pro-zápalový a pro-angiogénny efekt; indukcia proliferácie a invazivity buniek; regulácia endometriálnej receptivity; bunková proliferácia, diferenciácia; neovaskularizácia; motilita; indukcia EMT procesu	endometrióza

## MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie bolo vyselektovaných 112 pacientiek (59 s potvrdeným neúspešným výsledkom *in vitro* fertilizácie, 53 s potvrdeným úspešným výsledkom IVF) zúčastnených procesu IVF. Potvrdená negativita bola na základe séra hCG 10. deň po prenose blastocysty, 11. deň po prenose zhutnenej moruly. Úspešný výsledok IVF procesu bol definovaný u pacientiek u ktorých bola hladina hCG zaznamenaná viac ako 30 IU/l deň 10 po prenose blastocysty, deň 11 po prenose zhutnenej moruly. Na analýzu boli použité vzorky krvnej plazmy, odobratej do K<sub>2</sub>EDTA BDVacutainer. Odber krvi bol uskutočnený v deň transferu embrya, následne bola krv separovaná a získaná plazma bola uskladnená pri -80°C. Samotnej analýze predchádzala izolácia mikroRNA zo vzoriek plazmy, na ktorú bol použitý miRNeasy Micro Kit (Qiagen). Následne bola pripravená sekvenačná knižnica s použitím Qiagene sekvenačnej chémie QIAseq miRNA Library Kit. Sekvenovanie (NGS) bolo uskutočnené pomocou NextSeq 500 na Platforme (Illumina). Hlavné výsledky predkladanej štúdie boli získané na základe sekvenácie ncRNA molekúl a kombinácie bioinformatickej analýzy dát. Bioinformatické spracovanie využilo verejne dostupné referenčné databázy miRBase a IsomiR. Evaluácia výberu biomarkerových molekúl bola založená na aspoň jednej z metód, alebo ich kombinácii, so stanovením korelácie molekúl a metód strojového učenia (napr. LogisticRegression, RandomForestClassifier, SVC, SVM, SGD Classifier). Predkladaná štúdia bola schválená etickou komisiou KSK dňa 24.4.2018 ako aj etickou komisiou UNLP.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe bioinformatických analýz a metód strojového učenia bolo z celkového množstva miRNA identifikovaných a vyselektovaných 6 konkrétnych mikroRNA molekúl (mir-26a-2-3p, mir-874-5p, miR-6734-5p, miR-4767, miR-4775, miR-18b-3p), ktoré vykazovali vysokú špecificitu k predikčnej schopnosti určenia úspešného výsledku IVF procesu u pacientiek. Pri zohľadnení binárneho klasifikačného systému, ktorý ukazuje vzťah medzi špecificitou a senzitivitou našich molekúl v modeli ROC (receiver operating characteristic) sa hodnota Area Under Curve (AUC) krivky pohybovala nad úrovňou 0,7. (ROC/AUC > 70%). Na základe opublikovaných štúdií, je známe, že mikroRNA molekuly zohrávajú dôležitú úlohu v regulačných procesoch ovplyvňujúcich plodnosť ženy. Za zásadné procesy, s priamym dopadom na plodnosť, sú považované napr. angiogenéza, receptivita endometria, ale aj syntéza hormónov; zároveň poruchy plodnosti napr. endometrióza (Cho a kol., 2015), syndróm polycystických vaječníkov (Song a kol., 2019) majú svoje špecifické črty s diferencovaným profilom expície mikroRNA (sumarizované v tab. 1). V poslednej štúdií Huang a kol. (2021) priniesli súvis miR-18b-3p a preeklampsie, kde analýzami potvrdili regulačnú úlohu tejto mikroRNA s dopadom na integritu a vaskulárnu kondíciu placenty, ktorá je dôležitým faktorom úspešného tehotenstva (aj samotného *in vitro* fertilizačného procesu).

Využitie sekvenčne kvalitatívne a kvantitatívne definovaných biomarkerov vo forme 6 miRNA molekúl, by v IVF praxi mohlo napomôcť v predikcii pripravenosti matky na transfer embrya s následne potenciálne úspešnou implantáciou embrya do steny maternice. Súčasné štúdie potvrdzujú, že miRNA molekuly majú vysoký potenciál predstavovať biomarkery vhodné k predikcii úspešnosti IVF procesu (Qasemi, 2020). Odber krvi predstavuje jeden z menej invazívnych procesov získavania biologického materiálu, optimalizácia metódy detekcie miRNA molekúl by mohla prispieť k zlepšeniu liečby neplodnosti ako aj k prípadnému zvýšeniu počtu úspešne implantovaných embryí v procese *in vitro* fertilizácie.

*Práca vznikla na základe grantovej podpory: VEGA 1/0873/18 a VEGA 1/0620/19. Tieto projekty sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPJŠ LF a UNLP v Košiciach a Centrom pre asistovanú reprodukciu Gynecare v Košiciach.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Boivin J, et al.. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*, 2007, 22.6: 1506-1512.
- Cho S, et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis. *Fertility and sterility*, 2015, 103.5: 1252-1260.
- Hale B, et al. Small RNAs: their possible roles in reproductive failure. *The Male Role in Pregnancy Loss and Embryo Implantation Failure*, 2015, 49-79.
- Huang Q, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomal MicroRNA-18b-3p Inhibits the Occurrence of Preeclampsia by Targeting LEP. *Nanoscale Res. Lett.* 2021 Dec;16(1):1-3.
- Qasemi M, Amidi F. Extracellular microRNA profiling in human follicular fluid: new biomarkers in female reproductive potential. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2020, 1-12.
- Ruiz-Alonso M, et al. Endometrial Receptivity by Endometrial Receptivity Analysis (ERA) for Infertility. In: Kwak-Kim J. (eds) *Endometrial Gene Expression*. Springer, Cham. 2020; s. 91-102.
- Salmasi S, et al. Ovarian stimulation and exogenous progesterone affect the endometrial miR-16-5p, VEGF protein expression, and angiogenesis. *Microvascular Research*, 2021, 133: 104074.
- Song Y, et al. Altered miR-186 and miR-135a contribute to granulosa cell dysfunction by targeting ESR2: A possible role in polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol*, 2019, 494: 110478.
- Szamatowicz, M. Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations. *Ginekologia polska*, 2016; 87.12: 820-823.
- Zhao Z, et al. Mechanisms of lncRNA/microRNA interactions in angiogenesis. *Life sciences*, 2020, 254: 116900.



# ŠTANDARDIZÁCIA PROTOKOLU REPRODUKOVATELNEJ GENERÁCIE Z MONOCYTOV DERIVOVANÝCH DENDRITOVÝCH BUNIEK PRE ĎALŠIE *EX VIVO* VYUŽITIE

Kiššová Z.<sup>1</sup>, Tkáčiková L.<sup>1</sup>, Mudroňová D.<sup>1</sup>, Schusterová P.<sup>1</sup>, Link R.<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup>Klinika ošipaných, Univerzitná veterinárna nemocnica, UVLF, Košice, Slovensko

## ABSTRAKT

Hlavnou funkciou dendritových buniek (DC) je indukcia adaptívnej imunity v sekundárnych lymfoidných orgánoch a tkanivách prezentáciou antigénov prostredníctvom MHC I a MHC II molekúl naivným T-lymfocytom. Na štúdium úlohy DC v *in vitro* podmienkach sa bežne používajú z monocytov derivované dendritové bunky (moDC) pripravené počas *in vitro* kultivácie monocytov izolovaných z periférnej krvi, keďže v krvi sa primárne DC nachádzajú vo veľmi nízkom počte. Ich hlavným miestom lokalizácie sú tkanivá, resp. blízko povrchov, kde hrozí najväčšie nebezpečenstvo vstupu patogénov do organizmu. Tieto v *in vitro* podmienkach pripravené moDC sú svojou morfológiou a funkciou veľmi podobné konvenčným myeloidným dendritovým bunkám. Cieľom našej práce bola štandardizácia protokolu pre získanie moDC z monocytov (Mo) izolovaných z periférnej krvi mladých ošipaných. Mononukleárne leukocyty sme izolovali z krvi pomocou separačného roztoku (Lymphosep, Biosera) a na následnú izoláciu Mo z tejto suspenzie sme použili nemagnetické mikročastice (pluriBead<sup>®</sup> KIT, PluriSelect) značené protilátkou proti prasacím CD14. Takto získané Mo sme kultivovali v jamkách kultivačnej platne po dobu 5 dní v kontrolovanom prostredí (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Na stimuláciu diferenciácie Mo na moDC sme použili rastové faktory IL-4 a GM-CSF.

## ÚVOD

Dendritové bunky sú bunky špecializované na prezentáciu antigénov, ktoré majú jedinečnú schopnosť aktivovať naivné T-lymfocyty. DC rozpoznávajú cudzie štruktúry pochádzajúce z rôznych patogénov, pomocou tzv. vzory rozpoznávajúcich receptorov (PRR) exprimovaných na ich bunkovom povrchu. Úloha DC v imunitnom systéme je oveľa sofistikovanejšia než sa zdá, pretože nezabíjajú patogény priamo, ale svojou schopnosťou prezentácie antigénov v komplexoch s MHC molekulami aktivujú špecifické imunitné reakcie vďaka čomu zabezpečujú premostenie vrodenej a adaptívnej imunity (Lebeer, Vanderleyden, a De Keersmaecker, 2008). *In vitro* diferenciácia DC je alternatívnym spôsobom získania týchto buniek na štúdium ich funkcie. Jedna z možností nepriameho získania DC je ich derivácia z progenitorových CD34<sup>+</sup> buniek nachádzajúcich sa v kostnej dreni alebo v krvi (Schuler a Romani, 1997). Tieto metódy sú však vysoko náročné, navyše z krvi získané CD34<sup>+</sup> progenitorové bunky sú vo veľmi nízkom počte. Vhodnejšou metódou je príprava DC z monocytov získaných z periférnej krvi (Kim et al., 2019; Posch, Lass-Flörl, a Wilflingseder, 2016). DC diferencované z prasačích monocytov (moDC) je možné generovať rýchlo (do 48 hodín), alebo klasickou metódou. Funkcia a fenotypové charakteristiky moDC generovaných rýchlo metódou sú vyvinuté iba čiastočne (Wongyanin et al., 2012), zatiaľ čo moDC generované klasickou metódou (5- až 7-dňová kultivácia) sú fenotypovo aj funkčne viac podobné konvenčným DC a preto sú vhodnejším modelom na *in vitro* štúdium interakcií hostiteľ-patogén (Lecours et al., 2011). Je známe, že funkčné vlastnosti nezrelých a zreých DC sú veľmi odlišné, a z tohto pohľadu je fáza zrenia moDC pre interpretáciu experimentálnych výsledkov veľmi dôležitá (Nedumpun, Ritprajak, a Suradhat, 2016).

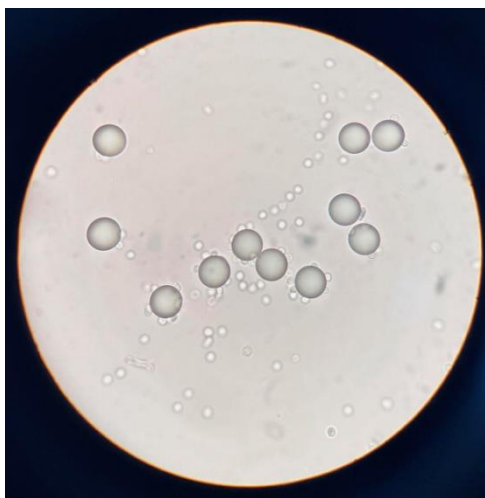
## MATERIÁL A METODIKA

Heparinizovanú krv (40 ml) sme odobrali za sterilných podmienok z krvného splavu oka mladého (8 týždňového) prasaťa. Mononukleárne leukocyty (MNL) sme izolovali z periférnej

krvi pomocou separačnej tekutiny (Lymphosep, Biosera). Následne sme monocyty z tejto suspenzie odseparovali pomocou nemagnetických mikročastíc (pluriBead<sup>®</sup> KIT, PluriSelect) značených protilátkou proti prasacím CD14 (dar od Dr. Šimkova, Bioscience). Mo boli kultivované metódou adhézie na plast v RPMI 1640 médiu obohatenom o glutamín ( $2\text{mmol.l}^{-1}$ ), tepelne inaktivované FBS (10%), gentamicín (0,1%) a rekombinantné prasacie cytokíny rpGM-CSF ( $20\text{ ng.ml}^{-1}$ ) a rpIL-4 ( $50\text{ ng.ml}^{-1}$ ), pri teplote  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v atmosfére 5%  $\text{CO}_2$  po dobu 5 dní. Médium sme menili každý druhý deň. Počty buniek a fenotypové charakteristiky sme stanovovali pomocou prietokového cytometra (BD FACSCanto<sup>™</sup>) na 1. deň a na 5. deň od nasadenia. Ako znak diferenciácie sme sledovali expresiu CD14, CD80, CD86 a MHC II molekúl.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najkritickejším krokom počas izolácie monocytov je krok centrifugácie krvi navrstvanej na separačnej tekutine, pretože presné oddelenie erytrocytov a leukocytov sa dosiahne iba vtedy,

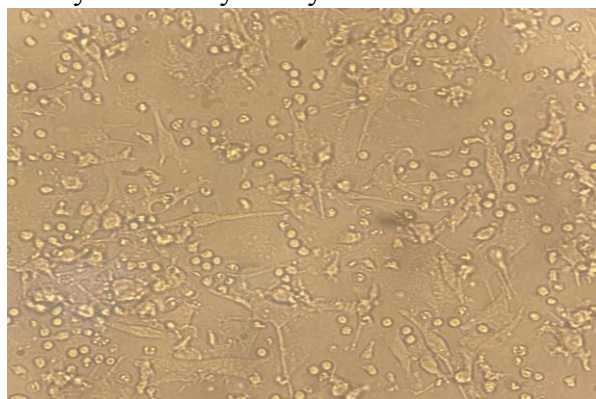


**Obr. 1** Separácia Mo pomocou mikročastíc značených protilátkami proti CD14

ak je brzda odstredivky vypnutá. Týmto spôsobom sa nám podarilo izolovať v priemere  $3,3 \times 10^8$  MNL zo 40 ml odobratej krvi, z ktorých sme následne separovali v priemere  $1,3 \times 10^6$  monocytov, čo predstavuje približne 4% Mo v krvi ošípaných. Prvý deň kultivácie sa nasadili na jamky ( $4\text{cm}^2$ ) dvanásť-jamkovej platničky získané monocyty v koncentrácii  $4 \times 10^5$  Mo/well. Pomocou prietokového cytometra sme stanovili prítomnosť lymfocytov (Ly) a fenotyp izolovanej populácie Mo. Získané výsledky poukázali na to, že separácia Mo pomocou mikročastíc značených protilátkami proti CD14 (Obr. 1.) je vysoko efektívnym spôsobom izolácie Mo s minimálnou kontamináciou Ly, keďže v pripravenej bunkovej suspenzii bolo 95% Mo a iba 3% Ly. V porovnaní s našim predošlým experimentom, kde

sme na separáciu Mo zo suspenzie mononukleárných leukocytov využili len metódu 2 h adhérencie na plast, bol pomer Mo/Ly 1:10.

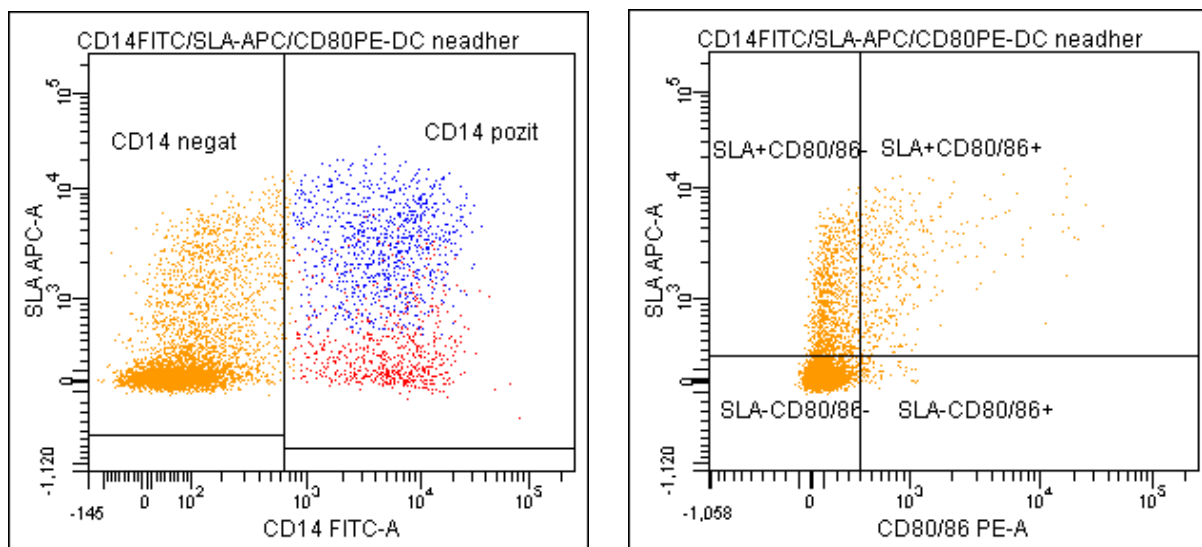
Po 5 dňoch kultivácie v kontrolovanom prostredí sme pri hodnotení pomocou svetelného mikroskopu pozorovali vzniknutú dendritovú morfológiu v kultivovaných bunkách (Obr. 2.). Pri hodnotení pomocou prietokového cytometra sme zistili, že podiel buniek exprimujúcich MHC molekuly II. triedy a CD80/86 sa zvýšil, kým expresia  $\text{CD14}^+$  bola u týchto buniek relatívne znížená



**Obr. 2** Nezrelé (neaktivované) prasacie moDC diferencované z periférnych monocytov v ex vivo podmienkach

(na 5. deň kultivácie až 77% buniek stratilo  $\text{CD14}^+$  znak – Obr. 3.). Populáciu moDC tvorili dve subpopulácie nezrelých buniek, z ktorých jedna bola adherovaná na povrch plastu a druhá nebola adherovaná. Podarilo sa nám štandardizovať protokol reprodukovateľnej generácie moDC, ktoré chceme využiť na vytvorenie ko-kultivačného modelu intestinálnych epitelových buniek kultivovaných spolu s moDC, ktorý chceme využiť na štúdium imunomodulačného účinku exopolysacharidov získaných z probiotického kmeňa *Limosilactobacillus reuteri* (*Lactobacillus reuteri*) počas

infekcie navodenej ETEC. Výsledky z tohto štúdia nám pomôžu lepšie pochopiť komplikované interakcie v komunikácii enterocytov s imunitnými bunkami uloženými v *lamina propria* tenkého čreva, počas pôsobenia laktobacilov a patogénov.



**Obr. 3** Analýza imunofenotypu moDC populácie pomocou prietokového cytometra. Zmena imunofenotypu moDC po 5 dňoch diferenciácie

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kim S. E., Hwang J. H. et al. Heterogeneity of porcine bone marrow-derived dendritic cells induced by GM-CSF. PLoS ONE. 2019; 14:11, 1–12.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2008; 72:4, 728–764.
- Lecours M. P, Segura M. et al. Characterization of porcine dendritic cell response to Streptococcus suis. Vet.Res. 2011; 42:1, 1–12.
- Nedumpun T, Ritprajak P, Suradhat S. Veterinary Immunology and Immunopathology Generation of potent porcine monocyte-derived dendritic cells ( MoDCs ) by modified culture protocol. Vet. Immunol. Immunopathol. 2016; 182, 63–68.
- Posch W, Lass-Flörl C, Wilflingseder D. Generation of human monocyte-derived dendritic cells from whole blood. J. Vis. Exp. 2016; 118, 2–7.
- Schuler G, Romani N. Generation of mature dendritic cells from human blood: An improved method with special regard to clinical applicability. Adv. Exp. Med. Biol. 1997; 417:96, 7–13.
- Wongyanin P, Buranapraditkul S. et al. Role of porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein in induction of interleukin-10 and regulatory T-lymphocytes (Treg). J. Gen. Virol. 2012; 93:6, 1236–1246.

# DIAGNOSTICKÝ POTENCIÁL NEKÓDUJÚCICH RNA Z KULTIVAČNÉHO MÉDIA V PROCESE IVF

Klepcová Z<sup>1</sup>, Toporceroová S.<sup>2</sup>, Kľoc M.<sup>1</sup>, Šoltys K.<sup>3</sup>, Mareková M.<sup>1</sup>, Rabajdová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Gynekologicko-pôrodná klinika, UPJŠ LF a UNLP, Košice, Centrum pre asistovanú reprodukciu  
Gyncare v Košiciach

<sup>3</sup>Katedra mikrobiológie a virológie, PriF, UK v Bratislave

## ABSTRAKT

Neplodnosť je v súčasnosti čoraz viac rozšírené ochorenie, v dôsledku čoho sa v poslednej dobe zvyšuje počet uskutočnených procesov *in vitro* fertilizácie (IVF). Úspešný IVF proces determinuje množstvo faktorov, no najdôležitejšie sú receptívne endometrium, určenie tzv. implantačného okna a v neposlednom rade výber kvalitného embrya. Cieľom tejto práce bola analýza nekódujúcich RNA (sncRNA) v použítom kultivačnom médiu embryí pomocou sekvenáčnej analýzy (NGS), bioinformatických a štatistických analýz. Vybrané sncRNA z kultivačného média preukázali štatistickú významnosť pri určení úspešnosti implantácie embrya v IVF procese, pri určení kvality embrya určeného na implantáciu. Vďaka rôznej expresii už spomínaných RNA v kultivačnom médiu, by vybrané miRNA mohli predstavovať sľubné biomarkery pre výber kvalitného embrya.

## ÚVOD

Neplodnosť je porucha reprodukčného systému, ktorá je definovaná ako neschopnosť otehotnieť po 1 roku neúspešného pokúšania sa o potomstvo. V poslednej dobe sledujeme zvyšujúci sa počet uskutočnených procesov *in vitro* fertilizácie. Percento úspešnosti transferu však nestúpa nad 30%, aj napriek zlepšujúcim sa podmienkam pre *in vitro* kultiváciu embryí v asistovanej reprodukcii. Na IVF klinikách sa kladie dôraz na výber jediného euploidného embrya vhodného na transfer do dutiny maternice.

Fertilizácia *in vitro* sa odohráva v embryoskope, kde práve kultivačné médium podporuje vývoj embrya od jeho začiatku až po transfer, vďaka čomu zohráva veľmi dôležitú úlohu pri asistovanej reprodukcii. Kultivačné médium by malo zabezpečiť čo najlepšie podmienky pre vývoj embryí, teda jeho zloženie by malo zabezpečiť metabolické potreby embrya a minimalizovať stres pri kultivácii v podmienkach *in vitro* (Chronopoulou a Harper, 2015). Počas preimplantačného vývoja embryo vylučuje do kultivačného média niektoré látky (tzv. sekretóm), ktoré by mohli predstavovať vhodný biomarker. Použité kultivačné médium je vhodné na štúdium proteomiky, metabolomiky a v neposlednom rade aj malých nekódujúcich RNA, vrátane mikroRNA a piwiRNA, ktoré sú čoraz populárnejšie pri štúdiu gynekologických malignít a neplodnosti (Rødgaard a kol., 2015).

Za posledné roky pribudli štúdie, ktoré preukázali dôležitú úlohu sncRNA, vrátane mikroRNA (miRNA), malých interferujúcich RNA (siRNA) a piwi-interagujúcich RNA (piRNA), v reprodukčnom systéme. Pochopenie ich funkcie v rámci gametogenézy a embryogenézy by mohlo byť prospešné pri možných príčinách neúspešnosti implantácie v procese IVF (Timofeeva a kol., 2019). MiRNA (19-23 nt) a piRNA (26-31 nt) sú krátke jednolátkové RNA molekuly zohrávajúce svoju úlohu nielen v bunkách, ale môžu byť uvoľnené do extracelulárneho prostredia a sprostredkovať tak medzibunkovú komunikáciu, ako aj poskytnúť informácie v súvislosti s fyziologickými a patologickými podmienkami (Liang a kol., 2017). Mechanizmus pôsobenia miRNA je v translačnej represii a degradácii mRNA, zatiaľ čo piRNA transkripčne alebo posttranskripčne reprimujú transpozóny. Ľudské embryá secernujú špecifické miRNA a piRNA molekuly do extracelulárneho prostredia, čím sprostredkujú interakciu medzi blastocystou a endometriom, ktorá je esenciálna pre úspešnú implantáciu embrya. Exozómy, ktoré sú vylučované epitelom ľudského endometria do dutiny

maternice, transportujú svoj obsah do blastocysty, resp. do príhľadného endometria, čím ovplyvňujú tak génovú expresiu v endometriu (Capalbo a kol., 2016).

*Tab. 1 Efektorové miRNA z kultivačného média pri úspešne a neúspešne implantovaných blastocystách*

<b>Proces</b>	<b>miRNA pri úspešne ✓ implantovaných blastocystách</b>	<b>miRNA pri neúspešne X implantovaných blastocystách</b>
<b>Proliferácia</b>	miR-20a, miR-30c, miR-19b-3p, miR-372-3p, miR-634, let-7b-5p	miR-373-3p, miR-518a-3p, miR-191
<b>Angiogenéza</b>	miR-29c-3p, miR-20a, miR-634	miR-373-3p
<b>Viabilita</b>	miR-20a, miR-92a-3p, let-7b-5p	miR-182-5p
<b>Bunkový cyklus</b>	miR-20a, miR-142-3p	miR-372, miR-302a-3p, miR-191
<b>Apoptóza</b>	miR-634, let-7b-5p	miR-372, miR-518a-3p, miR-302a-3p, miR-191
<b>Implantácia</b>	miR-20a, let-7b-5p, let-7i-5p	miR-661, miR-92, let-7, miR-519d-3p, miR-302a-3p, miR-92a-3p
<b>Vývoj blastocysty</b>	let-7b-5p, let-7i-5p	let-7, miR-92

## MATERIÁL A METODIKA

Na analýzu sme použili kultivačné médium embrya pacientiek v procese IVF. Odber kultivačného média embrya bol uskutočnený v deň transferu embrya do maternice (na 5. deň po oplodnení) v Centre pre asistovanú reprodukciu GynCare v Košiciach. Odber tohto biologického materiálu predstavuje neinvazívny a ľahko dostupný materiál, ktorý je považovaný za odpadový. Z celkového počtu 63 vzoriek kultivačných médií boli 3 vzorky kultivačných médií nepoužitých pre kultiváciu a slúžili ako kvalitatívny a kvantitatívny background, bias kultivačných médií. Z celkového počtu sekvenovaných vzoriek kultivačných médií 60, bolo úspešne implantovaných embryí 53% (n=32) a 47% (n=28) neúspešne implantovaných blastocýst. Ako prvý krok bola uskutočnená izolácia miRNA z kultivačného média blastocysty pomocou kitu miRNeasy Micro Kit (Qiagen). Následne bola pripravená sekvenačná knižnica s použitím Qiagene sekvenačnej chémie QIAseq miRNA Library Kit. Sekvenovanie (NGS) bolo uskutočnené pomocou NextSeq 500 na Platfóme Illumina. Hlavné výsledky predkladanej štúdie boli získané na základe sekvenácie ncRNA molekúl a kombinácie bioinformatickej analýzy dát. Bioinformatické spracovanie využilo verejne dostupné referenčné databázy miRBase a isomiR. Evaluácia výberu biomarkerových molekúl bola založená na aspoň jednej z metód alebo ich kombinácii so stanovením korelácie molekúl a metód strojového učenia (napr. LogisticRegression, RandomForestClassifier, SVC, SVM, SGD Classifier). Predkladané štúdie bola schválená etickou komisiou KSK dňa 24.4.2018 ako aj etickou komisiou UNLP.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

MiRNA a piRNA molekuly z kultivačného média úspešne a neúspešne implantovaných blastocýst ovplyvňujú expresiu génov zúčastňujúcich sa rôznych bunkových procesov súvisiacich s embryogenézou a implantáciou (proliferácia, angiogenéza, prežívanie, apoptóza, bunkový cyklus), ako aj v procese implantácie embrya do uteru, resp. v jeho

predimplantačnom vývoji (tab. 1) (Rosenbluth a kol., 2014; Cuman a kol., 2015; Borges a kol., 2016; Capalbo a kol., 2016; Abu-Halima a kol., 2017; Kim a kol., 2019; Cimadomo a kol., 2019; Timofeeva a kol., 2020). Spomedzi množstva detegovaných molekúl sme z použitého kultivačného média embrya identifikovali 6 miRNA (miR-196a-5p, miR-26a-2-3p, miR-192-3p, miR-150-5p, miR-337-3p a miR-874-5p) a 8 piRNA (piR-28263, piR-32898, piR-28096, piR-32905, piR-414, piR-32843, piR-28765 a piR-32942) molekúl, ktoré preukázali vysokú pravdepodobnosť úspešnosti implantácie embrya v IVF procese (AUC nad 70%). Z doposiaľ zistených výsledkov a predchádzajúcich publikácií by mohli nekódujúce RNA molekuly z kultivačného média embrya predstavovať biomarkery kvality a viability embryí, čo by značne prispelo k zvýšeniu úspešnosti výsledku v procese *in vitro* fertilizácie.

*Táto práca je súčasťou riešenia projektov VEGA 1/0873/18, VEGA 1/0620/19 a VEGA 1/0540/21 ktoré sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPJŠ LF a UNLP v Košiciach a Centrom pre asistovanú reprodukciu Gyncare v Košiciach.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abu-Halima M, et al. Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing in vitro fertilization. *Sci Rep* 2017; 7:13525.
- Borges E Jr, et al. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure - A pilot study. *JBRA Assist Reprod.* 2016; 20:200-205.
- Capalbo A. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril.* 2016; 105, 225–235.e3.
- Cimadomo D, et al. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Human Reproduction.* 2019; 34:1746-61.
- Cuman C, et al. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*, 2015; 2:1528-35.
- Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Human Reproduction Update.* 2015; 21:39 –55.
- Kim J, Lee J, Jun JH. Identification of differentially expressed microRNAs in outgrowth embryos compared with blastocysts and non-outgrowth embryos in mice. *Reprod Fertil Dev.* 2019 ;31: 645.
- Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017; 15:90.
- Rødgaard T, Heegaard PMH, Callesen H. Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success. *Reproductive BioMedicine Online.* 2015; 31:585–592.
- Rosenbluth EM, et al. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril.* 2014; 101:1493-1500.
- Timofeeva AV, et al. Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage. *International journal of molecular sciences.* 2020; 21:9399.
- Timofeeva AV. Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. *Int J Mol Sci.* 2019; 20:2912.

# SYNANTROPNÉ VTÁKY AKO REZERVOÁRE GÉNOV VIRULENCIE TYPICKÝCH PRE EXTRA-INTESTINÁLNE PATOGENNE *E. COLI*

Kocúreková T.<sup>1,2</sup>, Bujňáková D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

## ABSTRAKT

*Escherichia coli* (*E. coli*) je súčasťou komenzálnej mikrobioty čreva, môže však spôsobiť aj závažné intestinálne aj extra-intestinálne infekcie ľudí a zvierat. Naším cieľom bolo pomocou PCR identifikovať fylogenetické skupiny *E. coli* zo vzoriek kloakálnych výterov kurčiat a holubov a detegovať výskyt vybraných génov kódujúcich faktory virulencie a vychytávania železa. Najčastejšie identifikované fyloskupiny boli B1 (37%) a A (21%) u brojlerov, a B2 (48%) u holubov. Izoláty z kurčiat mali v priemere 4 faktory virulencie/kmeň, pričom ich najväčší počet bol zaznamenaný pre skupiny F (7.9) a B2 (7.6). U holubov pripadalo 5.3 faktora na kmeň a najviac génov asociovaných s virulenciou bolo u fyloskupiny B2 (7). Pri sledovaní frekvencie výskytu génov pre vychytávanie železa sme zaznamenali, že u brojlerov sa vyskytovali častejšie gény *feoB* (94%), *sitA* (83%) a *iutA* (58%) a u holubov to boli *feoB* a *sitA* (95%), *fyuA*, *irp2* (57%) a *iroN* (71%). Gény kódujúce protektíny (*iss*, *kpsMT II*) boli identifikované v priemere u 45% vzoriek z holubov a u 30% z kurčiat. U všetkých kmeňov od holubov určených ako B2 bola potvrdená prítomnosť génu pre invazívny proteín poškodzujúci endotel mozgových buniek (*ibeA*). Izoláty z brojlerov spadajúce do fyloskupiny B2 niesli aj *papC* (P fimbrie) gén, ktorý sa spája s infekciou horných močových ciest. Tieto skutočnosti poukazujú na to, že synantropné vtáky môžu byť rezervoármi génov spájaných s virulenciou *E. coli* spôsobujúcich extra-intestinálne infekcie u ľudí a zvierat.

## ÚVOD

Kmene *E. coli* sa na základe prítomnosti, resp. neprítomnosti špecifických génov zatriedujú do 8 fylogenetických skupín A, B1, B2, C, D, E, F a clade I (Clermont a kol. 2013). Do skupiny A a B1 sa zaraďujú kmene tvoriace komenzálnu mikrobiotu. Do fyloskupín B2 a D patria hlavne k extra-intestinálnym *E. coli* (ExPEC) (Picard a kol. 1999). Baktérie disponujú mnohými vlastnosťami a funkciami, ktoré im pomáhajú prispôbovať sa prostrediu a prežívať v ňom. Tieto vlastnosti sú tzv. fitness faktory (Hacker, Carniel 2001). Medzi najdôležitejšie faktory nevyhnutné na prežitie patrí bakteriálny príjem železa sprostredkovaný produkciou siderofórov, molekúl s vysokou afinitou k železu (Brüssow a kol. 2004). Železo je pre mikroorganizmy aj hostiteľov esenciálny prvok zapojený do rôznych bunkových procesov (Skaar 2010). Schopnosť získať železo z prostredia majú komenzálne aj patogénne baktérie, preto v črevnom prostredí vzniká „boj“ o tento prvok. V inter-mikrobiálnom boji majú baktérie dve hlavné možnosti, ktoré zvyšujú ich šance na prežitie: 1) syntetizujú špecifické siderofóry, ktoré nemôžu využívať iné bakteriálne kmene a/alebo 2) vylučujú toxické molekuly - bakteriocíny spojené s látkami chelátujúcimi železo, aby usmrtili baktérie schopné absorbovať tieto prostriedky; toto riešenie sa nazýva stratégia „trójsky kôň“, a má terapeutické využitie (Fardeau a kol., 2011). Cheláciu železa teda možno považovať za faktor virulencie. Faktory virulencie ako také možno priradiť k fitness faktorom, keďže pomáhajú bakteriálnej bunke prežiť. Cieľom práce bolo zistiť prevalenciu jednotlivých fylogenetických skupín *E. coli* u brojlerov a holubov, a sledovať prítomnosť génov pre faktory virulencie a vychytávanie železa vo vzťahu k fyloskupinám.

## MATERIÁL A METODIKA

Spolu bolo pomocou MALDI TOF-MS (Bruker Daltonics, Leipzig, Nemecko) detegovaných 136 kmeňov *E. coli* z kloakálnych výterov synantropných vtákov. 115 vzoriek pochádzalo od

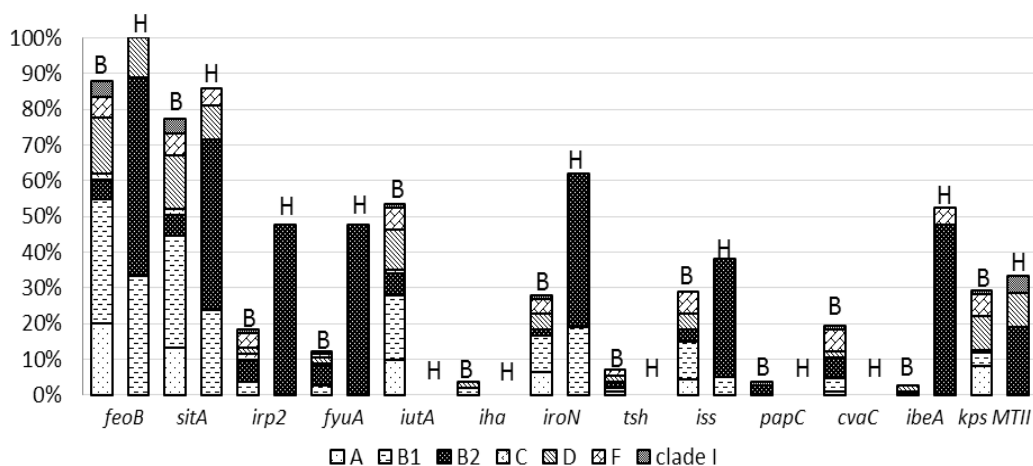


asymptomatických brojlerov z veľkokapacitných chovov a zvyšných 21 vzoriek od chorých holubov z domáceho chovu. Pre zatriedenie kmeňov do fyloskupín sme PCR reakciou analyzovali gény, *arpA*, *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 (Clermont a kol. 2013), *arpAgpE*, *trpAgpC* (Lescat et al., 2012). Detegované boli gény kódujúce siderofóry, resp. ich receptory *feoB*, *irp2*, *sitA*, *iha*, *iroN*, *fyuA*, *ireA* (Handrová, Kmeť 2019) a gény iných faktorov virulencie *iss*, *papC*, *iutA*, *cvaC*, *kpsMTII*, *tsh* (Handrová, Kmeť 2019), *ibeA* (Germon a kol. 2005).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Komenzálny kmene sú zaradované do fylogenetických skupín A a B1. Avšak kmene *E. coli* skupín A, B1, D a E môžu byť zodpovedné za rozvoj intestinálnych infekcií. Patogénne ExPEC sú identifikované ako skupiny B2 a D (Lee a kol. 2010). Kmene vyizolované zo zdravých brojlerov spadali do skupín A (21%), B1 (37%), B2 (6%), C (2%), D (17%), F (6%) a clade I (4%). U holubov dominovala skupina B2 (48%), ďalej boli identifikované B1 (29%), D (10%) a F (5%). Patogénne kmene disponujú niekoľkými ostrovmi patogenity a širším zastúpením faktorov virulencie ako sú toxíny, adhezíny, faktory pre tvorbu biofilmu a produkciu siderofórov, ale sú citlivejšie na liečivá. U komenzálnych kmeňov je naopak menej génov pre virulentné faktory, ale častejšie je detegovaná rezistencia na antibiotiká (Saralaya a kol. 2015). Jakobsen a kol. (2010) zistili, že izoláty zaradené do skupiny B2 a D mali viac faktorov virulencie ako skupiny A a B1. Naše výsledky poukazujú na skutočnosť, že u brojlerov mali v priemere najväčší počet virulentných faktorov práve fyloskupiny B2 (7.6/kmeň), F (7.9), D (4.1). Menej virulentnými boli kmene zo skupín A a B1, kde pripadali na kmeň približne 3 faktory. U holubov sa nám tento poznatok potvrdil, kde najbohatšou skupinou na faktory virulencie bola skupina B2 (7). Gény faktorov virulencie sú kódované na ostrovoch patogenity (PAI) – mobilných genetických elementoch, z ktorých mnohé boli identifikované u ExPEC (Starčíč Erjavec, Žgur-Bertok 2015), preto môže dôjsť k prenosu virulentných génov medzi patogénnymi a komenzálnymi druhmi *E. coli*. Köhler a Dobrindt (2011) charakterizovali gény kódujúce faktory virulencie typické pre ExPEC, ktoré sú fakultatívne patogény, a u mnohých jedincov sú súčasťou bežnej mikrobioty. Z našich výsledkov je zjavná prevalencia génov charakteristických pre ExPEC na vychytávanie železa, a to u brojlerov: *sitA* (83%), *iutA* (58%), *iroN* (28%), *irp2* (22%), *fyuA* (14%), a u holubov *sitA* (95%), *irp2*, *fyuA* (57%), *iroN* (71%). Ďalšie faktory virulencie ako adhezíny *papC*, *iha* (4%), *tsh* (10%) a protektín *cvaC* (22%) boli detegované len u kurčiat. Protektíny *iss*, *kpsMT II* boli identifikované u 30% brojlerov a 45% holubov. Podľa Nowrouziana a kol. medzi *E. coli* pretrvávajúcimi v hrubom čreve dochádza k prenosu génov pre tvorbu fimbrií *papC*, vychytávania železa *iutA*, *fyuA*, a pre tvorbu kapsúl *kps*, ktoré sú typické pre ExPEC (2001). V našich kmeňoch boli gény *iutA* najviac zastúpené v skupine B1 brojlerov, *fyuA* v B2 u holubov aj brojlerov, *kpsMTII* v B2 holubov a D skupine u brojlerov a *papC* bol u kurčiat v skupine B2. Významná bola aj detekcia génu pre inváziu endotelových mozgových buniek vo fylogenetickej skupine B2 u 3.5% kurčiat, ale až 48% holubov, ako aj detekcia génu pre P-fimbrie u 4.3% brojlerov, ktoré sú považované za kolonizačný faktor extra-intestinálnych infekcií. Preto môžeme skonštatovať, že ako holuby, tak aj brojlery môžu byť potenciálnymi prenášačmi génov extra-intestinálnej virulencie, čo môže znamenať potenciálne nebezpečenstvo pre zdravie zvierat aj ľudí. Keďže pre drvivú väčšinu baktérií je železo nevyhnutné pre prežitie, lepšie pochopenie procesu jeho získavania na molekulárnej úrovni, by mohlo v konečnom dôsledku viesť k racionálnemu návrhu nových tried anti-mikrobiálnych látok (peptidov, antibiotík) spojených so siderofórmami (s chelátormi železa, prenášačmi) v boji proti patogénnym mikroorganizmom.





**Graf 1. Distribúcia génov virulence vo vzťahu k fyloskupinám u brojlerov (B) a holubov (H)**

*Táto práca bola podporená slovenských grantom VEGA 2/0010/21.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brüssow H, et al. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(3):560-602.
- Clermont O, et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep.* 2013;5(1):58-65.
- Fardeau S, et al. Bacterial iron uptake: a promising solution against multidrug resistant bacteria. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* 2011 Jan;2:695-705.
- Germon P, et al. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading).* 2005 Apr;151(Pt 4):1179-1186.
- Hacker J, Carniel E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep.* 2001;2(5):376-381.
- Handrova L, Kmet V. Antibiotic resistance and virulence factors of *Escherichia coli* from eagles and goshawks. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* 2019;54(7):605-614.
- Jakobsen L, et al. Broiler chickens, broiler chicken meat, pigs and pork as sources of ExPEC related virulence genes and resistance in *Escherichia coli* isolates from community-dwelling humans and UTI patients. *Int J Food Microbiol.* 2010;142:264-72.
- Köhler CD, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *International Journal of Medical Microbiology.* 2011;301(8):642-647.
- Lee S, et al. Phylogenetic groups and virulence factors in pathogenic and commensal strains of *Escherichia coli* and their association with *bla*CTX-M. *Ann Clin Lab Sci.* 2010;40(4):361-7.
- Lescat M, et al. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environ Microbiol Rep.* 2013 Feb;5(1):49-57.
- Nowrouzian F, Adlerberth I, Wold AE. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect.* 2001 Feb;126(1):11-8.
- Picard B, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* 1999 Feb;67(2):546-53.
- Saralaya V, et al. Characterization of *Escherichia coli* phylogenetic groups associated with extraintestinal infections in South Indian population. *Ann Med Health Sci Res.* 2015;5(4):241.
- Skaar EP. The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1000949.
- Starčič Erjavec M, Žgur-Bertok D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans—the Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiology Letters.* 2015;362(5).

# ANTIOXIDAČNÝ POTENCIÁL MEDICINÁLNYCH RASTLÍN *IN VITRO* A *IN VIVO*

Kucková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Centra biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť antioxidačný potenciál vybraných medicínálnych rastlín a ich zmesí (Hmix 1 a Hmix 2) *in vitro* a taktiež *in vivo* u oviec experimentálne nakazených parazitom *Haemonchus contortus*. Zvieratá boli rozdelené do štyroch experimentálnych skupín: kontrolná nenakazená skupina (K), skupina nakazených zvierat (I), nakazené zvieratá suplementované zmesou rastlín Hmix 1 (I + Hmix 1) alebo Hmix 2 (I + Hmix 2). Odpoveď zvierat na parazitárnu infekciu bola hodnotená meraním aktivity antioxidačných enzýmov, lipidovej peroxidácie a celkovej antioxidačnej kapacity v pečeni, obličke, sliznici slezu a bachorovom obsahu jahniat. V pečeni nakazených zvierat bola zistená zvýšená lipidová peroxidácia, ako aj aktivita superoxid dismutázy (SOD) a znížená aktivita glutatión peroxidázy (GPx). Príjem rastlinných zmesí mal za následok zvýšenie celkovej antioxidačnej kapacity v bachorovom obsahu nakazených zvierat. Výsledky ukázali, že celkový obsah polyfenolov a flavonoidov v extraktoch bylenných zmesí signifikantne koreloval s ich antioxidačnou aktivitou a v prípade Hmix 1 boli tieto hodnoty vyššie v porovnaní s Hmix 2. Naše výsledky potvrdili, že endoparazitóza indukuje oxidačný stres u jahniat a príjem medicínálnych rastlín s antioxidačným potenciálom môže do istej miery posilniť antioxidačný obranný systém infikovaných zvierat.

## ÚVOD

Gastrointestinálny parazit *Haemonchus contortus* L. je jedným z najrozšírenejších helmintov malých prežúvavcov po celom svete, ktorý negatívne vplýva na zdravie zvierat a je hlavnou príčinou produkčných strát (Alam a kol., 2020). Hostiteľ reaguje na prítomnosť parazita rôznymi mechanizmami, pričom jedným z nich je aj zvýšená tvorba reaktívnych foriem kyslíka (RFK). Avšak, zvýšenie RFK za účelom zneškodniť parazita, môže spôsobiť nerovnováhu medzi nimi a antioxidantmi, čo môže viesť k vzniku oxidačného stresu a poškodeniu tkanív (Rashid a Irshadullah, 2019). V súčasnosti sa vedci sústreďujú na suplementáciu diét medicínálnymi rastlinami, ktoré majú vďaka sekundárnym metabolitom, polyfenolom, mnoho biologických účinkov, napríklad antimikrobiálne, antiparazitické a antioxidačné, pozitívne pôsobia na imunitný systém, vstrebávanie živín, morfológiu tráviaceho traktu a zvyšujú celkové zdravie a kvalitu produktov (Olagaray a Bradford, 2019).

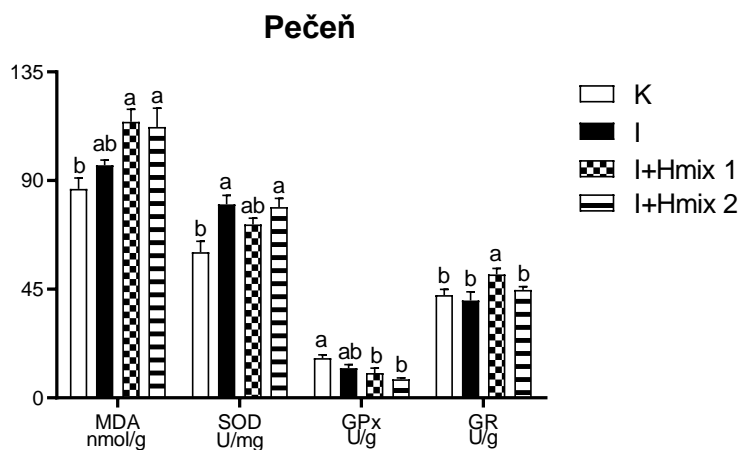
## MATERIÁL A METODIKA

Dvadsaťštyri jahniat (Zošľachtená valaška) bolo rozdelených do 4 experimentálnych skupín. Prvá, kontrolná (K) skupina dostávala len bazálnu diétu (BD) pozostávajúcu z komerčného koncentrátu (350 g DM/deň/zviera) a sena *ad libitum*. Zvieratá zo zvyšných troch skupín boli orálne infikované larvami *H. contortus* v štádiu L3. Druhá skupina, infikovaná (I), dostávala iba BD, tretia (I + Hmix 1) a štvrtá skupina (I + Hmix 2) mali BD suplementovanú o 100 g Hmix 1 resp. Hmix 2/deň/zviera. Základ oboch rastlinných zmesí tvorili: 1 % *Artemisia absinthium* L., a 13,42 % *Chamomilla recutita* L., *Fumaria officinalis* L. a *Malva sylvestris* L. v Hmix 1 (resp. 12,38 % v Hmix 2). Okrem toho Hmix 1 obsahoval 13,42 % *Hyssopus officinalis* L., *Melissa officinalis* L., *Plantago lanceolata* L., *Solidago virgaurea* L. a 5 % *Foeniculum vulgare* Mill. Hmix 2 navyše obsahoval 12,38 % *Achillea millefolium* L., *Calendula officinalis* L., *Cichorium intybus* L., *Hypericum perforatum* L. a *Urtica dioica* L. (Mravčáková a kol., 2019). Na konci 70 dňového experimentu boli zvieratám odobraté vzorky krvi a po následnom usmrtení im boli odobraté vzorky slezu, pečene, obličky a bachorového obsahu. Z medicínálnych rastlín a zmesí sme pripravili extrakty, v ktorých sme stanovovali obsah celkových polyfenolov, flavonoidov a ich antioxidačnú kapacitu (TEAC) stanovením

DPPH (2,2,-difenyl-1-pikrylhydrazyl) a ABTS (2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolín-6-sulfonát) (Tupec a kol., 2017). Účinky diét obohatených o zmesi rastlín na antioxidačný status oviec bol stanovený meraním aktivity glutatión reduktázy (GR) pomocou komerčného kitu v sére a v tkanivách podľa Carlberg a Mannervik (1985). Aktivita superoxid dismutázy (SOD), glutatión peroxidázy (GPx), koncentrácia malondialdehydu (MDA) a celková antioxidačná kapacita (TEAC) v sére, tkanivách a bachorovom obsahu boli stanovené podľa originálnych metód detailne popísaných Čobanovou a kol. (2020). Pre štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná analýza variancie (ANOVA) s použitím Tukey's Multiple Comparison Test.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parazitárna infekcia je úzko spojená s oxidatívnym stresom a ovplyvňuje antioxidačný status zvierat (Váradyová a kol., 2017). Celková antioxidačná aktivita meraná metódou FRAP, ktorá spočíva v schopnosti antioxidantov redukovať  $Fe^{3+}$  na  $Fe^{2+}$ , bola signifikantne zvýšená v bachorovom obsahu zvierat dostávajúcich zmes bylín v porovnaní s infikovanou skupinou ( $p < 0,05$ ), čo mohlo byť reakciou na zvýšený počet RFK produkovaných počas oxidačného stresu (Machado a kol., 2014).



*Obr.1. Antioxidačné parametre v pečeni*

V pečeni (Obr. 1) bola aktivita SOD bola signifikantne zvýšená u infikovaných zvierat a I+Hmix 2 oproti nenakazenej kontrole ( $p < 0,01$ ) a aktivita GR bola signifikantne zvýšená v skupine I+Hmix 1 oproti ostatným skupinám ( $p < 0,001$ ). Aktivita GR v sére bola zvýšená v skupine I+Hmix 2 oproti infikovaným zvieratám ( $p < 0,01$ ), avšak aktivita SOD v sére nebola signifikantne ovplyvnená infekciou ani prijímanými diétami. Vyššia koncentrácia MDA a znížená aktivita GPx súvisí s oxidatívnym poškodením zvierat infikovaných parazitom a ich zníženou antioxidačnou obranou (Nanev a kol., 2012). Tieto poznatky sú v súlade s výsledkami našej štúdie, kde koncentrácia MDA bola signifikantne zvýšená v sére ( $p < 0,05$ ) a v pečeni (Obr. 1) nakazených zvierat, ktoré zároveň dostávali zmes bylín ( $p < 0,01$ ) oproti kontrolnej skupine. Pridávanie medicínálnych rastlín do BD neznížilo lipidovú peroxidáciu v sledovaných tkanivách. Rovnako, aktivita GPx bola znížená v pečeni (Obr. 1), obličke a sleze u infikovaných skupín v porovnaní s kontrolnou skupinou. Nanev a kol. (2012) interpretuje podobné výsledky tým, že zvieratá trpiace haemonchózou sú selénodeficientné, s čím môže súvisieť znížená aktivita selénodependentého enzýmu GPx.

Tab.1. Výsledky *in vitro* analýz rastlinných extraktov

	Celkové polyfenoly (mg GAE/ g DW)	Celkové flavonoidy (mg QE/ g DW)	CAK (mmol Fe <sup>2+</sup> / g DW)	DPPH <sup>-</sup>	ABTS <sup>+</sup>
				TEAC (mmol Trolox/ kg DW)	
<b>Hmix 1</b>	39,45	8,23	0,49	219,8	193,2
<b>Hmix 2</b>	33,40	6,85	0,28	155,1	165,7

Medicinálne rastliny s obsahom polyfenolov majú antioxidantné účinky a napomáhajú organizmu s bojom proti oxidačnému stresu (Olagaray a Bradford, 2019). V našej štúdií napriek zistenému obsahu celkových polyfenolov a flavonoidov (Tab.1) v rastlinných zmesiach, ktoré pozitívne korelovali s ich celkovou antioxidantnou kapacitou ( $r = 0,904$ , resp.  $r = 0,713$ ) a schopnosťou vychytávať voľné radikály DPPH<sup>-</sup> a ABTS<sup>+</sup> ( $r = 0,728$  a  $r = 0,742$  resp.  $r = 0,442$  a  $r = 0,472$ ) v *in vitro* podmienkach, sa ich antioxidantné vlastnosti *in vivo* významne nepreukázali. V dôsledku štruktúrnych zmien polyfenolov počas absorpcie a metabolizmu sú formy, ktoré sa dostávajú do krvi a tkanív odlišné od foriem v potrave (Brglez Mojzer a kol., 2016). Podávanie herbálnych zmesí zvieratám infikovaným parazitom *H. contortus* pozitívne ovplyvnilo celkovú antioxidantnú kapacitu v bachorovom obsahu ( $p < 0,05$ ) a v sére jahniat dostávajúcich Hmix 1 ( $p < 0,01$ ) oproti infikovanej skupine a malo za následok zvýšenie aktivity GR v pečeni, obličke a sére v porovnaní s nakazenými zvieratami.

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alam RTM, et al. Haemonchus contortus infection in sheep and goats:alterations in haematological, biochemical, immunological, trace element and oxidative stress markers. J Appl Anim Res. 2020; 48: 357-364.
- Brglez Mojzer E, et al. Polyphenols: extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. Molecules. 2016; 21:1-38.
- Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Meth Enzymol. 1985; 113:484-490.
- Čobanová K, et al. Does herbal and/or zinc dietary supplementation improve the antioxidant and mineral status of lambs with parasite infection? Antioxidants. 2020; 9:1172.
- Machado V, et al. Relationship between oxidative stress and pathological findings in abomasum of infected lambs by Haemonchus contortus. Pathol Res Pract. 2014; 210:812-817.
- Mravčáková M, et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. BMC Vet Res. 2019; 15:1-13.
- Nanev V, et al. Impact of Haemonchus contortus (Nematoda) infection on the oxidant/antioxidant status in lambs. Ecologica. 2012; 19: 426-429.
- Olagaray KE, Bradford BJ. Plant flavonoids to improve productivity of ruminants – A review. Anim Feed Sci Tech. 2019; 251:21-36.
- Rashid S, Irshadullah M. Evaluation of antioxidant and oxidant status of goats (*Capra aegagrus hircus*) naturally infected with Haemonchus contortus. J Helminthol. 2019; 1-6.
- Tupec M, et al. Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. Food Biosci. 2017; 20:43-50.
- Váradyová Z, et al., The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and hematological parameters of the lambs experimentally infected with Haemonchus contortus. Small Rum Res. 2017; 151: 124-132.

## ERBB2 AMPLIKÓN V ŠTÚDIU NEPLODNOSTI

Lamancová P<sup>1</sup>, Urdzik P.<sup>2</sup>, Toporcerová S.<sup>2</sup>, Kuncová B.<sup>2</sup>, Špaková I.<sup>1</sup>, Rabajdová M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Gynekologicko-pôrodná klinika, UPJŠ LF a UNLP, Košice

### ABSTRAKT

Neplodnosť je globálny zdravotný problém ovplyvňujúci ľudí v reprodukčnom veku. Na základe dostupných údajov neplodnosťou trpí 186 miliónov jednotlivcov na celom svete, v dôsledku čoho stúpol aj počet *in vitro* fertilizácií (IVF). Cieľom predkladanej štúdie bola detekcia proteínov ErbB2 amplikónu v sére žien v IVF procese. Získané výsledky hladín ErbB2 amplikónu naznačujú, že dereguláciou expresie ErbB2 amplikónu môže dochádzať ku zmenám na úrovni angiogenézy u neplodných pacientiek. Výsledky tejto pilotnej štúdie prispeli k prehĺbeniu poznatkov o translačnej regulácii proteínov ErbB2 amplikónu a o ich úlohe pri regulácii neplodnosti v IVF procese.

### ÚVOD

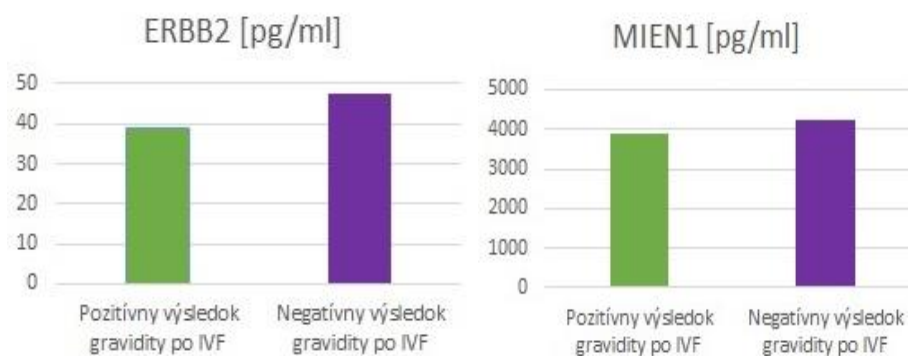
Keďže neplodnosť v súčasnosti postihuje čoraz viac párov, zvyšuje sa aj počet IVF. S úspešnou implantáciou embrya súvisí dostatočne vaskulárne vyživované endometrium a niektoré angiogénne faktory. Vaskulatúra sa u dospelého človeka vyvíja vaskulogenezou alebo angiogenezou. U žien vplýva angiogenéza na folikulogézu, ovuláciu a funkciu *corpus luteum*, ale ovplyvňuje aj niektoré patologické procesy v organizme. Medzi najvýznamnejšie faktory zapojené do angiogenézy patrí rodina vaskulárnych endotelových faktorov (VEGF, PLGF), angiopoetíny (Ang1,2), endoglin a signálne dráhy zahŕňajúce ErBb2 a NOTCH3. Erbb2 amplikón, tvorí skupina génov, ktoré sú exprimované pri chronickom zápale, v prekancerózných stavoch a overexprimované v bunkách tumorov reprodukčného traktu. Predpokladá sa, že jeden z týchto génov pôsobí ako spúšťač a vedie k deregulácii ostatných génov v amplikóne a následnej translačnej aktivite proteínov. Gény v amplikóne môžu byť deregulované aj na základe vzájomnej interakcie pri tvorbe tzv. génových loopov. Doposiaľ opublikované štúdie popisujú CTCF proteín a cohezin ako možné transkripčné insulátory. Deregulácia amplikónu vedie k deregulácii angiogenézy nielen na molekulovej, ale aj na proteínovej úrovni. CTCF proteín a cohezin ako funkčné chromatinové hranice medzi promótorami a zosilnovačmi (enhancer), môžu tvoriť tzv. kotvy (anchor), pre chromatinové slučky vzájomne interagujúcich génov. Kohezin hrá i významnú úlohu v držbe sesterských chromatíd a v držbe chromatinových slučiek vzájomne interagujúcich génov v mamálnych bunkách. (Gullerova, 2012, Bhahrajn, 2016). Analýza transkripčných faktorov a prítomnosť transkripčne, geneticky aktívneho euchromatínu, ako aj analýza proteínov kódovaných génmi ErBB2 amplikónu, hrá hlavnú úlohu v kontrole expresie pri vzniku inflamačných procesov, prekanceróz a tumorov. Pochopenie a analýza expresie všetkých génov v Erbb2 amplikóne kódujúcich proteíny ako napr. *Stard3*, *Ikz3*, *Mien1*, *Grb7*, môže v budúcnosti poskytnúť nové informácie o funkčnosti, úlohe týchto génov pri tvorbe a vzniku inflamačných procesov a karcinómov reprodukčného systému a nielen izoforiem génu *Erbb2*. ErbB2 sa rovnako považuje za pozitívny modulátor expresie VEGF (Agrawal, 2015). Signálna dráha VEGF predstavuje kľúčový regulátor pri iniciácii angiogenézy za fyziologických aj patologických podmienok. Je exprimovaný v stromálnych bunkách, lumenálnom epiteli a jeho nerovnováha vedie k zlyhaniu implantácie embrya a potratu, kvôli nedostatočnému cievnemu zásobovaniu. Nadmerná expresia ErbB2 zvyšuje hladinu VEGF prostredníctvom najmenej troch rôznych transkripčných faktorov - STAT3, Sp1 a hypoxiou indukovaných faktorov (HIF) (Salmasi a kol., 2021). Deregulácia amplikónu vedie k deregulácii angiogenézy nielen na molekulovej, ale aj na proteínovej úrovni, čo vo výsledku môže viesť k ovplyvneniu fyziologických procesov aj z hľadiska fertility.

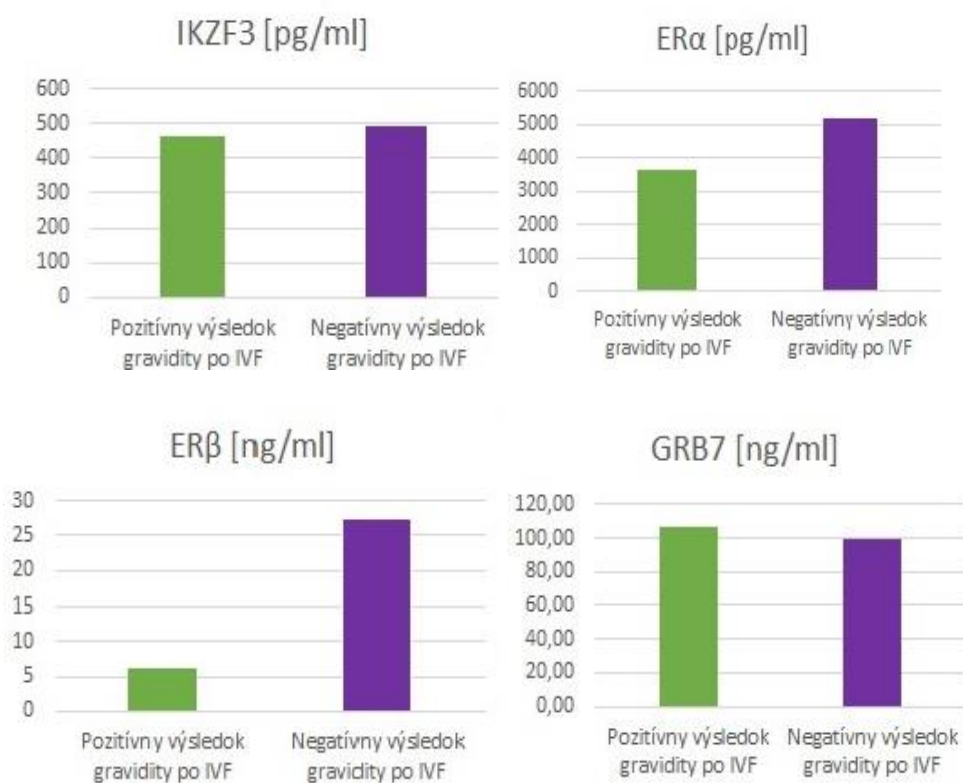
## MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie boli zaradené ženy, ktoré boli zahrnuté do procesu IVF. V experimentálnej skupine 37 pacientiek IVF proces zlyhal (potvrdená negativita séra hCG 10. deň po prenose blastocysty, 11. deň po prenose zhutnenej moruly). Úspech IVF bol hodnotený v druhej experimentálnej skupine, u 38 pacientiek, u ktorých bola hladina hCG zaznamenaná viac ako 30 IU/l deň 10 po prenose blastocysty, deň 11 po prenose zhutnenej moruly. V sére pacientiek bola v deň prenosu embrya detekovaná expresia 6 proteínov. Na kvantitatívne enzymaticko-imunologické stanovenie proteínov bola použitá ELISA metóda na základe využitia komerčne dostupných diagnostických kitov, a to ERBB2 (abcam), Estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ) (MyBioSource), Estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) (MyBioSource), Human Growth Factor Receptor Bound Protein 7 (GRB7) (MyBioSource), Human Zinc Finger Protein Aiolos (IKZF3) (MyBioSource), Migration And Invasion Enhancer 1 (MIEN1) (MyBioSource). Detekcia bola uskutočnená readrom Synergy H4. Pri vyhodnocovaní výsledkov bola vytvorená štandardná krivka závislosti priemerných hodnôt absorbancie od koncentrácie štandardov. Príslušné koncentrácie sledovaných proteínov, boli štatisticky vyhodnotené po zohľadnení riediaceho faktora. Získané údaje boli spracované voľne dostupnými bioinformatickými nástrojmi.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Estrogén je kľúčovým regulátorom rastu a diferenciácie v mnohých tkanivách, vrátane reprodukčného systému, mliečnej žľazy, centrálnej nervovej sústavy ale podieľa sa aj na mnohých patologických procesoch ako je karcinóm prsníka a endometria (Rumi a kol., 2017). Estrogénové hormóny ovplyvňujú dozrievanie oocytov, považujú sa za dôležité faktory určujúce kvalitu oocytu. Kvalitný oocyt je nevyhnutný pre úspešný IVF proces. Plodnosť ženy výrazným spôsobom ovplyvňuje endometrióza, je príčinou neplodnosti u 50% žien s neplodnosťou a je známe, že dochádza k zhoršovaniu kvality oocytov u týchto pacientiek (Cadenas a Bolt, 2012). Štúdie dokazujú zvýšené hladiny ER $\beta$  pri endometrióze, čo je v súlade s našimi zisteniami. Tiež sa predpokladá, že nadmerná expresia ErbB2 spôsobuje endometriálnu rezistenciu na progesterón pri neplodnosti súvisiacej s endometriózou (Yoo a kol., 2018). Štúdie uvádzajú zvýšenie priemerných hodnôt sledovaných proteínov ErbB2 amplikónu u pacientiek s negatívnym výsledkom gravidity po IVF v porovnaní s pacientkami s pozitívnym výsledkom gravidity po IVF. U pacientiek s negatívnym výsledkom IVF procesu boli detegované zvýšené expresie proteínov ErbB2 o 22%, MIEN1 o 8%, IKZF3 o 6,9%, ER $\alpha$  o 42% a ER $\beta$  o 342% v porovnaní s pacientkami s pozitívnym, úspešným výsledkom gravidity po IVF. Detegovali sme zníženie GRB7 o 6% u pacientiek u ktorých IVF bolo neúspešné (Obr. 1). Signifikantné pozorované zmeny boli analyzované na hladine významnosti  $p \leq 0,05$ .





**Obr. 1. Priemerné koncentrácie sledovaných proteínov ErbB2 amplikónu.**

Dosiahnuté výsledky ukázali významnú rozdielnú translačnú aktivitu proteínov kódovaných génmi *ErbB2* amplikónu, ato: *IKZF3*, estrogénových receptorov avšak aj *GRB7* proteínu u pacientiek s roznyim výsledkom *in vitro* fertilizačného procesu. Výsledky tejto pilotnej štúdie prispeli k prehĺbeniu poznatkov o translačnej regulácii proteínov ErbB2 amplikónu a o ich úlohe pri regulácii neplodnosti v IVF procese.

*Táto práca bola podporovaná z projektov VEGA 1/0873/18, VEGA 1/0620/19 a VEGA 1/0540/2021, ktoré sú realizované v spolupráci s Gynekologicko-pôrodnickou klinikou UPJŠ LF a UNLP v Košiciach.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Agrawal, SN. The basic molecular biology of angiogenesis and its implication in anticancer therapeutics. *Arch Int Surg*. 2015;5:121-30.
- Cadenas C, Bolt HM. Estrogen receptors in human disease. 2012.
- Rumi MAK, Singh P, Roby KF, et al. Defining the Role of Estrogen Receptor  $\beta$  in the Regulation of Female Fertility. *Endocrinology*. 2017;158(7):2330-2343.
- Salmasi S, Sharifi M, Rashidi B. Ovarian stimulation and exogenous progesterone affect the endometrial miR-16-5p, VEGF protein expression, and angiogenesis. *Microvasc Res*. 2021;133:104074.
- Varberg KM, Winfree S, Dunn KW, Haneline LS. Kinetic Analysis of Vasculogenesis Quantifies Dynamics of Vasculogenesis and Angiogenesis In Vitro. *J Vis Exp*. 2018;(131):57044.
- Yoo JY, Yang WS, Lee JH, et al. MIG-6 negatively regulates STAT3 phosphorylation in uterine epithelial cells. *Oncogene*. 2018;37(2):255-262.

## POTENCIÁL TRANSPLANTÁCIE FEKÁLNEJ MIKROBIOTY NA DSS-INDUKOVANÚ KOLITÍDU U PGF ANIMÁLNEHO MODELU

Lauko S.<sup>1</sup>, Gancarčíková S.<sup>1</sup>, Hrčková G.<sup>2</sup>, Hajdučková V.<sup>1</sup>, Kolesár Fecskeová L.<sup>3</sup>, Štrkolcová G.<sup>4</sup>, Marešová S.<sup>7</sup>, Ambro L.<sup>5</sup>, Janičko M.<sup>6</sup>, Hijová E.<sup>5</sup>, Strojný L.<sup>5</sup>, Kvaková M.<sup>5</sup>, Kamlárová A.<sup>5</sup>, Guľašová Z.<sup>5</sup>, Maďar M.<sup>1</sup>, Nemcová R.<sup>1</sup>, Bertková I.<sup>6</sup>

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

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

<sup>3</sup>Združená tkanivová banka UPJŠ LF a UNLP, Košice

<sup>4</sup>Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF, Košice

<sup>5</sup>Ústav experimentálnej medicíny, LF UPJŠ, Košice

<sup>6</sup>II. interná klinika UPJŠ LF a UNLP, Košice

<sup>7</sup>Klinika malých zvierat UVLF, Košice

### ABSTRAKT

Cieľom predloženej štúdie bolo overenie účinnosti transplantácie fekálnej mikrobioty (FMT), od zdravého humánneho darcu na animálnom pseudo germ-free (PGF) modeli s indukciou akútnej ulceróznej kolitídy (UC). Postup bol vykonaný s použitím 76 ks SPF myši samičieho pohlavia, genetickej línie BALB/c v gnotobiotických podmienkach a bol rozdelený do troch etáp. I. etapa postupu bola zameraná na selektívnu antibiotickú dekontamináciu zvierat, zatiaľ čo II. etapa zahŕňala chemickú indukciu akútnej ulceróznej kolitídy prostredníctvom *per os* aplikovaného 5% dextran sulfátu sodného (DSS). Vo finálnej III. etape sme aplikovali FMT v dávke 0,2 ml *per os* myšiam. U všetkých foriem klinickej UC bol zaznamenaný pozitívny efekt aplikácie FMT na celkový Index aktivity ochorenia (DAI), potvrdený významným poklesom strednej a ťažkej aktivity UC ( $p < 0,05$ ), ako aj významným poklesom DAI ( $p < 0,01$ ) u zvierat miernej aktivity (TZ IBD/M), oproti obdobiu po expozícii DSS. Avšak, aj napriek tomuto významnému poklesu, bolo DAI u zvierat TZ-IBD/S a TZ-IBD/T pomerne vysoké, a s hodnotou skóre (3,25) u ťažkej formy ochorenia bolo významne vyššie ( $p < 0,05$ ), oproti DAI zvierat s miernou aktivitou.

### ÚVOD

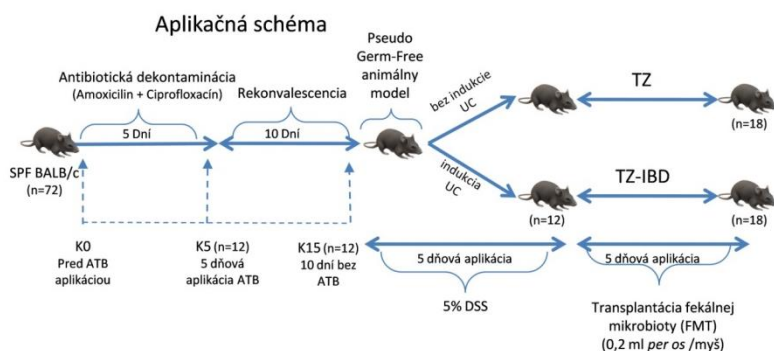
Terapeutický fenomén akým je transplantácia fekálnej mikrobioty (FMT) predstavuje terapeutický postup, ktorého podstata spočíva v transplantácii alebo prenose spoločenstiev fekálnych mikroorganizmov od zdravých osôb k pacientom, s cieľom eliminovať ich dysbiózu a znovu rekolonizovať gastrointestinálny aparát. Existuje značný počet dôkazov naznačujúcich spoločné špecifické znaky pacientov s ulceróznou kolitídou (UC). Takými je hlavne zmena črevnej mikrobioty korelujúca s dysreguláciou mnohých fyziologických funkcií, ako je napr. metabolizmus mastných kyselín s krátkym reťazcom, biosyntéza aminokyselín, regulácia oxidačného stresu a produkcie toxínov, ktoré by mohli potenciálne prispievať k rozvoju UC. Preto sa v posledných rokoch zvýšilo nadšenie z používania FMT ako alternatívnej terapeutickéj manipulácie s črevnou mikrobiotou ako potenciálnou liečbou UC. Predpoklad úspešnej transplantácie fekálnej mikrobioty spočíva v dôkladnom skríningovom vyšetrení potenciálneho donora stolice. Vykonanie dôsledného skríningového vyšetrenia zabráni prenosu choroboplodných zárodkov z donora na recipienta, čím sa zníži riziko poškodenia zdravotného stavu pacienta.

### MATERIÁL A METODIKA

Vykonaný postup prešiel schvaľovacím procesom ŠVPS SR pod protokolárnym č. 4073/18-221/3, do ktorého bolo zaradených 76 SPF myši samičieho pohlavia línie BALB/c z chovu Velaz s.r.o. (Praha), ustajnené v gnotobiotických izolátoroch akreditovaného zariadenia Laboratória gnotobiológie, Katedry mikrobiológie a imunológie, UVLF (SK U 16016). Celý postup bol rozdelený do troch samostatných etáp podľa aplikačnej schémy (Obr. 1).



Kultivačné sledovanie mikrobiologických parametrov prebiehalo na dvoch kultivačných médiách TSA agar a Schaedler Agar. Identifikácia kultivovateľných baktérií prebehla na základe PCR reakcie a ich sekvencií génu 16S rRNA, identifikácia nekultivovateľných baktérií bola realizovaná



**Obr. 1 Aplikačná schéma**

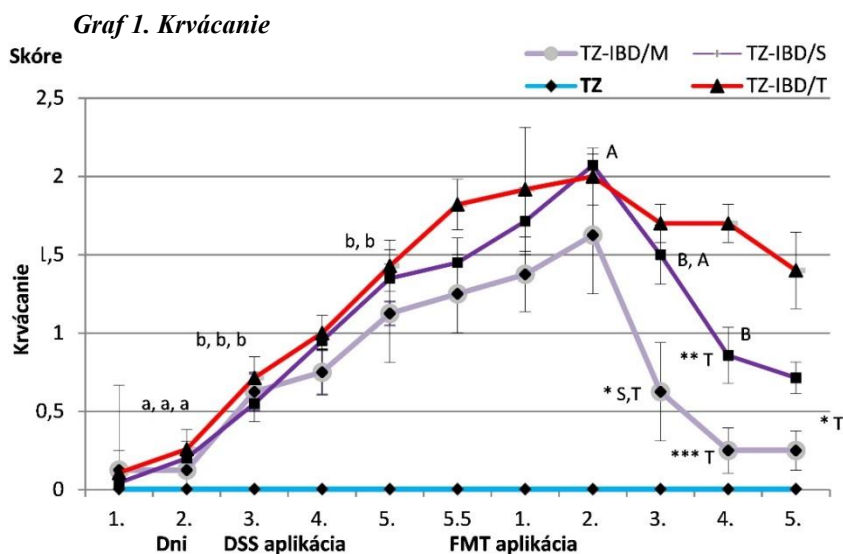
dôkladný anamnestický dotazník, na základe ktorého bol potenciálny darca podrobený hematologickým a sérologickým testom, doplneným o vyšetrenia stolice na prítomnosť alebo neprítomnosť parazitárnych, virologických a bakteriálnych patogénov.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V I. fáze postupu bol myšiam s mikrobiologickým statusom SPF za účelom získania pseudo germ-free (PGF) modelu perorálne aplikovaný amoxicillin v dávke 387,11 mg/kg /myš/ a subkutánne aplikovaný ciprofloxacín v dávke 19,60 mg/kg/myš, každých 12 hod. po dobu 5 dní. Dekontaminácia tráviaceho traktu myši selektívnymi antibiotikami mala za následok zníženie počtu kultivovateľných mikroorganizmov v obsahu céka na dva morfológicky odlišné typy kolónií. Pri analýze úseku DNA zodpovedajúcemu 16S rRNA prostredníctvom BLAST-n analýzy, sme zistili najväčšiu zhodu s druhom *Escherichia coli* RM9245 (GenBank: CP 044314.1) a s druhom *Enterococcus gallinarum* CIFRI-ONUSEG1 (GenBank: MN 481049.1), čo korešpondovalo s našimi predchádzajúcimi výsledkami v štúdií Gancarčíková a kol. (2020). Po selektívnej antibiotickej dekontaminácii bola potvrdená výrazná redukcia zloženia cekálnej mikrobioty, v prospech majoritného zastúpenia kmeňa Firmicutes, ktorý tvoril 98% z celkového počtu baktérií. Analýza údajov sekvenovania potvrdila, že Clostridiales masívne dominovala v črevnej komunite a prakticky ju úplne prerástla (98,5%), pričom jedna veľká skupina baktérií bola identifikovaná ako rod *Roseburia* (95%).

Po získaní PGF modelu s redukovanou črevnou mikrobiotou nasledovalo rozdelenie myši do 2 skupín, kontrolnej skupiny (TZ) bez indukcie UC a pokusnej skupiny zvierat (TZ-IBD) s indukciou akútnej UC expozíciou 5% DSS (dextrán sulfát sodného) po dobu 5,5 dní. Z dôvodu individuálneho príjmu DSS sme zvieratá na základe ich rozvíjajúceho sa individuálneho klinického obrazu UC, zahrňujúceho rektálne krvácanie a straty na celkovej hmotnosti, rozdelili do miernej (TZ-IBD/M), strednej (TZ-IBD/S) a ťažkej formy (aktivity) ochorenia (TZ-IBD/T). K podstatnému rozdielu medzi jednotlivými formami aktivity UC došlo po 5-ich dňoch a 12 hod. expozície DSS, s najvyšším skóre zaznamenaným u ťažkej aktivity UC, a rektálnym krvácaním na úrovni (1,82), poukazujúcim na mierne krvácanie z rekta. Do druhého dňa aplikácie FMT zaznamenávame u všetkých foriem UC postupný vzostup skóre rektálneho krvácania, s jeho najvyššou hodnotou (2,0) pozorovanou u TZ IBD/S a TZ IBD/T, v porovnaní s miernou aktivitou (TZ IBD/M) a jeho úrovňou skóre 1,6. V nasledovnom období zaznamenávame u zvierat TZ -IBD/M pozitívny efekt aplikácie FMT, so zaznamenaným významne nižším skóre rektálneho krvácania (0,6;  $p < 0,05$ ), oproti obom formám UC na 3. deň aplikácie FMT, a významne nižším skóre (0,25;  $p < 0,001$ ) oproti ťažkej aktivite UC na 4. deň jeho aplikácie (Graf 1). Aj u zvierat so strednou aktivitou je

zaznamenaný na 3. a 4. deň aplikácie FMT jeho pozitívny vplyv na postupný významný pokles rektálneho krvácania ( $p < 0,01$ ), ktorého pokles je na 4. deň štatisticky významný aj oproti zvieratám s ťažkou formou UC (0,85;  $p < 0,01$ ). Naproti tomu u zvierat TZ IBD/T je skóre rektálneho krvácania do konca aplikácie FMT pomerne vysoké, pohybujúce sa na úrovni (1,4-2). Masívne poškodenie črevnej steny je spojené s možnosťou zvýšenej permeability črevnej sliznice a rizikom bakteriálnej translokácie. U 2 myší s ťažkou aktivitou ochorenia bol zaznamenaný na 3. deň aplikácie FMT úhyn, s potvrdením translokácie *E. coli* v exsudáte ich dutiny brušnej. Na základe výsledkov PCR



testu na prítomnosť génov patogenity (K88, LT, STba) *E. coli*, tieto neboli potvrdené, a celková sepsa bola spôsobená translokáciou nepatogénnej baktérie. V predloženej štúdií vykazovali histologické rezy kolonu dvoch foriem aktivity UC po aplikácii FMT absenciu infiltrátov zápalových buniek, čo bolo potvrdené aj významne nižším skóre zápalového infiltrátu zvierat TZ IBD/S ( $p < 0,05$ ), ako aj TZ IBD/T ( $p < 0,01$ ), oproti obdobiu s expozíciou DSS. Rovnako pozitívny efekt aplikácie FMT bol v porovnaní so zvieratami po indukcii UC zaznamenaný aj v hodnotení celkového histologického skóre (HAI) u strednej ( $p < 0,001$ ), ako aj ťažkej aktivity UC ( $p < 0,001$ ). Avšak, zatiaľ čo bolo skóre zápalového markeru aplikáciou FMT priaznivo pozitívne ovplyvnené, deformačné poškodenie črevných krýpt a skóre epiteliálnych erózií bolo predovšetkým u TZ IBD/T ovplyvnené len zanedbateľne. Prítomnosť povrchových epiteliálnych erózií a deformity histologickej architektúry črevných krýpt boli stále prítomné. Tieto patologické zmeny v čreve naznačujú, že v prípade výraznejších poškodení tkaniva hrubého čreva, tie môže byť u zvierat TZ IBD/T rizikom pre translokáciu baktérií a endotoxémiu, čo následne môže prispieť k vyvolaniu systémového zápalu.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektov APVV-16-0176 a VEGA 1/0015/21.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Gancarčíková S, a kol. Innovative Animal Model of DSS-Induced Ulcerative Colitis in Pseudo Germ-Free Mice. Cells 2020; 9:2571.

# IZOLÁCIA A KVANTIFIKÁCIA EXOZÓMOV Z MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK Z PLODOVÝCH OBALOV

Morávek M., Slovinská L., Špaková T., Matejová J., Janočková J., Rosocha J.

*Združená tkanivová banka, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice*

## ABSTRAKT

V poslednej dobe sa stále častejšie uvažuje o pozitívnom prínose bezbunkovej terapie v oblasti regenerácie spojivových tkanív. Tá je založená na samotných produktoch buniek, ktoré majú schopnosť zmeniť svojim pôsobením osud poškodeného tkaniva. Prvým krokom pri bezpečnom využití extracelulárnych produktov z adultných mezenchýmových kmeňových buniek pre liečebné účely je štandardizácia postupu izolácie a charakterizácie exozómov. Preto bolo našim cieľom štandardizovať ich izoláciu a dosiahnuť jej efektívny postup z hľadiska výťažnosti a čistoty exozómov. V rámci našej práce sme izolovali a charakterizovali mezenchýmové kmeňové bunky, z ktorých boli exozómy izolované. Charakter mezenchýmových kmeňových buniek bol potvrdený aj diferenciáciou buniek do viacerých bunkovo-špecifických línií (osteocyty, adipocyty, chondrocyty). Následne sme tieto bunky použili na izoláciu exozómov precipitačnou metódou a stanovovali sme počet vyizolovaných exozómov viacerými semikvantitatívnymi metódami. Naše výsledky naznačujú, že mezenchýmové kmeňové bunky z choriónu produkujú exozómy v dostatočnom množstve na to, aby sa dali rýchlo a jednoducho izolovať, charakterizovať a následne ich použiť v kokultivačných experimentoch.

## ÚVOD

Mezenchýmové kmeňové bunky (MKB) majú vynikajúcu schopnosť diferenciacie do rôznych typov tkanivovo špecifických buniek. Preto je ich využitie v oblasti regenerácie a reparácie tkanív dlhodobou sľubným spôsobom liečby. MKB boli úspešne izolované z niekoľkých typov adultných tkanív a biologických tekutín, vrátane kostnej drene, tuku, synoviálnej membrány alebo periférnej krvi. Práve vďaka ich relatívne ľahkej dostupnosti a vysokej migračnej schopnosti *ex vivo* sú MKB často využívané pri klinickom skúšaní v regeneračnej medicíne. Viaceré experimenty potvrdili účinnosť MKB izolovaných z plodových obalov pri regenerácii postihnutého tkaniva pri léziách chrupavky a osteoartritických stavoch (Toh a kol., 2017). Exozómy sú malé transportné vezikuly produkované viacerými typmi buniek endozomálnou cestou. Nachádzajú sa v telesných tekutinách ako sérum, sliny, cerebrospinálny mok, plazma, moč či synoviálna tekutina (Hornick a kol., 2015). Sú podtypom extracelulárnych vezikul (EV), medzi ktoré patria aj mikrovezikuly a apoptotické telieska. Hlavným rozdielom medzi exozómami a mikrovezikulami je v ich veľkosti a biogenéze. Exozómy dosahujúce veľkosť 30-150 nm pochádzajú z intracelulárnych multivezikulárnych teliesok, ktoré obsahujú väčšie množstvo exozómov. Na rozdiel od nich, mikrovezikuly sú značne heterogénnejšie čo sa týka veľkosti (100-1000nm) a vznikajú vytlačením plazmatickej membrány. Spočiatku sa chybné považovalo za hlavnú úlohu exozómov zabezpečovať iba odstránenie nahromadeného odpadového materiálu z buniek (Yáñez-Mó a kol., 2015). Dnes sa vie, že ich úloha je oveľa dôležitejšia a rozsiahlejšia. Zabezpečujú medzibunkovú komunikáciu prostredníctvom transportu signálnych molekúl (mRNA, miRNA, cytokíny,...), majú dôležitú úlohu pri regenerácii a reparácii poškodeného tkaniva a podieľajú sa na zápalových procesoch v organizme (Kim a kol., 2018).

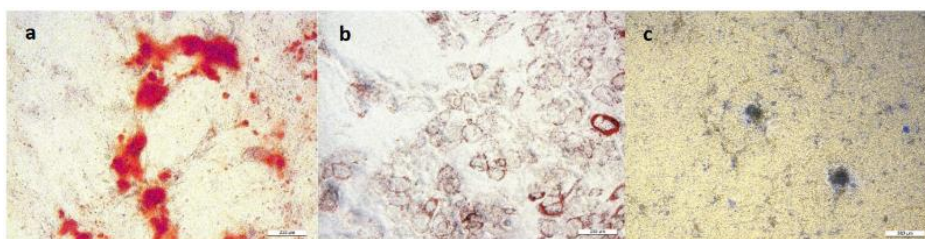
## MATERIÁL A METODIKA

Odber plodového obalu bol realizovaný pri plánovanej sekcii. Počas sterilného spracovania bol oddelený chorión (drsnejšie a hrubšie tkanivo) od amniónu (tenká priesvitná blana). Na izoláciu MKB bolo použité choriónové tkanivo, ktoré bolo v prvom kroku natrávené enzymaticky pomocou kolagenázy typu II. MKB boli stimulované do adipogénnej,

osteogénnej a chondrogénnej línie s využitím komerčných diferenciačných médií (Gibco™, USA) po dobu 14, resp. 21 dní. Na histochemické potvrdenie bunkovej diferenciácie do mezenchýmových línií boli použité metódy farbenia extracelulárneho matrix: Alizarin Red (osteoblasty), Alcian Blue (chondrocyty) a Oil Red O (adipocity). Expresia povrchových markerov typických pre MKB bola analyzovaná prietokovou cytometriou. Kondicionované médium (KM) bolo pripravené z mezenchýmových kmeňových buniek izolovaných z choriónu (CHo-MKB) po každej pasáži (do 2. pasáže). Bunky boli nasadené na kultivačné fľaše s plochou 175 cm<sup>2</sup> a kultivované v kompletnom kultivačnom médiu ( $\alpha$ -MEM, 10% fetálne bovinné sérum (FBS), 1% roztok ATB/antimykotík). Keď boli bunky porastené na 80-90%, boli premyté s fosfátovým pufrom (PBS) a bolo k nim pridané sterilné médium DMEM bez FBS. Takto pripravené KM bolo pozbierané po 24, resp. 48 hodinovej inkubácii, centrifugované pri 530  $\times$  g/7 min. a prefiltrované cez 0,22  $\mu$ m sterilný filter. KM bolo päťnásobne skoncentrované pomocou veľkokapacitnej filtračnej aparatury Amicon (EMD Millipore, USA) s využitím 3kDa a 100kDa filtračnej membrány (EMD Millipore, USA) a inertného dusíka. Alikvoty KM boli uskladnené pri -80 °C a použité pri izolácii exozómov. Na izoláciu exozómov bol použitý komerčný precipitačný kit (Total Exosome Isolation Reagent, Invitrogen), ktorého podstatou je vyzrážanie exozómov a mikrovezikúl pomocou polyméru. Do 1 ml KM bol pridaný 0,5 ml zrážacieho činidla, nasledovala centrifugácia pri 2000  $\times$  g/30 min a inkubácia cez noc pri 4°C. Ďalším krokom v procese izolácie bol zber vyzrážaných exozómov centrifugáciou pri 10 000  $\times$  g/60 min. Supernatant bol odstránený a pelet s vyzrážanými exozómami bol resuspendovaný v PBS. Vzorky izolovaných exozómov boli následne charakterizované na základe expresie tetraspanínových proteínov typických pre exozómy (CD9, CD63, CD81; MACSPlex Exosome Kit, human, Miltenyi), množstva exozómov s využitím ELISA metódy ExoTEST (HansaBioMed, Estónsko), ktorá stanovuje množstvo exozómov na základe expresie povrchového markera CD9. Prítomnosť exozómov bola potvrdená aj pomocou merania aktivity enzýmu acetylcholinesteráza prítomného v exozómoch (EXOCET Exosome Quantitation Kit, System Biosciences). Veľkosť a počet častíc vo vzorkách boli stanovené pomocou NTA (Nanoparticle Tracking Analysis). Táto metóda využíva rozptyl svetla po prechode laserového lúča časticami na výpočet veľkosti a koncentrácie častíc vo vzorke. Pri charakterizácii exozómov je pri niektorých komerčných kitoch nevyhnutné pred samotným začiatkom stanoviť množstvo celkových proteínov, aby bolo možné určiť vstupné množstvo vzorky. Množstvo proteínov bolo stanovované pomocou komerčného kitu (Pierce Rapid Gold BCA assay, Thermo Scientific™).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Diferenciačný potenciál MKB do adipogénnej, osteogénnej a chondrogénnej línie bol potvrdený histochemickým farbením *in vitro* (Obr.1).



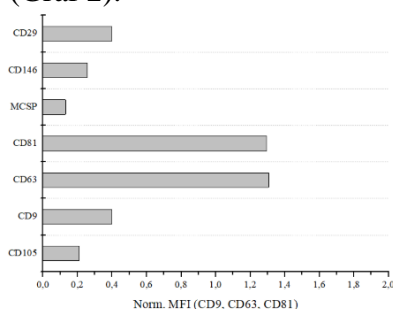
**Obr.1** Snímky diferencovaných MKB do troch bunkových línií: a. osteocyty detegované s Alizarin Red S farbiace oxalát vápenatý v bunkách, b. adipocyty detegované s Oil Red O farbiace vakuoly, c. proteoglykány chondrocytov farbené s Alcian Blue. Mierka 200  $\mu$ m.

Výsledky analýzy prietokovej cytometrie potvrdili vysokú expresiu pozitívnych povrchových markerov typických pre ľudské MKB (>99%). Zároveň výsledky potvrdili nízku expresiu negatívnych povrchových markerov (<2%) (Tab.1).

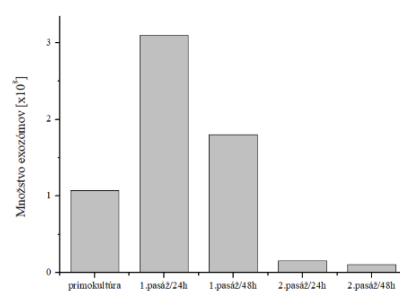
**Tab.1 Analýza exprese povrchových markerov Cho-MKB prietokovou cytometriou [%]**

Vzorka	CD90	CD105	CD73	CD29	CD44	CD54	CD45	HLA DR	CD14
primokultúra	80	81,7	98,2	95,4	84,9	40,6	2,16	2,11	1,96
1.pasáž	64,2	82,9	97,5	93,5	84,4	76,2	2,65	1,11	0,35
2.pasáž	86,7	99,6	99,9	99,9	99,9	95,6	0,85	0,81	0,47

Pri niektorých experimentoch bolo potrebné, aby vzorky exozómov obsahovali minimálnu koncentráciu celkových proteínov, ktoré boli stanovené pomocou BCA kitu. Výsledkami analýzy počtu exozómov pomocou komerčného ELISA kitu ExoTEST bola potvrdená prítomnosť exozómov vo všetkých vzorkách po izolácii na základe exprese CD9 proteínu. Najvyšší počet exozómov bol stanovený vo vzorke Cho-MKB z 1. pasáže po 24 hodinovom zbere média (Graf 1). Kvantifikáciou počtu exozómov a mikrovezikúl pomocou kolorimetrickej metódy EXOCET bola taktiež potvrdená prítomnosť týchto častíc vo všetkých vzorkách izolovaných precipitačnou metódou (priem. počet exozómov/vzorka:  $5,78 \times 10^8$ ). S využitím metódy NTA bola stanovená priemerná veľkosť a priemerný počet častíc vo vzorkách ( $D_{\text{mean}}$ : 169,8 nm; konc. exozómov:  $6,91 \times 10^8/\text{ml}$ ). Pomocou prietokovej cytometrie bol potvrdený exozomálny charakter izolovaných častíc na základe exprese povrchových markerov CD9, CD63 a CD81. Častice zároveň exprimovali integrín CD29, adhéziu molekulu CD146 a endoglin CD105, ktoré sú charakteristické povrchové markery pre MKB (Graf 2).



**Graf 1 Počet exozómov stanovený ELISA metódou ExoTEST (CD9)**



**Graf 2 Povrchové markery typické pre exozómy, resp. MKB stanovené prietokovou cytometriou. Výsledky normalizované voči CD9, CD63 a CD81**

Získané výsledky dokázali, že precipitačná metóda izolácie exozómov je efektívnou metódou na získanie dostatočného množstva exozómov z malého vstupného objemu média (1 ml). Charakterizácia a kvantifikácia vyizolovaných exozómov potvrdila expresiu povrchových markerov, ktoré sú typické pre exozómy pochádzajúce z Cho-MKB.

*Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt „Otvorená vedecká komunita pre moderný interdisciplinárny výskum v medicíne (OPENMED)“, kód ITMS2014+: 313011V455, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Experiment bol realizovaný aj s finančnou podporou projektu APVV-17-0118.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hornick NI, et al. Serum Exosome MicroRNA as a Minimally-Invasive Early Biomarker of AML, *Scientific Reports*, 2015. 5:11295.
- Kim A, Shah AS, Nakamura T. Extracellular Vesicles: A Potential Novel Regulator of Obesity and Its Associated Complications, *Children*, 2018. 5(11):152.
- Toh WS, et al. MSC exosome as a cell-free MSC therapy for cartilage regeneration: Implications for osteoarthritis treatment, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2017. 67:56-64.
- Yáñez-Mó M, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions, *Journal of Extracellular Vesicles*, 2015. 4:1.



# DIVERZITA BAKTÉRIÍ IZOLOVANÝCH Z HALDY BÝVALEJ STRIEBORNEJ BANE V TARNOWSKIE GORY (POĽSKO) A ICH REZISTENCIA VOČI ŤAŽKÝM KOVOM A ANTIBIOTIKÁM

Nosáľová L.<sup>1</sup>, Piknová M.<sup>1</sup>, Saternus M.<sup>2</sup>, Willner J.<sup>2</sup>, Pristaš P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra mikrobiológie, UPJŠ, Košice

<sup>2</sup>Silesian University of Technology, Katowice, Poland

## ABSTRAKT

Je preukázané, že kontaminácia životného prostredia ťažkými kovmi vedie k selekcii mikroorganizmov tolerantných voči ťažkým kovom, ale aj voči antibiotikám (ATB). V našej práci sme identifikovali mikroorganizmy z haldy bývalej striebornej bane s vysokým obsahom ťažkých kovov. Bakteriálna populácia bola tvorená 9 rodmi s dominantným zastúpením rodov *Arthrobacter* a *Staphylococcus*. Analýza minimálnych inhibičných koncentrácií pre vybrané ATB a kovy ukázala, že v rámci populácie sa nachádzali izoláty rezistentné voči všetkým ATB, ako aj voči všetkým kovom pri najvyšších použitých koncentráciách, aj keď sme pozorovali len slabú koreláciu medzi výskytom oboch týchto znakov.

## ÚVOD

Kontaminácia pôd je často spôsobená prítomnosťou ťažkých kovov, ktoré významne ovplyvňujú zloženie a aktivitu mikroorganizmov (Nath a kol., 2019). Väčšina ťažkých kovov je toxických pre baktérie, ale niektoré mikroorganizmy odolávajú ich toxickému účinku zmenou ich oxidačného stavu, fyziologickými adaptáciami alebo produkciou sekundárnych metabolitov (Domingues a kol., 2020). Okrem priameho negatívneho vplyvu na mikroorganizmy, kontaminácia ťažkými kovmi má aj nepriamy negatívny vplyv, akými je udržiavanie a šírenie antibiotickej rezistencie (Wales a kol., 2015). Cieľom tejto práce bola izolácia a identifikácie bakteriálnych izolátov z prostredia haldy s vysokým obsahom ťažkých kovov, ako aj analýzy ich tolerancie voči vybraným skupinám ATB a ťažkých kovov.

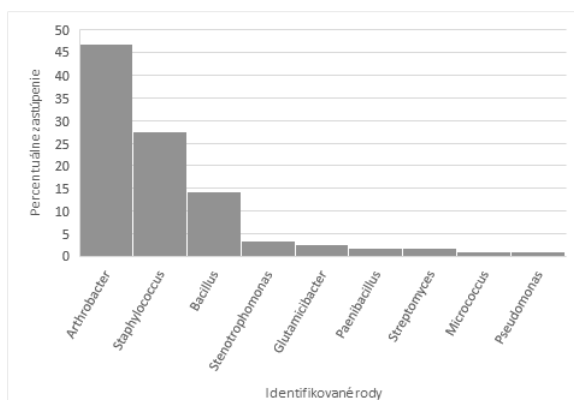
## MATERIÁL A METODIKA

Substrát zo štyroch odberných miest z haldy bývalej striebornej bane v lokalite Tarnowskie Gory (Poľsko) bol homogenizovaný a ICP-MS analýzou bolo stanovené zastúpenie kovov vo vzorke. Päť gramov materiálu bolo rozsuspendovaných v 50 ml sterilného PBS. Po 30 minútach intenzívneho trepania s nasledujúcou sedimentáciou bolo 100 µl desiatkových riedení supernatantu inokulovaných na živný agar (NA2). Kultivácia prebiehala v tme pri laboratórnej teplote. Bola stanovená početnosť kultivovateľných baktérií a 113 náhodne vybraných kolónií bolo ďalej analyzovaných. Pre dereplikáciu a primárnu identifikáciu izolátov bola použitá MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) analýza, neidentifikované izoláty boli identifikované prostredníctvom klastrovej analýzy a sekvenovania génu pre 16S rRNA. Izoláty boli podrobené stanoveniu minimálnych inhibičných koncentrácií (MIC) vybraných štyroch ATB (TET - tetracyklín, AMP - ampicilín, KAN - kanamycín, CAM - chloramfenikol) a šiestich kovov (Zn, Fe, Cu, Ni, Pb, Cd) prostredníctvom dilučnej agarovej metódy s použitím Mueller-Hinton kultivačného média. Kultivácia prebiehala po dobu 48 hodín pri laboratórnej teplote v duplikátoch. Na základe získaných výsledkov boli stanovené IC50 hodnoty pre každý kov a ATB, zo získaných výsledkov bola uskutočnená korelačná analýza s použitím nástroja ClustVis (Metsalu, 2015).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Substrát z haldy bane Fryderyk, ktorá slúžila 120 rokov na triedenie striebornej rudy, obsahoval relatívne vysoké koncentrácie viacerých ťažkých kovov (napr. Fe – 258933 mg/kg, Zn – 65658 mg/kg, Pb – 10388, Cd – 510 mg/kg), ale taktiež alkalických kovov, ktoré

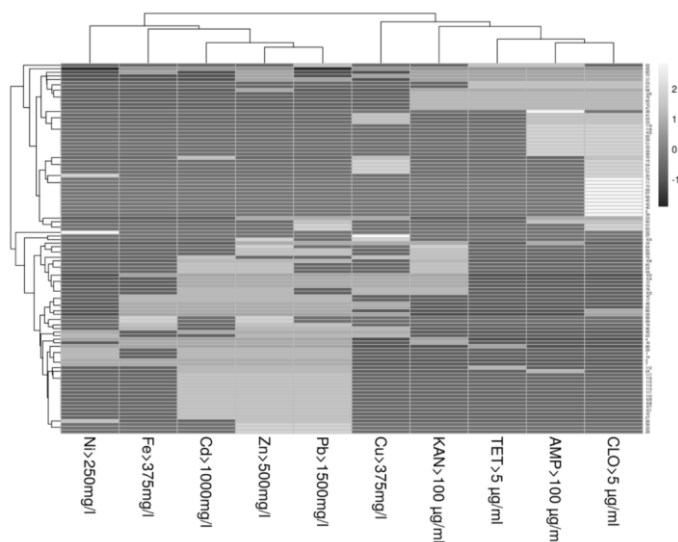
spôsobili mierne alkalické pH substrátu (7,85). Vo vzorke bola pozorovaná relatívne vysoká početnosť kultivovateľných baktérií -  $5,7 \times 10^4$  KTJ/g, čo je porovnateľná hodnota s hodnotami KTJ pozorovanými v prostrediach kontaminovaných kovmi, ako napríklad Zn, Cd, Cu, Mn, Ni (Sinegani a Younessi, 2017), ale rádovo nižšia v porovnaní s prácou Margesin a kol. (2011), v pôde kontaminovanej Cu, Zn a Pb. Prostredníctvom MALDI analýzy bolo identifikovaných 44 izolátov na úrovni rodu, ostatné izoláty boli identifikované klastrovou analýzou a sekvenovaním génu pre 16S rRNA. Izoláty boli zatriedené do 9 rodov (Obr. 1), z ktorých väčšina patrila medzi gram-pozitívne baktérie. Najpočetnejšia skupina izolátov bola tvorená zástupcami rodu *Arthrobacter* a tvorila takmer 50% populácie, dominantným bol druh *A. aurescens*. Druhá najpočetnejšia skupina (takmer 20%) patrila do rodu *Staphylococcus* s najväčším zastúpením druhu *S. xylosus*. Tieto druhy boli izolované z prostredia kontaminovaného ropou (Keskin a kol., 2015) alebo banského prostredia v Grécku (Aryal a kol., 2011).



Obr. 3 Percentuálne zastúpenie rodov izolovaných z haldy

Študované bakteriálne izoláty vykazovali pomerne vysokú mieru antibiotickej rezistencie, keď pozorované  $IC_{50}$  hodnoty boli: AMP=100  $\mu$ g/ml, CLO=10  $\mu$ g/ml, KAN=5  $\mu$ g/ml, TET=1  $\mu$ g/ml. Zvlášť prekvapivá bola vysoká miera rezistencie voči AMP, ktorú vykazovalo viac ako 40% izolátov. Najvyššia MIC – 200  $\mu$ l/ml, bola pozorovaná u viac ako 15% populácie. Medzi tieto ampicilín-rezistentné izoláty patrili aj zástupcovia koaguláza-negatívnych stafylokokov. Štyri izoláty identifikované ako *S. xylosus* vykazovali rezistenciu voči všetkým štyrom ATB pri najvyšších použitých koncentráciách (AMP > 200  $\mu$ g/ml, CLO > 50  $\mu$ g/ml, KAN > 300  $\mu$ g/ml, TET > 20  $\mu$ g/ml). Študované izoláty vykazovali aj vysokú mieru tolerancie voči použitým kovom,  $IC_{50}$  hodnoty boli Zn=125mg/l, Cu=375mg/l, Fe=250mg/l, Pb=1000mg/l, Ni=125mg/l, Cd=125mg/l. Takmer 50% študovanej populácie rástlo pri najvyššej koncentrácii Pb (1500 mg/l). Tri bakteriálne izoláty tolerovali všetky kovy pri najvyšších použitých koncentráciách (Zn > 500 mg/ml, Cu >375 mg/l, Fe > 375 mg/l, Pb > 1500 mg/l, Ni > 250 mg/l, Cd > 1000 mg/l) a boli identifikované ako zástupcovia rodu *Arthrobacter*. Tento rod je známy svojou odolnosťou voči environmentálnemu stresu (Guo a kol. 2019), vrátane ťažkých kovov (Pathak a kol., 2020).

Korelácia medzi antibiotickou rezistenciou a rezistenciou voči ťažkým kovom bola vizualizovaná ako heatmap (Obr. 2). Aj keď viaceré práce zdokumentovali vzťah medzi ATB rezistenciou a toleranciou voči kovom (Sinegani a Younessi, 2017), výsledky našej analýzy naznačujú len veľmi slabú koreláciu medzi zvýšenou rezistenciou voči kovom a ATB. Len v prípade medi je možno pozorovať slabú koreláciu.



Obr. 4 Výsledok korelačnej analýzy medzi rezistenciou voči ťažkým kovom a antibiotikám

Bakteriálna populácia haldy bývalej striebornej bane, ktorá obsahovala vysokú koncentráciu ťažkých kovov, bola tvorená zástupcami 9 rodov a prevažná väčšinu tvorili gram-pozitívne mikroorganizmy z rodov *Arthrobacter* (50%) a *Staphylococcus* (20%). Bakteriálne izoláty vykazovali vysokú mieru rezistencie voči ATB, ako aj rezistencie voči kovom, avšak pozorovali sme len slabú koreláciu medzi týmito fenotypmi, pričom medzi izolátmi rezistentnými voči kovom dominovali izoláty rodu *Arthrobacter* a naopak, medzi izolátmi rezistentnými voči ATB, dominovali druhy rodu *Staphylococcus*.

Práca vznikla za podpory grantu SK-PL-18-0012.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aryal M, et al. Comparison of Cr(VI) and As(V) removal in single and binary mixtures with Fe(III)-treated *Staphylococcus xylosus* biomass: Thermodynamic studies. *Chem. Eng. J.* 2011; 169:100-6.
- Domingues V, et al. Diversity of metal-resistant and tensoactive-producing culturable heterotrophic bacteria isolated from a copper mine in Brazilian Amazonia. *Sci Rep.* 2020. 10:6171.
- Guo X, et al. Biodegradation of persistent environmental pollutants by *Arthrobacter* sp. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2019; 26:8429–43.
- Keskin N, et al. Production and structural characterization of biosurfactant produced by newly isolated *Staphylococcus xylosus* STF1 from petroleum contaminated soil. *J. Pet. Sci. Eng.* 2015.;133:689-94.
- Margesin R, et al. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. *Chemosphere.* 2011; 82:1583-88.
- Metsalu T, et al. ClustVis : a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43:566–70.
- Nath S, et al. Isolation and identification of metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria from soil samples of Cachar district of Assam, India. *SN App Sci.* 2019; 1:7.
- Pathak A, et al. Genomic characterization of a mercury resistant *Arthrobacter* sp. H-02-3 Reveals the presence of heavy metal and antibiotic resistance determinants. *Front. Microbiol.* 2020; 10:3039.
- Sinegani A, Younessi. Antibiotic resistance of bacteria isolated from heavy metal-polluted soils with different land uses. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2017.;10:247-55.
- Wales A, Davies R. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics.* 2015; 4:567-604.



# VPLYV PELETOVANÉHO VIČENCA VIKOLISTÉHO (*ONOBRYCHIS VICIIFOLIA*) NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A HEMATOLOGICKÝ PROFIL U JAHNIAT S HAEMONCHÓZOU

Petrič D.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

## ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo zistiť účinok peliet z vičenca vikolistého (*Onobrychis viciifolia*) na bachorovú fermentáciu, mikrobiálnu populáciu a hematologický status u jahniat s haemonchózou spôsobenou experimentálnou infekciou gastrointestinálnym nematódom (GIN) *Haemonchus contortus*. V. vikolistý patrí medzi krmoviny bohaté na triesloviny a kvantitatívne analýzy rastlinných sekundárnych metabolitov odhalili hlavne flavonoidy a kondenzované taníny (CTs). Všetky jahňatá v počte 24 kusov boli infikované v 0. deň experimentu a rozdelené do dvoch experimentálnych skupín: 1. skupina - zvieratá kŕmené bazálnou diétou (Kontrola) a 2. skupina - zvieratá kŕmené od 28. dňa infekcie pelletami z v. vikolistého (Vičenec). Po 44. dni od začiatku experimentu (infekcie) bola odobratá bachorová tekutina na stanovenie fermentačných parametrov a kvantifikáciu mikrobiálnej populácie molekulárnymi a mikroskopickými metódami. Hematologická analýza krvi jahniat potvrdila klinické prejavy haemonchózy, znížením počtu erytrocytov a poklesom koncentrácie hemoglobínu a hematokritu od 22. dňa infekcie ( $P < 0,001$ ). V rámci fermentačných parametrov bachora bola zaznamenaná znížená produkcia metánu v skupine Vičenec ( $P = 0,030$ ). Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) v bachorovej tekutine ukázala pokles celkovej bakteriálnej populácie v skupine Vičenec ( $P = 0,022$ ), zníženie celkového počtu *Archaea* ( $P = 0,001$ ) a pokles počtu *Methanobacteriales* ( $P = 0,001$ ). Výsledky ukázali potenciál peletovaného vičenca vikolistého ako náhrady objemového krmiva na ovplyvnenie bachorového mikrobiómu a metanogenézy u GIN infikovaných jahniat.

## ÚVOD

Súčasný svetový trend v moderných systémoch živočíšnej výroby ekologicky čistých potravín vyžaduje zachovanie optimálneho zdravia zvierat a efektívnu výrobu vysokokvalitných živočíšnych produktov. Rastie záujem o nutraceutiká s rastlinnými sekundárnymi metabolitmi (PSM), ktoré kombinujú nutričnú hodnotu krmiva s priaznivým účinkom na zdravie zvierat a životné prostredie ako alternatívu k chemoterapeutickej terapii a prevencii GIN u prežúvavcov (Mravčáková a kol., 2019; 2020). Vičenec vikolistý (*Onobrychis viciifolia*) patriaci do čeľade bôbovité, obsahuje PSM hlavne flavonoidy a kondenzované taníny (CTs), ktoré majú schopnosť reverzibilne viazať proteíny a znižovať parazitizmus GIN u malých prežúvavcov (Desrues a kol., 2016). Je známe, že parazitárne zaťaženie GIN infekciami u prežúvavcov zvyšuje intenzitu skleníkových plynov a hlavne metánu až o 33% (Fox a kol., 2018). Navyše peletizačný proces v. vikolistého zahrňujúci vysokú teplotu a vysoký tlak neovplyvňuje jeho bioaktívne vlastnosti (Gaudin a kol., 2016). Preto našim cieľom bolo zistiť či bioaktívne látky peletovaného v. vikolistého majú vplyv na bachorovú fermentáciu a mikrobióm a či dokážu ovplyvniť hematologické parametre jahniat s haemonchózou.

## MATERIÁL A METODIKA

Jahňatá experimentálne infikované gastrointestinálnym nematódom (GIN) *Haemonchus contortus* (Váradyová a kol., 2017) v počte 24 kusov (vek 3-4 mesiace, hmotnosť  $15,01 \pm 2,07$  kg) boli rozdelené do dvoch experimentálnych skupín: 1. skupina - zvieratá kŕmené bazálnou diétou (Kontrola) a 2. zvieratá kŕmené pelletami vičenca vikolistého (Vičenec) ako náhradou objemového krmiva. Bazálna kŕmna dávka pozostávala z lúčneho sena (600 g sušiny/deň/zviera) a kompletnej kŕmnej zmesi ČOJ (MIKROP ČEBÍN, a.s. Čebín, Česká republika) (300 g sušiny/deň/zviera). Po 28 dňoch od začiatku experimentu a infekcie došlo v

skupine Vičenec k náhrade objemového krmiva peletami (NATURE'S BEST Equovis GmbH, Münster, Nemecko) (600 g sušiny/deň/zviera). Po 44. dňoch od začiatku experimentu bola odobratá bachorová tekutina na stanovenie pH, unikavých mastných kyselín, metánu a amoniaku a bola kvantifikovaná mikrobiálna bachorová populácia molekulárnymi (FISH) a mikroskopickými metódami (Petrič a kol., 2021). V priebehu experimentu bola na 0., 22., 29., 36. a 43. deň uskutočnená hematologická analýza krvi zvierat (Váradyová a kol., 2017). Štatistická analýza údajov bola realizovaná pomocou Studentovho *t*-testu v programe GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tabuľke č. 1 vidíme, že v experimentálnej skupine jahniat Vičenec bol zaznamenaný významný vplyv diéty na množstvo vyprodukovaného metánu v porovnaní s kontrolnou skupinou ( $P=0,030$ ). Potvrdili to aj výsledky fluorescenčnej *in situ* hybridizácie bachorovej tekutiny (Tab. 2), kde sme zaznamenali významný pokles celkovej bakteriálnej populácie v skupine Vičenec ( $P=0,022$ ), zníženie celkového počtu *Archaea* ( $P=0,001$ ) a zníženie rodu metanogénnych baktérií *Methanobacteriales* ( $P=0,001$ ). Pripisujeme to prítomnosti hlavne CTs vo vičenci a ich priamemu účinku na metanogénne *Archaea*. Je zrejmé, že antimetanogénny účinok bioaktívnych látok v peletách v. vikolistého pravdepodobne ovplyvňuje štiepenie bielkovín v bachore na amoniak, metán, plyny a celkové unikavé mastné kyseliny (Hatew a kol., 2014). Hematologická analýza krvi jahniat (Tab. 3) potvrdila klinické prejavy haemonchózy, medzi ktoré patrí pokles počtu erytrocytov a zníženie koncentrácie hemoglobínu a hematokritu. Štatisticky významný vplyv peliet v. vikolistého na červené krvné parametre nebol zaznamenaný, čo bolo v súlade s našimi predchádzajúcimi výsledkami s použitím rastlinných nutraceutík u GIN infikovaných jahniat (Váradyová a kol., 2017; 2018). Dospeli sme k záveru, že nahradenie peliet vičenca vikolistého ako objemového krmiva u GIN nakazených jahniat predstavuje nie len vhodnú alternatívu k chemoterapeutikám, ale zároveň môže znižovať produkciu metánu u prežúvavcov a tak prispievať k zníženiu emisií skleníkových plynov.

**Tab. 1. Vplyv peletovaného vičenca vikolistého na bachorovú fermentáciu jahniat ( $n=12$ )**

Parameter	Kontrola	Vičenec	SD	<i>P</i> -value
pH	6,36	6,37	0,575	0,974
Amoniak (mg/l)	205	199	79,0	0,849
Metán (mM)	3,17	2,30	0,903	0,030
Celk. UMK (mM)	68,2	70,2	27,7	0,847
K. octová (mol%)	74,6	73,3	4,33	0,462
K. propiónová (mol%)	11,9	10,45	4,40	0,425
K. <i>n</i> -maslová (mol%)	11,1	13,48	3,96	0,123

**Tab. 2. Vplyv peletovaného vičenca vikolistého na bachorové mikrobiálne populácie jahniat ( $n=12$ )**

Parameter	Kontrola	Vičenec	SD	<i>P</i> -value
Celkové baktérie ( $10^9$ /ml)	3,60	3,16	0,499	0,022
Celkové <i>Archaea</i> ( $10^7$ /ml)	7,71	4,79	1,84	0,001
<i>Methanobacteriales</i> ( $10^7$ /ml)	3,74	2,9	0,672	0,001
<i>Methanomicrobiales</i> ( $10^7$ /ml)	2,92	2,88	0,218	0,849
Celkové protozoa ( $10^3$ /g DM)	6,65	8,70	6,60	0,438

**Tab. 3. Vplyv peletovaného v. vikolistého na hematologické parametre jahniat (n=12)**

Parameter	Deň	Kontrola	Vičeneč	SD	Liečba	Čas	Liečba × čas
Erytrocyty (T/l)	0	11,37	11,63	1,176	NS	***	NS
	22	7,68	7,10	1,289			
	29	7,22	6,56	1,382			
	36	7,15	6,55	1,373			
	43	7,00	6,83	1,276			
Hemoglobín (g/l)	0	111,7	115,5	11,62	NS	***	NS
	22	74,6	68,9	11,30			
	29	71,5	64,8	12,89			
	36	72,0	67,1	14,28			
	43	69,5	71,7	14,29			
Hematokrit (l/l)	0	0,263	0,265	0,0251	NS	***	NS
	22	0,187	0,171	0,0261			
	29	0,182	0,165	0,0313			
	36	0,185	0,174	0,0339			
	43	0,178	0,187	0,0336			

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 18-0131) a programom grantov pre doktorandov SAV (DoktoGrant APP0162).

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Desrués O, et al. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit Vectors* 2016; 9:329.
- Fox NJ, et al. Ubiquitous parasites drive a 33% increase in methane yield from livestock. *Int J Parasitol* 2018; 48:1017-1021.
- Gaudin E, et al. Efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) pellets against multi resistant *Haemonchus contortus* and interaction with oral ivermectin: Implications for on-farm control. *Vet Parasitol* 2016; 227:122-129.
- Hatew B, et al. Diversity of condensed tannin structures affects rumen *in vitro* methane production in sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) accessions. *Grass Forage Sci* 2014; 70:474-490.
- Mravčáková D, et al. Natural chemotherapeutic alternatives for controlling of haemonchosis in sheep. *BMC Vet Res* 2019;15:1–13.
- Mravčáková D, et al. Anthelmintic activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L.) and mallow (*Malva sylvestris* L.) against *Haemonchus contortus* in sheep. *Animals* (Basel). 2020; 10:219.
- Petrič D, et al. Impact of zinc and/or herbal mixture on ruminal fermentation, microbiota, and histopathology in lambs. *Front Vet Sci* 2021; 8:630971.
- Váradýová Z, et al. The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and haematological parameters of the lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Rum Res* 2017; 151:124-132.
- Váradýová Z, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res* 2018; 14:78.

# MORFOLOGICKÝ DŮKAZ NEURONÁLNEJ REGULÁCIE POSTNATÁLNEJ NEUROGENÉZY V ČUCHOVOM SYSTÉME POTKANA

Popovičová, A., Fabianová, K., Martončíková, M., Raček, A., Račeková, E.

*Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice, Slovenská republika*

## ABSTRAKT

Regulačné mechanizmy postnatálnej neurogenézy v hlavnej neurogénnej oblasti čuchového systému, v subventrikulárnej zóne (SVZ) a rostrálnej migračnej dráhe (RMS) zostávajú aj napriek množstvu nových poznatkov nedostatočne vysvetlené. Pre možné využitie novovzniknutých buniek pri reparácii mozgu je nevyhnutné úplné pochopenie týchto mechanizmov. Najnovšie poznatky poukazujú na to, že neurogenéza v SVZ/RMS by mohla byť regulovaná neurónmi nachádzajúcimi sa priamo v týchto oblastiach. V RMS dospelého potkana boli doteraz potvrdené dva typy buniek, ktoré vykazujú typické morfológické charakteristiky zrelých neurónov: neuróny produkujúce oxid dusnatý (NO) a neuróny, ktoré exprimujú sekretagogín (SCGN). Cieľom našej práce bolo získanie nových morfológických poznatkov o týchto dvoch populáciách neurónov v neurogénnej oblasti čuchového systému. Aby sme rozšírili naše vedomosti o prítomnosti neurónov v neurogénnej oblasti, zamerali sme sa na identifikáciu NO a SCGN produkujúcich neurónov v SVZ. Ďalej sme sa venovali zmapovaniu distribúcie a počtu týchto dvoch typov neurónov v jednotlivých častiach RMS a na základe dvojitého imunofluorescenčného značenia pomocou syntázy oxidu dusnatého (nNOS) a SCGN sme zisťovali ich vzájomný vzťah v migračnej dráhe. Pomocou mikroskopicej analýzy sme potvrdili prítomnosť NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> neurónov v SVZ. Prítomnosť NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> neurónov sme pozorovali aj pozdĺž celej RMS, avšak ich distribúcia bola nerovnomerná. Kvantitatívna analýza ukázala štatisticky významný vyšší priemerný počet SCGN<sup>+</sup> buniek v SVZ ale aj vo všetkých troch anatomických častiach RMS, v porovnaní s počtom NO<sup>+</sup> neurónov v týchto oblastiach. Naše výsledky o rozdieloch v počte a distribúcii SCGN<sup>+</sup> a NO<sup>+</sup> buniek naznačujú odlišný funkčný význam týchto neurónov v SVZ/RMS.

## ÚVOD

Najväčší zdroj kmeňových buniek v mozgu dospelých cicavcov sa nachádza v čuchovom systéme, a to konkrétne v subventrikulárnej zóne (SVZ) bočných mozgových komôr (Altman, 1969). Nové neuróny, ktoré vznikajú z kmeňových buniek SVZ sú určené pre bulbus olfactorius (BO), ktorého úlohou je prijímať a spracovávať čuchové signály a postúpiť ich do vyšších čuchových centier (Ruberte a kol., 2017). Neuronálne progenitory zo SVZ migrujú pozdĺž zreteľne vymedzenej dráhy – tzv. rostrálnej migračnej dráhy (RMS) do BO, kde sa diferencujú na inhibičné interneuróny (Ruberte a kol., 2017). Postnatálna neurogenéza v systéme SVZ-RMS-BO predstavuje komplexný proces, ktorý zahŕňa proliferáciu, migráciu, diferenciáciu progenitorových buniek a integráciu nových neurónov do existujúcich neurónových okruhov. Mechanizmy regulácie týchto procesov sú nesmierne zložité a v súčasnosti sú predmetom intenzívneho bádania. Bolo zistené, že do regulácie neurogenézy sú zapojené jednak vnútrobunkové regulačné mechanizmy a jednak molekuly z mikroprostredia. Ako zdroj týchto faktorov boli popísané bunky v blízkosti progenitorových buniek, ako sú napr.ependymové bunky, astrocyty, neuroblasty, endotelové bunky, alebo mikroglia (Bovetti a kol., 2011). O neuronálnej regulácii postnatálnej neurogenézy sa dlho neuvažovalo, keďže až donedávna sa považovalo za fakt, že oblasti SVZ/RMS neobsahujú žiadne zrelé neuróny. V štúdií (Račeková a kol. 2003 a 2005) však bolo zistené, že RMS dospelého potkana obsahuje bunky produkujúce oxid dusnatý (NO), ktoré vykazujú typické morfológické charakteristiky zrelých neurónov. V RMS dospelých potkanov bola nedávno pozorovaná aj ďalšia populácia neurónov, ktoré exprimujú sekretagogín (SCGN). Tieto neuróny sú

spôsobilé externalizovať enzým matrix metalloprotease-2 (MMP-2), ktorý štiepi extracelulárnu matrix, a tým vytvára „koridory“, ktoré uľahčujú migráciu neuroblastov (Hanics a kol., 2017). Prítomnosť nitrergických a SCGN produkujúcich neurónov v RMS naznačuje, že neurogenéza v čuchovom systéme by mohla byť regulovaná neurónmi nachádzajúcimi sa priamo v migračnej dráhe.

Cieľom našej práce bolo získanie nových morfológických poznatkov o týchto dvoch populáciách neurónov v neurogénnej oblasti čuchového systému. Aby sme rozšírili naše vedomosti o prítomnosti neurónov v neurogénnej oblasti zamerali sme sa na identifikáciu NO a SCGN produkujúcich neurónov v SVZ. Ďalej sme sa venovali zmapovaniu distribúcie a počtu týchto dvoch typov neurónov v jednotlivých častiach RMS a na základe dvojitého imunofluorescenčného značenie pomocou syntázy oxidu dusnatého (nNOS) a SCGN sme zisťovali ich vzájomný vzťah v migračnej dráhe.

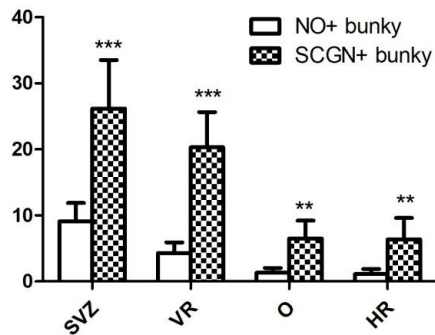
## MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili potkany kmeňa Wistar albino. Ich chov prebiehal za štandardných podmienok zvieratníka NbÚ BMC SAV v Košiciach. Pred odberom tkaniva sme potkany uspali izofluránovou narkózou a podali sme im 10% roztok chloralhydrátu. Následne sme ich transkardiálne prepláchli cez ľavú srdcovú komoru fyziologickým roztokom po ktorom nasledoval 4% paraformaldehyd v 0,1 M PBS. Potkany sme dekapitovali, mozgy sme vybrali z lebiek a následne ich postfixovali. Pomocou kryomikrotómu sme mozgy potkanov nakrájali na 30 µm hrubé rezy v sagitálnej rovine a uložili sme ich do 0,1 M PBS.

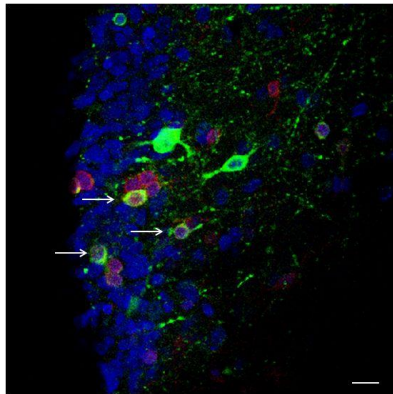
Na zistenie potenciálneho vzťahu medzi NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> neurónmi sme použili dvojité imunofluorescenčné značenie proti nNOS a sekretagogínu. Rezy mozgov sme analyzovali pomocou mikroskopu Olympus BX51. Za pomoci fluorescenčného mikroskopu sme vizuálne počítali NO a SCGN pozitívne bunky v SVZ a v troch častiach RMS (horizontálne rameno, ohyb, vertikálne rameno).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou mikroskopickéj analýzy sme potvrdili prítomnosť NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> neurónov v SVZ. V SVZ je zvyčajne popisovaných päť hlavných typov buniek - endymové bunky, dva rôzne typy gliových buniek, prekursorové bunky a neuroblasty (Wang a Bordey, 2008), ale nie bunky s neurónovým fenotypom. Naše zistenie o lokalizácii zrelých neurónov v SVZ naznačuje možnosť neuronálnej regulácie neurogenézy už priamo v rezervoári kmeňových buniek. Podrobná morfológická analýza ukázala prítomnosť NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> neurónov aj pozdĺž celej RMS avšak ich distribúcia bola nerovnomerná. Vysokú koncentráciu sledovaných typov buniek sme pozorovali vo vertikálnom ramene migračnej dráhy a najvyššiu koncentráciu v SVZ. Koncentrácia NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> buniek bola nižšia v horizontálnom ramene a ohybe RMS. Z čoho vyplýva, že v kaudálnych častiach migračnej dráhy sa nachádzalo viac nami sledovaných typov neurónov ako v rostrálnych častiach RMS. Kvantitatívna analýza potvrdila naše morfológické pozorovania a ukázala štatistický významný vyšší priemerný počet SCGN<sup>+</sup> buniek v SVZ ale aj vo všetkých troch častiach (vertikálnom ramene, ohybe, horizontálnom ramene) RMS, v porovnaní s počtom NO<sup>+</sup> neurónov v týchto oblastiach mozgu (Obr. 1). Pozorovali sme aj veľmi nízku kolokalizáciu NO<sup>+</sup> a SCGN<sup>+</sup> buniek (Obr. 2), na základe nášho pozorovania sa však nazdávame, že sa jedná o dve odlišné populácie neurónov.



**Obr. 1. Kvantitatívna analýza počtu NO+ a SCGN+ buniek v SVZ a RMS (VR-vertikálne rameno, O-ohyb, HR-horizontálne rameno). Aritmetický priemer ± SEM. Štatistická významnosť: \*\*\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$**



**Obr. 2. Distribúcia SCGN+ (červené) a NO+ buniek (zelené) v SVZ potkana. DAPI (modré) znázorňuje bunkové jadrá v SVZ. Šípky ukazujú kolokalizáciu SCGN a NO v bunkách SVZ potkana. Mierka=200μm**

Naše výsledky o rozdieloch v počte a distribúcii SCGN+ a NO+ buniek svedčia o rôznom funkčnom význame týchto neurónov v SVZ/RMS. Ďalšie štúdie by mali byť zamerané na odhalenie neurónových obvodov do ktorých sú nitreggické a SCGN produkujúce neuróny zapojené.

Protokol postupov a práca so zvieratami boli schválené Etickou komisiou pri Neurobiologickom ústave Biomedicínskeho centra SAV a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou SR (Č.k. Ro. 3515/19-221/3).

Podporené grantmi: APVV-19-0279, VEGA 2/0005/2019

## POUŽITÁ LITERATÚRA:

- Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *The Journal of Comparative Neurology*. 1969; 137:433-457.
- Bovetti S, et al. From progenitors to integrated neurons: Role of neurotransmitters in adult olfactory neurogenesis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2011; 42:304–316.
- Hanics J, et al. Secretagogin-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114:E2006-E2015.
- Račeková E, et al. NADPH-diaphorase positivity in the rostral migratory stream of the developing rat. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 2003; 146:131-134.
- Račeková E, et al. Age-related changes of NADPH-diaphorase positivity in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol*. 2005; 25:1093-105.
- Ruberte J, et al. Nervous system. *Morphological Mouse Phenotyping*. 2017; 377-474.
- Wang D, Bordey A. The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*. 2008; 86:342-367.

# MECHANIZMY REGULÁCIE TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP V NÁDOROVÝCH BUNKÁCH OVPLYVNENÝCH HYPERICÍNOM

Romanovová M., Jendželovská Z., Jendželovský R., Majerník M., Fedoročko P.

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

## ABSTRAKT

Rastlinný metabolit hypericín predstavuje perspektívny fotosenzibilizátor vo fotodynamickej diagnostike (PDD) a terapii (PDT). V dôsledku nadmernej expresie transportného proteínu BCRP v nádorových bunkách dochádza k poklesu jeho intracelulárnej koncentrácie a teda aj účinnosti PDT. Jedným z cieľov našej práce bolo objasniť mechanizmus regulácie proteínu BCRP s využitím modulátorov vybraných cieľových signálnych molekúl JNK1, EGFR a PKC $\delta$ . Na štyroch ľudských nádorových bunkových líniiach (A549, HT-29, RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20) sme stanovili netoxické koncentrácie modulátorov a následne sme sledovali ich účinok na hladinu proteínov BCRP, JNK1, EGFR a PKC $\delta$ . Použitím induktora PKC $\delta$  (TPA) sme zaznamenali v bunkových líniiach HT-29 a A549 výrazne zvýšené hladiny p-PKC $\delta$ , ale aj p-JNK1. Okrem toho, pôsobenie TPA vyvolalo vo väčšine nádorových bunkových líniiach nárast hladiny proteínu BCRP. Inhibícia kinázy JNK1 (SP600125; likochalkón A) viedla k poklesu hladiny proteínu BCRP v bunkových líniiach s vysokou expresiou tohto proteínu, HT-29 a RPMI-8226/MR20. Pôsobenie TPA, SP600125 a likochalkónu A navyše poukázalo na prepojenie medzi signálnymi proteínmi PKC $\delta$  a JNK1 v použitých bunkových líniiach. Menej jednoznačné výsledky sme zistili v prípade pôsobenia inhibítora EGFR (tyrfoštín), ktoré vyvolalo nárast, ale aj pokles proteínu BCRP v závislosti na type bunkovej línie. Inhibitor PKC $\delta$  (rottlerin) sa javil ako najmenej efektívny modulátor. Z našich výsledkov vyplýva, že do regulácie transportného proteínu BCRP by mohli byť zapojené najmä signálne molekuly PKC $\delta$  a JNK1, stále však nie je vylúčená ani účasť receptora EGFR. Tieto zistenia bude potrebné overiť v ďalších experimentoch, v ktorých budú vybrané nádorové bunky ovplyvnené hypericínom.

## ÚVOD

Transportný proteín BCRP predstavuje jeden z dôležitých mechanizmov rezistencie nádorových buniek voči aplikovanej liečbe. Je zodpovedný za eflux širokého spektra rôznych látok a liečiv z buniek, pričom medzi jeho substráty patrí množstvo protinádorových liečiv a fotosenzibilizátorov (Mao a Unadkat 2014). Nadmerná expresia proteínu BCRP spôsobuje aj zníženú intracelulárnu akumuláciu biologicky aktívnej prírodnej zlúčeniny, hypericínu (Vargová a kol. 2018; Jendželovský a kol. 2019), ktorý predstavuje perspektívny fotosenzibilizátor vo fotodynamickej diagnostike (PDD) a terapii (PDT) niektorých nádorových ochorení (Jendželovská a kol. 2016). Úspešnosť diagnostiky a liečby nádoru závisí od jeho dostatočnej intracelulárnej akumulácie, preto objasnenie regulácie proteínu BCRP v prítomnosti hypericínu v bunke by mohlo zlepšiť stratégie aplikované v PDD či PDT a zamedziť tak vzniku rezistencie nádorových buniek voči týmto diagnostickým, resp. liečebným postupom.

## MATERIÁL A METÓDY

*Bunkové línie.* Ako experimentálny model boli použité ľudské nádorové bunkové línie pľúcneho adenokarcinómu (A549), kolorektálneho adenokarcinómu (HT-29) a myelómu (senzitívna bunková línia RPMI-8226; odvodená bunková línia rezistentná na mitoxantrón RPMI-8226/MR20). Bunkové línie boli kultivované v médiu RPMI 1640 obohatenom o 10% FBS, antibiotiká, antimykotiká a gentamycín v inkubátore za štandardných podmienok (teplota 37°C, 95% vlhkosť, 5% CO<sub>2</sub>).

*Test metabolickej aktivity buniek (MTT test).* S ohľadom na možný vplyv vybraných modulátorov (induktor PKC $\delta$  – TPA; inhibítor PKC $\delta$  – rottlerin; inhibítor EGFR – tyrfostín AG1478, inhibítory JNK1 – SP600125 a likochalkón A) na proliferáciu a prežívanie buniek bolo potrebné stanoviť ich netoxické koncentrácie. Bunky boli nasadené do 96-jamkových platní a po 24 hod boli k bunkám pridané modulátory v rôznych koncentráciách. V dvoch časových intervaloch ich pôsobenia (24, 48 hod) bola k bunkám pridaná žltá tetrazoliová soľ MTT (3-(4,5-dimetyltiazozyl)-2,5-difenylnitrazolium bromid; 0,5 mg/ml), ktorá je živými bunkami metabolizovaná na nerozpustný fialový formazán. Po 4 hod bola zastavená metabolizácia MTT pridaním 10% SDS (dodecylsulfát sodný) a nasledujúci deň odmeraná absorbancia ( $\lambda = 584$  nm) s využitím spektrofluoroluminometra FluorStar Optima.

*Western blot.* Indukčný, resp. inhibičný účinok modulátorov na cieľové signálne molekuly a transportný proteín BCRP bol analyzovaný po 30 min a 16,5 hod ich pôsobenia. Bunkové lyzáty boli pripravené s využitím komerčnej zmesi inhibítorov proteáz a fosfatáz. Následne boli vzorky kvantifikované s využitím komerčnej sady (BioRad Laboratories), nariadené na rovnakú koncentráciu (4  $\mu$ g/ $\mu$ l), separované pomocou polyakrylamidovej elektroforézy (10% SDS-PAGE gél) a prenesené na PVDF membránu. Po 1 hod inkubácii v tlmivom roztoku obsahujúcom 5% sušené mlieko alebo 2,5% BSA boli membrány inkubované s príslušnou primárnou protilátkou cez noc pri teplote 4°C. Po premytí v preplachovacom roztoku boli membrány 1 hod inkubované s príslušnou sekundárnou protilátkou konjugovanou s chrenovou peroxidázou (1 hod, laboratórna teplota). Imunodetekcia hladiny analyzovaných proteínov bola stanovená pomocou chemiluminiscenčného kitu na RTG film.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky viacerých prác poukázali na hypericín ako na potenciálny substrát transportného proteínu BCRP (Jendželovský a kol. 2009, Jendželovská a kol. 2014, Vargová a kol. 2018). V nedávnej štúdií sa potvrdilo, že s nadmernou expresiou proteínu BCRP rapídne klesala intracelulárna akumulácia hypericínu, v dôsledku čoho bola PDT s hypericínom (HY-PDT) neúčinná (Jendželovský a kol. 2019). Naším najnovším komplexným cieľom je teda overenie potenciálnych priamych a nepriamych interakcií medzi hypericínom a proteínom BCRP a objasnenie mechanizmu regulácie v nádorových bunkách ovplyvnených hypericínom. Nové poznatky by tak mohli prispieť k zamedzeniu vzniku rezistencie buniek voči HY-PDT. V prípade zistenia účasti konkrétnych signálnych molekúl na nepriamych interakciách medzi hypericínom a BCRP je možné špecificky modulovať signálne dráhy a tým zvýšiť efektívnosť protinádorovej liečby. Naše prvotné výsledky sú zamerané na nepriame interakcie a sledovanie efektu modulátorov vybraných signálnych molekúl na proteín BCRP, ktoré by sa pravdepodobne mohli zúčastňovať aj na interakciách „hypericín – BCRP“.

Pre overenie možnej účasti kináz PKC $\delta$ , JNK1 a receptora EGFR v regulácii expzie proteínu BCRP sme použili modulátory daných signálnych molekúl. Keďže prostredníctvom indukcie, resp. inhibície signálnych dráh by mohli ovplyvniť viabilitu a proliferáciu nádorových buniek, pre ďalšie experimenty bolo potrebné vybrať koncentrácie bez cytotoxického efektu, avšak s modulačným účinkom voči cieľovým molekulám. Efekt modulátorov na bunkové línie sme stanovili pomocou MTT testu a v prípade každého modulátora sme zvolili dve nižšie koncentrácie s minimálnym dosahom na vyššie uvedené cytokinetické parametre (TPA – 0,01 a 0,03  $\mu$ M; rottlerin – 0,1 a 0,5  $\mu$ M; tyrfostín – 2,5 a 5  $\mu$ M; SP600125 – 10 a 20  $\mu$ M; likochalkón A – 5 a 10  $\mu$ M). Následne sme pomocou metódy Western blot overovali efekt vybraných koncentrácií modulátorov na cieľové signálne proteíny, ako aj na expresiu proteínu BCRP.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme potvrdiť, že všetky modulátory v netoxických koncentráciách mali požadovaný efekt na svoje cieľové proteíny, avšak závisel od použitej bunkovej línie, koncentrácie modulátora a časového intervalu. Okrem cieľového proteínu



modulátory ovplyvnili v niektorých prípadoch aj aktivitu ďalších proteínov, pričom výsledky naznačujú najmä prepojenie medzi kinázami PKC $\delta$  a JNK1. Pôsobením TPA sme detegovali v bunkových líniiach A549 a HT-29 výrazne zvýšenú hladinu fosforylovanej formy kináz PKC $\delta$  (p-PKC $\delta$ ) a JNK1 (p-JNK1) a zároveň mierne zvýšenú hladinu proteínu BCRP vo všetkých bunkových líniiach okrem RPMI-8226. Naopak, vybrané koncentrácie rottlerinu sa nevyznačovali dostatočným inhibičným efektom voči PKC $\delta$ . V prípade kinázy JNK1, významného regulátora proteínu BCRP (Zhu a kol. 2012), sa preukázal inhibitor SP600125 v porovnaní s likochalkónom A ako účinnejší, avšak účinkom oboch modulátorov sa znížila hladina proteínu BCRP v bunkách s vysokou expresiou tohto proteínu (HT-29 a RPMI-8226/MR20). Pôsobením SP600125 zároveň poklesli hladiny p-PKC $\delta$  a p-EGFR v bunkových líniiach A549 a RPMI-8226. Tieto zmeny opätovne potvrdzujú nielen prepojenie signálnych molekúl JNK s PKC (Chen a kol. 2002), ale aj s tyrozín kinázovým receptorom EGFR (Wee a Wang 2017). Navyše po modulácii EGFR inhibítorom tyrfostín sme sledovali pokles hladiny p-PKC $\delta$  a p-JNK1 v bunkách A549. Regulácia proteínu BCRP cez tento receptor je však podľa výsledkov nejednoznačná a závislá na experimentálnom modeli. Naše výsledky teda naznačujú, že do regulácie BCRP môžu byť zapojené všetky signálne proteíny JNK1, PKC $\delta$  a EGFR. V ďalších experimentoch bude naším cieľom overiť tieto predpoklady a sledovať zmeny hladiny BCRP po modulácii týchto proteínov v prítomnosti hypericínu.

*Táto práca bola podporovaná Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0022/19.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Chen Y, et al. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol.* 2002; 8:1014-8.
- Jendželovská Z, et al. Single pre-treatment with hypericin, a St. John's wort secondary metabolite, attenuates cisplatin- and mitoxantrone-induced cell death in A2780, A2780cis and HI-60 cells. *Toxicol. In Vitro.* 2014; 28:1259-1273.
- Jendželovská Z, et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. *Front. Plant Sci.* 2016; 7:560.
- Jendželovský R, et al. Drug efflux transporters, MRP1 and BCRP, affect the outcome of hypericin-mediated photodynamic therapy in HT-29 adenocarcinoma cells. *Photochem. Photobiol.* 2009; 8:1716-1723.
- Jendželovský R, et al. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation a toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 109:2173-2181.
- Mao Q, Unadkat J. D. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport – an update. *AAPS J.* 2014; 17:65-82.
- Vargová J, et al. Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP. *Biomed. Pharmacother.* 2018; 99:511-522.
- Wee P, Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers (Basel).* 2017; 9:52.
- Zhu MM, et al. Increased JNK1 signaling pathway is responsible for ABCG2-mediated multidrug resistance in human colon cancer. *PLoS One.* 2012; 7:e41763.

# DISTRIBÚCIA A CHARAKTERIZÁCIA STAFYLOKOKOV KOLONIZUJÚCICH KOŽU KLINICKY ZDRAVÝCH PSOV

Štempelová L.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, Košice

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

## ABSTRAKT

Koža je kolonizovaná rozmanitými mikroorganizmami, ktoré zohrávajú významnú úlohu v prevencii, ale aj vzniku kožných ochorení. Cieľom našej štúdie bola izolácia stafylokokov z kože psov a charakterizácia ich vlastností, ako je tvorba biofilmu, rezistencia na antibiotiká a produkcia enzýmov. Kožné stery boli odobraté od 30 klinicky zdravých psov z 8 rozličných oblastí tela. Odlišné fyziologické podmienky na koži sú určené hrúbkou kože, jej záhybmi, prítomnosťou chlповých folikulov, či rozmiestnením mazových a potných žliaz. Najčastejšie izolovaným bakteriálnym druhom bol *Staphylococcus pseudintermedius*. V rámci sledovania vlastností kmeňov *S. pseudintermedius* sme pozorovali rezistenciu na chloramfenikol (80%), penicilín (73%), tetracyklín (33%), erytromycín (30%) a vankomycín (27%). Rezistencia na oxacilín bola zistená u jedného kmeňa. Multirezistencia bola pozorovaná u 53% izolátov. Všetky testované kmene *S. pseudintermedius* boli silnými alebo stredne silnými producentmi biofilmu s vysokou aktivitou kyslej a alkalickéj fosfatázy. Všetky testované kmene boli DNáza pozitívne, zároveň bola produkcia želatinázy pozorovaná u 56 % kmeňov a lipázová aktivita u 97% kmeňov. Produkcia slizu bola zistená u 89% izolátov, no hydrolýza škrobu nebola zistená u žiadneho kmeňa *S. pseudintermedius*.

## ÚVOD

Podobne ako mikroorganizmy čreva, aj kožné komenzálne baktérie zohrávajú kľúčovú úlohu pri zabránení kolonizácie patogénnymi mikroorganizmami, pri rozklade kožných produktov, ale aj pri vytváraní normálnej imunitnej tolerancie (Byrd a kol., 2018). Stafylokoky sú bežnou súčasťou kože a slizníc ľudí a zvierat, ale tiež sú to aj oportúnne patogény, ktoré sa môžu podieľať na vzniku ochorení. U psov sú klinicky najdôležitejšími druhmi koaguláza-pozitívny *S. pseudintermedius* (predtým *S. intermedius*) a menej často *S. aureus*, ktoré sa bežne spájajú s pyodermiou, infekciou rán, sepsou a otitídou (Ma a kol., 2020). *S. pseudintermedius* má potenciál kolonizovať aj ľudský organizmus a môže sa podieľať na infekciách ako je endokarditída, rinosinusitída alebo infekcia v mieste chirurgického zákroku (Pompilio a kol., 2015; Somayaji a kol., 2016). Mnohé štúdie poukazujú na schopnosť kmeňov *S. pseudintermedius* produkovať širokú škálu virulentných faktorov (vrátane virulentných faktorov podobných druhu *Staphylococcus aureus*) medzi ktoré patrí produkcia enzýmov (koaguláza, termonukleáza, proteázy), toxínov (leukotoxíny, enterotoxíny, exfoliatívny toxín, hemolyzíny) ako aj faktorov nevyhnutných pre tvorbu biofilmu (Maali a kol., 2018). V ostatných rokoch si druh *S. pseudintermedius* získal pozornosť aj z dôvodu výskytu rezistentných izolátov na antibiotiká. Môže tak komplikovať liečbu infekcií zvierat a ľudí (Kadlec a kol., 2012).

## MATERIÁL A METODIKA

Kožné stery boli odobraté od 30 klinicky zdravých psov rôzneho plemena a veku (12 domácností). Stery boli odobraté z 8 oblastí tela každého psa (vnútorná strana ušnice, nos, brada, axila, chrbát, brucho, perianálna oblasť a medziprstový priestor). Stery boli inokulované na neselektívne živné médium: Brain Heart Infusion a selektívne živné médium: Mannitol Salt Agar (Becton Dickinson, USA) a kultivované za aeróbnych 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). Na stanovenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC)

antimikrobiálnych látok proti izolovaným kmeňom *S. pseudintermedius* sa použili testovacie stripy Liofilchem® MIC (Taliansko). Kultúra týchto izolátov bola naočkovaná na živné médium Mueller Hinton (Oxoid, UK) a inkubovaná pri teplote 37 °C po dobu 18 hodín (24 hod v prípade vankomycínu). Na vyhodnotenie rezistencie boli použité tabuľky hraničných hodnôt EUCAST v. 11 (2021) pre *Staphylococcus* spp. Hodnotenie produkcie tvorby biofilmu sa uskutočnilo pomocou spektrofotometrického testu kryštálovou violeťou podľa predtým publikovanej metódy Toledo-Arana a koll. (2001) s malými modifikáciami, ako popísala Bujňáková a Kmeť (2012). Schopnosť tvorby biofilmu sa hodnotila meraním hodnoty optickej denzity (OD) pri  $\lambda = 570$  nm v čítačke mikrotitračných doštičiek Synergy HT (BioTek, Winooski, VT, USA). Enzymatická aktivita bola stanovená pomocou komerčnej súpravy API ZYM (bioMérieux, Francúzsko) určenej na semikvantitatívnu detekciu produkcie enzýmov. DNázová aktivita bola zistená inokuláciou kmeňov na DNázový agar (Oxoid, UK) (inkubácia 37 °C, 48 hod) a následným preliatím 1N HCl. Zóna vyčistenia v okolí kolónie znamená pozitívny výsledok. Schopnosť kmeňov hydrolyzovať škrob bola pozorovaná na platniach s obsahom škrobu (Starch agar, Himedia, India), po inkubácii pri 37 °C po dobu 48 hod (Stepanovic a kol., 2001). Congo red agar (Congo red, sacharóza, BHI, agar) bol použitý na hodnotenie tvorby slizu baktérií (inkubácia 24 hod, 37 °C). Kmene tvoriace sliz tvorili čierne kolónie a negatívne kolónie boli červené. Produkcia želatínázy bola stanovená naočkováním kmeňov do bujónu s obsahom želatíny (Himedia, India) a ďalších zložiek (inkubácia: 30°C, 7 dní), následným schladením pri 4°C (pozitívny výsledok: tekutá substancia). Na hodnotenie lipázovej aktivity bol použitý agar s obsahom Tween 80, tryptónu, CaCl<sub>2</sub>, NaCl. Inkubácia: 24/48 hod pri 37° C. Pozitívny výsledok: precipitácia solí v okolí kolónií.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zo zdravej kože psov bolo kultivačnými metódami získaných 136 izolátov, pričom najväčšie množstvo izolátov predstavovali stafylokoky (91/136), z ktorých bolo 54/91 koaguláza-pozitívnych a 37/91 koaguláza-negatívnych. Koaguláza-pozitívny *S. pseudintermedius* bol identifikovaný u 80 % psov aspoň na jednej časti tela. Miestami jeho najčastejšieho výskytu boli mukokutánne oblasti ako oblasť nosa, brady, perianálna oblasť, ale aj interdigitálna oblasť a vnútorná strana ušnice. Nasledoval druh *S. hominis* (40% psov) a *S. aureus* (20% psov). Zvyšné izoláty patrili medzi druhy *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. xylosus*, *S. pasteurii*, *S. intermedius* a *S. succinus* (<13% psov). Zo získaných izolátov druhu *S. pseudintermedius* bol vytvorený MSP dendrogram na základe ktorého boli vybrané kmene u ktorých sme sa zamerali na stanovovanie vlastností ako antibiotická rezistencia, tvorba biofilmu a produkcia enzýmov. Pri testovaní antibiotickej citlivosti (n=30) bolo zistené, že najviac kmeňov bolo rezistentných na chloramfenikol (80%), nasledovala rezistencia na penicilín (73%), tetracyklín (33%), erytromycín (30%), vankomycín (27%) a klindamycín (23%). Iba jeden kmeň vykazoval rezistenciu na oxacilín. Hodnoty MIC<sub>50</sub> a MIC<sub>90</sub> sú zhrnuté v tabuľke č. 1. Za multirezistentné stafylokoky môžeme považovať 53% z testovaných kmeňov. Všetky testované kmene boli citlivé na ciprofloxacín, levofloxacín, gentamicín a rifampicín. Kmene, ktoré boli izolované od psov z jednej domácnosti vykazovali podobnú fenotypovú rezistenciu. Tieto výsledky sú čiastočne v súlade so štúdiou vykonanou v rokoch 2011 – 2015, avšak odlišné výsledky antimikrobiálnej rezistencie klinických izolátov boli v tejto štúdii zistené pre chloramfenikol (18,4%), oxacilín (13,7%) gentamicín (6,6%), enrofloxacin (7,3%) (Grontal a kol., 2017). Ďalším cieľom bolo vyhodnotiť schopnosť tvorby biofilmu izolátov (n=36) a porovnať ju medzi jednotlivými kmeňmi. V rámci biofilmu majú baktérie výrazne zmenený metabolizmus, zosilnenú komunikáciu medzi bunkami a sú schopné vyhnúť sa imunitnej odpovedi hostiteľa a účinku antimikrobiálnych látok (Donlan a kol., 2002; Singh a kol., 2013). V našej štúdii boli všetky testované kmene schopné tvoriť

biofilm. U 5,5% kmeňov bola zaznamenaná slabá schopnosť produkcie biofilmu, u 55,6% stredná a 38,9% kmeňov tvorilo silný biofilm. Meroni a kol. (2019) zistili priamu súvislosť medzi multirezistenciou izolátov a ich schopnosťou tvoriť biofilm, avšak naše výsledky na túto súvislosť nepoukazujú. Pri testovaní enzymatickej aktivity kmeňov *S. pseudintermedius* bola najvýraznejšia aktivita pozorovaná pri kyslej, alkalickéj fosfatáze a  $\beta$ -galaktozidáze. Všetky testované kmene (n=36) boli dnáza pozitívne (23 vysoko a 13 stredne pozitívnych). Pri sledovaní produkcie želatínázy bolo 20 kmeňov pozitívnych (4 vysoko pozitívne, 16 stredne). Lipázová aktivita sa prejavila u 35 sledovaných kmeňov (13 vysoko pozitívnych, 22 stredne). Produkcia slizu s použitím Congo red agar bola zistená u 32 kmeňov (30 vysoko pozitívnych, 2 stredne). Schopnosť pozorovaných kmeňov hydrolyzovať škrob nebola zistená.

Tabuľka č. 1 Antimikrobiálna rezistencia kmeňov *S. pseudintermedius* izolovaných zo zdravej kože psov

Antibiotikum	Strip range	MIC range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
Chloramfenikol	0.016 - 256	8 - >256	12	>256
Ciprofloxacín	0.002 - 32	0.064 - 0.75	0.125	0.19
Cindamycín	0.016 - 256	0.05 - >256	0.19	>256
Erytromycín	0.016 - 256	0.19 - >256	0.5	>256
Gentamicín	0.016 - 256	0.094 - 0.25	0.19	0.25
Levofloxacín	0.002 - 32	0.064 - 0.38	0.125	0.25
Oxacilín	0.016 - 256	0.125 - 0.5	0.25	0.38
Penicilín	0.002 - 32	0.012 - >32	6	>32
Rifampicín	0.002 - 32	0.006 - 0.064	0.032	0.047
Tetracyklín	0.016 - 256	0.19 - 64	0.5	64
Vancomycín	0.016 - 256	1 - 3	2	3

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0006/20

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- 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 *et al.* The human skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018;16:143-155.
- Bujňáková D, Kmeť V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Folia Microbiol.* 2012; 57:263–267.
- Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(9): 881–890.
- EUCAST(2021) Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. v.11.0. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_11.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf)
- Grönthal T *et al.* Antimicrobial resistance in *S. pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017; 72: 1021–1030.
- Kadlec K, Schwarz S. Antimicrobial resistance of *S. pseudintermedius*. *Vet. Dermatol.* 2012; 23: 276–282, e55.
- Kmieciak W, Szewczyk EM. Are zoonotic *S. pseudintermedius* strains a growing threat for humans? *Folia Microbiol.* 2018; 63:743–747.
- Ma GC *et al.* Commensal Staphylococci Including Methicillin-Resistant *S. aureus* from Dogs and Cats in Remote New South Wales, Australia. *Microb. Ecol.* 2020;79: 164–174.
- Maali Y *et al.* Understanding the Virulence of *S. pseudintermedius*: A Major Role of Pore-Forming Toxins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:221.
- Meroni G *et al.* Investigation on Antibiotic-Resistance, Biofilm Formation and Virulence Factors in Multi Drug Resistant and Non Multi Drug Resistant *S. pseudintermedius*. *Microorganisms.* 2019; 7(12):702.
- Pompilio A *et al.* New insights in *S. pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. *BMC Microbiol.* 2015; 15: 109.
- Singh A *et al.* Characterization of the biofilm forming ability of *S. pseudintermedius* from dogs. *BMC Vet. Res.* 2013; 9:93.
- Somayaji R *et al.* Exploring *S. pseudintermedius*: An emerging zoonotic pathogen? *Future Microbiol.* 2016; 11:1371–1374.
- Stepanović S, Vuković D, Trajković V *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* 2001; 199(1): 47-53.
- Toledo-Arana A *et al.* The Enterococcal surface protein, Esp, is involved in *E. faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:4538–4545.

## DOKÁŽE 3D FLUORESCENČNÁ SPEKTROSKOPIA ODHALIŤ GYNEKOLOGICKÉ ZÁPALOVÉ OCHORENIE?

Švecová M.<sup>1</sup>, Lešová D.<sup>1</sup>, Dubayová K.<sup>1</sup>, Karabinoš A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie

<sup>2</sup>SEMBID, s.r.o., Výskumné centrum aplikovanej biomedicínskej diagnostiky

### ABSTRAKT

Vysoká incidencia závažných chronických ochorení, najmä onkologických, je dôležitým a stále aktuálnym problémom vo svete medicíny. Neinvazívna a včasná diagnostika zmien v zložení telových tekutín, ktoré indikujú možný prekancerózny stav, môže prispieť k včasnému záchytu, úspešnej liečbe ochorenia a zníženiu úmrtnosti pacientov. Neliečené chronické zápalové ochorenia urogenitálneho traktu žien sú často príčinou neoplázií, či kancerogenézy. Pôvodcom týchto infekcií sú zvyčajne sexuálne prenosné patogény (STD), pričom najčastejším bakteriálnym patogénom je *Ureaplasma urealyticum*.

Cieľom práce bola aplikácia 3D fluorescenčnej analýzy moču vo forme synchronných spektier u gynekologických pacientok s rôznym typom zápalových ochorení urogenitálneho traktu vo vzťahu k infekcii baktériou *Ureaplasma urealyticum*. Metabolóm moču bol prezentovaný ako fluorescenčný profil rozdelený do jednotlivých zón podľa prítomnosti špecifických skupín fluorofórov. Fluorescenčné profily pacientok boli porovnávané s profilom zdravých žien. Profil gynekologických pacientok so zápalovým ochorením sa výrazne líšil od profilu zdravých žien v kvalitatívnom aj kvantitatívnom zložení fluorescenčného metabolómu moču. Fluorescenčná komparatívna analýza aj bez znalostí zloženia metabolómu odhalí rozdiely a odlišnosti skúmanej vzorky od definovaného štandardu. Preto má perspektívu a potenciál stať sa skriningovou metódou závažných ochorení a prispieť k ich včasnej diagnostike.

### ÚVOD

*Ureaplasma urealyticum* je jednou z najčastejších sexuálne prenosných infekcií spojených s urogynekologickými ochoreniami a neplodnosťou. *Ureaplasma* svojim pôsobením v ženskom urogenitálnom trakte môže spôsobiť zápalové ochorenia krčka maternice, cervikálnu dyspláziu a následne môže viesť až k rakovine krčka maternice. V súčasnej dobe je v praxi na detekciu *Ureaplasma urealyticum* využívaná metóda real-time PCR (qRT-PCR), ktorá deteguje a kvantifikuje produkty súčasne s amplifikáciou.

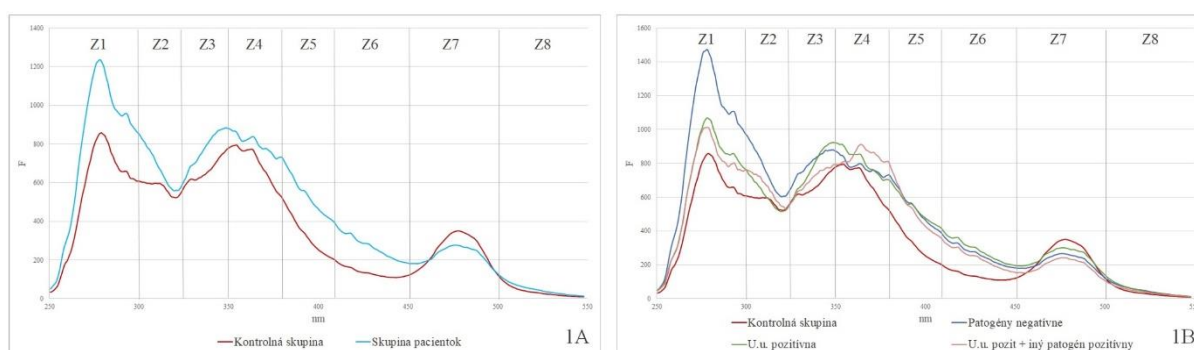
Fluorescenčná spektroskopia predstavuje spektrálnu metódu umožňujúcu vysoko citlivú analýzu multifuorescenčného biologického systému. Fluorescenčné metódy dokážu detegovať zmeny na molekulovej úrovni, a tak sú vhodnými skriningovými a diagnostickými metódami (Monici, 2005). Existuje množstvo štúdií využívajúcich natívne fluorofóry tkanív ako zápalové či nádorové markery vo fluorescenčnej spektroskopii, ale iba niekoľko z nich sa zameralo na používanie telesných tekutín na diagnostiku ochorenia (Atif a kol., 2018; Birková a kol., 2020). Moč obsahuje množstvo metabolitov, vrátane fluorofórov, vyskytujúcich sa v rozmedzí rôznych koncentrácií. Napriek ľahkej dostupnosti a neinvazívnemu odberu ostáva nevýhodou analýzy moču variabilita v jeho koncentrácii a vplyv exogénnych faktorov na jeho zloženie, akými sú lieky alebo strava (Dubayová a kol., 2015; Lamancová a kol., 2019). Fluorescenčný metabolóm moču je možné zobrazit' graficky vo forme jednoduchej krivky, ktorá predstavuje fluorescenčný profil moču (Birková a kol., 2020). Porovnaním grafického záznamu analyzovaného moču s definovaným štandardom metabolického profilu je možné okamžite identifikovať abnormality, a to aj bez podrobných znalostí o zložení. Komparatívna profilová analýza má potenciál stať sa skriningovou metódou závažných gynekologických ochorení, ktorých včasná diagnostika môže prispieť k zníženiu úmrtnosti a skvalitneniu života mnohých žien.

## MATERIÁL A METODIKA

Vyšetrovaný súbor tvorilo 78 pacientok vo veku od 16 do 63 rokov s rôznymi zápalovými ochoreniami urogenitálneho traktu. Porovnávaciú skupinu tvorili dobrovoľníčky, 32 zdravých žien vo veku od 17 do 45 rokov bez zápalových ochorení urogenitálneho traktu s negatívnym výsledkom semikvantitatívnej analýzy moču. Vzorka cervikálneho výteru bola analyzovaná metódou PCR a real time PCR na prítomnosť DNA patogénov sexuálne prenosných ochorení (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, HPV). Analyzovaná vzorka moču bola spracovaná ako séria riedení ultračistou vodou v pomere 1:3 od neriedeného moču až po 1000x riedený. Synchronne excitačné spektrá jednotlivých riedení boli snímané luminiscenčným spektrofotometrom Perkin Elmer LS 55. Zo sady zosnímaných spektier bola manuálne v počítačovom programe FLWinlab vytvorená tzv. fluorescenčná koncentračná matica (Kušnír a kol., 2005), ktorá bola matematicky pomocou autorského softvéru<sup>1</sup> spracovaná do jednoduchého grafu - fluorescenčného profilu. Ten bol rozdelený do ôsmich fluorescenčných zón ktoré korešpondujú so skupinami fluorescenčných metabolitov moču. (Dubayová a kol., 2015; Birková a kol., 2020). Zmeny vo fluorescenčnom koncentračnom profile pacientok boli identifikované porovnaním s profilom, ktorý bol vytvorený ako priemer fluorescenčných koncentračných profilov močov zdravých žien a slúži ako porovnávaci štandardný etalón.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fluorescenčný koncentračný profil zdravých žien sa vyznačoval výraznými signálmi v zóne Z1 (250-300 nm), Z4 (345-380 nm) a Z7 (450-500 nm). Porovnaním profilu zdravých žien s priemerným profilom všetkých analyzovaných vzoriek pacientok bol pozorovaný nárast intenzity fluorescence takmer vo všetkých fluorescenčných oblastiach okrem zóny Z7 (450-500 nm), kde došlo k poklesu fluorescence v porovnaní so zdravou skupinou žien. Zóna Z7 je výsledkom fluorescence flavínov. Maximum fluorescenčného signálu zo zóny Z4 u zdravých žien sa u pacientok presunulo do Z3. (Obr. 1 A). Zóny 3, 4 a 5 sú výsledkom fluorescence kyseliny nikotínovej a redukovaných koenzýmov (NADH, NADPH, nikotínamid). Zvýšená intenzita fluorescence v týchto zónach a znížená v Z7 môže súvisieť s patologickým procesom a nárastom redukovaných foriem koenzýmov. Fluorescenčne sa totiž prejavuje redukovaný NADH a oxidovaný FAD.



**Obr. 1 Porovnanie priemerov fluorescenčných koncentračných profilov jednotlivých pozorovaných skupín. 1A. Porovnanie priemerov fluorescenčných koncentračných profilov skupiny 78 pacientok (červená čiara) so zdravou kontrolnou skupinou (modrá čiara), 1B. Porovnanie priemerov fluorescenčných koncentračných profilov skupín v závislosti od prítomnosti patogénov a kontrolnej skupiny zdravých žien**

<sup>1</sup> Autorský softvér Ing. Martin Lešo, PhD.

Tab. 1 Zastúpenie vyšetovaných analytov v moči

ANALYT V MOČI	SKUPINY					
	1. Negatívne		2 U. u.		3. U. u + iný patogén	
	(n=34)		(n=32)		(n=12)	
Negatívny moč	2	6%	16	50%	10	83%
Bielkoviny	22	65%	14	44%	1	8%
Ketolátky	3	9%	0		0	
Urobilinogén	2	6%	1	3%	0	
Bilirubín	4	12%	0		0	
Krv	7	21%	1	3%	0	
Hemoglobín	15	44%	5	16%	1	8%

Vyšetrovaný súbor pacientok bol rozdelený na základe prítomnosti vyšetovaných patogénov PCR metódou na 3 veľké skupiny: 1. všetky patogény negatívne, 2. *Ureaplasma urealyticum* (Uu) pozitívna a iné patogény negatívne a 3. skupina *Ureaplasma urealyticum* (Uu) pozitívna a zároveň aj iný patogén pozitívny (z toho HPV 66%, *Chlamydia trachomatis* 33%, *Mycoplasma hominis*

25%). Porovnaním priemerov fluorescenčných koncentračných profilov týchto troch skupín, bolo zistené, že v prvej skupine došlo k najvýraznejšiemu nárastu intenzity fluorescence v excitačnej oblasti zóny Z1 (250-300 nm) a zvyšné dve skupiny vykazovali v tejto oblasti približne rovnakú hodnotu intenzity fluorescence (Obr.1 B). V tejto zóne sú fluorescenčne aktívne aromatické aminokyseliny a ich metabolity. S tým korešponduje aj prítomnosť proteinúrie (Tab. 1). Najvyšší podiel pacientov s proteinúriou bol v skupine bez prítomnosti patogénov. V zóne Z4 (345-480 nm) sa výrazne odlišoval priemerný profil pacientok tretej skupiny (Uu pozitívna + iný patogén pozitívny) (Obr. 1B). Výsledky analýzy moču pomocou močových testovacích prúžkov (Dekaphan) sú zhrnuté v Tabuľke 1. Glukóza nebola detegovaná ani u jednej pacientky.

Uvedené výsledky sú veľmi povzbudivé, ale vyžadujú verifikáciu výsledkov v súbore s väčším počtom pacientok. Zápalové ochorenia urogenitálneho traktu, najmä opakované a chronické, môžu indikovať prekancerózný stav. Skrining preventabilných onkologických ochorení v iníciaľnom asymptomatickom štádiu, kedy existuje vysoká šanca úspešnej terapie, môže prispieť k zníženiu úmrtnosti a skvalitneniu života pacientov. Aplikácia fluorescenčnej komparatívnej profilovej analýzy moču na skrining prekanceróz urogenitálneho traktu žien má perspektívu uplatniť sa v rutinej diagnostickej praxi.

Práca bola finančne podporená grantom VEGA 1/0620/19 a štrukturálnym fondom EÚ, projekt ITMS 26220220143

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Monici M, Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications. *Biotechnology Annual Review*, 2005; 227-256
- Kušnír J, et al. Concentration Matrices-Solutions for Fluorescence Definition of Urine. *Analytical letters*, 2005; 38(10):1559-1567
- Birková A, et al., Human Fluorescent Profile of Urine as a Simple Tool of Mining in Data from Autofluorescence Spectroscopy. *Biomedical Signal Processing and Control*. 2020; 56(20): 01693-1-01693-10
- Dubayová K, et al. A Novel Way to Monitor Urine Concentration: Fluorescent Concentration Matrices. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015; 9(1): BC11-BC14
- Lamancová P, et al., Autofluorescence of body fluids in early diagnostics of cervical inflammatory diseases. *GRANT journal*. 2019; 8(2): 97-101
- Atif M, et al. A study for the detection of kidney cancer using fluorescence emission spectra and synchronous fluorescence excitation spectra of blood and urine. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018; 23:40-44.

# BIODOSTUPNOSŤ STOPOVÝCH PRVKOV Z KŔMNYCH ADITÍV

Tokarčíková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat CBv SAV, Košice

## ABSTRAKT

Ovplyvňovaním skladby kompletného krmiva hospodárskych zvierat je možné zvýšiť absorpciu a biovyužitelnosť stopových prvkov z kŕmnych aditív, čím sa dosiahne lepšia úžitkovosť, zdravie zvierat a zároveň sa zníži environmentálne zaťaženie zo živočíšnej výroby. Cieľom tejto štúdie bolo hodnotenie biodostupnosti stopových prvkov z kŕmnych aditív *in vitro* a *in vivo* metódami. Sledovali sme vplyv anorganickej a organickej formy Zn a zdroja vlákniny na relatívnu absorpciu stopových prvkov (Zn, Cu, Mn, Fe) a stráviteľnosť vlákniny u mladých prasiat a biodostupnosť týchto prvkov simulovaním trávenia pomocou modelu *in vitro* a *in situ*. Príjem zemiakovej vlákniny (ZV) znížil absorpciu Fe, ale zvýšil absorpciu Cu, zvýšil rozpustnosť Zn v ileu a naopak znížil v jejune (*in situ*), pričom sa tento efekt neodrazil na relatívnej absorpcii Zn u prasiat (*in vivo*), kde sme zaznamenali vplyv zdroja Zn. Pri simulovanom trávení sme nezaznamenali vplyv ZV a Zn na biodostupnosť prvkov (*in vitro*). Zdroj vlákniny a Zn neovplyvnili stráviteľnosť vlákniny v GIT (*in vitro*, *in situ*), ale u prasiatok (*in vivo*) sme zaznamenali pozitívny vplyv ZV na stráviteľnosť sušiny. Naše výsledky poukazujú na silnú koreláciu medzi rozpustnosťou prvkov v duodene a ich relatívnou absorpciou v tomto úseku tenkého čreva, ktoré je hlavným miestom absorpcie stopových prvkov.

## ÚVOD

Stopové prvky sú potrebné pre správne fungovanie fyziologických procesov nevyhnutných pre život. Nedostatok stopových prvkov v organizme je zvyčajne spôsobený ich nízkym obsahom v potrave, alebo ich nízkou biodostupnosťou/biovyužitelnosťou (Kumari a Platel 2017). Ich biologická dostupnosť závisí od procesov prebiehajúcich v tráviacom trakte, obzvlášť dvojmocné minerály prechádzajú cheláciou, ktorá ovplyvňuje ich dostupnosť a absorpciu. Biodostupnosť prvkov je definovaná ako ich množstvo, ktoré sa uvoľní z kompletného krmiva v GIT a je k dispozícii na absorpciu (Parada, Aguilera 2007). Pre biodostupnosť je dôležitá rozpustnosť minerálnych zlúčenín, ktorá závisí od pH, koncentrácie makro a mikro elementov ako aj od prítomnosti komplexotvorných činidiel v GIT (Bohn a kol. 2017). Cieľom tejto štúdie bolo hodnotenie a porovnanie biodostupnosti stopových prvkov (Zn, Cu, Mn, Fe) a stráviteľnosti vlákniny počas trávenia v žalúdku, v tenkom a v hrubom čreve monogastrických zvierat simulované pomocou 3-krokového *in vitro* modelu trávenia (Boisen a Fernández 1997), hodnotenie rozpustnosti stopových prvkov v úsekoch tenkého čreva (*in situ*) a relatívnej absorpcie prvkov v bilančnom experimente mladých prasiat (*in vivo*).

## MATERIÁL A METODIKA

Biodostupnosť/biovyužitelnosť stopových prvkov sme určili rôznymi postupmi: Modifikáciou metódy 3-krokového modelu *in vitro* (simulované gastrointestinálne trávenie), bilančným experimentom na prasatách (*in vivo*) a metódou *in situ* sme zistili rozpustnosť stopových prvkov v obsahu tenkého čreva z jeho jednotlivých úsekov (duodenum, jejunum, ileum). Základom *in vitro* a *in vivo* experimentu bola bazálna diéta (BD), ktorá obsahovala 5% vlákniny vo forme lignocelulózy (C) alebo zemiakovej vlákniny (ZV) a 150 mg Zn/kg vo forme anorganického monohydrátu ZnSO<sub>4</sub> (ZnSO<sub>4</sub>), alebo organického Zn chelátu glycinového hydrátu (ZnGly).

*Biodostupnosť stopových prvkov v GIT - in vitro* (Boisen, Fernández, 1997). Inkubácia 0,5-1 g experimentálnych diét pozostávala zo simulácie počiatočného trávenia s pepsínom (trávenie



v žalúdku: pH 2, 39 °C, 120 min.), po ktorom nasledovala intestinálna fáza pridaním pankreatínu a úpravou pH (trávenie v tenkom čreve: pH 6,8; 39 °C, 4 hodiny) a poslednou fázou bola simulácia trávenia v hrubom čreve pri pH 4,8 pomocou multienzýmového komplexu (Viscozyme L) po dobu 18 hodín. Supernatant z každej fázy sa analyzoval pomocou plameňovej atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) na zistenie % biodostupnosti stopových prvkov a stanovila sa sušina natráveného krmiva na výpočet stráviteľnosť sušiny.

*Relatívna absorpcia stopových prvkov - in vivo (bilančný experiment na prasatách).* 24 odstavčiat prasiatok plemena Danbred x Duroc bolo rozdelených do 4 skupín (6 replikátov) a počas 4 týždňov prijímali experimentálne diéty *ad libitum*. Desať dní pred koncom experimentu bol ku každej experimentálnej diéte pridaný Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ako markér pre odhad stráviteľnosti. Po 4 dňoch adaptácie sa odoberal trus všetkých zvierat počas 5 dní. Po ukončení experimentu sa z jednotlivých úsekoch tenkého čreva odoberal obsah. Koncentrácie stopových prvkov v obsahoch čreva a truse boli použité na výpočet relatívnej absorpcie stopových prvkov (%) v jednotlivých úsekoch tenkého čreva.

*Rozpustnosť stopových prvkov v tenkom čreve - in situ (Kleinman a kol. 2007).* Navážené vzorky obsahu čreva sa inkubovali v ultračistej vode 60 minút pri 37°C s trepaním. Po hodine inkubácie sme vzorky scentrifugovali a prefiltrovali. Získaný filtrát sme analyzovali pomocou AAS a bol stanovený rozpustný obsah (%) stopových prvkov v jednotlivých úsekoch tenkého čreva .

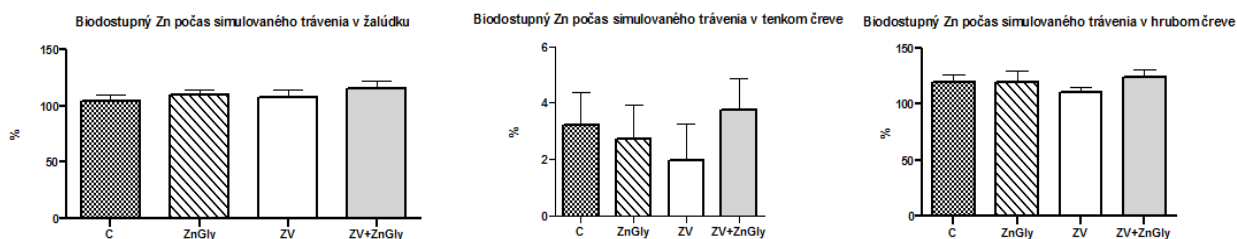
Na štatistické hodnotenie výsledkov a stanovenie účinku ZV a zdroja Zn na absorpciu, rozpustnosť a biodostupnosť stopových prvkov sme použili analýzu rozptylu- jednocestná ANOVA s Tukey post-testom (štatistický softvér GraphPad Prism 5).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

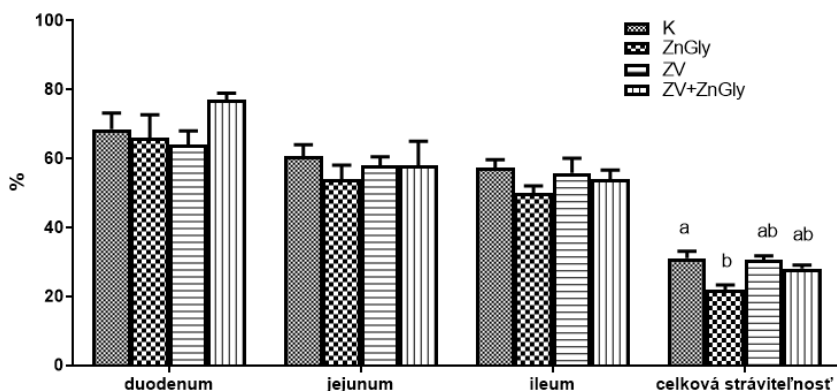
Zdroj Zn ako aj ZV nemali vplyv na biodostupnosť Zn (Obr. 1) ani ostatných prvkov. Zemiaková vláknina stimuluje bakteriálnu fermentáciu čím môže ovplyvniť absorpciu a dostupnosť minerálov. Prijem ZV v *in situ* metóde zvýšil rozpustnosť Zn v ileu, ale znížil jeho rozpustnosť v jejune (Obr. 3), čo však nemalo vplyv na relatívnu absorpciu Zn v žiadnom úseku tenkého čreva v bilančnom pokuse na prasiatkach (*in vivo*, Obr. 2). Zvýšená rozpustnosť Zn v ileu môže byť spôsobená zvýšenou produkciou kyseliny mliečnej a mastných kyselín s krátkym reťazcom, ktoré znižujú pH v tráviacom trakte monogastrických zvierat (Pastuszewska a kol. 2010). Celková stráviteľnosť sušiny bola vyššia u prasiat prijímajúcich diéty obohatené o ZV, no pri simulácii trávenia (*in vitro*) sme nezaznamenali žiadny vplyv diét na stráviteľnosť sušiny (Obr. 4).

Nižšiu celkovú stráviteľnosť Zn sme zistili u skupín zvierat prijímajúc organický ZnGly (Obr. 2). Silnejšia väzba Zn v organickom cheláte ZnGly mala zrejme za následok jeho nižšiu stráviteľnosť v GIT (*in vivo*).

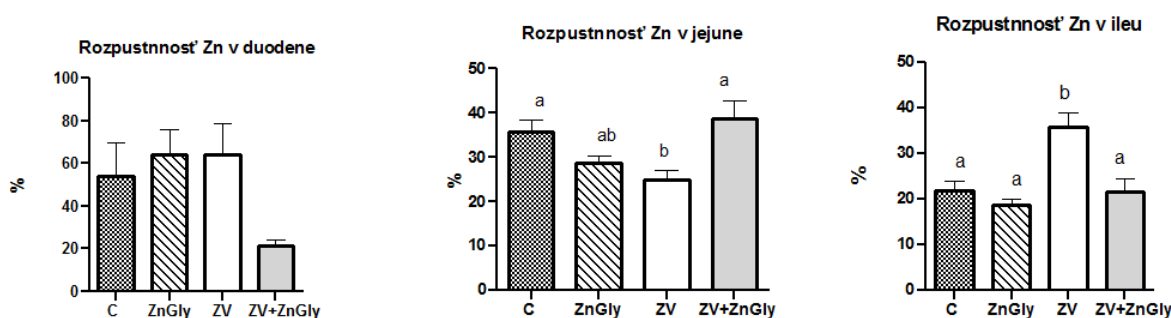
Korelačné analýzy z našich experimentov preukázali silnú závislosť medzi rozpustnosťou prvkov a ich relatívnu absorpciou v duodene, ktoré je hlavným miestom absorpcie stopových prvkov.



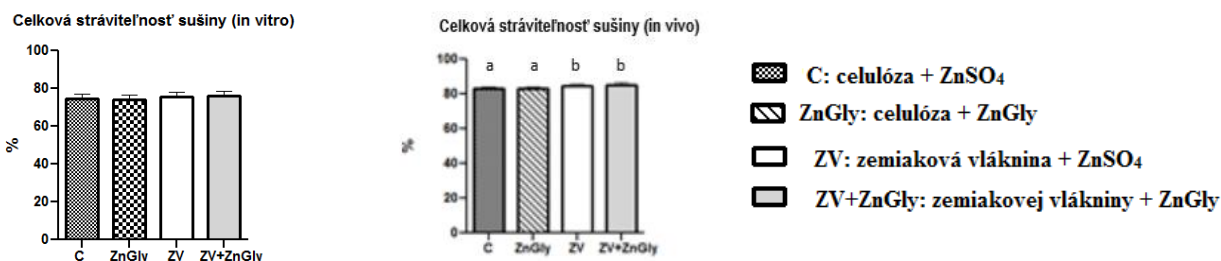
Obr. 1 Biodostupnosť Zn počas trávenia v žalúdku, v tenkom a hrubom čreve (*in vitro* metóda)



Obr. 2 Relatívna absorpcia Zn v úsekoch tenkého čreva a celková stráviteľnosť (in vivo metóda)



Obr. 3 Rozpustnosť Zn v jednotlivých úsekoch tenkého čreva (in situ metóda)



Obr. 4 Celková stráviteľnosť sušiny in vitro a in vivo metódou

a, b: rozdielne písmená nad stĺpcami znamenajú signifikantné rozdiely ( $P < 0,05$ )

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

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bohn T, et al. Correlation between in vitro and in vivo data on food digestion. What can we predict with static in vitro digestion models? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018; 58(13):2239-2261.
- Boisen S, Fernandez J A. Prediction of the total tract digestibility of energy in feedstuffs and pig diets by in vitro analyses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1997; 68(1997):277-286.
- Kleinman P, et al. Selection of a water extractable phosphorus test for manures and biosolids as an indicator of runoff loss potential. *J Envir Qual.* 2007; 36: 1357-1367.
- Kumari M, Platel K. Bioaccessibility of trace elements and chromium speciation in commonly consumed cereals and pulses. *Int. J. Food Prop.* 2017; 20 (7):1612-1620.
- Parasda J, Aguilera J M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J. Food Sci.* 2007; 72(2): R21-R32.
- Pasteszewska B, et al. Physiological effects of long-term feeding diets supplemented with potato fibre or cellulose to adult rats. *Arch. Anim. Nutr.* 2010; 64 (2):155-69.

# VPLYV PRAŽENIA NA OBSAH POLYFENOLOV, KOFEÍNU A AKRYLAMIDU V ZRNÁCH VÝBEROVEJ KÁVY

Várady M., Popelka P.

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

## ABSTRAKT

Výberovou kávou nazývame kávu, ktorá má štandardizovaný celý proces výroby, od výberu kritérií pre plantáže až po jej prípravu, pričom prechádza predbežnými testami triedenia a degustácie (cuppingu) a tak sa dostane k zákazníkovi. Naším cieľom bolo zistiť v zrnách výberovej kávy obsah celkových polyfenolov (PPH), kofeínu (CAF) a akrylamidu (AA) v závislosti od teploty praženia. V našom experimente sme použili vzorky výberovej 100% arabskej kávy (*Coffea arabica*) Kolumbia (COL) a Nikaragua (NI). Zelené kávové zrná (COL-GR) a NI (NI-GR) boli pražené na dvoch úrovniach – svetlejšie praženie (COL-LIGHT a NI-LIGHT) pri teplote 210°C (10 min) a tmavšie praženie (COL-DARK a NI-DARK) pri teplote 215°C (12 min). Kvantitatívne analýzy PPH pomocou hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením identifikovali kyselinu kafeoyl-chinovú (CQA), kyselinu feruloyl-chinovú a dikafeoyl-chinovú. Z celkových PPH bol najviac zastúpený izomér 5-CQA: COL-GR (60,8%), NI-GR (57,7%), COL-LIGHT (23,4%), NI-LIGHT (29,3%), COL-DARK (18 %) a NI-DARK (24,2%). Praženie ovplyvnilo obsah celkových PPH, CAF a AA ( $p < 0,001$ ). Tmavšie praženie oboch typov káv malo nižší obsah AA, ale podobný obsah CAF a celkových PPH ako svetlejšie praženie. Je zrejmé, že pôvod kávy a praženie môže ovplyvniť obsah zdraviu prospešných (polyfenoly, kofeín), ale aj potenciálne nebezpečných (akrylamid) látok v káve. Naše výsledky ukázali, že popri senzorickej kvalitatívnej analýze kávových zrn, by kvantitatívne analýzy mali byť významným ukazovateľom kvality výberovej kávy.

## ÚVOD

Výberová káva je charakterizovaná štandardizovaným výrobným postupom od výberu kávovej plantáže až po prípravu kávy, pričom prechádza predbežnými testami triedenia, degustácie - cuppingu a hodnotenia (Poltronieri a Rossi, 2016). Antioxidačná aktivita kávy závisí od vlastností fenolových zlúčenín, najmä chlorogénových kyselín (CGA) a kofeínu (CAF). S konzumáciou kávy sú spojené potenciálne zdravotné výhody pripisované hlavne CGA, ako je zníženie výskytu chronických a degeneratívnych chorôb napr. rakovina, srdcovocievne poruchy, cukrovka alebo Parkinsonova choroba (Tajik a kol., 2017). Za hlavné chemické, fyzikálne a organoleptické vlastnosti konečného kávového produktu je zodpovedné praženie kávy, kedy sa v dôsledku Maillardových reakcií vytvárajú aj potenciálne toxické látky ako akrylamid (AA). CAF je prírodný metylxantínový alkaloid, ktorý sa nachádza v kávových zrnách a jeho množstvo je výrazne ovplyvnené úrovňou praženia kávy (Hecimovic a kol., 2011). Vplyv praženia na ukazovatele kvality výberovej kávy zatiaľ nebol dostatočne študovaný u výberovej kávy, preto našim cieľom bolo zistiť jeho vplyv na obsah celkových PPH, CAF a AA a identifikovať hlavné bioaktívne zlúčeniny vo výberovej káve Kolumbia a Nikaragua.

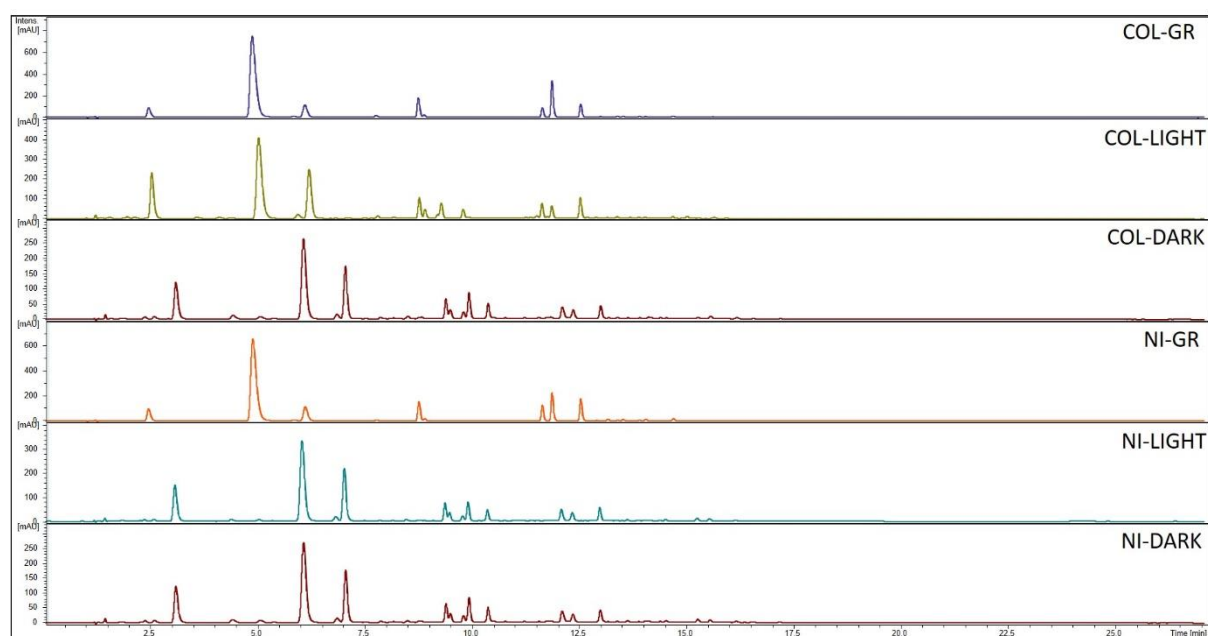
## MATERIÁL A METODIKA

Boli použité vzorky 100% *Coffea arabica* (Project FOX Roaster, Praha, Česká republika) Kolumbia (COL) a Nikaragua (NI). Káva COL bola z farmy Finca La Cabana a bola spracovaná anaeróbnou fermentáciou. Káva NI bola z farmy Finca Buena Vista a bola spracovaná prírodnou metódou ako jedinečná odroda Sarchimor, ktorá je kávovým hybridom. Svetlé praženie (COL-LIGHT a NI-LIGHT) prebehlo pri konečnej teplote 210°C počas 10 minút s dobou vývoja 30 sekúnd. Tmavšie praženie (COL-DARK a NI-DARK) malo konečnú teplotu 215°C počas 12 minút s dobou vývoja 2 minúty a 30 sekúnd. Káva bola pražená v

plynovom pražiči Probatone 5 (Probat, Emmerich am Rhein, Nemecko). Teplota praženia sa s časom zvyšovala a bola meraná sondou vo vnútri bubna pražiča. Vzorky kávy boli rozomleté na jemný prášok pomocou dezintegrátora FW 177 Herbal Medicine (Chincan, Tianjin, Čína) a bioaktívne zúčeniny boli analyzované hmotnostnou spektrometriou s ultra vysokým rozlíšením na systéme Dionex UltiMate 3000RS (Thermo Scientific, Darmstadt, Nemecko) a QTOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Nemecko). Analýza PPH, CAF a AA je podrobne popísaná v práci Várady a kol. (2021). Na štatistické analýzy bola použitá ANOVA (GraphPad Prism 8.3.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kvantitatívne analýzy bioaktívnych zlúčenín vzoriek kávy (Obr.1.) ukázali prítomnosť fenolových kyselín v troch hlavných skupinách CGA: kyselina kafeoyl-chinová (CQA), kyselina feruloyl-chinová (FQA) a kyselina dikafeoyl-chinová (diCQA). Vo všeobecnosti je najpočetnejšou a najprospernejšou bioaktívnou zlúčeninou kávy izomér 5-O-CQA, ktorého obsah bol vyšší v COL ako v NI (Tab. 1). Pražením sa znížili obsah 5-O-CQA o 61-70% v COL a o 49-58% v NI ( $p < 0,001$ ). Zníženie (47-72%) obsahu 5-O-CQA bolo pozorované po pražení aj pri *Coffea robusta* (Budryn a kol., 2015). Obsah izomérov 3-O-CQA a 4-O-CQA v COL a NI vzrástol pri svetlejšom aj tmavšom pražení približne dvojnásobne. Podobný obsah PPH pri káve NI pripisujeme jej spracovaniu prírodnou metódou, ktorá pravdepodobne vedie k ochrane PPH počas praženia. Rozdiely v obsahu celkových PPH vo výberovej káve závisia aj od spôsobu prípravy nápoja (napr. Hario V60, espresso, zalievaná káva) (Várady a kol. 2020). Tmavšie praženie oboch typov káv malo nižší obsah AA a podobný obsah CAF a celkových PPH ako svetlejšie praženie (Tab. 2). Záverom môžeme povedať, že výberová káva sa na trhu považuje za najkvalitnejšiu, ale zákazník, pražiar ani farmár nevedia, či obsahuje aj viac prosperných bioaktívnych zlúčenín. Správny spôsob výroby výberových káv však môže zachovať obsah bioaktívnych zlúčenín a minimalizovať škodlivé kontaminanty.



**Obr. 1. Reprezentatívne chromatogramy (320 nm) identifikovaných polyfenolov v extraktoch zo vzoriek výberovej kávy Kolumbia a Nikaragua**

Tab. 1. Vplyv druhu kávy a praženia na obsah kyseliny kafeoyl-chinovej (CQA)

Káva (K)	Praženie (P)	CQA ( <i>cis</i> a <i>trans</i> ) (mg/g DM)		
		3-O-CQA	5-O-CQA	4-O-CQA
Kolumbia	Zelená káva	2,35 ± 0,08 <sup>a</sup>	36,3 ± 2,04 <sup>c</sup>	3,93 ± 0,06 <sup>b</sup>
	Svetlé (210°C 10 min)	5,05 ± 0,74 <sup>b</sup>	14,0 ± 1,02 <sup>a</sup>	6,55 ± 0,21 <sup>e</sup>
	Tmavšie (215°C 12 min)	2,92 ± 0,41 <sup>b</sup>	10,8 ± 0,86 <sup>a</sup>	5,00 ± 0,09 <sup>c</sup>
Nikaragua	Zelená káva	2,22 ± 0,60 <sup>a</sup>	24,2 ± 2,11 <sup>b</sup>	2,97 ± 0,08 <sup>a</sup>
	Svetlé (210°C 10 min)	4,40 ± 0,21 <sup>b</sup>	12,3 ± 1,22 <sup>a</sup>	5,99 ± 0,65 <sup>d</sup>
	Tmavšie (215°C 12 min)	3,84 ± 0,07 <sup>b</sup>	10,1 ± 1,01 <sup>a</sup>	4,67 ± 0,08 <sup>c</sup>
Signifikancia účinku:				
Káva		0,148	0,001	0,001
Praženie		0,001	0,001	0,001
K × P		0,001	0,001	0,053

Priemer ± SD. Písmená označujú rozdiely v stĺpci pri  $p < 0,05$ .

Tab. 2. Vplyv druhu kávy a praženia na obsah celkových polyfenolov (PPH), kofeínu (CAF) a akrylamidu (AA)

Káva (K)	Praženie (P)	PPH (mg/g DM)	CAF (mg/kg)	AA (µg/kg)
Kolumbia	Zelená káva	59,8 ± 8,94 <sup>b</sup>	11104 ± 777	Nd
	Svetlé (210°C 10 min)	35,5 ± 3,64 <sup>a</sup>	12660 ± 886	457 ± 82,3 <sup>b</sup>
	Tmavšie (215°C 12 min)	30,1 ± 4,56 <sup>a</sup>	12329 ± 863	192 ± 34,6 <sup>a</sup>
Nikaragua	Zelená káva	41,9 ± 6,44 <sup>a</sup>	11127 ± 779	Nd
	Svetlé (210°C 10 min)	32,8 ± 4,15 <sup>a</sup>	12822 ± 898	413 ± 74,3 <sup>b</sup>
	Tmavšie (215°C 12 min)	30,0 ± 2,56 <sup>a</sup>	12868 ± 901	277 ± 49,9 <sup>a</sup>
Signifikancia účinku:				
Káva		0,002	0,559	0,590
Praženie		0,001	0,011	0,001
K × P		0,054	0,865	0,115

Priemer ± SD. Nd, nezistené. Písmená označujú rozdiely v stĺpci pri  $p < 0,05$ .

Práca bola podporená Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV 18-0039).

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Budryn G, et al. Correlation between the stability of chlorogenic acids, antioxidant activity and acrylamide content in coffee beans roasted in different conditions. *Int J Food Prop* 2015; 18:290-302.
- Hecimovic I, et al. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. *Food Chem* 2011; 129:991-1000.
- Poltronieri P, Rossi F. Challenges in specialty coffee processing and quality assurance. *Challenges* 2016; 7:19.
- Tajik N, et al. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature. *Eur J Nutr* 2017; 56:2215-44.
- Váradý M, et al. Effect of preparation method and roasting temperature on total polyphenol content in coffee beverages. *Czech J Food Sci* 2020; 38:417-21.
- Váradý M, et al. Heavy-metal contents and the impact of roasting on polyphenols, caffeine, and acrylamide in specialty coffee beans. *Foods* 2021; 10:1310.

# MATRIXOVÉ METALOPROTEINÁZY OPTIKOU DVOCH ROZLIČNÝCH METODICKÝCH PRÍSTUPOV

Večurkovská, I.<sup>1</sup>, Kaľuchová, J.<sup>2</sup>, Mašlanková, J.<sup>1</sup>, Stupák, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Lekárska fakulta, Ústav lekárskej a klinickej biochémie

<sup>2</sup>Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura v Košiciach, I. chirurgická klinika

## ABSTRAKT

Na Slovensku je najvyššia mortalita na kolorektálny karcinóm (CRC) z celej EÚ. Je preto veľmi potrebné určiť dôveryhodný marker, ktorý by dokázal CRC odhaliť v skorom štádiu, čím by sa pre pacienta výrazne zvýšila šanca na úspešnosť liečby. Pozornosť sa v tejto súvislosti zameriava na matrixové metaloproteinázy (MMP) -9 a -2, ktoré svojou aktivitou degradujú extracelulárny matrix (ECM), čím tvoria priestor pre rast nádoru a šírenie metastáz. Ich zvýšená expresia v tkanivách pacientov s CRC je podľa viacerých štúdií diagnosticky významná. V práci porovnáваме dve rôzne metódy používané pri určovaní MMP- imunometódu ELISA a želatínovú zymografiu, ktoré poskytujú navzájom sa dopĺňajúce výsledky.

## ÚVOD

MMP-9 je jedným z kľúčových proteolytických enzýmov pri rozklade a rekonštrukcii ECM počas invázie a tvorby metastáz CRC. Aktivita MMP-9 je prísne regulovaná na troch rôznych úrovniach: aktivácia, syntéza a inhibícia. Jeho syntéza je regulovaná adhéznymi molekulami, ako sú integríny, cytokíny a rastové faktory. Podobne ako ostatné MMP, aj MMP-9 je syntetizovaný ako pro-enzým, ktorý je aktivovaný proteolytickým štiepením jeho propeptidovej domény rôznymi proteázami, vrátane plazmínu, meprínov, furínov a ďalších aktivovaných MMP. Aktívna forma MMP-9 následne degraduje hlavné zložky ECM, kolagén (typ III a IV), elastín, agrekán a laminín (Charzewski a kol., 2021). MMP-9 reguluje mikroprostredie okolo nádoru, zvyšuje koncentráciu vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF), ktorý reguluje angiogénezu, a má aj ďalšie významné funkcie v progresii CRC (Lukaszewicz-Zajac a Mroczko, 2021). Imunochemické testy založené na efektorovom účinku protilátok, ako je ELISA, sú zlatým štandardom analytickej platformy používanej v predklinických laboratóriách na kvantifikáciu analytov vo vzorke. Tieto konvenčné platformy ELISA, používané na odhad MMP-9, však majú niekoľko inherentných obmedzení: nekonkretizujú hladiny aktívnych a latentných foriem MMP (Ricci a kol., 2015). Kvantitatívne stanovujú celkové množstvo proteínu vo vzorke a v tejto hodnote sú teda zahrnuté aj neaktívne formy MMP-9: pro-MMP-9, homodiméry MMP-9, heterodiméry: MMP-9/TIMP-1, MMP-9/CD44 a iné (Charzewski a kol. 2021). Na stanovenie jednotlivých foriem MMP-9 (a MMP-2), sa využíva elektroforetická metóda- želatínová zymografia. Táto technika je založená na tvorbe polyakrylamidového gélu dodecylsulfátu sodného (SDS), s ktorým kopolymerizuje substrát, v tomto prípade želatína, ktorá je degradovaná prostredníctvom MMP. Na zymograme je možné podľa proteínového ladderu jednoducho odčítať molekulovú hmotnosť a vďaka nej aj formu MMP (Bencsik a kol., 2017).

## MATERIÁL A METODIKA

Tkanivo bolo odobraté na I. chirurgickej klinike UNLP v Košiciach od 100 pacientov s CRC, z ktorých bolo histológiou potvrdených 32 ako benígnych, 2 v štádiu Tis, 10 v I. štádiu CRC, 20 v II. štádiu, 18 v III., 4 v IV. a 14 pacientov nebolo dodiferencovaných. Tkanivo bolo homogenizované (40mg tkaniva v 1 ml PBS s 0,01% TRITON X-100), centrifugované (10 000 × g /10 minút) a supernatant bol následne využívaný na jednotlivé analýzy. Na kvantitatívne stanovenie MMP sme využili sendvičovú ELISA imunometódu. Na stanovenie aktivity MMP-9 sme využili želatínovú zymografiu., ktorá prebiehala v 10%



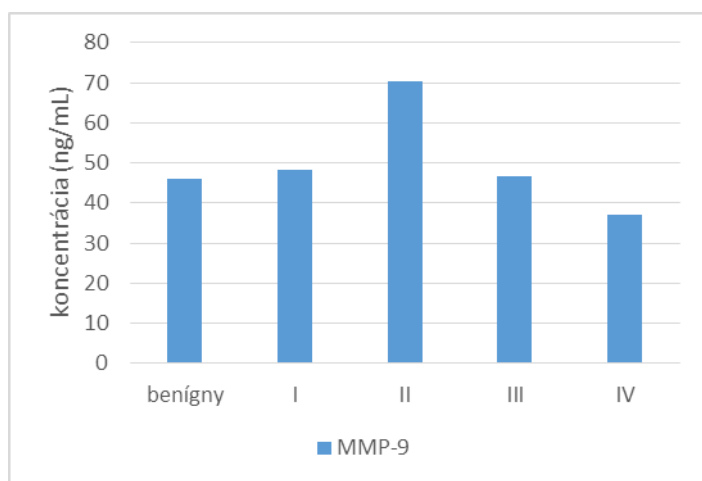
polyakrylamidovom géli kopolymerizovanom s 1 mg/ml želatínou pri 150 V. Po elektroforéze bol gél premývaný v 2,5% Triton X-100 (2×30 min) a 100mM Tris-base (2×5 min). Následne bol gél inkubovaný pri 37°C vo vyvíjacom (renaturačnom) roztoku obsahujúcom ióny Zn<sup>2+</sup> a Ca<sup>2+</sup> (24 hod). Po inkubácii bol gél farbený 0,5% roztokom Coomassie Brilliant Blue G-250 (1 hod) a následne odfarbovaný v odfarbovacom roztoku (24 hod). Enzymatické aktivity jednotlivých foriem MMP boli rozoznané ako biele pásy na modrom pozadí.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Hladiny MMP-9 v nádorovom tkanive boli kvantitatívne stanovené ELISA metódou, pričom priemerné hodnoty v jednotlivých skupinách predstavujúcich štádiá CRC uvádzame v tabuľke (Tab. 1) a znázorňujeme v priloženom grafe (Obr. 1).

**Tab. 1. Výsledky stanovenia MMP-9 metódou ELISA**

Štádium CRC	benígny nádor	I. štádium	II. štádium	III. štádium	IV. štádium
cMMP-9 (ug/mL)	45, 8906	48, 2434	70, 4352	46, 5927	37, 2231

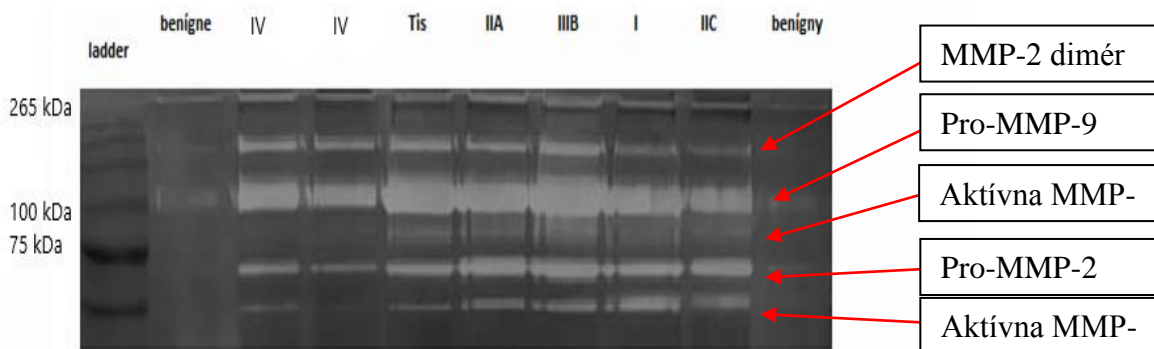


**Obr. 1. Porovnanie koncentrácií MMP-9 v nádorovom tkanive pacientov medzi štádiami CRC**

celkovú koncentráciu MMP-9 vo vzorke a nevieme, akú časť z tejto hodnoty tvorí aktívna forma enzýmu. Preto sme kvôli ďalšej identifikácii foriem MMP zvolili metódu želatínovej zymografie, ktorá má jednotlivé formy špecifikovať na základe molekulovej hmotnosti. Výsledkom zymografie bol zymogram (Obr. 2) tkaniva pacientov v rôznych štádiách CRC, ktorý naozaj potvrdil rozdiely v aktivite MMP-9 v závislosti od štádia rakoviny. Je zrejme, že v benígnych nádoroch sa nenachádzajú aktívne formy MMP-9, ani MMP-2. Zo zymogramu je tiež vidieť, že množstvá aktívnych aj neaktívnych foriem MMP-9 (ako aj MMP-2) v tkanivách pacientov v IV. štádiu CRC sú nižšie v porovnaní s množstvami MMP v tkanive u pacientov v I., II., či III. štádiu. Vysvetlenie spočíva v tom, že obaja pacienti v IV. štádiu nemajú primárnu diagnózu CRC. U jedného bola potvrdená rakovina prsníka, u druhého rakovina prostaty. Hladiny a formy MMP zistené v tkanive u týchto pacientov sú výsledkom metastáz zasahujúcich až do hrubého čreva a konečníka. Čo sa týka hladín pro-MMP-9, pomerne výrazný rozdiel v hustote pásika bol u pacientov s potvrdeným Tis, IIA a IIB. Pro-MMP-2 hustota bola zvýšená u pacientov IIA, IIIB a IIC, čo korelovalo aj s prežívaním pacientov. Všetci títo pacienti už umreli. Najkratšie prežívanie bolo zaznamenané u pacienta so štádiom IIIB, u ktorého na zymograme pozorujeme pásiky s najvyššou hustotou. V tomto štádiu karcinóm metastázuje do regionálnych lymfatických uzlín, čo je logickým odôvodnením zvýšenej hustoty MMP-9 aj MMP-2, ktoré zohrávajú významnú úlohu v šírení nádoru.

Hladiny MMP-9 nekorelovali so štádiami CRC. V štádiách I a III sa hladiny MMP-9 v porovnaní s benígnou skupinou nelíšili, pri IV dokonca klesli. Najvyššie hladiny MMP-9 boli v tkanivách pacientov v II. štádiu CRC. Hladiny teda korelujú s definíciou štádia II, v ktorom dochádza k prerastaniu nádoru do susedných tkanív vo vnútri peritonea, prípadne priamo prerastaniu do orgánov alebo štruktúr v intraperitoneálnom priestore.

Ako sme už uviedli v úvode, metódou ELISA sme stanovili



**Obr. 2. Zymogram tkaniva pacientov s CRC (144kDa:MMP-2 dimér; 92kDa:pro-MMP-9; 86 kDa: aktívna forma MMP-9; 72kDa: pro-MMP-2; 66kDa: aktívna forma MMP-2**

Pacient v IV. štádiu s metastázami na viacerých miestach po chirurgickom zákroku a odstránení nádorov ďalej žije. Jeho zymogram ukazuje nízku hladinu pro-MMP-2 a dokonca žiadnu jeho aktívnu formu. Podľa Langersa a kol. (2012) vysoká expresia MMP-9 a -2 koreluje s horším 5-ročným preživaním. Kombinácia oboch parametrov je ešte silnejším prognostickým faktorom. V tejto práci autori predpokladajú, že zlá prognóza zistená u pacientov s veľmi nízkymi hladinami MMP-9 v nádore je pravdepodobne spôsobená nedostatkom infiltrujúcich leukocytov, ktoré môžu mať protirakovinové účinky. Naše výsledky poukazujú na to, že prežvanie pacientov nemôžeme odhadovať podľa štádia CRC, zymogram však dokáže poskytnúť celkový obraz o jednotlivých formách MMP a teda diagnostický potenciál želatínovej zymografie je jednoznačný.

Predkladaná štúdia bola schválená etickou komisiou UNLP dňa 10.07.2020.

*Táto práca bola finančne podporená projektom VEGA 1/0333/20.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bencsik, P, et al. MMP Activity Detection in Zymogram. Zymography (Methods and Protocols). 2017; 53-70.
- Charzewski L, Krzyško KA, Lesyng B. Structural characterisation of inhibitory and non-inhibitory MMP-9/ TIMP-1 complexes and implications for regulatory mechanisms of MMP-9. Nature. 2021; 11.
- Lukaszewicz-Zajac M, Mroczo B. Circulating Biomarkers of Colorectal Cancer (CRC)—Their Utility in Diagnosis and Prognosis. Journal of Clinical Medicine. 2021; 10:2391.
- Ricci S, et al. Substrate-zymography: a still worthwhile method for gelatinases analysis in biological samples. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2015; 54(8).
- Langers AM, et al. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. British Journal of cancer. 2012; 106(9): 1495-1498.



Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2021  
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu  
XVI. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2021

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 ISBN 978-80-972752-9-7**