

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2022

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

XVII. ročník

Košice, 10. a 11. november 2022

**Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný pamiatke
akademika Bod'u
10. a 11. november 2022
Košice**

Organizátori seminára:

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

doc. MVDr. Marián Prokeš, 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

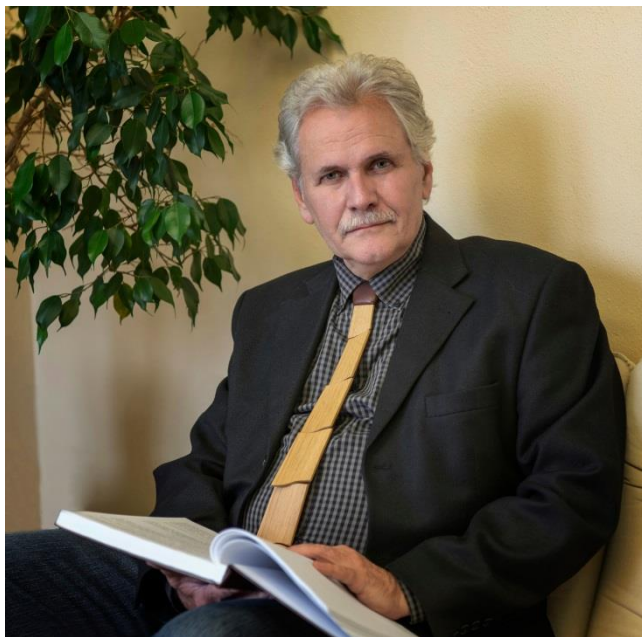


CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

doc. RNDr. Peter Javorský, DrSc.

* 25. septembra 1950 † 5. apríla 2021

Doc. Javorský bol najaktívnejším pracovníkom Ústavu fyziológie hospodárskych zvierat SAV vo vzťahu k Semináru doktorandov venovanému pamiatke akademika Boďu. Ako predseda hodnotiacej komisie sa od prvého ročníka zaslúžil o zvyšovanie kvality vedeckých prezentácií, ako aj celkovej vedeckej práce mladých vedeckých pracovníkov.



Na ÚFHZ SAV v Košiciach pôsobil od roku 1976 až do odchodu do dôchodku v roku 2020. Vo svojej vedeckej práci sa najprv venoval štúdiu výmenných procesov dusíkatých látok v bachore oviec, získané výsledky z tejto oblasti spracoval vo svojej kandidátskej dizertačnej práci, ktorú úspešne obhájil v roku 1985. Jeho ďalšia vedecká činnosť sa orientovala na oblasť molekulárnej genetiky bachorových mikroorganizmov, so zameraním na štúdium restriktívno-modifikačného systému bachorových baktérií, konštrukciu klonovacích systémov pre vybrané bachorové baktérie *S. bovis* a *S. ruminantium* a štúdium ich bakteriocínov, čím významne prispel k založeniu vedeckej školy orientovanej na štúdium genetiky a genomiky bachorových baktérií. Časť dosiahnutých výsledkov z tejto výskumnej činnosti spracoval vo svojej doktorskej práci, ktorú obhájil v roku 1997. Vďaka vynikajúcim výsledkom, ktoré dosiahol so svojím kolektívom, sa ÚFHZ SAV zaradil medzi popredné pracoviská vo svete v tejto problematike. Kolektív pod jeho vedením sa zapojil aj do viacerých medzinárodných projektov. Na sklonku života sa venoval najmä ochrane zdravia včiel pomocou probiotík, čo je oblasť výskumu s významným ekologickým a ekonomickým potenciálom v budúcnosti. Tento perspektívny smer výskumu sa pevne zakotvil a má svojich nasledovníkov, ktorí ho budú ďalej rozvíjať.

Doc. Javorský vchoval celý rad doktorandov, ktorí sú veľmi úspešní vo výskume, ako aj v pedagogickom procese na vysokých školách. Dlhé roky vykonával funkciu zástupcu riaditeľa ÚFHZ SAV a bol aj predsedom Vedeckej rady ÚFHZ SAV. V rokoch 2008 – 2009 bol členom Predsedníctva SAV, kde zastával funkciu predsedu komisie pre životné prostredie. Dlhodobou pôsobil ako externý učiteľ na katedre biochémie Prírodovedeckej fakulty UPJŠ a od roku 2009 aj na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. V roku 2002 bol habilitovaný na PF UPJŠ v Košiciach za docenta biochémie. Bol činný a aktívny organizátor vedeckého života v Košiciach i na celom Slovensku a srdcom spoločenského života na ÚFHZ SAV.

Češ' jeho pamiatke.

OBSAH

GENETICS AND GENOMICS OF PHA SYNTHESIS IN HALOPHILIC BACTERIA Adhvaryu S., Píknová M., Pristaš P.	9
ZHODNOTENIE <i>IN VIVO</i> INTERAKCIE BIOFILM-FORMUJÚCEHO KMEŇA <i>ENTEROCOCCUS HIRAE</i> Kr8B+ S ENTEROCÍNOM M V CHOVE BROJLEROVÝCH KRÁLIKOV Bino E., Mícnková L., Chrastinová Ľ., Kandričáková A., Plachá I., Pogány Simonová M., Lauková A.	12
MOŽNOSTI KONTINUÁLNEJ INTRAVENÓZEJ ANESTÉZIE U PSOVI KATEGÓRIE ASA III. Bočkay A., Trbolová A.	15
DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNEHO OCHORENIA ANOMÁLIA OKA KÓLIÍ (CEA) U PSOVI METÓDOU PCR Bučan J., Holečková B., Sedláková S., Galdíková, M.	18
ANOPLOCEFALIDÓZA U KONÍ NA SLOVENSKU: IMUNOLOGICKÁ DETEKCIA PROTI LÁTOK V SLINÁCH A KRVNOM SÉRE V POROVNANÍ S KOPROLOGICKÝMI DIAGNOSTICKÝMI TECHNIKAMI Burečáková Ľ., Königová A., Austin C., Lightbody K., Peczak N., Matthews J., Várady M.	21
PÔSOBENIE KŮRMNYCH ADITÍV V CHOVE HYDINY NA KONCENTRÁCIU ČREVNÝCH BAKTÉRIÍ A ANTIMIKROBIÁLNU REZISTENCIU Dančová N., Gregová G., Szabóová T.	24
HODNOTENIE ANGIOGÉNEHO POTENCIÁLU ACELULÁRNEHO PÓROVITÉHO BIOMATERIÁLU NA BÁZE POLYHYDROXYBUTYRÁTU A CHITOSANU POMOCOU KURACIEHO CAM MODELU Demčišáková Z., Luptáková L., Tirpáková Z., Kvasilová A., Medvecký Ľ., De Spiegelaere W., Petrovová E.	27
EXPERIMENTÁLNA APLIKÁCIA MUNDTICÍNU EM 41/3 V CHOVE KONÍ PLEMENA NORIK MURÁNSKY Focková V., Styková E., Valocký I., Bino E., Pogány Simonová M., Grešáková, Ľ., Lauková A.	30
KAROTICKÁ ENDARTEREKTÓMIA A JEJ VPLYV NA INDUKCIU ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE Furman M., Némethová M., Mačáková Ľ., Sihotský V., Kopolovets I., Virág M., Mucha R.	33
VZŤAH MEDZI FGF 23, SDMA, KREATINÍNOM, UREOU A FOSFOROM NA BÁZE CHRONICKÉHO RENALNÉHO ZLYHANIA OBLIČIEK U MAČIEK Grelová S., Karasová M., Tóthová C., Kisková T., Baranová D., Lukáč B., Fialkovičová M., Micháľová A., Kunay L., Svoboda M.	36
RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETROV PACIENTOV HOSPITALIZOVANÝCH NA INTERNOM ODDELENÍ V ROKOCH 2010 A 2021 Hrubá O., Massarová P., Žigová L., Vranecová K., Payer J., Jackuliak P., Kyselovič J., Gažová A.	39
ÚČINOK SEKRETÓMU HUMÁNNYCH MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK PUPOČNÍKA NA VIABILITU BUNKOVEJ LÍNIE SH-SY5Y Hudáková N., Petroušková P., Maloveská M., Humeník F., Mudroňová D., Dosedla E., Ballová Z., Bačenková D., Trebuňová M., Čížková D.	42

ČREVNÉ ENDOPARAZITY NA DOLNOM ZEMPLÍNE – EPIDEMIOLOGICKÁ A EPIZOOTOLOGICKÁ SITUÁCIA	
Ihnacik L., Šmigová J., Papajová I.	45
ŠTÚDIUM VARIABILITY <i>PAENIBACILLUS LARVAE</i> S VYUŽITÍM MALDI-TOF MS	
Ivorová S., Kopčáková A., Šalamúnová S., Javorský P., Sabo R., Legáth J., Píknová M., Pristaš P.	48
PÔDNE ROZTOČE ALPÍNSKEHO STUPŇA TATIER AKO MEDZIHOSTITELIA PÁSOMNÍC	
Jászayová A., Chovancová G., Hurníková Z.	51
VPLYV SFINGOIDNEJ BÁZY 2-EPI-JASPINU NA ADENOKARCINÓM KRČKA MATERNICE <i>IN VITRO</i>	
Kešľačková A., Nosálová N., Bago Pilátová M., Kello M.	54
ELEKTRICKÁ STIMULÁCIA AKO MOŽNOSŤ REGENERAČNEJ TERAPIE PRI TRAUMATICKOM POŠKODENÍ MIECHY	
Kokavcová M., Bačová M., Gálik J.	57
POTENCIÁLNE ANTIPROLIFERAČNÉ ÚČINKY NOVÉHO 3,5-DIARYLIZOXAZOLU	
Majirska M., Takáč P., Kello M., Kudličková Z.	60
MIKROKLÍMA A TOPOGRAFIA KRASOVÝCH ZÁVRTOV MAJÚ PODSTATNÝ VPLYV NA PÔDNE SPOLOČENSTVÁ CHVOSTOSKOKOV (<i>HEXAPODA, COLLEMBOLA</i>)	
Marcin M.	63
TAJOMNÉ B CHROMOZÓMY V KARYOTYPE HÁČIKOHLAVCA <i>ACANTHOCEPHALUS LUCII</i>: VPLYV PCB KONTAMINÁCIE?	
Marková A., Orosová M.	66
POROVNANIE SÉROVÝCH KONCENTRÁCIÍ VITAMÍNU D U PACIENTOV DISPENZARIZOVANÝCH NA INTERNEJ KLINIKE V ROKOCH 2019 A 2021	
Massarová P., Žigová L., Vranecová K., Hrubá O., Chomaničová N., Adamičková A., Valášková S., Payer J., Jackuliak P., Kyselovič J., Gažová A.	69
MONITORING VÝVOJA SILÁŽNEJ ZRELOSTI RÔZNYCH HYBRIDOV KUKURÍC	
Mitrik A., Mitrik T., Maskaľová I.	72
POTENCIÁLNE PROTINÁDOROVÉ ÚČINKY NOVÉHO SYNTETIZOVANÉHO PYROLIDÍNU V <i>IN VITRO</i> PODMIENKACH NA MODELI KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU	
Nosálová N., Bago Pilátová M., Kešľačková A., Kello M.	75
VPLYV MODULÁCIE VNÚTROBUNKOVÝCH SIGNÁLNYCH DRÁH NA AKTIVITU TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP A ÚČINOK FOTODYNAMICKEJ TERAPIE S HYPERICÍNOM	
Romanovová M., Jendželovská Z., Majerník M., Barčáková I., Jendželovský R., Fedoročko P.	78
OVERENIE RELEVANTNOSTI <i>IN VITRO</i> MODELOV POLARIZÁCIE MAKROFÁGOV NA ZÁKLADE TRANSKRIPTOMICKEJ ANALÝZY	
Ryniková M., Adamková P., Hradická P., Štofilová J., Demečková V.	81
DETEKCIA CHROMOZÓMOVÝCH TRANSLOKÁCIÍ METÓDOU FISH PO EXPOZÍCII MIKONAZOLU NA BOVINNÉ LYMFOCYTY	
Sedláková S., Schwarzbacherová V., Bučan J., Holečková B., Galdíková M.	84

VÝSKYT BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÍCICH KMEŇOV <i>STREPTOCOCCUS SALIVARIUS</i> V DENTÁLNÝCH BIOFILMOCH ĽUDÍ NA SLOVENSKU	
Sondorová M., Šurín Hudáková N., Kačírová J., Tamášová M., Kučera J., Maďar M.	87
MIKROBIOTA KOŽE PŤOV – ZLOŽENIE A MOŽNOSTI JEJ PROSPEŠNEJ MODULÁCIE	
Štempelová L.	90
“ZA TO MÔŽE LIŠAJNÍK!“ ALEBO ZMENY SPRÁVANIA LABORATÓRNYCH ZVIERAT PO PODÁVANÍ ATRANORÍNU	
Šimko P., Urbanská N., Leškaničová A., Kisková T.	93
TRANSPORT Mn CEZ EPITEL TENKÉHO ČREVA HYDINY POMOCOU <i>IN VITRO</i> MODELU USSING CHAMBER	
Tokarčíková K.	96
VÝSKYT <i>CLOSTRIDIODES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE</i> U HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTOV	
Toporová A., Čurová K., Lovayová V., Nagyová M., Siegfried L., Kamlárová A., Novotný M.	99
VPLYV METÓDY SPRACOVANIA VÝBEROVEJ KÁVY NA OBSAH BIOAKTÍVNYCH A AROMATICKÝCH LÁTOK	
Várady M., Tauchen J., Fraňková A., Klouček P., Popelka P.	102
POHYBOVÉ CHARAKTERISTIKY ROPUCHY ZELENEJ V URBÁNNOM PROSTREDÍ	
Vargová V., Balogová M., Gulyás K., Kaňuch P., Uhrin M.	105
ZMENY AKTIVITY SULFOTRANSFERÁZY 1A1 V SPOJITOSTI S KARCINÓMOM PROSTATY	
Vilčková M., Jurečeková J., Kliment J., Škereňová M., Híveš M., Dušenka R., Knoško Brožová M., Kmeťová Sivoňová M.	108
VPLYV KYSELINY ACETYLSALICYLOVEJ NA EXPRESIU PROTEÍNOV BAX A BCL-2 V ĽUDSKÝCH GINGIVÁLNYCH FIBROBLASTOCH	
Vranecová K., Chomaničová N., Adamičková A., Žigová L., Massárová P., Hrubá O., Kyselovič J., Gažová A.	111
ANALÝZA VÝSKYTU DEDIČNÝCH OČNÝCH OCHORENÍ NEMECKÝCH OVČIAKOV A ČESKOSLOVENSKÝCH VLČIAKOV NA SLOVENSKU	
Zubrický P., Trbolová A.	114
VPLYV EXPRESIE PROTEÍNOV VEGF-A A IGF-1 NA PROGNÓZU PACIENTOV S OCHORENÍM COVID-19	
Žigová L., Vranecová K., Massárová P., Hrubá O., Chomaničová N., Adamičková A., Valášková S., Kužma M., Jackuliak P., Payer J., Kyselovič J., Gažová A.	117

GENETICS AND GENOMICS OF PHA SYNTHESIS IN HALOPHILIC BACTERIA

Adhvaryu S., Píknová M., Pristaš P.

Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Pavol Jozef Safarik University in Kosice

ABSTRACT

Halophiles are salt loving microorganisms used in industrial biotechnology for degradation of toxic compounds or to produce enzymes, fermented food, and also polymers. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are important biopolymers having variety of applications in the production of disposable bioplastics, animal feed, biofuels as well as biomedical applications. Production of PHAs is challenging because of high production cost, poor thermal mechanical properties, microbial contamination, and unstable product quality and all these obstacles can be overcome by using halophilic bacterial strains. The PHA production was analysed in halophilic isolates from high salt environments in Central Europe. Isolates were identified as members of *Halomonas* and *Halovibrio* genera and PHA production was detected in 60% of isolates. Nile Blue A and Sudan Black B staining, Confocal microscopy and bright field microscopy were used to detect PHA micro granules in selected strains. Genetics and genomics of PHA production in two selected strains was analysed by whole genome analysis and both strains were found to encode for class I poly(R) hydroxyalkanoic synthase gene with similarity about 90% to known PHA genes but in different genomic background.

INTRODUCTION

Halophiles are salt loving microorganisms thriving in hypersaline environments. Halophiles require different amount of NaCl for their life and according to that they are classified into slight, moderate and extreme halophiles (Kaye et al., 2004). As a result of their special characteristics, halophiles can be used in many biotechnological industries to produce enzymes, polymers, fermented food, degradation of toxic compounds, etc. Recently, halophiles caught significant interest as a promising and cost-effective producer of polyhydroxyalkanoates (PHAs), specifically under stress conditions, such as lack of nutrients O, P, N, S, and in the presence of excess carbon source (Quillaguamán et al., 2006). PHAs contain (R)-hydroxyl fatty acid monomer units and can be categorized into 3 types according to carbon atom present in PHA monomer (Fig. 1) (Tan et al., 2014). Three enzymes are involved in the PHA biosynthesis: 3-ketothiolase (PhaA), Acetoacetyl-CoA by Acetoacetyl-CoA reductase (PhaB) and PHA synthase (PhaC). PHA Synthase (PhaC) is responsible for synthesis of PHA from R-3-hydroxyacyl-CoA (Obruca et al., 2020).

PHAs have diverse applications in the production of disposable bioplastics, animal feed, biofuels as well as biomedical applications (Tan et al., 2021). Plastic overuse and reduction in the amount of fossil fuels changes the focus of scientists in the direction of synthesis of bioplastics such as PHAs, as they are completely biodegradable, biocompatible, renewable and sustainable alternatives and thus the best substitute for conventional plastics (Gahlawat & Kumar Soni, 2019; Obruča et al., 2022). Existing PHAs produced by industrial biotechnology have some disadvantages like high production cost, poor thermal mechanical properties, microbial contamination and unstable product quality. To overcome these challenges, development of next-generation industrial biotechnology (NGIB) is necessary, and halophiles are the coming stars of it. Halophiles are capable to produce PHAs using inexpensive mixed substrates, seawater, open and continuous fermentation processes (Tan et al., 2021). That is why study of halophiles for the bulk production and cost effective PHAs is important.

MATERIALS AND METHODS

Halophilic bacteria examined in this study were isolated previously (Píknová, unpublished data) from the former salt mine Solivar near Presov. Preliminary assessment of PHA

accumulation in halophilic bacteria was performed via Nile Blue A and Sudan Black B staining. The minimal medium (MM) used for screening was as follows (% w/v): NaCl, 5; MgCl₂, 0.7; MgSO₄·7H₂O, 0.96; CaCl₂, 0.036; KCl, 0.2; NaHCO₃, 0.006; glucose, 2; agar, 1.5; yeast extract, 0.01.

Nile Blue A (NB) staining was performed as follows: 1 µg/ml of NB solution was also added in the MM media while preparing plates. Bacterial strains were inoculated and incubated for 4-5 days at room temperature and then tested under UV light for the fluorescence. For better assurance of result confocal microscopy was performed. Bacterial cell smears were prepared after heat fixing and stained with 1% NB solution for 10 min. The excess of stain was removed by water, smears were dried and observed under confocal microscope.

Sudan Black B (SB) staining was performed as follows: Bacteria were grown on solid MM media for 4-5 days followed by flooding the plates with 0.05% SB solution (in ethanol) for 30 min. The excess stain was removed by sterile saline and the color change of the colonies was observed. To watch it under bright field microscope, 100 µl of smear was prepared, heat fixed and stained with 0.05% SB for 10 min. Then the smear was flooded with xylene, counter stained with 0.5% safranin for 1 min, rinse with water and observed under 100x oil immersion lens. Type Strain Genome Server (TYGS) was used to identify closely relative species of our collection. Annotation of the genomic sequences of the studied halophiles was conducted using RAST (Rapid annotation using subsystem technology). Amino acid sequences of PhaC were also studied and compared with MEGA software.

RESULTS AND DISCUSSION

Multiple halophilic strains were obtained from Solivar brine near Presov, Solotvino Salt Lake in Ukraine and natural Oravska Polhora salt spring upon cultivation on TSA medium supplemented with 5% of NaCl. These strains were identified by performing 16S rRNA sequencing as *Halomonas* and *Halovibrio* spp.



Fig. 1 Plate method of PHA staining using Nile Blue A.



Fig. 2 Plate method of PHA staining using Sudan Black B.

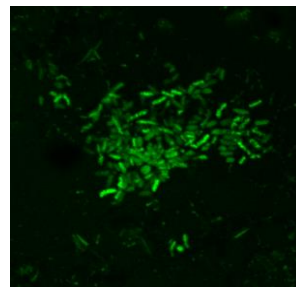


Fig. 3 PHA in confocal microscopy

To verify whether PHA metabolic gene is active or not, detection plate assay using NB and SB stains were performed. HP20-50 strain identified as *Idiomarina* sp. was taken as negative control. Positive strains for PHAs in NB staining showed bright red/orange fluorescence (Fig. 1) and in SB staining appeared as dark black color colonies (Fig. 2). Confocal microscopy showed bright fluorescence for the positive strains (Fig. 3). Overview of PHA production in tested isolates is summarised in Tab. 1.

Tab. 1 PHA production in species of *Halomonas* and *Halovibrio*

Species	Number of strains tested	Number of strains positive for PHA production
<i>Halomonas</i> sp.	16	12
<i>Halovibrio</i> sp.	1	1

To evaluate genomic background of PHA production draft of genome sequences of *Halomonas* (HP20-15) and *Halovibrio* (HP20-59) isolates were obtained by Illumina NGS Sequencing. PHA homologue in both the genomes were detected belonging to the class I of poly(R) hydroxyalkanoic synthases. Their genome was analysed using RAST which for the HP20-15 is 4,084,150bp in size and 3757 genes and for the HP20-59 it is 3,778,681bp in size with 3408 different genes. Genomic analyses indicate that the same gene is located in different genomic background in tested isolates. Our data confirmed that halophilic bacteria are promising PHA producer and possibly new poly(R) hydroxyalkanoic synthase genes were detected.

REFERENCES

- Gahlawat G, Kumar Soni S. Study on sustainable recovery and extraction of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) produced by *Cupriavidus necator* using waste glycerol for medical applications. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2019; 33:1, 99–110. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2018.1471>
- Kaye JZ, et al. *Halomonas neptunia* sp. nov., *Halomonas sulfidaeris* sp. nov., *Halomonas axialensis* sp. nov. and *Halomonas hydrothermalis* sp. nov.: Halophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal-vent environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004; 54:2, 499–511. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02799-0>
- Obruča S, et al. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. In *Biotechnology Advance*. 2022; 58 Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107906>
- Obruca S, et al. Novel unexpected functions of PHA granules. In *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020; 104:11, 4795–4810. Springer. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10568-1>
- Quillaguamán J, et al. Poly(β -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 38:1–2, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.05.013>
- Tan D, et al. Grand Challenges for Industrializing Polyhydroxyalkanoates (PHAs). In *Trends in Biotechnology*. 2021; 39:9, 953–963 Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.11.010>
- Tan GYA, et al. Start a research on biopolymer polyhydroxyalkanoate (PHA): A review. *Polymer*. 2014; 6:3, 706–754). *Molecular Diversity Preservation International*. <https://doi.org/10.3390/polym6030706>

ZHODNOTENIE *IN VIVO* INTERAKCIE BIOFILM-FORMUJÚCEHO KMEŇA *ENTEROCOCCUS HIRAE* Kr8B+ S ENTEROCÍNOM M V CHOVE BROJLEROVÝCH KRÁLIKOV

Bino E.¹, Micenková L.², Chrastinová L.³, Kandričáková A.¹, Plachá I.¹, Pogány Simonová M.¹, Lauková A.¹

¹Centrum biovied SAV v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

²Prírodovedecká fakulta, Recetox, Masarykova univerzita, Kotlářska 2, 611 37 Brno, Česká republika

³Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav živočíšnej výroby, Hlohovecká 2, Nitra-Lužianky, 951 41

ABSTRAKT

Pre brojlerové králiky je obdobie po odstave obdobím, ktoré sa vyznačuje zvýšenou náchylnosťou k ochoreniam. Preto bol v tomto experimente sledovaný dopad biofilm-formujúceho kmeňa *Enterococcus hirae* Kr8B+ z trusu králika na mikrobiotu, fagocytárnu aktivitu a rastové parametre. Zároveň bol sledovaný stav králikov po podaní Enterocínu M (produkovaný kmeňom *E. faecium* AL41=CCM8558, ktorého vlastnosti už boli testované v *in vitro* ako aj *in vivo* podmienkach) ako aj jeho účinok proti kmeňu Kr8B+ v rámci mikrobioty. Králiky (96, M91) po odstave vo veku 35 dní oboch pohlaví boli rozdelené do 4 skupín (24 zvierat v každej skupine, PS1-PS3 a KS). Boli kŕmené komerčnou kŕmnu zmesou pre rastúce králiky s prístupom k vode *ad libitum*. Králikom v PS1 sa podávalo 10⁸ CFU/ml kmeňa *E. hirae* Kr8B+ (500 µl/zviera/deň) Ent M (50 µl/zviera/deň) sa podával králikom v skupine PS2 a kombinácia oboch aditív sa podávala králikom v skupine PS3. Zároveň sa kontrolnej skupine KS nepodávalo žiadne aditívum. Odber vzoriek bol na 0./1. deň, 21. deň a 42. deň experimentu. Sekvenačná metóda analyzovala v truse králikov 8 kmeňov s vysokým % zastúpením: fylum Firmicutes bol detegovaný s najvyššou abundanciou v PS2, potom v PS1 a najnižšia abundancia bola v PS3. Zastúpené boli aj fylá Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Tenericutes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Saccharibacteria a Actinobacteria. Pri porovnaní pokusných skupín s KS na 21. deň boli zistené významné zvýšenia FA v PS1 a PS2. V PS2 pravdepodobne Ent M stimuloval FA. V skupine s Ent M bola zaznamenaná najvyššia živá hmotnosť. Experiment bol zameraný na získanie nových poznatkov z hľadiska možností ochrany zdravia potravinových zvierat.

ÚVOD

Mladé králiky sú v období po odstave často ohrozované napr. aj škodlivou mikrobiotou. Zvieratá sú v tomto období náchylné aj na gastrointestinálne ochorenia. Enterokoky sú kontroverzné baktérie, ktoré na jednej strane môžu spôsobiť infekcie u ľudí a zvierat, ale na druhej strane sú to baktérie, o ktorých je známe, že sú prospešné teda majú tzv. probiotický charakter a produkujú antimikrobiálne látky – bakteriocíny (Franz a kol., 2007; Hanch a kol., 2018). V súčasnej dobe bolo zaznamenané zvýšenie rezistencie baktérií na antibiotiká, najmä u baktérií formujúcich biofilm. Sľubný prístup k riešeniu tohto problému poskytujú bakteriocíny (antimikrobiálne proteínové substancie) s inhibičným účinkom proti viac či menej príbuzným baktériám (Nes a kol., 2014). Bakteriocíny boli už viackrát použité s priaznivým účinkom práve v chove králikov. Cieľom tejto štúdie bolo overiť *in vivo* interakciu Ent M (charakterizovaného v našom laboratóriu) s fekálnym, biofilm-formujúcim kmeňom *E. hirae* B+Kr8, ktorý obsahuje gén pre produkciu želatinázy (*gelE*) ako virulentného faktora, aby sme zistili, či je Ent M schopný redukovať počty *E. hirae* B+Kr8 a ako sa hostiteľský organizmus vysporiada s daným stavom. Tento cieľ bol koncipovaný podľa stratégie - zdravé potravinové zvieratá znamenajú bezpečné produkty živočíšneho pôvodu.

MATERIÁL A METODIKA

Experiment bol realizovaný v Národnom poľnohospodárskom a potravinárskom centre, Nitra-Lužianky (NPPC, Ústav výživy malých zvierat, Slovensko, schválený Etickou komisiou pre ochranu zvierat chovaných a používaných na vedecké účely a vzdelávacie účely) s využitím brojlerových králikov po odstave (96) vo veku 35 dní oboch pohlaví (mäsová línia M91). Králiky boli rozdelené do 4 skupín po 24 zvierat v každej skupine. Počas experimentu boli kŕmené komerčnou diétou pre rastúce králiky s prístupom k vode *ad libitum*. Králikom v skupine PS1 bol podávaný aj biofilm-formujúci kmeň *E. hirae* B+Kr8 (500 μ l na zviera a deň, 10^8 CFU/ml). Zvieratám v skupine PS2 sa podával Ent M (50 μ l na zviera a deň) a králikom v skupine PS3 sa podávala kombinácia oboch aditív v pitnej vode počas 21 dní. Od 22. dňa boli všetky zvieratá kŕmené iba štandardnou diétou. Experiment trval 42 dní. Králiky boli chované v štandardných klietkach a počas experimentu sa použil v hale cyklus 16 hodín svetla a 8 hodín tmy. Priemerná živá hmotnosť králikov na začiatku pokusu sa pohybovala od 994,17 do 1006,25g. Odber vzoriek trusu bol v deň 0/1 (zmesná vzorka od 96 králikov); na 21. deň a v deň 42 (vzorky 5 fekálnych zmesí z každej skupiny ($n=5$)). Na 21. a 42. deň boli zabitú 4 králiky z každej skupiny ($n=4$), pričom appendix a cékum boli tiež odobraté na štandardné mikrobiologické vyšetrenie. Enterokoky a kyselinu mliečnu produkujúce baktérie boli stanovené štandardnou mikrobiologickou riediacou metódou na médiách podľa ISO. Agarové platne sa inkubovali pri 37 °C počas 48 h. Počet baktérií bol vyjadrený v kolónie tvoriacich jednotkách na gram (CFU/g, log 10) \pm SD. Vzorky trusu z 21. dňa boli analyzované aj pomocou sekvenáčnej analýzy (NGS-next-generation sequencing). Krv odobratá z *vena auricularis* králikov v dňoch 0/1, 21. a 42. bola podrobená analýze na fagocytárnu aktivitu (FA). Sledované boli i rastové parametre do 83. dňa veku králikov, pričom boli týždenne sledované hmotnostné prírastky a telesná hmotnosť (sledovanie a vyhodnotenie uskutočnili kolegovia v Nitre - NPPC).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najvyššie hodnoty dosahoval kmeň *E. hirae* Kr8B+ v truse králikov zo skupiny PS1 ($3,81 \pm 0,91$ CFU/g log 10). Vysoké počty kmeňa *E. hirae* Kr8B+ boli aj u králikov skupiny PS3. Na 21. deň bol však zaznamenaný signifikantný pokles kmeňa Kr8B+ ($p < 0,01$) v skupine PS3 v porovnaní so skupinou PS1, čo navodzuje vysvetlenie, že Ent M preukázal inhibičný účinok proti kmeňu *E. hirae* Kr8B+. Na 21. deň boli celkové počty enterokokov takmer na rovnakej úrovni u všetkých králikov. Signifikantný nárast enterokokov sa zistil na 21. deň v porovnaní s dňom 0/1. ($p < 0,001$) a tiež so 42. dňom. Na 21. a 42. neboli počty kyselinu mliečnu produkujúcich baktérií (KMPB) ovplyvnené. Avšak pri porovnaní dní 0/1. a 21. bol zaznamenaný významný nárast KMPB ($p < 0,01$). KMPB v céku dosiahli na 21. deň až 5,29 CFU/g. Na 42. deň boli v céku zaznamenané nižšie počty kmeňa *E. hirae* Kr8B+, ako aj enterokokov a počet KMPB dosiahol takmer 10^4 CFU/g. Len v skupine PS3 bol zistený matematický pokles KMPB v porovnaní s králikmi v PS1, PS2 a KS. Počet enterokokov v appendixe bol najvyšší v PS1. Pri použití NGS mal fyllum/kmeň Firmicutes najvyššiu abundanciu u všetkých skupín králikov; 61,9 % v PS2, 57 % v PS1 a najnižšia abundancia bola v PS3 (47,4 %). V KS tvorili Firmicutes 56,9 %. Ostatné kmene, ako sú Verrumicrobia, Bacteroidetes, Tenericutes, Proteobacteria, Cyanobacteria, Saccharibacteria a Actinobacteria, boli detegované v malom %. Verrumicrobia boli najviac zastúpené v KS (17,2 %); v PS1 dosiahli 12,4 %; v PS2 a PS3 to bolo 8,6 % a 5,6 %. Zdá sa, že Ent M interaguje s touto mikrobiotou, keďže jej počty boli znížené. Najnižšie percento abundancie pre fyllum Bacteroidetes, Tenericutes, Cyanobacteria a Saccharibacteria bolo v PS3, čo naznačuje ich možnú interakciu s Ent M. Počty fyllum Actinobacteria neboli ovplyvnené. Fagocytárna aktivita (FA) v KS dosahovala takmer rovnakú hodnotu na 21. a 42. deň. Na 21. deň bola FA vyššia vo všetkých PS v porovnaní s KS. Pri porovnaní pokusných skupín s KS na 21. deň bol

zistený významný nárast FA v PS1 a PS2, ($p < 0,001$). V PS2 pravdepodobne Ent M stimuloval FA. Na konci experimentu bola najvyššia živá hmotnosť u králikov v PS2 ($2789,37 \pm 234,28$ g), kde bol aplikovaný Ent M. U králikov v PS1 dosiahla živá hmotnosť na konci experimentu $2745,56 \pm 271,80$ g a v KS to bolo $2630,0 \pm 226,08$ g.

Už bolo spomínané, že v období po odstavě sú králiky náchylnejšie na ochorenia. Práve preto je potrebné vedieť, ako môže organizmus králikov reagovať a aké sú možnosti eliminácie ochorenia alebo ich zmiernenia či predchádzania. Je známe, že Ent M má široký antimikrobiálny účinok proti viac či menej príbuzným baktériám. Použitím NGS analýzy bolo zaznamenané vysoké a dobre vyvážené % abundancie u králikov KS, PS1 a PS2, s najnižším % zastúpením mikrobioty v skupine PS3. V prípade kmeňa *E. hirae* Kr8B+ sa neprejavil výrazný nepriaznivý vplyv na králiky; Ent M indikoval trvalé zvýšenie FA na 42. deň a potenciálne podporujúcu imunitnú odpoveď u králikov proti kmeňu Kr8B+. Aj na základe údajov zo sekvenovania spočíva perspektívny význam tejto štúdie v indikácii a podpore podávania enterocínov na zníženie/prevenciu chorôb prostredníctvom inhibície ich prípadných pôvodcov.

Práca bola podporená projektom VEGA 2/0006/17 a VEGA 2/0005/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Costerton JW, Stewart PS. Battling biofilms. *Sci. Am.* 2001; 285: 74-81.
- Dicpinigaitis PV, De Aguirre M, Divio J. *Enterococcus hirae* bacteremia associated with acute pancreatitis and septic shock. *Case Rep. Inf. Dis.* 2015; ID123852, 3 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/123852>.
- Franz CHMAP, van Belkum MJ, Holzapfel WH, Abriouel H, Gálvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol. Rev.* 2007; 31: 293-310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.0004.x>.
- Hanch H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The Genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns-An update. *Fron.t Microbiol.* 2018; 9: 1791 doi: 10.3389/fmicb.2018.01791
- Nes IF, Diep DB, Moss, MO. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to nichecontrol. In *Enterococci from commensals to leading of drug resistant infection.* 2014; 1-34.

MOŽNOSTI KONTINUÁLNEJ INTRAVENÓZEJ ANESTÉZIE U PSOV KATEGÓRIE ASA III.

Bočkay A., Trbolová A.

Univerzitná veterinárna nemocnica - Klinika malých zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Celková anestézia geriatrických pacientov so súčasne prebiehajúcim systémovým ochorením predstavuje anestéziologickú výzvu. Pre lepší odhad výskytu perianestetických komplikácií vyvinula Americká spoločnosť anestéziológov hodnotenie pacientov na základe zdravotného stavu. Kategória ASA I. predstavuje zdravých pacientov, zatiaľ čo kategória ASA V. výrazne morbidných pacientov s vysokým rizikom úmrtia. Totálna intravenózna anestézia ako technika celkovej anestézie, ktorú možno využiť u kategórie ASA III. predstavuje výhodnú alternatívu k inhalačnej anestézii z viacerých hľadísk. V rámci udržiavania anestézie môže byť využitý dávkovací režim infúzie s konštantnou rýchlosťou, pri ktorom dochádza k eliminácii možných výkyvov plazmatickej koncentrácie anestetika a tým k redukcii výskytu nežiaducich účinkov alebo neadekvátnej hĺbky anestézie. Medzi vhodné skupiny anestetík z hľadiska kardiovaskulárnej depresie patria opioidy a benzodiazepíny, ktoré majú len nevýrazný vplyv na srdcovú frekvenciu a kontraktilitu myokardu. Alfa-2 adrenergne agonisty aj napriek ich výrazným sedatívnym účinkom nie sú vhodnou skupinou anestetík z dôvodu veľmi výrazného vplyvu na hemodynamiku organizmu.

ÚVOD

V poslednom období narastá počet geriatrických pacientov v praxi malých zvierat. Geriatrický vek však predisponuje pacientov k výskytu ochorení rôznych orgánových systémov. V niektorých situáciách je potrebné vykonať sedáciu alebo celkovú anestéziu aj u pacientov v geriatrickom veku so systémovým ochorením. Americká spoločnosť anestéziológov (ASA) vyvinula stupnicu na hodnotenia rizika spojeného s anestéziou vzhľadom na zdravotný stav pacientov. Pacienti zaradení do kategórie I. sú klasifikovaní ako zdraví, v dospelom veku, bez systémových ochorení a s nízkym rizikom perianestetických komplikácií. Naopak, pre pacientov kategórie ASA V. je charakteristický vážny život ohrozujúci zdravotný stav, ktorý si vyžaduje urgentnú chirurgickú intervenciu (torzia a dilatácia žalúdka, masívne abdominálne krvácanie, závažná polytrauma). Pre túto kategóriu je tiež charakteristické vysoké riziko vzniku perianestetických komplikácií a úmrtia. Kategória ASA III. predstavuje pacientov s dekompenzovaným systémovým ochorením, kedy je schopnosť organizmu kompenzovať vedľajšie účinky anestetík významne redukovaná. Výzvou pri anestézii tejto kategórie pacientov je vyvážiť negatívny vplyv daného ochorenia a nežiaduce účinky použitých anestetík tak, aby došlo k redukcii záťaže organizmu (najmä kardiovaskulárneho systému).

KONTINUÁLNA INTRAVENÓZNA ANESTÉZIA

Totálna intravenózna anestézia (TIVA) je technika celkovej anestézie, pri ktorej sa všetky anestetiká používané na indukciu a udržiavanie anestézie aplikujú iba intravenózne (Suarez a kol., 2012). TIVA má v porovnaní s inhalačnou anestéziou niekoľko výhod (Matthews, 2007). Medzi výhody totálnej intravenózne anestézie okrem iného patrí menšia kardiopulmonálna depresia a následne lepšie udržiavaný krvný tlak u pacienta v porovnaní s použitím inhalačných anestetík (White, 2015). Totálna intravenózna anestézia je založená na princípe rýchleho dosiahnutia efektívnej plazmatickej koncentrácie liečiva potrebnej na vyvolanie anestézie a jej udržiavanie (Dewangan a kol., 2016). V momente indukcie anestézie môže byť ďalej udržiavaná aplikáciou intermitentných bolusov krátkodobo pôsobiaceho intravenózneho anestetika. Pri použití prerušovaných bolusov má plazmatická koncentrácia

anestetika tendenciu oscilovať medzi vrcholmi (potenciálne spôsobujú zvýšený výskyt vedľajšie účinky, ako je apnoe alebo hypotenzia) a minimálnymi hodnotami (čo vedie k neadekvátnej hĺbke anestézie). Toto kolísanie plazmatickej koncentrácie anestetika vedie k nevyhovujúcej kvalite anestézie (Smith a kol., 1998). Ďalšou možnosťou udržiavania totálnej intravenózne anestézie je technika infúzie s konštantnou rýchlosťou (CRI). Tento dávkovací režim je používaný na aplikáciu konštantného množstva liečiva za určitú jednotku času (Grimm a kol., 2010). Technika CRI je vhodnejšia v porovnaní s intermitentnou aplikáciou bolusov, pretože je schopná stabilnejšie udržiavať plazmatickú koncentráciu v cieľovom terapeutickom rozmedzí a zároveň eliminuje vrcholy a minimá koncentrácie v plazme (Lucas a kol., 2001). Výsledkom je lepšia kvalita anestézie (Gepts, 1998).

ANESTÉZIA PACIENTOV KATEGÓRIE ASA III.

Takmer všetky anestetiká používané vo veterinárnej anestéziológii majú vplyv na kardiovaskulárny systém pacienta. V závislosti od zdravotného stavu je potrebné zvoliť vhodný anestéziologický protokol, aby došlo k redukcii stresu kardiovaskulárneho systému (Harvey a kol., 2007). Mimoriadne dôležitým krokom v procese anestézie je premedikácia, ktorá poskytuje sedáciu, analgéziu a zníženie indukčných a udržiavacích dávok anestetík (Grimm a kol., 2015). Redukciou úrovne stresu u pacientov sa minimalizuje uvoľňovanie katecholamínov, potencionálny vznik tachykardie a nadmerná myokardiálna záťaž (Rankin, 2015). Opioidy sú základom premedikácie, indukcie a udržiavania anestézie u pacientov so zhoršenou schopnosťou kompenzácie, pretože majú minimálne kardiovaskulárne účinky (Psatha a kol., 2011). Bradykardia je hlavným dôsledkom aplikácie opioidov (Lamont a kol., 2007), ktorú možno korigovať podaním alebo súčasťou premedikáciou anticholinergikami (Snyder a kol., 2015). Benzodiazepíny sú podobne vhodnou voľbou pre sedáciu tejto kategórie pacientov, pretože majú len minimálny účinok na srdcovú frekvenciu, kontraktilitu alebo vazomotorický tonus (Haskins a kol., 1986). Agonisty α -2 adrenergných receptorov spôsobujú po aplikácii intenzívnu periférnu vazokonstrikciu. S tým spojené zvýšenie systémovej vaskulárnej rezistencie vedie k výraznému zvýšeniu krvného tlaku a k baroreceptormi sprostredkovanej reflexnej bradykardii (Ringer a kol., 2013). Pri aplikácii α -2 adrenergných agonistov zvyčajne dochádza k redukcii srdcového výdaja. K tejto redukcii dochádza sekundárne v dôsledku zníženia srdcovej frekvencie v snahe organizmu udržať fyziologický krvný tlak pri zvýšenej systémovej vaskulárnej rezistencii (Grimm a kol., 2015). Aj keď sú α -2 adrenergné agonisty mimoriadne spoľahlivými sedatívami, vedľajšie kardiovaskulárne účinky sú natoľko výrazné, že v záujme hemodynamickej stability môže byť hĺbka anestézie obetovaná na úkor bezpečnosti (Snyder a kol., 2015). Propofol, ako anestetikum používané k indukcii a udržiavaniu anestézie je vhodný na použitie v režime infúzie konštantnou rýchlosťou (Zoran a kol., 1993). Hlavnou výhodou propofolu je rýchly nástup a krátke trvanie účinku po intravenózne aplikácii (Short a kol., 1999). Najvýraznejším kardiovaskulárnym účinkom aplikácie propofolu je zníženie arteriálneho krvného tlaku, zníženie systémovej vaskulárnej rezistencie a srdcového výdaja (Brusel a kol., 1989). Zatiaľ čo pacienti s miernym ochorením srdca môžu tolerovať hypotenziu vyvolanú propofolom, u pacientov so závažnejším ochorením kardiovaskulárneho systému má byť indukcia propofolom opatrná (Snyder a kol., 2015).

Táto práca vznikla vďaka podpore VEGA 1/0194/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brussel T, et al. Hemodynamic and cardiodynamic effects of propofol and etomidate: negative inotropic properties of propofol. *Anesth Analg* 1989; 69(1): 35–40.
- Dewangan R, Tiwari SK. Total Intravenous Anaesthesia (TIVA) in Veterinary Practice. *Intern Jou of Scie and Res* 2016; ISSN (Online): 2319-7064.
- Gepts E. Pharmacokinetic concepts for TCI anaesthesia. *Anaesthesia* 1998; 53 (Supplement), 4-12.
- Grimm A, et al. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*, 5th ed., Wiley Blackwell Publishing, 2015, ISBN 978-1-118-52623-1.
- Harvey RC, Ettinger SJ. Cardiovascular Disease. In: Tranquilli, W.J., Thurmon, J.C., Grimm, K.A. (eds.): *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4th ed. 2007, Blackwell Publishing, Ames, p. 891–898.
- Haskins SC, Farver TB, Patz JD. Cardiovascular changes in dogs given diazepam and diazepam-ketamine. *Am J Vet Res* 1986; 47(4):795–8.
- Lamont LA, Mathews KA. Opioids, nonsteroidal anti-inflammatories and analgesic adjuvants. In: Tranquilli WJ, Thurmon JC, Grimm KA, editors. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4th ed. 2007, p. 244. Ames: Blackwell Publishing.
- Lucas AN, et al. Comparison of the effects of morphine administered by constant rate infusion or intermittent intramuscular injection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218, 884– 891
- Mathews NS. Inhalant anaesthetics. In: Seymour C., Duke-Novakovski T. (editors). *BSAVA Manual of Canine and Feline Anaesthesia and Analgesia*. Second edition 2007, British Small Animal Veterinary Association, Gloucester p.150-155.
- Psatha E, et al. 2011. Clinical efficacy and cardiorespiratory effects of alfaxalone, or diazepam/fentanyl for induction of anaesthesia in dogs that are a poor anaesthetic risk. *Vet Anaesth Analg* 2011; 38(1):24–36.
- Rankin DC. Sedative and tranquilizers. In: Grimm KA, Lamont LA, Tranquilli WJ, Greene SA, Robertson SA, eds. *Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 5th edn 2015; Wiley Blackwell, Ames, IO: 196–206.
- Ringer SK, et al. Effects on cardiopulmonary function and oxygen delivery of doses of romifidine and xylazine followed by constant rate infusions in standing horses. *Vet J* 2013; 195(2):228–34.
- Short CE, Bufalari A. Propofol anesthesia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29(3):747–78.
- Smith I, White PF. Intravenous anaesthesia delivery and monitoring systems. *Total Intravenous Anaesthesia. Principles and Practice Series*. London, BMJ Books 1998; pp 98-127.
- Snyder L, Johnson R. *Canine and feline anesthesia and co-existing disease*, John Wiley & Sons, Inc., 2015, pp. 347, ISBN 978-1-118-28820-7.
- Suarez MA, et al. Comparison of alfaxalone and propofol administered as total intravenous anaesthesia for ovariohysterectomy in dogs. *Vet Anaesth Analg* 2012; 39: 236–44. doi: 10.1111/j.1467-2995.2011.00700.x.
- White K. Total and partial intravenous anaesthesia of horses. *Practice* 2015; 37(4), 189–197. doi:10.1136/inp.h1676.
- Zoran DL, Riedesel DH, Dyer DC. Pharmacokinetics of propofol in mixed-breed dogs and greyhounds. *Am J Vet Res* 1993; 54(5): 755–760.

DIAGNOSTIKA HEREDITÁRNEHO OCHORENIA ANOMÁLIA OKA KÓLIÍ (CEA) U PSOV METÓDOU PCR

Bučan J., Holečková B., Sedláková S., Galdíková, M.
Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Anomália oka kólií (CEA), taktiež nazývaná syndróm sklerálnej ektázie kólií je hereditárne ochorenie postihujúce prevažne kóliovité plemená. Hlavným klinickým príznakom je choroidálna hypoplázia a vznik kolobómov. U takto postihnutých jedincov nachádzame 7,8 kb deléciu v 4. intróne génu *NHEJ1*. V tomto výskume sme študovali 20 jedincov psov patriacich medzi kóliovité ale aj iné druhy plemien, keďže toto ochorenie sa môže zriedkavo vyskytnúť aj u nich. Za použitia jednoduchej PCR metódy s následnou elektroforetickou separáciou sme boli schopní presne určiť jednotlivé genotypy jedincov a ich genetickú predispozíciu na toto ochorenie. Na základe zistení bolo možné navrhnúť typy kríženia rodičovských jedincov s predpokladaným najnižším pomerom novonarodených postihnutých potomkov.

ÚVOD

Anomália oka kólií, taktiež nazývaná ako syndróm sklerálnej ektázie kólií, je dedične podmienená porucha zraku u psov. Prvý krát bola popísaná v roku 1953 (Magrane 1953). Ochorenie je spôsobené chybnou mezodermálnou diferenciáciou fibróznej a vaskulárnej tuniky v zadnej polárnej oblasti oka (Vít a Beránek 1994). U takto postihnutých jedincov môžeme pozorovať zmeny na tkanivách skléry, cievy, sietnice a optického disku (Bedford 1982). Ochorenie sa najčastejšie vyskytuje u kóliovitých plemien ako dlhosrstá a krátkosrstá kólia, borderská kólia a šetlandský ovčiak. Avšak bolo zaznamenané aj u iných plemien ako napríklad austrálsky ovčiak, dlhosrstý vipet, nemecký ovčiak, toy pudel, beagle a u niektorých krížencov (Bedford 1998).

MATERIÁL A METODIKA

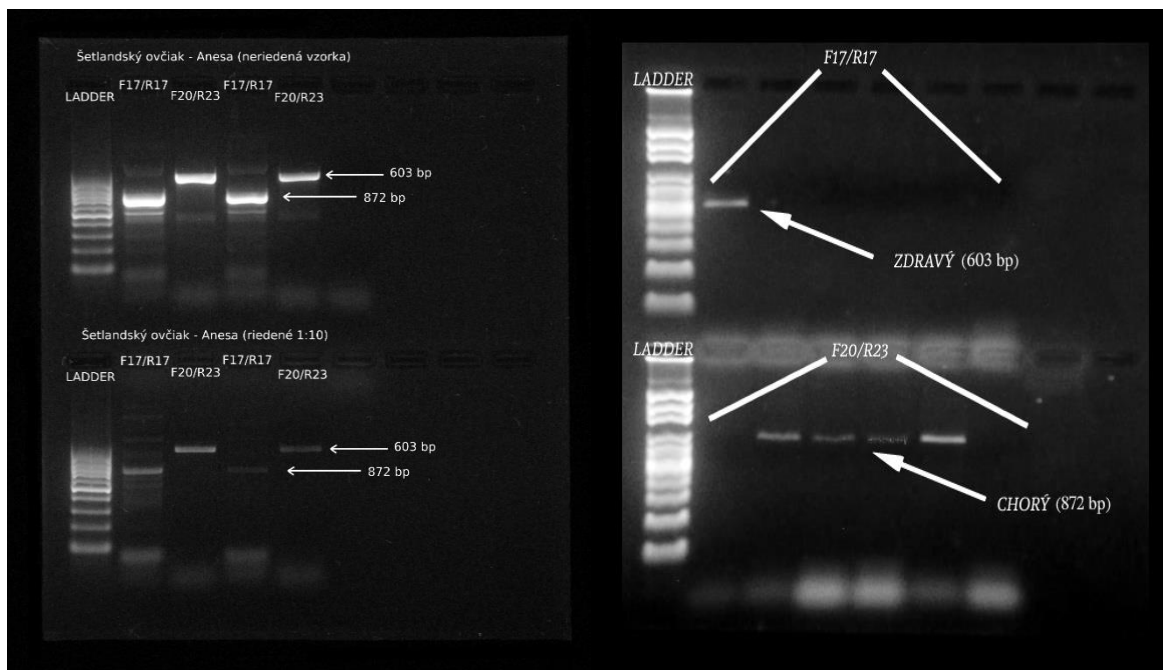
Od jednotlivých psov boli odobrané vzorky biologického materiálu. Používala sa buď invazívna metóda odberu vzorky krvi, alebo neinvazívna metóda sterov z bukálnej sliznice jedinca. Krv bola odobratá do sterilných skúmaviek s prídavkom antikoagulačného činidla kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA). Miesto odberu bola *vena cephalica antebrachii*, poprípade u menších druhov, u ktorých by nebolo možné odobrať požadované množstvo krvi z tejto vény, sa použila *vena jugularis*. Stery bukálnej sliznice sa vykonávali kefkami podľa priloženého návodu výrobcu (Genomia, Česká republika). Aby sa zamedzilo kontaminácii vzorky, vyšetrowaný jedinec nesmel v predchádzajúcich 15 minútach konzumovať žiadnu potravu alebo vodu. Ster po dobu 5 sekúnd s pravidelnou zmenou smeru pohybu po sliznici bol vykonaný bilaterálne za použitia dvoch kefiiek pre získanie dostatočného množstva epitelových buniek. Takto získané vzorky boli označené, sterilne uložené a prevezené do laboratória na vyšetrenie. Na izoláciu DNA z krvi bola použitá komerčná súprava (kit) ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Wisconsin USA). Rovnaká súprava bola použitá aj pri bukálnych steroch s menšími úpravami v protokole izolácie z dôvodu rozdielnej povahy vzorky. Interval inkubácie vzorky vo vodnom kúpeli bol predĺžený z pôvodných 10 minút na 30 minút pre zabezpečenie dôkladnej lýzy epitelových buniek. Získané vzorky DNA boli analyzované spektrofotometricky pre zistenie kvality a kvantity nukleových kyselín. Vzorky boli podrobené PCR reakcii za použitia komerčnej sady primerov (Eurofins Genomics, Nemecko), ktorá bola popísaná Parkerom a kol. (2007). Sada obsahuje dva páry primerov, a to primery pre amplifikáciu neporušeného úseku génu (*NHEJ1*-F17, 5'-TCTCACAGGCAGAAAGCTCA-3' a *NHEJ1*-R17, 5'-CCATTCATTCCTTTGCCAGT-3')

ako aj primery pre amplifikáciu mutovaného úseku s deléciou (*NHEJ1*-F20, 5'-TGGGCTGGTGAACATTTGTA-3' a *NHEJ1*-R23 5'-CCTTTTTGTTTGCCCTCAGA-3'). Tieto primery boli pridané do PCR reakčnej zmesi v množstve 0,625 µl pri koncentrácii 100 pM. Zmes bola vyšetrená v termocykleri, kde po iniciačnej denaturácii pri 95°C (2 min.) pokračovalo 35 opakovaní denaturácie pri 95°C (40s), hybridizácie pri 50°C (50s) a elongácie pri 72°C (90s). PCR bola ukončená konečnou syntézou pri teplote 72°C (5 min.). Amplikóny boli elektroforeticky separované v 1,5% agarózovom géli, pri elektrickom napätí 75V po dobu 60 – 65 minút.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amplikóny získané pomocou PCR reakcie a ich následnej separácii na agarózovom géle boli analyzované a na ich základe boli určené genotypy vyšetrovaných jedincov. Keďže sa jedná o monogénny typ dedičnosti, po vyšetrení jedinca pomocou oboch párov primerov vieme jednoznačne určiť genotyp jedinca. Pri zdravých jedincoch, ktorí sú genotypovo dominantní homozygoti (AA) nachádzame fragmenty len pri použití primerov F17/R17. Naopak ak sa jedná o jedincov postihnutých, genotypovo sú to recesívni homozygoti (aa) a fragmenty nachádzame len pri použití primerov F20/R23. V prípade že jedinec je prenášačom daného ochorenia (heterozygot Aa), nachádzame fragmenty amplikónov pri oboch pároch primerov. Skupina 20 psov zložená z plemien rodézsky ridgeback, labradorský retriever, borderská kólia, dlhosrstá kólia, šetlandský ovčiak, bavorský farbiar, francúzsky buldoček a bernský salašnícky pes bola postupne analyzovaná touto metódou. Aj keď ochorenie väčšinou postihuje kóliovité plemená, výnimočne sa môže vyskytnúť aj u iných plemien. Z toho dôvodu boli do výskumu zahrnuté aj iné plemená. U 15 jedincov nebola potvrdená mutácia v géne *NHEJ1* a fragmenty amplikónov sa na agarózovom géli objavili len pri použití primerov F17/R17, ktoré amplifikujú neporušený úsek génu (t.j. úsek bez mutácie). To potvrdilo fenotypový nález u týchto jedincov, keďže oftalmologicky nevykazovali žiadne zmeny. Jednalo sa hlavne o jedince nezaradené do kóliovitých plemien, ako aj dve borderské kólie a jedného šetlandského ovčiaka. Vzorky odobraté od rodinky dlhosrstých kólií (otec, matka a ich dvaja potomkovia–sučky) s oftalmologicky potvrdenou CEA boli vyšetrené rovnakou metódou. U celej rodiny sa objavili charakteristické fragmenty o veľkosti 872 bázových párov (bp), pri použití primerov F20/R23. Tento nález potvrdzuje prítomnosť delécie v 4 intróne génu *NHEJ1* (Obr. 1, vpravo). Pri vyšetrovaní vzorky od samice šetlandského ovčiaka, ktorá fenotypovo nevykazovala žiadne príznaky daného ochorenia, došlo ku vytvoreniu fragmentov pri použití oboch párov primerov (Obr. 1, vľavo). Tým sa jednoznačne potvrdil heterozygotný genotyp jedinca, charakteristický pre prenášačov tohto ochorenia. Genetická detekcia prenášačov je veľmi dôležitá z dôvodu že fenotypovo sa tieto jedince javia ako zdravé, no je pri nich riziko narodenia postihnutých mláďat. Keďže sa jedná o geneticky podmienené ochorenie, liečba nie je možná. V prípade výskytu kolobómov alebo odchlípeneia sietnice je možné indikovať transpupilárnu laserovú retinopexiu. Avšak túto metódu je možné použiť iba u jedincov, u ktorých ešte nedošlo ku úplnému oddeleniu sietnice (Gelatt 2013). Tento zákrok však iba zmierni príznaky ochorenia u daného jedinca, čo nič nemení na jeho schopnosti prenášať zmutovanú alelu na svoje potomstvo. V minulosti bola príčina ochorenia predmetom špekulácií. Až Parker a kol. (2007) jednoznačne potvrdili monogénny typ dedičnosti, kde príčinou bola prítomná delécia v 4 intróne génu *NHEJ1*. Na základe tohto zistenia je možné určiť jednoduché pravidlá kríženia takto postihnutých plemien s cieľom znížiť frekvenciu zmutovaných alel v ich populácii. Výskyt ochorenia u jednotlivých plemien je príliš vysoký. Yakely a kol. (1972) potvrdili CEA u 70-97% hruboa hladkosrstých kólií v USA. Rovnako Wallin-Hakanson a kol. (2000) pozorovali CEA u 68% hrubosrstých kólií vo Švédsku. Z tohto dôvodu je nemožné postihnuté jedince úplne vylúčiť s plemenitby. Je však potrebné genetické vyšetrenie jedincov pred ich zaradením do

plemenitby. Najideálnejšie by bolo kríženie dvoch zdravých jedincov, čiže dominantných homozygotov. Avšak to z dôvodu vysokej incidencie ochorenia CEA nie je možné. Preto na základe jednoduchšej Mendelovskej dedičnosti druhým najlepším modelom je kríženie zdravého jedinca (AA) s prenášačom (Aa), čo nám dáva štiepny pomer 1:1 (zdraví : prenášači). Z takéhoto kríženia nevznikne klinicky chorý jedinec.



Obr. 1. Elektroforetická separácia vzoriek od prenášačel'a (vľavo) a chorých jedincov (vpravo)

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0166/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bedford PG. Collie eye anomaly in the Lancashire heeler. *Vet Rec.* 1998;143(13):354-6.
- Bedford PG. Collie eye anomaly in the United Kingdom. *Vet Rec.* 1982;111(12):263-70.
- Gelatt KN. *Veterinary Ophthalmology*. Fifth Edition. Iowa, USA: WILEY-BLACKWELL, 2013. ISBN 978-0-4709-6040-0/2013.
- Magrane W.: Congenital anomaly of the optic nerve in Collies. *North Am. Vet.* 1953, 34: 646–647.
- Parker HG, et al. Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. *Genome Res.* 2007;17(11):1562-71.
- Vít PJ, Beránek J. *Praktická oftalmologie psa*. 1. vyd. Brno: Vydavateľstvo Medicus veterinarius, 1994, 89 s.
- Wallin-Håkanson B, Wallin-Håkanson N, Hedhammar A. Influence of selective breeding on the prevalence of chorioretinal dysplasia and coloboma in the rough collie in Sweden. *J Small Anim Pract.* 2000;41(2):56-9.
- Yakely WL, et al. Genetic transmission of an ocular fundus anomaly in Collies. *J Am Vet Med Assoc.* 1968;152(5):457-61.

ANOPLOCEFALIDÓZA U KONÍ NA SLOVENSKU: IMUNOLOGICKÁ DETEKCIA PROTILÁTOK V SLINÁCH A KRVNOM SÉRE V POROVNANÍ S KOPROLOGICKÝMI DIAGNOSTICKÝMI TECHNIKAMI

Burcáková Ľ.^{1,2}, Königová A.¹, Austin C.³, Lightbody K.³, Peczak N.³, Matthews J.³, Várady M.¹

¹Laboratórium terapie parazitárnych infekcií, SAV, Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, UVLF, Košice

³Austin Davis Biologics, Great Addington, Northamptonshire, UK

ABSTRAKT

Koprologická a sérologická štúdia na stanovenie prevalencie a rizikových faktorov infekcie pásomnicami *Anoplocephala* spp. bola vykonaná na 15 farmách východného a stredného Slovenska. Analyzované boli spárované vzorky trusu, krvného séra a slín (n=143) od koní vo veku 9 mesiacov až 28 rokov. Koprologické metódy, MiniFLOTAC a dvojitá centrifugačná / kombinovaná sedimentačno-flotačná metóda, boli porovnávané s ELISA analýzou vzoriek krvného séra a slín na stanovenie protilátok proti *Anoplocephala* spp. 12/13 kDa exkrečno/sekrečným (E/S) antigénom. Hodnoty 62%, 43% a 4% pre vzorky slín, krvného séra a trusu poukazujú na najvyššiu prevalenciu pásomníc v slinných vzorkách. Inovatívny EquiSal[®] Tapeworm Test Kit (Austin Davis Biologics, Ltd, Northamptonshire, UK) spoľahlivo stanovuje sérové IgG(T) protilátky na základe slizničnej imunitnej odpovede. Pomocou EquiSal[®] testu je možné diagnostikovať anoplocefalidózu v raných fázach infekcie pri nízkej parazitárnej infestácii, vyhnúť sa rozvoju klinických príznakov u infikovaných zvierat a odporučiť indikovaný terapeutický postup anticestodikami.

ÚVOD

Definitívna lokalizácia pásomníc *Anoplocephala* spp., klasifikuje anoplocefalidózu, ako príčinu vzniku kolík u koní. Diagnostické postupy opierajúce sa o koprologickú detekciu vajíčok sú v parazitologickej praxi najdostupnejšie, avšak nedokážu zachytiť infekciu pri absencii klinických príznakov. Nedostatočná citlivosť metód na detekciu počtu vajíčok v truse viedla k zavedeniu citlivejších imunologických diagnostických techník stanovujúcich hodnoty sérových IgG(T) protilátok (podtriedy IgG3 a IgG5). Určujúcimi faktormi presnosti koprologických, ako aj imunologických metód sú hodnoty citlivosti a špecificity. Použitím dostatočne citlivej a špecifickej metódy je možné detegovať nielen aktuálne prebiehajúcu infekciu, ale aj odporučiť použitie anticestodík, ako praziquantel a pyrantel pamoát, ktoré sú v súčasnosti dostupné ako jediné účinné látky v rámci antiparazitárnej terapie anoplocefalidózy (Jürgenschellert a kol. 2020; Lightbody, Davis a Austin 2016). Vzhľadom na uvedené aspekty, cieľom nášho príspevku bolo poukázať na rozdiely prevalencie anoplocefalidózy stanovenej koprologickými metódami, MiniFLOTAC a dvojitá centrifugačná / kombinovaná sedimentačno-flotačná metóda, v porovnaní s imunologickými, Horse Tapeworm ELISA z krvného séra a EquiSal[®] (Austin Davis Biologics, Ltd, Northamptonshire, UK) zo slinných vzoriek koní (Jürgenschellert a kol. 2020; Lightbody, Davis a Austin 2016).

MATERIÁL A METODIKA

Výskum bol realizovaný od októbra do decembra 2021 na 15 farmách koní v rámci východného a stredného Slovenska. Odobraný bol biologický materiál (krv, trus, sliny) od 143 koní vo veku 9 mesiacov až 28 rokov. V chovoch koní sa počet spárovaných vzoriek pohyboval od 4 do 18. V rámci doplňujúcich informácií bol zostavený anamnestický dotazník (iniciále, parazitárna anamnéza a antiparazitárny program) vyplnený počas konzultácie s majiteľom v deň odberu. Farmy koní boli vybrané na základe intervalu použitia anticestodík >4 mesiace. Na stanovenie prítomnosti vajíčok *Anoplocephala* spp. boli použité dve

koprologické diagnostické techniky, metóda MiniFLOTAC a dvojitá centrifugačná / kombinovaná sedimentačno-flotačná metóda (Jürgenschellert a kol. 2020). Rozbor vzoriek krvného séra bol uskutočnený Horse Tapeworm ELISA metódou a vzorky slín boli odobrané a analyzované testovacím kitom EquiSal[®] Tapeworm Saliva Test (Austin Davis Biologics, Ltd, Northamptonshire, UK) (Lightbody, Davis a Austin 2016).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

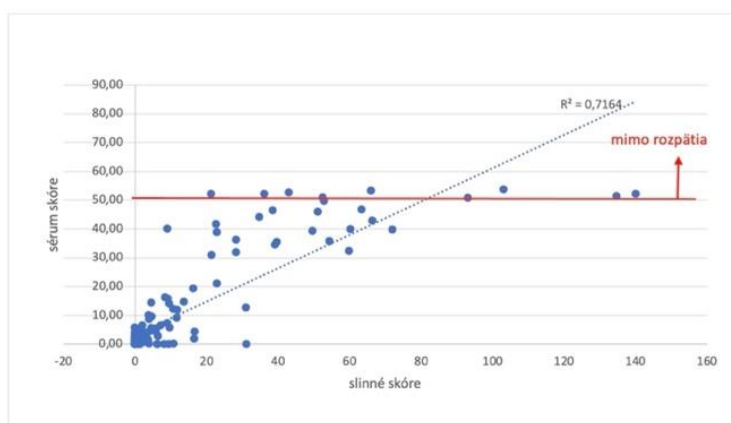
Hodnoty prevalencie anoplocefalidózy detegovanej koprologickými a imunologickými metódami sú zhrnuté v Tab. 1.

Tab. 1. Výsledky prevalencie sérologickej a EquiSal I[®] analýzy v porovnaní s koprologickými metódami. Hodnoty optickej denzity pre sérum skóre: <2,7 = negatívny; 2,7-6,3 = hraničný/pozitívny; >6,3 = pozitívny. Pre saliva skóre: <-0,09 = negatívny negatívny; 0,09-0,6 = hraničný/pozitívny; >0,6 = pozitívny

Farma	N	Saliva			Sérum ELISA			Koprológia – n / %P	
		Slinné skóre	n	% P	Sérum skóre	n	% P	MiniFLOTAC	DC/KS-F
1	10	-0,09-13,71	7	70	-0,20-14,79	5	50	negatívny	negatívny
2	10	-0,09	0	0	-0,79-3,46	0	0	negatívny	negatívny
3	10	2,64-71,98	10	100	0,93-42,99	8	80	negatívny	negatívny
4	5	-0,09-10,75	4	80	0,18-4,35	2	40	negatívny	negatívny
5	10	-0,09-6,11	4	40	-0,70-6,61	1	10	negatívny	negatívny
6	10	-0,09-31,08	7	70	-0,50-5,73	3	30	negatívny	negatívny
7	10	-0,09-2,75	5	50	-0,65-2,29	0	0	negatívny	negatívny
8	9	0,78-22,94	9	100	0,53-41,72	7	78	1 / 11	1 / 11
9	11	-0,09-4,55	4	36	-0,68-15,87	2	18	negatívny	negatívny
10	10	-0,09-0,83	2	20	-0,49-5,34	2	20	negatívny	negatívny
11	10	-0,09-4,63	4	40	-0,33-9,66	2	20	negatívny	negatívny
12	5	21,23-42,98	5	100	21,07-52,75	5	100	negatívny	negatívny
13	18	1,08-140,04	18	100	0,51-53,85	17	94	5 / 28	5 / 28
14	7	-0,09-59,86	6	86	-0,31-32,36	3	43	negatívny	negatívny
15	8	-0,09-10,71	4	50	-0,45-14,24	4	50	negatívny	negatívny
Celkový počet			89	62 %		61	43%	6 / 4 %	6 / 4 %

N = celkový počet vzoriek, n = počet pozitívnych vzoriek, %P = % prevalencie, DC/KS-F = dvojitá centrifugačná / kombinovaná sedimentačno-flotačná metóda

Výsledky prevalencie udávajú najnižšie hodnoty pri koprologickom stanovení (4%) bez ohľadu na typ použitej metódy. Tento fakt môže byť vysvetlený biológom vylučovania *Anoplocephala* spp. vajčiek a ich nerovnomernou disperziou v truse. Najvyššia hodnota 62% získaná zo slinného skóre je v súlade s údajmi validačnej štúdie od Lightbody a kol. (2016), kde sa zistilo, že na základe imunitných mechanizmov sú slinné testy najpresnejšie a dokážu diagnostikovať anoplocefalidózu v počiatočných fázach infekcie (Obr.1). Protilátky sa v slinách objavujú na základe slizničnej imunitnej odpovede, zatiaľ čo impulz na eleváciu protilátok do krvného obehu vzniká zo systémovej imunitnej odpovede. Rozdiely v prevalencii zo slinných a krvných vzoriek môžu byť vysvetlené prítomnosťou <20 pásomnic na miestach predilekčnej lokalizácie (tenké črevo, ileo-cekálna chlopňa). Z uvedeného dôvodu, pomocou stanovenia protilátok zo slín je zvýšená pravdepodobnosť zachytenia infekcie nízkej intenzity pred zahájením systémovej imunitnej odpovede, pričom nedôjde k rozvoju zápalových reakcií spojených s infekciou. Súčasťou výskumu bol aj prieskum parazitárnej anamnézy a manažmentu pastvy od majiteľov fariem (Tab. 2).



Obr. 1. Korelácia výsledkov analýzy vzoriek krvného séra a slín.

Tab. 2. Vybrané dáta antiparazitárnej anamnézy a manažmentu chovu

Farma	Frekvencia dehelmintizácie	Praziquantel použitie	frekvencia / rok	interval	Počet koní na farme	Veľkosť pastvy / kôň / ha
1	2x	áno	1x	1 rok	10	3
2	2x	áno	2x	4 mesiace	40	0,4
3	2x	áno	1x	6 mesiace	16	4
4	2x	nie	-	-	9	neznámy
5	3-4x	áno	1x	6 mesiace	20	0,9
6	2-4x	áno	neznámy	neznámy	12	0,7
7	2-4x	áno	1x	9 mesiacov	13	1,5
8	0-1x	nie	-	-	9	neznámy
9	2x	áno	2x	6 mesiacov	40	0,15
10	2x	áno	1x	10 mesiacov	14	neznámy
11	3-4 x	áno	-	-	30	0,6
12	2-3x	áno	1x	7 mesiacov	11	0,6
13	2x	áno	1x	7 mesiacov	56	1,8
14	2x	áno	1x	7 mesiacov	12	0,4
15	1x	neznámy	-	-	11	1

Podľa Jürgenschellert a kol. (2022), veľkosť pastvy a koncentrácia zvierat sú hlavnými rizikovými faktormi infekcie z dôvodu *per os* nákazy pôdnymi roztočmi Oribatidae. Kľúčovou informáciou bolo použitie praziquantelu a časový interval od jeho posledného použitia. Z dôvodu perzistencie postterapeutických protilátok v krvnom obehu (5 mesiacov) je dôležité zvážiť, ako postupovať pri monitoringu anoplocefalidózy. Po uplynutí tejto periódy sa zvyšuje predpoklad získania skutočného obrazu o aktuálne prebiehajúcej infekcii, ak uvažujeme diagnostiku EquiSal® testom. Z nášho výskumu vyplýva, že EquiSal® test je z diagnostického hľadiska najpresnejší, kvôli vysokej citlivosti pri terénnom prieskume.

Práca bola financovaná grantom VEGA 2/0090/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Jürgenschellert L, et al. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples. *Parasites & Vectors*. 2020; 13(1):1-10.
- Lightbody K, Davis J, Austin C. Validation of a novel saliva-based ELISA test for diagnosing tapeworm burden in horses. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016; 45(2):335-346.

PÔSOBENIE KŔMNYCH ADITÍV V CHOVE HYDINY NA KONCENTRÁCIU ČREVNÝCH BAKTÉRIÍ A ANTIMIKROBIÁLNU REZISTENCIU

Dančová N., Gregová G., Szabóová T.

Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo skúmanie vplyvu probiotík, humínových látok a ich kombinácie na výskyt fekálnych baktérií a antibiotikorezistentných *E. coli*. Z exkrementov brojlerových kurčiat bola zisťovaná mikrobiálna kontaminácia a z *E. coli* izolátov bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) na antibiotiká. Prídavkom humínových kyselín a probiotík došlo k miernemu zníženiu počtov baktérií v exkrementoch (o 1-2 logaritmickej rády). Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že prídavok probiotík a humínových látok u skúmaných kurčiat nemal vplyv na pokles antimikrobiálnej rezistencie u *E. coli* izolátov. Je však potrebné ďalšie skúmanie týchto látok na zistenie vhodnej dávky prídavku humínových látok a probiotík.

ÚVOD

Hydinársky priemysel predstavuje jeden z najväčších, rýchlo sa rozvíjajúcich a prosperujúcich priemyselných odvetví na svete. Problém však predstavuje pomerne vysoká spotreba antibiotík. Hydinári podávajú zvieratám antibiotiká pri terapii a prevencii infekčných ochorení a v minulosti sa používali aj pri stimulácii rastu (Muhammad a kol., 2020). Nadmerná a nesprávna aplikácia liečiv v živočíšnej produkcii prispieva k zvyšovaniu selekčného tlaku na baktérie, čo vedie k vzniku rezistencie voči účinkom medikamentov. Prítomnosť antibiotikorezistentných bakteriálnych kmeňov a rezíduí antibiotík v krmivách, živočíšnych produktoch a v prostredí môže ohroziť zdravie ľudí a zvierat (Roth a kol., 2019). Preto je v súčasnosti zvýšený záujem o skúmanie vhodných alternatív, čím by sa zachovala účinnosť antibiotík aj do budúcnosti. V chovoch hydiny sa antibiotiká najčastejšie nahrádzajú prírodnými aditívami, akými sú organické kyseliny, probiotiká, prebiotiká, fyto génné skupiny látok, enzýmy a ich deriváty (Mehdi a kol., 2018). Bolo preukázané, že v optimálnych množstvách a kombináciách zlepšujú kvalitu krmiva a dostupnosť živín, zvyšujú úžitkovosť, podporujú rast a zdravie zvierat a negatívne neovplyvňujú zdravie spotrebiteľov ani životné prostredie (Ayalew a kol., 2022).

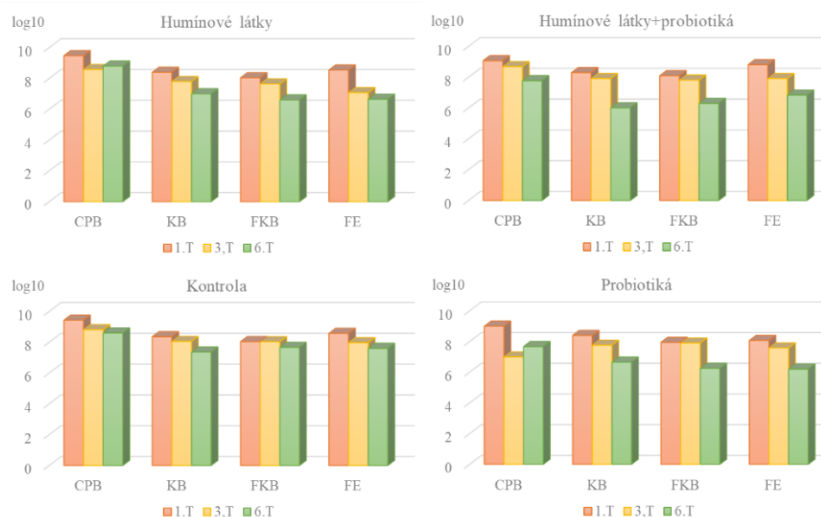
MATERIÁL A METODIKA

160 kusov jednodňových brojlerových kurčiat plemena ROSS 308 (Hydina Slovensko s.r.o.), bolo rozdelených do troch experimentálnych a jednej kontrolnej skupiny. Kurčatá boli chované po dobu 42 dní na podstielke za dodržiavania požiadaviek týkajúcich sa hygieny chovu, welfare, výživy a kŕmenia daného plemena. Prístup ku krmivu a vode bol *ad libitum*. Všetky skupiny boli kŕmené rovnakými základnými kŕmnymi zmesami BR, BR2 (od 11. dňa) a BR3 (od 28. dňa). Jedna skupina dostávala prídavok probiotického kmeňa *Limosilactobacillus fermentum* v dávke 1ml/kura/deň do vody. Druhá skupina mala v krmive pridávané humínové látky vo forme prípravku Humac Natur AFM Mycotoxsorb (Humac s.r.o., Košice) v koncentrácii 0,7 %. V tretej experimentálnej skupine boli s krmivom podávané humínové látky (Humac Natur AFM Mycotoxsorb v koncentrácii 0,7 %) a vo vode probiotický kmeň (*Limosilactobacillus fermentum*; 1ml/kura/deň). Vzorky exkrementov boli zriedené a naočkované na mäsopeptonový agar (celkové počty baktérií – CPB), endoagar (koliformné baktérie – KB a fekálne koliformné baktérie – FKB) a Slanetz-Bartley agar (fekálne enterokoky – FE). Minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) na 20 ATB u *E. coli* izolátov bola stanovená mikrodilučnou platničkovou metódou podľa Gattringera a kol. (2002)

a prostredníctvom automatizovaného diagnostického systému Bel-MIDITECH (Bratislava, Slovensko).

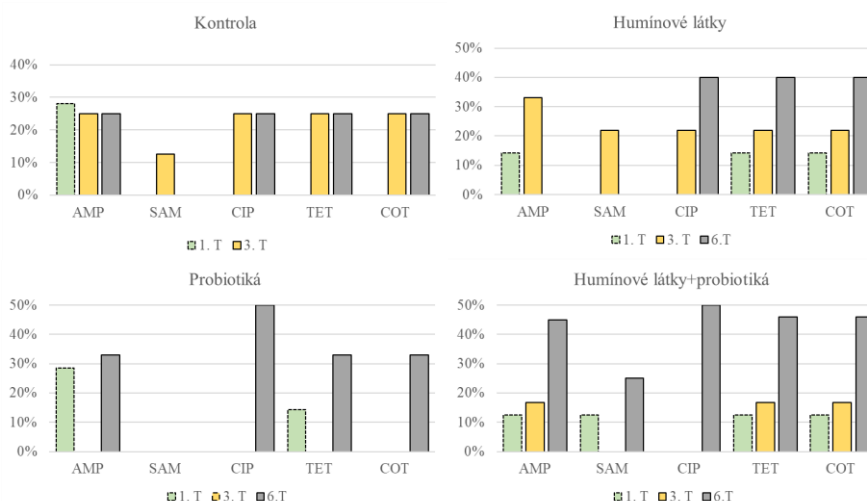
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V skupinách kurčiat kŕmených s prídavkom probiotík alebo s prídavkom humínových kyselín a probiotík došlo k najviditeľnejšiemu poklesu (o 2 log rády) všetkých skúmaných baktérií v exkrementoch (Obr. 1).



Obr. 1. Priemerná mikrobiálna koncentrácia v exkrementoch brojlerových kurčiat

Na základe našich výsledkov možno skonštatovať, že aplikácia probiotík, humínových látok ani ich kombinácie nemala účinok na zníženie antibiotickej rezistencie izolátov *E. coli*. Boli zistené len malé rozdiely v rezistencii *E. coli* kmeňov. Z 20 ATB bola zachytená rezistencia voči ampicilínu, ampicilínu so sulbaktámom, ciprofloxacínu, tetracyklínu a kotrimoxazolu (Obr. 2).



Obr. 2. Percentuálne vyjadrenie rezistencie *E. coli* izolovaných z exkrementov brojlerových kurčiat voči ATB

Viacere práce preukázali výhody probiotickej a humínovej suplementácie v chove hydiny. Obe priaznivo ovplyvňujú rast, hmotnostné prírastky, metabolizmus živín, morfológiu čriev a imunitnú odpoveď organizmu. Taktiež znižujú stres, hladiny toxínov a iných zdraviu škodlivých látok a potláčajú rast nežiadúcich mikroorganizmov (Zhang a kol., 2021; Arif a kol., 2019). Výsledky autorov na účinky humínových látok na črevnú mikrobiotu sú značne

odlišné. Niektorí autori popisujú ich pôsobenie na stabilizáciu mikrobiómu, nárast prospešných druhov baktérií a pokles patogénov (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus* spp.) znemožnením adhézie v organizme (Arif a kol., 2019). Iní naopak zaznamenali nárast baktérií, hlavne populácie *E. coli*. Tento jav pravdepodobne závisí od typu danej baktérie, ako aj od zloženia humínových substancií (Shermer a kol., 1998). Naše výsledky však preukazujú, že prídavok humínových látok do krmiva neznížil výskyt bakteriálnej populácie patogénnej *E. coli* v črevách kurčiat. HL tvorí po chemickej stránke aromatické jadro s alifatickými reťazcami a rôznymi funkčnými skupinami alebo mostíkmi (karboxylové, fenolické, enolové, chinónové, hydrochinónové, laktónové, éterové, alkoholové a v menšej miere aj dusíkové, sírové a fosforové) a tým sú schopné viazať polárne aj nepolárne zlúčeniny. Najpevnšie sa viažu toxické kovy, čím sa biogénny prvok v organizme využije a škodlivý sa stane neprístupným a z organizmu sa vylúči (Skokanová a Dercová, 2008). Tento mechanizmus slúži len na elimináciu škodlivých zlúčenín a nie aj na vyviazanie a vylúčenie patogénov z organizmu zvierat. Probiotiká podávané v chove hydiny majú okrem vyššie spomenutých pozitívnych vlastností, schopnosť vytlačiť a vylúčiť z gastrointestinálneho traktu patogénne baktérie (Bhogoju a Nahashon, 2022). Ako uvádza Ouwehand a kol. (2016) probiotiká sa nepodieľajú na šírení antibiotickej rezistencie a môžu ju až znižovať. Do akej miery je to možné je stále predmetom skúmania. Naše výsledky ukazujú, že aj pri podávaní probiotík bola zaznamenaná zvýšená rezistencia *E. coli* izolátov na ampicilín, ciprofloxacín, tetracyklíny a kotrimoxazol. Stúpajúcu rezistenciu izolátov *E. coli* sme zaznamenali aj u vzoriek kurčiat, ktorým bola podávaná kombinácia probiotík s humínovými látkami. Vzhľadom na neustále stúpajúci trend bakteriálnej rezistencie vo svete a na prítomnosť rezistentných baktérií v živočíšnych produktoch, je potrebné uskutočniť ďalšie skúmanie vhodných látok prírodného pôvodu vo výžive brojlerových kurčiat.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Muhammad J. et al. Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: a systematic review. *J Soils Sediments*. 2020; 20:486-497.
- Roth N. et al. The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*. 2019; 98:1791-1804.
- Mehdi Y. et al. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*. 2018; 4:170-178.
- Ayalew H. et al. Potential feed additives as antibiotic alternatives in broiler production. *Front. Vet. Sci*. 2022; 9:916473.
- Gattringer R. et al. Evaluation of MIDITECH automated colorimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother*. 2002; 49(4):651-659.
- Zhang L. et al. Supplementation of probiotics in water beneficial growth performance, carcass traits, immune function, and antioxidant capacity in broiler chickens. *Open Life Sciences*. 2021; 16 (1):311-322.
- Arif M. et al. Humic acid as a feed additive in poultry diets: a review. *Iran J Vet Res*. 2019; 20(3):167-172.
- Shermer C.L. et al. Caecal metabolites and microbial populations in chickens consuming diets containing a mined humate compound. *J. Sci. Food Agric*. 1998; 77:479-486.
- Skokanová M., Dercová K. Humínové kyseliny – pôvod a štruktúra. In *Chem. Listy*. 2008; 102:262-268.
- Bhogoju S., Nahashon S. Recent advances in probiotic application in animal health and nutrition: a review. *Agriculture*. 2022; 12(2):304.
- Ouwehand A.C. et al. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*. 2022; 48(4):246-255.

HODNOTENIE ANGIOGÉNNHO POTENCIÁLU ACELULÁRNEHO PÓROVITÉHO BIOMATERIÁLU NA BÁZE POLYHYDROXYBUTYRÁTU A CHITOSANU POMOCO KURACIEHO CAM MODELU

Demčišáková Z.¹, Luptáková L.², Tirpáková Z.², Kvasilová A.³, Medvecký Ľ.^{1,4}, De Spiegelaere W.⁵, Petrovová E.¹

¹Katedra morfológických disciplín, UVLF, Košice, Slovenská republika

²Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Košice, Slovenská republika

³Anatomický ústav, 1. lekárska fakulta UK, UK, Praha, Česká republika

⁴Ústav materiálového výskumu, SAV, Košice, Slovenská republika

⁵Laboratórium veterinárnej morfológie, GU, Merelbeke, Belgicko

ABSTRAKT

Chorioalantoická membrána (CAM) je vysokovaskularizovaná vtáčia extraembryonálna membrána používaná ako *in vivo* model na štúdium angiogenézy a jej inhibície v reakcii na tkanivá, bunky alebo rozpustné faktory. V posledných rokoch sa používanie CAM stáva integrálnou súčasťou procesu testovania biokompatibility pri vývoji inovatívnych materiálov určených pre regeneračné stratégie a aplikácie tkanivového inžinierstva. V predkladanej štúdií sme použili CAM test na hodnotenie angiogénneho potenciálu acelulárneho biopolyméru na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu (PHB/CHIT), ktorý je určený pre klinické použitie v oblasti regenerácie defektov tvrdých tkanív, v závislosti od pridania vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF-A), fyziologického roztoku (PHY) a inhibítora tyrozínkináz (SU5402). Na 7. embryonálny deň (ED) bol testovaný materiál implantovaný na CAM samostatne alebo s prídavkom VEGF-A, PHY alebo SU5402. Prítomnosť a tvorba ciev v póroch implantátu a v okolitej CAM bola analyzovaná 72 hodín po aplikácii materiálu markermi embryonálneho endotelu (WGA, SNA), myofibroblastov (α -SMA) a makrofágov (KUL-01). Morfológická a histochemická analýza ukázala silný angiogénny potenciál neošetreného biomateriálu v porovnaní s materiálom s angiogénnym faktorom VEGF-A a PHY. Najnižší angiogénny potenciál bol pozorovaný v materiáli po pridaní SU5402. Génová expresia proangiogénnych rastových faktorov (VEGF-A, ANG-A a VE-CAD) bola zvýšená v neošetrenom biomateriáli a indikovala proangiogénne prostredie. Dospeli sme k záveru, že PHB/CHIT má silný endogénny angiogénny potenciál a mohol by byť sľubným biomateriálom pri liečbe defektov tvrdých tkanív.

ÚVOD

Chorioalantoická membrána (CAM) je vysokovaskularizovaná extraembryonálna membrána, ktorá vzniká fúziou dvoch extraembryonálnych membrán, chorionu a alantoisu, na štvrtý deň embryonálneho vývinu (ED4; Valdes a kol., 2002). Predstavuje primárny respiračný a exkretčný orgán vtáčieho embrya, ktorý v priebehu embryonálneho vývinu zabezpečuje dýchanie embrya, transport sodíka a chloridu z alantoisu, ako aj transport kalcia z vajecnej škrupiny do embryonálnej vaskulatury. Podieľa sa na mineralizácii kostí, udržiava acidobázickú rovnováhu, formuje stenu alantoisového vaku kumulujúceho odpadové produkty exkrécie, a zabezpečuje reabsorpciu iónov a vody z alantoisu (Maina 2017). CAM v súčasnosti reprezentuje alternatívny modelový systém, ktorý predstavuje medzistupeň medzi jednoduchým modelom (*in vitro*) a komplexným systémom *in vivo* (hlodavce, veľké zvieratá). Uplatňuje sa pri štúdiu biologických procesov, experimentov pre tumorové transplantáty a toxicitu. Vďaka rozsiahlej vaskularizácii umožňuje sledovať priebeh angiogenézy, ktorá je odrazom tvorby cievnej siete. V posledných rokoch sa štúdium CAM kuracieho embrya stalo populárnym v rámci vedeckých štúdií v oblasti tkanivového inžinierstva, ktoré sú orientované najmä na využitie jej potenciálu pre štúdium biokompatibility materiálov. Biokompatibilita materiálu je skúmaná z hľadiska angiogénnej odpovede CAM vo vzťahu k implantovanému materiálu na základe makroskopického

a mikroskopického hodnotenia neovaskularizácie v mieste implantácie materiálu, resp. aplikácie testovanej látky alebo zmesi (Nowak-Sliwiska a kol., 2014). Neoangiogénny účinok sa prejaví prerastaním radiálne usporiadaných ciev v smere od štepu 72-96 hodín od stimulácie CAM (Baiguera a kol., 2012). V rámci štúdie sme hodnotili angiogénnu odpoveď CAM kuracieho embrya po implantovaní acelulárneho materiálu na báze polyhydroxybutyrátu a chitosanu, určeného pre klinické použitie v oblasti regenerácie tvrdých tkanív, ako nevyhnutného predpokladu stanovenia biologickej kompatibility.

MATERIÁL A METODIKA

Polyhydroxybutyrát-chitosanový kompozit (PHB/CHIT) bol pripravený podľa metódy Medvecký a kol. (2013). Na posúdenie biokompatibility a angiogénneho potenciálu testovaného materiálu na CAM sme použili modifikovanú metódu podľa Ribatti a kol. (2006). Na pokus boli použité oplodnené vajcia kury domácej (*Gallus gallus domesticus*, Lohmann Brown breed, $n = 194$), ktoré boli do laboratórnych podmienok prepravené z certifikovaného chovu Párovské Háje, Nitra, Slovensko. Vajcia boli očistené 70 % etanolom a umiestnené do liahne za štandardných inkubačných podmienok ($37,5 \pm 0,5$ °C, 60 % relatívna vlhkosť). Po 72. hodinách od začiatku inkubácie (ED3) boli vajcia vybrané z inkubátora za účelom vyklopenia embryí metódou *ex ovo*. Na ED7 bol testovaný materiál implantovaný na CAM samostatne alebo s prídavkom rastového faktora VEGF-A (aplikačná dávka 25 ng, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), fyziologického roztoku (PHY; Sodium Chloride 0,9 %) a inhibítora tyrozínkináz (koncentrácia 5 mM, SU5402, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Testované materiály sme vyšetrovali vo vzťahu biokompatibility k okolitým cievam CAM na ED10. Pre vizualizáciu vaskulárnej denzity a prerastania ciev CAM do materiálu bol použitý stereomikroskop Olympus SZ61 (Olympus, Tokyo, Japan) s kamerou (PROMICAM 3-3CP, Olympus, Tokyo, Japan). Počet ciev radiálne vrastajúcich do materiálu bol hodnotený v programe ImageJ (1.53e., National Institutes of Health, MD, USA). Vzorky PHB/CHIT s okolitou CAM boli fixované (Dent's) a následne histopatologicky a imunohistochemicky spracované. Morfometricky sme hodnotili počet a priemer ciev, ako aj hrúbku jednotlivých vrstiev CAM v štandardne používaných H-E rezoch. Tvorbu ciev v okolí a v póroch materiálu sme hodnotili markermi embryonálneho endotelu (WGA, SNA), myofibroblastov (α -SMA) a makrofágov (KUL-01). Génová expresia pro- a antiangiogénnych markerov bola hodnotená metódou PCR. Získané dáta sme analyzovali pomocou štatistického programu GraphPad Prism 9.3.1 (One-way ANOVA, Šidák's multiple comparisons test a Dunett's multiple comparisons test). Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm štandardná odchýlka (SD). Hodnoty $p < 0,05$ boli považované za štatisticky významné. Vtáčie embryá, ktoré boli použité v predkladanej štúdii ako *ex ovo* experimentálny model, sú vyňaté z legislatívy na ochranu zvierat používaných na vedecké účely (2010/63/EU).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chorioalantoická membrána vyvíjajúceho sa vtáčieho embrya predstavuje v súčasnosti ľahko dostupný a cenovo efektívny alternatívny modelový systém, ktorý je vďaka rozsiahlej vaskularizácii vhodný nielen ako experimentálny model na štúdium angiogenézy, ale aj na predklinické testovanie biokompatibility a funkčnosti materiálov (Baiguera a kol., 2012; Maina 2017). Umožňuje rýchly dôkaz prerastania krvných ciev do materiálu pred jeho testovaním v podmienkach *in vivo* na zvieratách, a hodnotí tak jeho regeneračnú schopnosť z hľadiska angiogenézy a biokompatibility (Mangir a kol., 2019). Biologickú kompatibilitu testovaného acelulárneho PHB/CHIT sme posudzovali na základe hodnotenia *in vivo* angiogénnej aktivity PHB/CHIT pomocou CAM modelu, v závislosti od pridania VEGF-A, PHY a SU5402. Morfologická a histochemická analýza ukázali vyšší angiogénny potenciál v neošetrenom materiáli ($77,51 \pm 3,31$ %) v porovnaní s materiálom s angiogénnym faktorom

VEGF-A ($74,70 \pm 4,06$ %) a PHY ($51,24 \pm 8,04$ %). Najnižší angiogénny potenciál bol pozorovaný v materiáli po pridaní SU5402 ($19,69 \pm 6,83$ %). Morfometrickou analýzou sme dokázali signifikantne vyšší počet ciev CAM v okolí neošetreného materiálu ($42,72 \pm 7,18$) v porovnaní s materiálom s VEGF-A ($31,44 \pm 5,07$), PHY ($33,22 \pm 1,11$) a SU5402 ($13,28 \pm 0,89$). Najviac zastúpenou skupinou ciev boli cievy s priemerom do $50 \mu\text{m}$. Hrúbka ektodermu CAM bola signifikantne nižšia v okolí materiálu s SU5402 ($9,91 \pm 4,33 \mu\text{m}$) v porovnaní s PHB/CHIT ($14,62 \pm 7,49 \mu\text{m}$). Hrúbka mezodermu v materiály s VEGF-A ($154,96 \pm 72,11 \mu\text{m}$) bola signifikantne vyššia a v materiály s SU5402 ($74,33 \pm 20,61 \mu\text{m}$) signifikantne nižšia v porovnaní s PHB/CHIT ($120,22 \pm 52,81 \mu\text{m}$). Markermi embryonálneho endotelu (WGA, SNA), myofibroblastov (α -SMA) a makrofágov (KUL-01) sme detegovali tvorbu ciev na povrchu ako aj v póroch materiálu. Prítomnosť endotelových buniek vo vnútri kompozitu je znakom biokompatibility a bioaktivity testovaného materiálu. Génová expresia pro- a antiangiogénnych markerov potvrdila histologické výsledky. Angiogénny účinok materiálov sa líši kvantitatívne v angiogénnej indukcii a kvalitatívne v bunkovej odpovedi (Oates a kol., 2007). Biomateriály sa líšia schopnosťou ovplyvniť angiogénnu odpoveď CAM predovšetkým na základe rozličnej povrchovej aktivity, ako aj odlišných fyzikálno-chemických charakteristík. Niektoré materiály (homogénne) pôsobia angiogénne, čím tvorbu nových ciev podporujú, iné (nehomogénne) môžu pôsobiť antiangiogénne, čo sa prejaví inhibičným účinkom na tvorbu nových ciev (Zwaldo-Klarwasser a kol., 2001). Z dôležitých chemických charakteristík, ktoré ovplyvňujú biokompatibilitu a angiogénny potenciál testovaného materiálu, je rozhodujúca pórovitosť. V našom prípade mal testovaný pórovitý materiál PHB/CHIT z 90 % veľkosť pórov do $30 \mu\text{m}$ (Giretová a kol., 2019). Detekcia zmien v procese angiogenézy robí z CAM modelu vhodný modelový systém pre rýchly skrining biokompatibility poréznych materiálov špeciálne navrhnutých pre oblasť tkanivového inžinierstva pred ich použitím na vyšších experimentálnych zvieratách.

Práca bola podporená projektom APVV 20-0073 a VEGA 1/0050/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baiguera S, Macchiarini P, Ribatti D. Chorioallantoic membrane for In vivo investigation of tissue-engineered construct biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2012; 100:1425-1434.
- Giretová M. et al. Polyhydroxybutyrate/Chitosan 3D Scaffolds Promote In Vitro and In Vivo Chondrogenesis. *Appl Biochem Biotech.* 2019; 189:556-575.
- Maina JN. Structure and Function of the Shell and the Chorioallantoic Membrane of the Avian Egg: Embryonic Respiration. 2017; Springer International Publishing, New York.
- Mangir N. et al. Using ex Ovo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay to Evaluate the Biocompatibility and Angiogenic Response to Biomaterials. *ASC Biomater. Sci. Eng.* 2019; 5:3190-3200.
- Medvecký L. et al. Properties and in vitro characterization of polyhydroxybutyrate-chitosan scaffolds prepared by modified precipitation method. *J Mater Sci: Mater Med.* 2013; 25:777-789.
- Nowak-Sliwinska P, Segura T, Iruela-Arispe ML. The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis.* 2014; 17:779-804.
- Oates MR. et al. The angiogenic potential of three-dimensional open porous synthetic matrix materials. *Biomaterials.* 2007; 28:3679-3686.
- Ribatti D. et al. The gelatin sponge-chorioallantoic membrane assay. *Nat Protoc.* 2006; 1:85-91.
- Valdes TI, Kreutzer D, Moussy F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62:273-282.
- Zwaldo-Klarwasser G. et al. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *J Mater Sci: Mater Med.* 2001; 12:195-199.

EXPERIMENTÁLNA APLIKÁCIA MUNDTICÍNU EM 41/3 V CHOVE KONÍ PLEMENA NORIK MURÁNSKY

Focková V.¹, Styková E.², Valocký I.², Bino E.¹, Pogány Simonová M.¹, Grešáková, L.¹,
Lauková A.¹

¹Centrum biovied SAV v.v.i. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Uplatňovanie prospešných baktérií v chove koní je pomerne neznámou oblasťou a už vôbec neznámou je aplikovanie bakteriocínov. Avšak chovatelia sa dožadujú inovácií pre udržiavanie zdravého statusu v chovoch koní. V našich predchádzajúcich experimentoch boli zaznamenané povzbudivé výsledky po aplikácii kmeňa *Enterococcus faecium* EF 412 a jeho enterocínu u koní plemena slovenský teplokrvník. Rozhodli sme sa preto pre aplikačné overenie účinku nového bakteriocínu-mundticínu EM41/3, t. j. substancie s antimikrobiálnou aktivitou produkovaného autochtónnym kmeňom *E. mundtii* EM41/3 z trusu zdravého koňa plemena norik muránsky na mikrobiotu a niektoré ďalšie parametre. Počty enterokokov a stafylokokov poklesli len u niektorých jednotlivých koní. Avšak, zaznamenaná bola redukcia koliformných zárodkov a pseudomonád (matematický rozdiel 0,76-1,20 logaritmickeho cyklu). Podávanie mundticínu nevyvolávalo oxidačný stres. Ostatné parametre sú v procese vyhodnocovania.

ÚVOD

Zo strany chovateľov hospodárskych, ale i spoločenských zvierat čoraz viac narastá záujem o praktické využitie prospešných substancií produkovaných baktériami. Ide o bioaktívne substancie, ktoré sú ľahko dostupné, účinné, neškodné, prírodného charakteru, čo chovatelia radi uvítajú pre zachovanie dobrého zdravotného stavu zvierat. V chovoch hospodárskych, ale aj spoločenských zvierat sa takéto prospešné (probiotické) baktérie používajú ako doplnky výživy (Cooke a kol., 2021). Medzi tieto prospešné baktérie patria aj enterokoky (rod *Enterococcus*, kmeň/fylum Firmicutes). Na jednej strane sú 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 - enterocínov. Ich priaznivý vplyv bol zaznamenaný u rôznych zvierat; napr. u brojlerových králikov, hydiny, či psov (Lauková a kol., 2003, 2012, 2015, 2018, 2020; Szaboová a kol., 2011; Pogány Simonová a kol., 2013, 2020; Kubašová a kol., 2020). Stále však existujú obmedzené informácie týkajúce sa použitia prospešných kmeňov a bakteriocínov u koní. Lauková a kol. (2020) popisali po podávaní neautochtóneho kmeňa kmeňa *Enterococcus faecium* AL41=CCM 8558 (produkuje Ent M) redukciu aeromonád a zvýšenie fagocytárnej aktivity. Po podávaní Ent M bol zaznamenaný aj pokles koliformných zárodkov (Lauková a kol., 2018). Vzhľadom na vyššie zmieňovanú skutočnosť bola táto štúdia zameraná na testovanie a overenie prospešného účinku novej bakteriocínovej substancie-mundticínu EM41/3 produkovanej autochtónnym kmeňom *Enterococcus mundtii* EM 41/3 v chove koní.

MATERIÁL A METODIKA

Autochtónný kmeň *E. mundtii* EM 41/3 (izolovaný z trusu norika muránskeho) bol naočkovaný do MRS bujónu (De Man-Rogosa-Sharpe, Merck, Nemecko). Po 6-7 hodinovej kultivácii pri teplote 37°C bola bujónová kultúra centrifugovaná pri 10 000 x g 30 minút. K supernatantu bol pridaný chelaton-EDTA III. Supernatant bol vystavený teplote 80°C po dobu 10 minút na zničenie nežiaducich látok. Takto upravená kultúra bola následne precipitovaná síranom amónnym pri teplote 4°C počas 18 hodín (40% saturácia). Získaný precipitát bol resuspendovaný v minimálnom objeme fosfátového pufru (10 mM, pH 6,5). Inhibičná aktivita bola testovaná metódou podľa de Vuysta a kol. (1996) proti hlavnému

indikátorovému kmeňu *Enterococcus avium* EA5 a proti kmeňu *Listeria monocytogenes* LMP 7223 (Štátny veterinárny ústav Olomouc, Česká republika). Do experimentu bolo zahrnutých 13 klinicky zdravých koní-kobýl plemena Norik Muránsky rôzneho veku (n=13). Zvieratá boli ustajnené v maštali, kŕmené senom, dostávali tiež ovos alebo sa pásli na pastve. Mali prístup k vode *ad libitum*. Experiment trval 42 dní a bol schválený Etickou komisiou ako aj príslušnými štatutármi a veterinárnym lekárom. Odber vzoriek bol realizovaný na začiatku experimentu pred aplikáciou mundticiínu EM41/3 (deň 0/1.), na 21. deň (3 týždne aplikácie mundticiínu EM 41/3) a na konci experimentu (21. deň po ukončení aplikácie mundticiínu EM 41/3). Dávka pre každého koňa bola 100 µl mundticiínu EM 41/3 v boluse z krmiva denne, po dobu 21 dní. Odoberali sa vzorky trusu z recta pre zistenie počtov baktérií a krv z *vena jugularis* na biochemickú analýzu (glutathion peroxidáza - GPx) a ostatné parametre. Na určenie GPx bola heparizovaná krv testovaná pomocou komerčného kitu Randox (Anglicko). Vzorky boli okamžite ošetrené a/alebo odložené na príslušnú analýzu. Ako kontrolné zvieratá si slúžili kone samotné, teda každý kôň slúžil ako kontrolné zviera každému vzorkovaniu. Ich stav na začiatku experimentu (deň 0/1) sa porovnal s ich stavom po podávaní mundticiínu, a potom po 21 dňoch od ukončenia jeho podávania. Vzorky trusu (1g) z každého koňa boli ošetrené štandardnou mikrobiologickou metódou - riedenie v Ringerovom roztoku (Merck, Nemecko), v pomere 1: 9, pH 7,0; homogenizované pomocou Stomacher IUL (Instruments, Španielsko) podľa Medzinárodnej organizácie pre štandardizáciu. Média boli kultivované pri teplote 37 °C a pri laboratórnej teplote počas 24-48 hodín. Počty baktérií boli vyjadrené v (log 10) jednotkách tvoriacich kolónie na gram (KTJ/g) ± SD. Na štatistické vyhodnotenie bol použitá „one-way“ analýza (ANOVA) a Tukey post-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počty enterokokov u jednotlivých koní boli pred podávaním mundticiínu EM41/3 vyrovnané a dosahovali v priemere 5.65 ± 0.38 KTJ/g (log 10). Na 21. deň poklesli počty enterokokov u 3 koní oproti odberu v deň 0/1; u koňa č. 6 (8-ročná kobyľa) bol rozdiel 2,36 log cyklu, u koňa č. 9 (7-ročná kobyľa) bol tento rozdiel 1,7 log cyklu a u koňa č. 13 (7-ročná kobyľa) bol rozdiel až 2,68 log cyklu. To znamená, že aj keď v priemernom vyhodnotení sa neprejavil inhibičný účinok mundticiínu EM41/3 na enterokoky, u 3 koní došlo ku inhibičnému účinku. Na 42. deň boli počty enterokokov opäť vyrovnané a u koní č. 6, 9 a 13 dosiahli takmer iniciačné hodnoty. U koní č. 11 a 12 bola však na 42. deň (aj napriek tomu, že na 21. deň sa pokles nepreukázal) zaznamenaná redukcia enterokokov s matematickým rozdielom 2,56 log cyklu (kôň č. 11) a u koňa č. 12 bol rozdiel 1,92 log cyklu. Celkové počty stafylokokov na deň 0/1. dosiahli v priemere 3.90 ± 0.97 KTJ/g a ich počty neboli ovplyvnené mundticiínom EM 41/3. Avšak, u koní č. 1, 2, 7 a 8 a 12 boli zistené nižšie počty na 42. deň (teda 3. týždne od nepodávania) než to bolo na 21. deň (kedy boli nezmenené). Usudzujeme na tzv. prolongovaný účinok mundticiínu EM 41/3. Počty KMPB boli vysoké ($6,68 \pm 0,50$) na deň 0/1. ako aj na 21. deň a 42. deň. K ich poklesu došlo len u koňa č. 6 (2,54 log cyklu) a č. 9 (2,18 log cyklu) ako j u koňa č. 13 (1,29 log cyklu) na 21. deň. Počty koliformných zárodkov boli na 0/1. deň u jednotlivých koní vyrovnané a dosiahli v priemere $5,78 \pm 0,40$ KTJ/g (log 10). Mundticiín EM 41/3 prejavil inhibičný účinok na koliformné zárodky, keď na 21. deň bola zaznamenaná ich redukcia o 1,20 log cyklu oproti dňu 0/1. Skutočnosť, že redukcii spôsobil mundticiín potvrdzuje aj fakt, že na 42. deň, teda keď sa už mundticiín nepodával, sa počty koliformných zárodkov zvýšili o 1,31 cyklu oproti 21. dňu a boli vyššie než na deň 0/1. Podobne vysoké a vyrovnané boli aj počty *Pseudomonas* spp., v priemere $5,73 \pm 0,39$ KTJ/g. Na 21. deň bol zaznamenaný pokles pseudomonád oproti dňu 0/1. o 0,76 log cyklu a opäť môžeme hovoriť o inhibičnom účinku mundticiínu, keď na 42. deň, teda 3. týždne po nepodávaní, boli počty pseudomonád vyššie než v deň 0/1. Lauková a kol. (2018) publikovali

redukciu koliformných zárodkov, kampylobakterov a klostríí po aplikácii Ent M u koní rôzneho plemena ($p < 0,05$). Podávanie mundticínu nevyvolávalo oxidačný stres, keďže na 21. deň boli namerané nižšie hodnoty GPx ($129,5 \pm 40,12$ U/g Hb) než v deň 0/1. ($205,6 \pm 10,32$ U/g Hb), a potom na 42. deň sa opäť tieto hodnoty zvýšili ($168,3 \pm 39,23$ U/g Hb), teda došlo ku signifikantnému poklesu ($p < 0,0001$). Ostatné parametre sú vo vyhodnocovaní. Jedná sa o originálne výsledky ako z hľadiska možnosti mundticínu EM 41/3 a hlavne o jeho potenciálnom využití v chove koní. Pokračujeme v ďalších testovaniach.

Práca bola podporená projektom (Doktograf) APP0253 (2022).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cooke CG, Gibb Z, Harnett JE. The safety, tolerability and efficacy of probiotic bacteria for equine use. *J Equine Vet Sci* 2021; 99.
- 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.
- Kubašová I, et al. Bacteriocin production and distribution of bacteriocin-encoding genes in enterococci from dogs. *Int J Antimicrob Agents*. 2020; 55.
- Lauková A, et al. Reduction of *Salmonella* in Gnotobiotic Japanese Quails Caused by the Enterocin A-producing EK13 Strain of *Enterococcus faecium*. *Vet Res Commun*. 2003; 27: 275–280.
- Lauková A, et al. *Enterococcus faecium* AL 41: Its enterocin M and their beneficial use in rabbits husbandry. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012; 4: 243–249.
- Lauková A, Kandričáková A, Ščerbová J. Use of bacteriocin-producing, probiotic strain *Enterococcus faecium* AL41 to control intestinal microbiota in farm ostriches. *Lett Appl Microbiol*. 2015; 60: 531-535.
- Lauková A, et al. Enterocin M and its Beneficial Effects in Horses- a Pilot Experiment. *Prob Antimicrob Prot*. 2018; 10: 420-426.
- Lauková A, et al. Enterocin M-producing *Enterococcus faecium* CCM8558 demonstrating probiotic properties in horses. *Prob Antimicrob Prot*. 2020; 12:1555-1561.
- Pogány Simonová M, et al. Can enterocins affect phagocytosis and glutathione peroxidase in rabbits? *Central Europ J Biol*. 2013, vol. 8, no. 8, pp. 730–734.
- Pogány Simonová M, Chrastinová Ľ, Lauková A. Autochthonous strain *Enterococcus faecium* EF 2019 (CCM 7420), its bacteriocin and their beneficial effects in broiler rabbits-a review. *Animals* 2020; 10: 1188.
- Szabóová R, et al. Enterocin 4231 produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231 and its use in rabbits. *Acta Vet Beograd*. 2011; 61: 523–529.

**KAROTICKÁ ENDARTEREKTÓMIA A JEJ VPLYV NA INDUKCIU
ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE**
Furman M.¹, Némethová M.¹, Mačáková L.¹, Sihotský V.³, Kopolovets I.², Virág M.²,
Mucha R.¹

¹*Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., NbÚ, Košice*

²*Klinika cievnej chirurgie, Východoslovenský ústav srdcových a cievnych chorôb, Košice*

³*Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice*

ABSTRAKT

Ischemická cievna mozgová príhoda (CMP) je závažný stav vznikajúci redukciami krvného prietoku mozgovým tkanivom. Ide o akútne poškodenie nervového tkaniva mozgu patriace celosvetovo k najčastejším príčinám úmrtí a invalidity. Ischemická tolerancia (IT) je neuroprotektívny fenomén schopný redukovať ischemické poškodenie. Jeho presný mechanizmus účinku však pre svoju komplexnosť doposiaľ nie je známy. Navodenie IT je možné dosiahnuť aplikáciou rôznych typov stresorov na subletálnej úrovni, a to vrátane samotnej ischémie. Karotická endarterektómia (CEA) je chirurgickým odstránením arterosklerotického plátu z karotidy, pričom prietok krvi karotidou je počas zákroku pozastavený. Táto práca má za cieľ objasnenie vplyvu CEA na navodenie ischemickej tolerancie. Úspešnosť navodenia IT sme detegovali na základe modifikácie génovej expresie ADM. ADM je hormón regulujúci vazodilatáciu a stimulujúci angiogénu. Okrem toho tiež zvyšuje bunkovú odolnosť voči oxidačnému stresu a hypoxickému poškodeniu. Pacientov podstupujúcich CEA sme rozdelili do skupín na základe toho, či už prekonalí CMP a ako dávno. Odber krvných vzoriek sme situovali pred CEA a po nej. Z krvných buniek sme izolovali RNA, reverznou transkripciou ju prepísali do cDNA a následne analyzovali pomocou kvantitatívnej RT-PCR. Naše výsledky potvrdzujú vplyv CEA na navodenie IT, pričom štatisticky najvýznamnejší efekt bol pozorovaný u skupín pacientov po ischémii. Veríme, že uvedené výsledky prispievajú k detailnejšiemu objasneniu mechanizmov navodzujúcich IT na molekulárnej úrovni. Predkladaná práca patrí do širšieho výskumného projektu so zameraním na popisovanie mechanizmov kondicionovania na molekulárno-proteomickej úrovni.

ÚVOD

Cievna mozgová príhoda (CMP) je akútnym poškodením buniek mozgového tkaniva v určitom regióne. Ischemický typ CMP tvorí až 80% všetkých prípadov CMP. Ischémia vzniká ako následok nedostatočného prekrvenia postihnutej oblasti nervového tkaniva mozgu. Dôvodom je zvyčajne prekážka blokujúca prísun okysličenej krvi k nervovým bunkám mozgu (Donnan a kol., 2008). Ischémiu z molekulárneho pohľadu tvorí celý rad biochemických kaskád vedúcich až ku smrti postihnutých buniek. Terapeutické postupy, ktoré sa zamerali iba na jeden mechanizmus v rámci komplexnej patofyziologickej odpovede sa doposiaľ nepreukázali ako účinné. Pozornosť sa tak obracia k telu vlastným endogénnym neuroprotektívnym mechanizmom a ich využitiu pri liečbe ischémie. Navodenie ischemickej tolerancie spadá do tejto kategórie neuroprotektívnych mechanizmov a je pre ňu charakteristické zvýšenie bunkovej odolnosti voči ischemickému poškodeniu. Molekulárny mechanizmus navodzujúci toleranciu stále nepatrí k úplne prebádaným fenoménom. Dôvodom je vysoká miera komplexnosti a zložitosti jednotlivých dráh. Z aktuálnych poznatkov vieme, že pôsobenie stimulu indukujúceho toleranciu spôsobuje tvorbu efektorových molekúl, ktoré následne menia génovú expresiu, prípadne posttranslačne upravujú už existujúce proteíny. Proces navodzujúci toleranciu (kondicionovanie) je možné uskutočniť pôsobením rôznych stimulov s možnosťou využitia viacerých kondicionačných stratégií, pričom aplikácia subletálneho ischemického ataku je jedným z mnohých toleranciu indukujúcich stimulov (Gidday, 2006; Kirino, 2002; Koch a kol., 2014; Lehotský a kol.,

2009; Wang a kol., 2015). Táto práca je zameraná na karotickú endarterektómiu (CEA). Ide o chirurgický zákrok spĺňajúci kritérium jemného ischemického ataku, keďže pri nej dochádza k dočasnému uzatvoreniu jednej z karotíd zásobujúcich nervové tkanivo mozgu oksyločnou krvou. Dočasné uzatvorenie priechodnosti jednej z karotíd je nevyhnutné pre chirurgické odstránenie arterosklerotického plátu nahromadeného na vnútornej stene dotyčnej karotidy. Mozog je tak počas zákroku zásobovaný krvou len prostredníctvom jednej z karotíd, čo má vplyv na stimuláciu neuroprotektívnych kaskád a následné navodenie ischemickej tolerancie (Howell, 2007). Tento vplyv sme detegovali na základe zmien v expresii génu *ADM*. Ten okrem toho, že reguluje vazodilatáciu a stimuluje angiogénu, zvyšuje tiež bunkovú odolnosť voči oxidačnému stresu a hypoxickému poškodeniu (Furman a kol., 2021). Cieľom našej štúdie bolo objasnenie vplyvu CEA na indukciu ischemickej tolerancie na základe kvantifikácie zmien v expresii génu *ADM*.

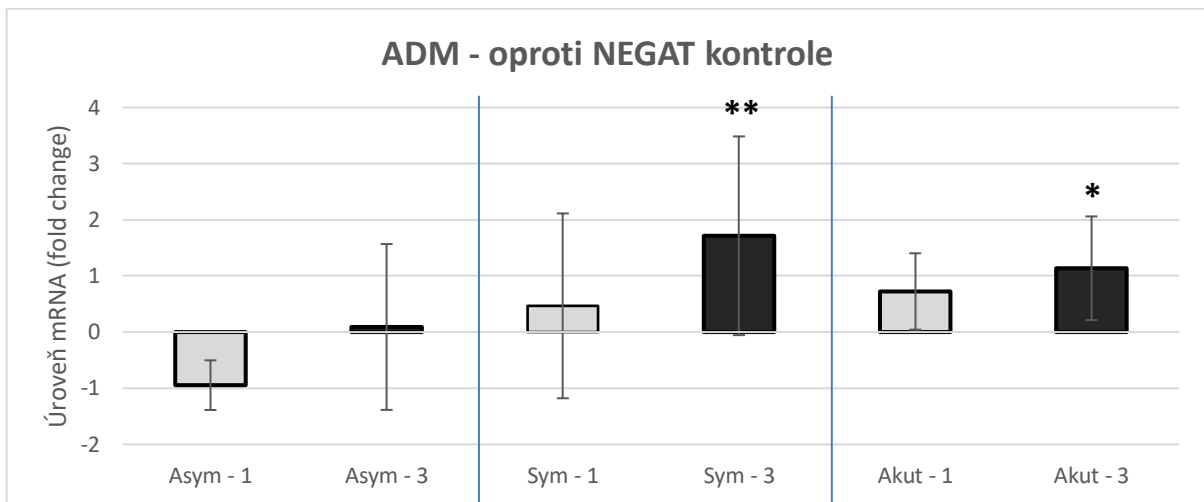
MATERIÁL A METODIKA

Pacientov čakajúcich na plánovaný chirurgický zákrok karotickej endarterektómie sme rozdelili na tri skupiny na základe toho, či v minulosti už prekonali ischemickú CMP a ak áno, ako dávno. Asymptomatická skupina (Asym) prekonala CMP dávnejšie než 6 mesiacov pred CEA, resp. ju neprekonala vôbec, Symptomatická skupina (Sym) prekonala CMP 7 dní až 6 mesiacov pred CEA a Akútna skupina (Akut) prekonala CMP do 7 dní pred CEA. Každá skupina pacientov podstúpila odober vzoriek krvi pred karotickou endarterektómiou (označené -1) a následne 48 hodín po nej (označené -3). Ďalšou samostatnou skupinou bola negatívna kontrola (NEGAT) obsahujúca vzorky krvi zdravých ľudí.

Po odobratí vzoriek periférnej celej krvi 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). Pomocou programu Geneious (Biomatters, Ltd., New Zealand) sme nadizajnovali sekvencie pre forward a revers primery k nami zvolenému markeru ischemickej tolerancie (*ADM*) a pre housekeeping gén (*18S*). Podľa pokynov výrobcu kitu (PowerUp SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific, USA) sme pripravili reakčnú zmes a vykonali qRT-PCR 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 štatisticky analyzovali s využitím štandardných vzorcov pre výpočet smerodajnej odchýlky s mierou spoľahlivosti 95% a štatistického významu prostredníctvom T-testu. Táto štúdia bola schválená Etickou komisiou Východoslovenského ústavu srdcových a cievnych chorôb (30/07/2018) pre štúdie na ľuďoch a títo pacienti podpísali informovaný súhlas.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Gén *ADM*, ktorého modifikáciu úrovne expresie pôsobením endarterektómie sme pozorovali, bol zvolený vzhľadom na jeho antihypoxický efekt a vplyv na zvýšenie tolerancie buniek voči oxidatívne mu stresu. Zvýšená miera expresie *ADM* oproti negatívnej (NEGAT) kontrole bola pozorovaná u všetkých skupín s výnimkou skupiny Asym-1, ktorá bola znížená. Taktiež sme pozorovali zvyšovanie miery expresie *ADM* vo vzorkách 48 hodín po CEA (-3) oproti vzorkám pred CEA (-1). Tento trend sa prejavil u všetkých troch skupín, pričom bol pozorovaný v štatisticky najvýznamnejšej miere u Sym skupiny, menej výrazne u Akut skupiny a štatisticky najmenší význam má posun v expresii *ADM* u Asym skupiny. Celkovo najvyššia miera expresie *ADM* bola pozorovaná u Sym-3 a najnižšia u Asym-1.



Obr. 1. Úroveň expresie génu *ADM* oproti negatívnej kontrole (*NEGAT*)

Z výsledkov je viditeľné, že po CEA nastáva zvýšenie miery expresie *ADM*. CEA teda plní funkciu kondicionovania a indukuje tak aktiváciu ischemickej tolerancie. Tento neuroprotektívny efekt sa prejavil u všetkých skupín. V najvyššej štatistickej miere sa táto neuroprotektivita prejavila v Sym skupine, v mierne menšej miere v Akut skupine a v najnižšej miere v Asym skupine. V Asym skupine, ktorá ischemickú CMP neprekonala vôbec, alebo pred viac než 6 mesiacmi sa po CEA miera expresie *ADM* dostala na úroveň zdravých jedincov negatívnej kontroly, pričom pôvodne znížená miera expresie *ADM* pred CEA môže súvisieť s procesmi tvorby arterosklerotického plátu neovplyvnenými ischemickou fázou, či už v podobe CMP alebo CEA.

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. *The Lancet*. 2008; 371:1612-1623.
- Furman M, et al. Modifications of gene expression detected in peripheral blood after brain ischemia treated with remote postconditioning. *Molecular Biology Reports*. 2021; 49:477-485. Gidday J. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience*. 2006; 7:437-448.
- Howell S J. 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.
- Wang Y, et al. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. *Experimental Neurology*. 2015; 272:26-40.

VZŤAH MEDZI FGF 23, SDMA, KREATINÍNOM, UREOU A FOSFOROM NA BÁZE CHRONICKÉHO RENALNÉHO ZLYHANIA OBLIČIEK U MAČIEK

Grelová S.¹, Karasová M.¹, Tóthová C.², Kisková T.³, Baranová D.¹, Lukáč B.¹, Fialkovičová M.¹, Micháľová A.¹, Kunay L.¹, Svoboda M.¹

¹ *Klinika malých zvierat, UVLF, Košice*

² *Klinika prežívavcov, UVLF, Košice*

³ *Ústav biologických a ekologických vied, UPJŠ, Košice*

ABSTRAKT

Chronická choroba obličiek (CKD) je bežnou diagnózou u starších mačiek a jej prevalencia sa zvyšuje s vekom. Konvenčné nepriame biomarkery rýchlosti glomerulárnej filtrácie (GFR) majú svoje obmedzenie a nie sú účinné pri detekcii skorého poklesu rýchlosti glomerulárnej filtrácie. Nedávno boli navrhnuté koncentrácie symetrického dimetylgarginínu (SDMA) ako nový biomarker GFR na včasnú detekciu CKD. Táto štúdia pojednáva o vzťahu medzi SDMA, FGF 23 a predtým používanými indikátormi funkcie obličiek, najmä kreatinínom, močovinou a fosfátom. Do tejto štúdie bolo zahrnutých 99 mačiek. Na základe ich hodnôt SDMA malo 48 mačiek CKD a zvyšných 51 mačiek sa použilo ako zdravá kontrolná skupina. Sérum týchto mačiek sa testovalo na koncentrácie kreatinínu, močoviny a fosfátu, ako aj hodnoty FGF23 a vyhodnotili sa korelácie medzi nimi. Mačky s CKD mali vyššie koncentrácie FGF 23 ako zdravé mačky a nezistila sa žiadna korelácia medzi FGF 23 a SDMA, ani FGF 23 a fosfátom. Na druhej strane fosfát silne koreluje s SDMA, močovinou a kreatinínom, čo z neho robí možný nezávislý faktor progresie CKD.

ÚVOD

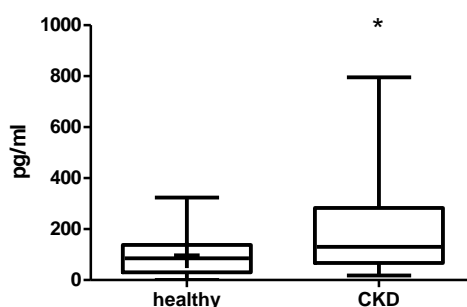
Chronické ochorenie obličiek mačiek (CKD) má progresívny charakter a jeho prevalencia sa zvyšuje s vekom, pričom je postihnutých až 80 % mačiek starších ako 15 rokov (Chen a kol., 2020). Na diagnostiku sa v súčasnosti používajú nepriame markery glomerulárnej filtrácie (GFR), ako je sérový kreatinín a urea, pričom každý z nich má svoje vlastné obmedzenia (Brown a kol., 1996). V posledných rokoch sa na nepriame meranie GFR používa nový biomarker, symetrický dimetylgarginín (SDMA). S chronickým ochorením obličiek asociovaná porucha minerálov a kostí je systémová porucha ovplyvňujúca hormonálny a minerálny metabolizmus v dôsledku poruchy kalcium-fosfátovej homeostázy, ku ktorej dochádza v dôsledku straty renálnej vylučovacej schopnosti fosfátov (Locatelli a kol., 2002). Fibroblastový rastový faktor 23 (FGF 23) sa primárne vylučuje obličkami a u ľudí sa predpokladá, že je markerom GFR (Filler a kol., 2011), ale aj prediktorom progresie renálneho ochorenia. Predpokladá sa, že u mačiek sa FGF 23 zvyšuje s progresiou CKD a je zvýšený u pacientov s hyperfosfatémiou (Geddes a kol., 2013).

MATERIÁL A METODIKA

Pacienti zaradení do tejto štúdie boli vybraní z mačiek vyšetrených v Univerzitnej veterinárnej nemocnici v priebehu jedného roka. Zahrnutí boli všetci pacienti starší ako 10 rokov. Na základe odporúčaní IRIS bola u každého pacienta meraná SDMA. Mačky bez predchádzajúcej anamnézy akútneho poškodenia obličiek, bez abnormalít zobrazovania a SDMA v referenčnom rozsahu boli klasifikované ako klinicky zdravé. Diagnóza CKD bola založená na anamnéze, biochemických abnormalitách séra a príznakoch obličkovej nedostatočnosti a/alebo abnormalít zobrazovania alebo zvýšených hodnôt SDMA (SDMA > 14). Biochemické analýzy boli vykonané v deň prijatia pre každú mačku. Zostatkové sérum bolo použité na stanovenie FGF 23 metódou ELISA.

VÝSLEDKY

Do analýzy bolo celkovo zaradených 99 mačiek starších ako 10 rokov ($12,6 \pm 2,4$), z toho 48 mačiek malo zvýšené sérové koncentrácie SDMA a bolo zaradených do skupiny CKD. Zvyšných 51 mačiek s SDMA v referenčnom rozmedzí bolo použitých ako kontrolná skupina. U mačiek s CKD bola koncentrácia FGF 23 v sére významne vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 1). Korelácie sú znázornené na obrázku 2 pre mačky s CKD. Sérový kreatinín a močovina vykazovali pozitívnu koreláciu ($r^2 = 0,86$; $p = 0,001$) v CKD skupine mačiek. Okrem toho sa v skupine s CKD našli významné pozitívne korelácie aj medzi sérovým kreatinínom a fosfátom ($r^2 = 0,70$; $p < 0,001$) a močovinou a fosfátom ($r^2 = 0,93$; $p < 0,001$). SDMA pozitívne korelovala s fosfátom ($r^2 = 0,84$; $p < 0,001$) a močovinou ($r^2 = 0,75$; $p < 0,001$). Pozitívna korelácia bola zistená aj medzi kreatinínom a SDMA ($r^2 = 0,56$; $p < 0,05$).

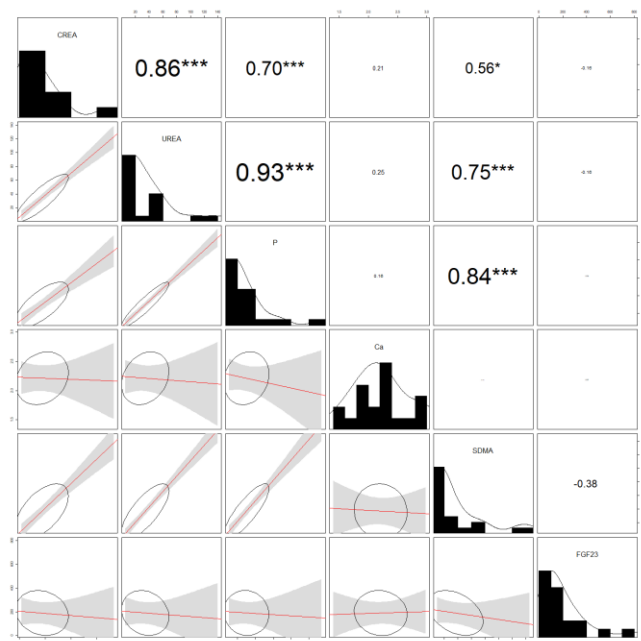


Obr. 1. Porovnanie FGF23 medzi zdravými mačkami a mačkami s CKD

Údaje sú vyjadrené ako medián \pm SD. Rámček označuje dolný a horný kvartil a stredná čiara je medián. Body na koncoch sú hodnoty 2,5 a 97,5 %. Graf ukazuje hladinu FGF23 v sére u zdravých mačiek a mačiek s CKD. Hladina FGF23 u zvierat s CKD je výrazne vyššia ako u zdravých kontrol. Význam v porovnaní so zdravými zvieratami je uvedený ako: * $p < 0,05$

DISKUSIA

Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť vzťah medzi SDMA, FGF 23, kreatinínom, močovinou a fosfátom u geriatrických mačiek s CKD. Pretože predtým publikovaná štúdia (Finch a kol., 2013) prišla s hypotézou, že FGF 23 by sa mal zvyšovať so zvyšujúcou sa SDMA a mal by pozitívne korelovať s koncentraciami fosfátov, hodnotili sme aj tieto dva parametre. Štúdie naznačujú, že FGF 23 sa zvyšuje s progresiou CKD u ľudí, psov a mačiek (Geddes a kol., 2013; Dittmer a kol., 2017), a preto by mohol byť biomarkerom pre včasnú detekciu CKD (Lin a kol., 2021). SDMA spolu so sérovým kreatinínom sú oba považované za nepriame biomarkery GFR, čo bolo tiež preukázané v našej štúdii pozitívnou koreláciou medzi týmito dvoma parametrami v CKD skupine zvierat. Rovnako ako v mnohých predchádzajúcich štúdiách sme tiež zistili, že FGF 23 sa zvyšuje u mačiek s CKD na rozdiel od zdravých neazotemických mačiek. V našej štúdii nebola žiadna významná korelácia medzi FGF23 a fosfátom v skupine CKD. Zistili sme však pozitívnu koreláciu medzi SDMA a sérovým fosfátom, čo naznačuje, že porucha metabolizmu fosfátov sa môže vyskytnúť na začiatku ochorenia. Preukázanie pozitívnej korelácie medzi fosfátom a sérovou močovinou, kreatinínom a SDMA naznačuje, že koncentrácie fosfátov by sa mohli použiť ako nezávislý prediktor progresie CKD. Predchádzajúce štúdie naznačujú, že zvyšujúca sa závažnosť a frekvencia hyperfosfatémie môže naznačovať závažnejšie CKD a kratší čas prežitia pacienta (Marsell a kol., 2008). V humánnej medicíne sa plazmatické koncentrácie FGF 23 a PTH zvyšujú u pacientov s CKD pred rozvojom hyperfosfatémie (Finch a kol., 2012). Nezistili sme žiadnu koreláciu medzi FGF 23 a koncentraciami fosfátu v sére u mačiek s CKD. Podobne štúdia uskutočnená Sargentom a kol. zistili signifikantne vyššie koncentrácie FGF 23 napriek žiadnemu rozdielu v koncentráciách PTH alebo fosfátov u mačiek so zvýšenou SDMA (Sargent a kol., 2019).



Obr. 2. Analýza korelácií (korelogramov) medzi úrovňami vybraných parametrov v skupine mačiek s CKD. CREA, kreatinín; P, fosfát; Ca, vápnik; SDMA, symetrický dimetylarginín; FGF23, fibroblastový rastový faktor 23. Uvádza sa Pearsonov korelačný koeficient. Významnosť je daná * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$.**

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Brown SA, Haberman C, Finco DR. Use of plasma clearance of inulin for estimating glomerular filtration rate in cats. *Am. J. Vet. Res.* 1996; 57, 1702–1705.
- Chen H, Dunaevich A, Apfelbaum N, et al. Acute on chronic kidney disease in cats: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and outcome. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; 34, 1496–1506. <https://doi.org/10.1111/jvim.15808>
- Dittmer KE, et al. Serum fibroblast growth factor 23 concentrations in dogs with chronic kidney disease. *Res. Vet. Sci.* 2017; 114, 348–350. DOI: 10.1016/j.rvsc.2017.06.013
- Finch NC, Syme HM, Elliott J. Parathyroid hormone concentration in geriatric cats with various degrees of renal function. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2012; 241, 1326-1335. DOI: 10.2460/javma.241.10.1326
- Finch NC et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) concentrations in cats with early nonazotemic chronic kidney disease (CKD) and in healthy geriatric cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2013; 27, 227-233. DOI: 10.1111/jvim.12036
- Geddes R, et al. Fibroblast Growth Factor 23 in Feline Chronic Kidney Disease. *J. Vet. Intern. Med.* 2013; 27, 234-241. <https://doi.org/10.1111/jvim.12044>
- Lin J, et al. Serum fibroblast growth factor 23 (FGF-23): associations with hyperphosphatemia and clinical staging of feline chronic kidney disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2021; 33, 288-293. DOI: 10.1177/1040638720985563. Epub 2021 Feb 5.
- Locatelli F et al. Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency, with emphasis on the control of hyperphosphataemia. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002; 17,723-31. DOI: 10.1093/ndt/17.5.723.
- Marsell R, et al. Fibroblast growth factor-23 is associated with parathyroid hormone and renal function in a populationbased cohort of elderly men. *Eur. J. Endocrinol.* 2008; 158, 125-129. DOI: 10.1530/EJE-07-0534
- Sargent HJ, et al. Fibroblast growth factor 23 and symmetric dimethylarginine concentrations in geriatric cats. *J. Vet. Intern. Med.* 2019, 33, 2657-2664. DOI: 10.1111/jvim.15590. Epub 2019 Sep 30.

RETROSPEKTÍVNA ANALÝZA VYBRANÝCH PARAMETROV PACIENTOV HOSPITALIZOVANÝCH NA INTERNOM ODDELENÍ V ROKOCH 2010 A 2021

Hrubá O., Massarová P.,¹ Žigová L.,¹ Vranecová K.,¹ Payer J.,² Jackuliak P.,² Kyselovič J.,^{2,3}
Gažová A.¹

¹ Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

² V. interná klinika LF a UN Bratislava, pracovisko Ružinov, Univerzita Komenského v Bratislave

³ Katedra farmakológie a toxikológie, Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Zber dát a ich následná deskripcia prináša informácie o zdravotnom stave danej populácie, o výskyte ochorení a rizikových faktorov pre zdravie. Monitorovanie epidemiologických ukazovateľov v rámci nemocničných oddelení poskytuje poznatky o profile hospitalizovaných pacientov a formuluje priority pre zdravotnú starostlivosť. Vykonalí sme zber dát pacientov hospitalizovaných na V. internej klinike Lekárskej fakulty Univerzity Komenského (LF UK) a Univerzitnej Nemocnice v Bratislave (UNB) v rokoch 2010 a 2021. Do výsledného súboru sme zaradili iba tých pacientov, ktorí počas hospitalizácie zomreli. Cieľom našej práce bol popis dát a ich následné vzájomné porovnanie pomocou základných epidemiologických metód. Mali sme k dispozícii údaje 396 pacientov z roku 2010 a 501 pacientov z roku 2021. Popísali sme ich vek pri úmrtí, dĺžku hospitalizácie a hlavnú diagnózu. Nakoľko V. Interná klinika LF UK a UNB patrí k oddeleniam slúžiacim na liečbu pacientov aj s infekciou vírusom SARS-CoV-2, sme sledovali odlišnosti v popísaných údajoch v súvislosti s pandémiou COVID-19. V roku 2010 najväčšiu časť zomrelých tvorili pacienti s hlavnou diagnózou zo skupiny „Ochorenia obehovej sústavy“ (55,6%), v roku 2021 zomierali v najväčšej miere pacienti s diagnózou COVID-19 (29,3%). Priemerný vek zomretých pacientov v roku 2010 bol 73,26 rokov u mužov a 78,27 rokov u žien. V roku 2021 hodnoty klesli na 73,10 rokov u mužov a 76,76 u žien. Priemerná dĺžka hospitalizácie (ALOS) pred úmrtím sa pohybovala v oboch rokoch na úrovni 7 dní, variabilita jednotlivých hodnôt však bola vysoká. Spracovaný popis dát bude slúžiť v ďalšom výskume ako základ k analýze korelácie a kauzality jednotlivých parametrov.

ÚVOD

V. Interná klinika Univerzitnej Nemocnice v Bratislave predstavuje najväčšiu internú kliniku v hlavnom meste a má významné postavenie v celoslovenskom meradle. Klinika poskytuje komplexnú starostlivosť o pacientov s rôznorodými ochoreniami, ktorí často trpia viacerými diagnózami naraz.

V našej práci sme sa zamerali na zomrelých pacientov, popísali sme ich vek pri úmrtí, dĺžku hospitalizácie a hlavnú diagnózu pri úmrtí. Vybrali sme rok 2010, ktorý predstavuje prvopočiatky elektronizácie zdravotníctva a rok 2021, ktorý bol rokom doposiaľ najviac poznačeným pandémiou COVID-19.

Zásah pandémie do globálnych ukazovateľov je zrejмый a náhle zmeny sú badateľné aj na štatistických údajoch zo Slovenska. V. Interná klinika UNB v období pandémie COVID-19 liečila aj pacientov s infekciou vírusom SARS-CoV-2. Predpokladáme, že pri porovnávaní sledovaných rokov sa v parametroch objavia odlišnosti v súvislosti s pandémiou. Jedným z ukazovateľov, zasiahnutým pandémiou je stredná dĺžka života (*life expectancy*). Udáva priemerný očakávaný vek, ktorého sa dožijú členovia populácie v rovnakom veku. Stredná dĺžka života na Slovensku predstavovala 71,6 rokov u mužov a 78,8 rokov u žien v roku 2010. Hodnoty tohto ukazovateľa postupne rástli do roku 2019. U mužov bol zaznamenaný výraznejší nárast na 74,31 rokov, kým u žien došlo k nárastu na 80,84. Vypuknutie pandémie vírusu SARS-CoV-2 a vysoká úmrtnosť na toto ochorenie spôsobilo náhly pokles strednej dĺžky života. Na Slovensku, v roku 2020 hodnoty klesli na 73,47 rokov u mužov a 80,17 rokov u žien. V roku 2021 sa pokles prehĺbil na úroveň hodnôt z roku 2010

(71,16 rokov u mužov a 78,13 rokov u žien) (Štatistický úrad SR, n.d.) Čas, ktorý pacienti strávia na nemocničnom lôžku sa udáva ako priemerná dĺžka pobytu v nemocniciach (ALOS). Tento údaj sa často používa ako ukazovateľ efektívnosti zdravotnej starostlivosti. Pri rovnakých podmienkach kratší pobyt zníži náklady na prepustenie a presunie starostlivosť z lôžkových zariadení do menej nákladných post-akútnych zariadení. ALOS sa vzťahuje na priemerný počet dní, ktoré pacienti strávia v nemocnici. Vo všeobecnosti sa meria vydelením celkového počtu dní pobytu všetkých hospitalizovaných pacientov počas roka počtom prijatí alebo prepustení. Hodnoty ALOS majú globálne klesajúcu tendenciu. Na Slovensku hodnota ALOS predstavovala 7,3 dní v roku 2010 a 6,5 dní v roku 2021. (NCZI, n.d.).

V prepúšťacej správe alebo v správe o úmrtí sa stretávame s pojmom hlavná diagnóza. Hlavná diagnóza je po analýze stanovená ako tá, ktorá bola hlavnou príčinou hospitalizácie pacienta. Stanovuje sa na základe vyhodnotenie výsledkov vyšetrení pri ukončení hospitalizácie (alebo pri úmrtí) za účelom stanovenia toho ochorenia, ktoré vyvolalo potrebu hospitalizácie.

MATERIÁL A METODIKA

V našej práci sme študovali dáta pomocou deskriptívnych epidemiologických metód. Cieľom bol zber údajov a ich následný spracovaný popis. Následné porovnanie hodnôt bude slúžiť na ďalšiu analýzu korelácie a kauzality. Zdrojom dát boli chorobopisy pacientov získané z nemocničného informačného systému UNB. Do výsledného súboru sme zaradili pacientov, ktorý po hospitalizácii zomreli na klinike. V roku 2010 sme popisovali údaje 396 pacientov, kde ženy predstavovali 51,8%. V roku 2021 bolo hospitalizovaných takmer o tretinu viac pacientov, počtom 501. V tomto roku bolo hospitalizovaných menší podiel žien (49,3%). Zamerali sme sa na ich vek pri úmrtí, na dĺžku hospitalizácie a na hlavnú diagnózu. Využili sme základné štatistické metódy a deskriptívnu matematiku. Výskum je schválený Etickou komisiou Nemocnice Ružinov Bratislava.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo z oboch skúmaných rokov bolo do štúdie zaradených 897 pacientov, ktorí vyhovovali kritériám. Výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1 a 2.

Tab. 1. Vek pri úmrtí a dĺžka hospitalizácie pacientov v rokoch 2010 a 2021

Výsledky Počet+smerodajná odchýlka	2010				2021			
	muži	ženy	spolu	SR	muži	ženy	spolu	SR
vek pri úmrtí (roky)	73,76 ±12,5	78,27 ±11,6	75,77 ±12,1	75,2	73,1 ±12,0	76,76 ±12,7	74,93 ±12,3	74,61
dĺžka hospitalizácie (dni)	7,8 ±8,9	6,4 ±8,2	7,1 ±8,5	7,3	7,9 ±9,9	7,2 ±8,7	7,6 ±9,3	6,5

V Tab. 1 je uvedený vek pacientov pri úmrtí na V. Internej klinike a pre porovnanie uvádzame aj strednú dĺžku života na Slovensku v danom roku. V roku 2010 sme zaznamenali vyššie hodnoty ako v roku 2021.

V Tab. 1 popisujeme priemernú dĺžku hospitalizácie (ALOS). V pandemickom roku sa zaznamenal malý nárast oproti roku 2010 z 7,3 na 7,6 dní. Variabilita jednotlivých hodnôt je však veľmi výrazná, čo sa ukázalo na smerodajnej odchýlke. Z výpočtov vyplýva, že až štvrtina pacientov zomrelo v prvý deň po prijatí na oddelenie (v roku 2010 takto zomrelo

26,9% pacientov, v roku 2021 24,6%). Najdlhšie hospitalizovaný pacient v roku 2010 bol v nemocnici 65 dní a v roku 2021 74 dní.

Tab. 2. Počet úmrtí podľa hlavnej diagnózy pri hospitalizácii

Skupina diagnóz podľa MKCH-10	2010	2021
A00-B99 Infekčné a parazitové choroby	12	27
C00-D48 Nádory	55	10
E00-E90 Endokrinné, nutričné a metabolické choroby	18	30
F00-F99 Duševné poruchy a poruchy správania	2	3
G00-G99 Choroby nervovej sústavy	2	1
I00-I99 Choroby obehovej sústavy	220	80
J00-J99 Choroby dýchacej sústavy	36	95
K00-K93 Choroby tráviacej sústavy	38	16
L00-L99 Choroby kože a podkožného tkaniva	0	1
N00-N99 Choroby močopohlavnej sústavy	8	25
R00-R99 Subj. a obj.príznaky, abnormálne nálezy,[...]	3	65
U00-U99 Kódy na osobitné účely (COVID-19)	0	147
S00-T98 Poranenia, otravy a iné následky vonk. príčin	2	0
V01-Y98 Vonkajšie príčiny chorobnosti a úmrtnosti	0	1
Počet diagnóz spolu	396	501

V Tab. 2 je uvedený súhrn hlavných diagnóz pacientov v čase hospitalizácie. Najfrekvencovanejšie diagnózy boli choroby obehovej sústavy v roku 2010, ktoré predstavovali 55,6% všetkých diagnóz, na druhom mieste boli nádory (13,8%), nasledovali choroby tráviacej sústavy (9,5%).

V roku 2021 prevažovali diagnózy s kódmi na osobitné účely, medzi ktoré je zaradené ochorenie COVID-19. Pacienti s touto diagnózou predstavovali 29,3%. Druhá najčastejšia diagnóza boli choroby dýchacej sústavy (19,9%). Choroby obehovej sústavy predstavovali 16% zo všetkých diagnóz.

Výsledky práce poukazujú na odlišnosti v parametroch zomrelých pacientov na V. Internej klinike v rokoch 2010 a 2021. Údaje z roku 2021 sú ovplyvnené pandémiou ochorenia COVID-19. Popísané údaje budú tvoriť základ pre naše ďalšie analýzy. Finálne výsledky by potom mohli ponúknuť možnosť navrhnúť intervencie, prostredníctvom ktorých by mohlo dôjsť k optimalizácii starostlivosti o pacientov na internej klinike.

POUŽITÁ LITERATÚRA:

Národné centrum zdravotníckych informácií. Štatistika hospitalizovaných. doi:

<https://www.nczisk.sk/aktuality/Pages/Statistika-hospitalizovanych-v-Slovenskej-republike-v-roku-2021.aspx> (accessed 11.09.22).

Štatistický úrad SR. Stredná dĺžka života pri narodení [WWW Document]. doi:

http://datacube.statistics.sk/#!/view/sk/vbd_sk_win2/om3802rr/v_om3802rr_00_00_00_sk (accessed 29.08.22).

ÚČINOK SEKRETÓMU HUMÁNNYCH MEZENCHÝMOVÝCH KMEŇOVÝCH BUNIEK PUPOČNÍKA NA VIABILITU BUNKOVEJ LÍNIE SH-SY5Y

Hudáková N.¹, Petroušková P.¹, Maloveská M.¹, Humeník F.¹, Mudroňová D.², Dosedla E.³, Ballová Z.³, Bačenkova D.⁴, Trebuňová M.⁴, Čížková D.¹

¹Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, UVLF v Košiciach

²Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

³Gynekologicko-pôrodná klinika UPJŠ LF a Nemocnica AGEL Košice-Šaca a.s.

⁴Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania, Strojnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach

ABSTRAKT

Najnovšie poznatky dokazujú, že multipotentné mezenchýmové stromálne kmeňové bunky (MSC) dokážu ovplyvniť rôzne patologické stavy, vrátane ochorení nervového systému. Mechanizmus akým tieto bunky prispievajú k neuroprotekcii však nie je jasný. Je známe, že MSC sprostredkujú svoj účinok najmä vďaka parakrínnej aktivite. Skúmanie interakcie sekretómu MSC s modelovými bunkovými líniami teda môže poskytnúť dôležité informácie, ktoré sú nevyhnutné pre použitie kmeňových buniek a ich sekretómu v klinickej praxi. V tejto štúdií sme skúmali účinok sekretómu z MSC izolovaných z ľudského Whartonovho rôsolu (WJ-MSC) na viabilitu bunkovej línie humánnych neuroblastomov SH-SY5Y. WJ-MSC boli izolované z ľudskej pupočnej šnúry, charakterizované podľa kritérií Medzinárodnej spoločnosti pre bunkovú terapiu (ISSCR) a následne boli použité na získanie sekretómu WJ-MSC CM. Účinok sekretómu WJ-MSC na viabilitu a proliferáciu buniek SH-SY5Y bol hodnotený pomocou xCelligence RTCA analýzy. Sekretóm WJ-MSC významne zvýšil viabilitu a proliferáciu SH-SY5Y, čo naznačuje, že s podrobnejšími štúdiami a klinickým skrúningom by terapia sekretómom MSC mohla byť novou stratégiou liečby ochorení nervového systému.

ÚVOD

Mezenchýmové stromálne kmeňové bunky (MSC) sú podskupinou heterogénnych nehematopoetických buniek, ktoré dokážeme získať z rôznych tkanív. Hoci sa za zlatý štandard zdroja MSC považuje kostná dreň (BM), perinatálne tkanivá, napríklad pupočníková krv (UCB) alebo Whartonov rôsol (WJ), sa považujú za atraktívne zdroje MSC, pretože ich možno získať menej invazívnymi metódami bez poškodenia donorov (Kabataş a kol., 2018). Podľa ISSCR musia MSC spĺňať minimálne kritériá, a to mať schopnosť prilnúť k plastovým kultivačným miskám, ako aj trilineový diferenciačný potenciál (osteogénny, adipogénny a chondrogénny); a musia exprimovať povrchové markery CD29, CD90, CD105 a CD73 a nesmú exprimovať antigény bunkového povrchu CD45, CD34, CD14 alebo CD11b, CD79a alebo CD19 a HLA-DR (Dominici a kol., 2006).

Najnovšie štúdie sú zamerané na bioaktívne molekuly produkované MSC, všeobecne označované ako sekretóm (kondicionované médium, CM). Medzi tieto súbory faktorov/molekúl produkovaných MSC môžeme zaradiť rozpustné proteíny (napr. cytokíny, chemokíny a rastové faktory), lipidy a extracelulárne vezikuly, ktoré sú známe svojou schopnosťou podporovať prežívanie buniek, ich proliferáciu a diferenciáciu, ale aj chrániť bunky pred oxidačným stresom alebo dokonca regulovať zápalové procesy (Mendes-Pinheiro a kol., 2019).

MATERIÁL A METODIKA

Izolácia WJ-MSC

Výskum prebiehal v spolupráci s Nemocnicou AGEL Košice-Šaca, a.s.. Pacienti poskytli informovaný písomný súhlas s použitím tkaniva na výskumné účely (schválené etickou komisiou Nemocnice AGEL Košice-Šaca, a.s.). Humánne tkanivo pupočníka bolo získané za sterilných aseptických podmienok po pôrode placenty donoseného plodu v treťom trimestri

cisárskym rezom. Pupočník bol dvakrát premytý pufrovaným fosfátom (PBS, Sigma) s obsahom antibiotika (Penicilín, Streptomycín, Sigma). Tkanivo bolo rozdelené na menšie kúsky (5–10 mm³) a po odstránení ciev a izolácii Whartonovho rôsolu sme explantáty vložili do kultivačných Petriho misiek, kde sa kultivovali v podmienkach 5% CO₂ a 37°C v kultivačnom médiu (DMEM F12, 10 % fetálne bovinné sérum, 2 % antibiotiká), kým bunky nemigrovali z explantátov. Bunky boli stiahnuté po dosiahnutí 70 – 80 % konfluencie a charakterizácia prebiehala v tretej pasáži.

Trojliniová diferenciácia

Pre dokázanie chondrogénnej, osteogénnej a adipogénnej diferenciácie sa WJ-MSC kultivovali v STEMPRO® (STEMPRO, Life Technologies) diferenciálnych médiách s diferenciálnymi suplementmi podľa pokynov výrobcu kitu. Testované bunky boli kultivované v 24-jamkových platničkách a boli nasadené v koncentrácii 30 x 10³ buniek na jamku. Médiá boli menené každé dva-tri dni. Diferenciácia prebiehala po dobu 21 dní, následne sme bunky fixovali v 4 % paraformaldehyde a ofarbili Alizarínovou červenou (špecifické farbivo pre osteocyty), Alcianovou modrou (chondrocyty) a Oil red O (adipocyty).

Povrchové CD markery

Čistota a homogenita MSC bola overená použitím fluorescenčne označených protilátok na prietokovom cytometri, kde sme izolované bunky v tretej pasáži najskôr po premytí kultivovali s fluorescenčne značenými protilátkami CD29 (PE), CD44 (PE) a CD90 (PE) voči antigénom špecifickým pre MSC. Prítomnosť povrchových markerov bola hodnotená pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto™ (Becton Dickinson Biosciences), analýza dát prebehla pomocou softvéru BD FACS Diva™.

Príprava sekretómu

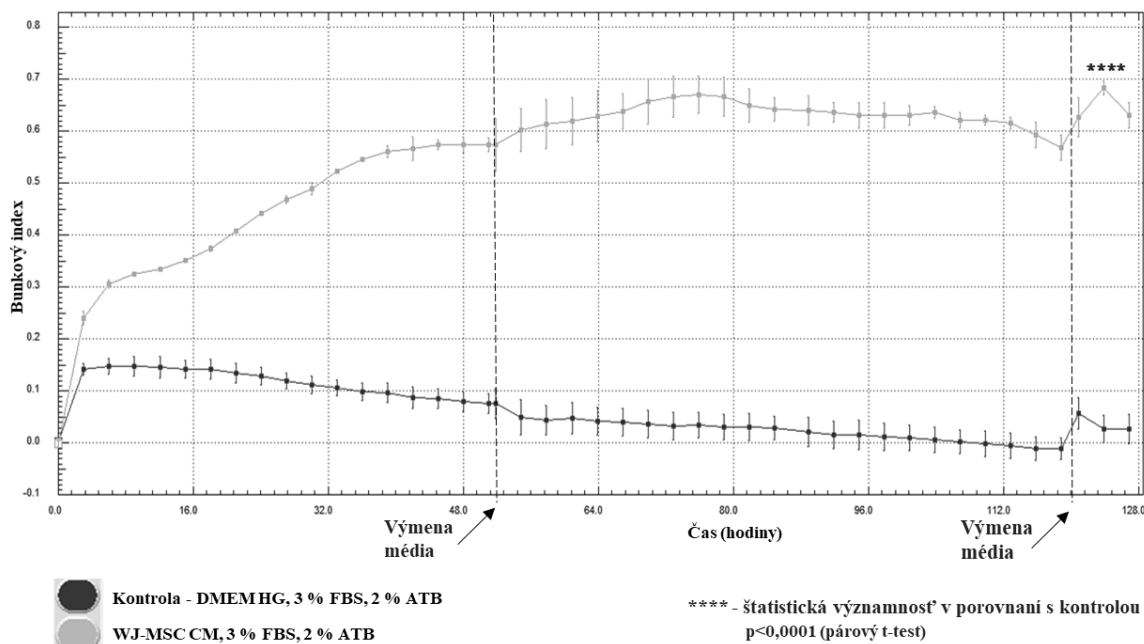
Bunky v tretej pasáži sme kultivovali do 90 % konfluencie v štandardnom kultivačnom médiu, ktoré sme potom nahradili médiom bez séra zloženým z DMEM F12 (Sigma) s 2 % antibiotikami (Penicilin/Streptomycin). Bunky sme inkubovali pri 37 °C a 5 % CO₂. Po 30 hodinách sa médium zozbieralo a označilo ako MSC-CM, ktoré sme následne centrifugovali pri 2700 rpm a uskladnili pri -80 °C až do použitia.

xCELLigence

xCELLigence (Roche) je mikrofluidný systém navrhnutý tak, aby umožňoval nepretržité monitorovanie bunkovej adhérence v *in vitro* systéme pomocou merania impedancie v podobe tzv. bunkového indexu, ktorý predstavuje bunkovú adhéziu v jamkách. Naše dáta sme získali použitím softvéru xCELLigence verzie 1.2.1.. Po kalibrácii prístroja sme SH-SY5Y bunky nasadili v denzite 2 × 10³ buniek na jamku a E-stripy sme vložili do xCELLigence systému po dobu 130 hodín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Naša práca sa zamerala na štúdium vplyvu WJ-MSC sekretómu na SH-SY5Y bunkách. Naším prvým krokom bolo izolovať WJ-MSC bunky z ľudského pupočného povrazca, ktoré sme následne charakterizovali pomocou kritérií ISSCR, čiže sme dokázali schopnosť adhérence, expresie vybraných povrchových markerov (94,6 % pre CD29, 92,4 % pre CD44 a 60,0 % pre CD90, negatívna kontrola 2,9 %) a schopnosť trojliniovej diferenciácie *in vitro*. Následne sme z našich buniek získali sekretóm, ktorým sme ovplyvňovali rast SH-SY5Y buniek.



Obr. 1. Účinok WJ-MSC CM na viabilitu bunkovej línie SH-SY5Y

XCelligence RTCA analýza ukázala, že sekretóm z WJ-MSC buniek signifikantne zvyšuje *in vitro* viabilitu a proliferáciu SH-SY5Y (Obr. 1.). Tieto výsledky korelujú s mnohými proteomickými analýzami dokazujúcimi obsah trofických faktorov a aktívnych biomolekúl (BDNF, GDNF, NGF, IGF-I) v sekretóme MSC (Kupcova Skalnikova, 2013). Celkovo naše výsledky naznačujú, že použitie sekretómu WJ-MSC môže byť efektívnou liečebnou stratégiou na liečbu ochorení nervového systému, pretože sekretóm je schopný modulovať viabilitu a proliferáciu SH-SY5Y, ktorá je často využívaným modelom rôznych napr. neurodegeneratívnych ochorení. Efektivita sekretómu MSC je popísaná v množstve *in vitro* ako aj *in vivo* štúdií, čo potvrdzuje potenciál sekretómu ako inovatívnej formy liečby (Mendes-Pinheiro a kol., 2019; Wu a kol., 2020). Štúdium a pochopenie zloženia a funkcií sekretómu MSC, ako aj jeho funkčného účinku a efektivity v klinickej liečbe je rozhodujúce pre vývoj acelulárnej terapie na báze MSC pre rôzne ochorenia.

Tento výskum bol podporený: APVV-19-0193, VEGA 1/0376/20, VEGA 1/0285/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dominici M, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8, 315–317.
- Kabataş S, et al. Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Patient with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Cell Transplant*. 2018; 27, 1425–1433.
- Kupcova Skalnikova, H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*. 2013; 95, 2196–2211.
- Mendes-Pinheiro B, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells’ Secretome Exerts Neuroprotective Effects in a Parkinson’s Disease Rat Model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 2019; 7. .
- Wu X, et al. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11, 345.

ČREVNÉ ENDOPARAZITY NA DOLNOM ZEMPLÍNE – EPIDEMIOLOGICKÁ A EPIZOOTOLOGICKÁ SITUÁCIA

Ihnacik L.^{1,2}, Šmigová J.¹, Papajová I.¹

¹Parazitologický ústav SAV, v. v. i., Hlinkova 3, 040 01 Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice

ABSTRAKT

Vo vybraných oblastiach Dolného Zemplína (okresy Michalovce, Sobrance a Trebišov) sa sledoval výskyt endoparazitóz u domových zvierat a ľudí. Zároveň sa na prítomnosť vývinových štádií parazitov vyšetrila aj pôda. V priebehu sledovaného obdobia (9/2021 – 6/2022) sa celkovo vyšetrilo 649 vzoriek trusu psov, 426 vzoriek ľudskej stolice a 133 vzoriek pôdy. Parazitárna infekcia sa potvrdila v 47,15% vzoriek trusu psov. Najčastejšie sa v truse detegovali vajíčka *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis*, *Toxascaris leonina*, *Ascaris* spp. a vajíčka z čeľade Ancylostomatidae. Šanca nákazy psov spomínanými parazitmi bola vyššia v meste než na vidieku. Výnimku však predstavovali vajíčka *Ascaris* spp., u ktorých bola pravdepodobnosť nákazy vyššia na vidieku, čo poukazuje na významnú úlohu domácich zvierat v mechanickom prenose pre ne inak nešpecifických parazitárnych zárodokov. Týmto skutočnostiam odpovedala aj 12,71-krát vyššia pravdepodobnosť kontaminácie pôdy vajíčkami helmintov v segregovaných osadách než v mestách Dolného Zemplína. Vajíčka endoparazitov boli detegované v 10,56 % vyšetrených vzoriek stolice, pričom v nich dominovali vajíčka *Ascaris lumbricoides* a *Trichuris trichiura*. Pozitívne vzorky stolice ľudí boli len z minoritnej populácie. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že nákaza črevnými parazitmi je v lokalite Dolného Zemplína spojená s chudobou, nízkym hygienickými štandardmi a taktiež obmedzeným prístupom k čistej vode.

ÚVOD

Výskyt črevných parazitárnych ochorení na Slovensku nie je príliš vysoký. Črevné parazity sa u ľudí vyskytujú najmä tam, kde sa na obmedzenom priestore sústreďuje väčšie množstvo osôb a kde je absencia zdrojov pitnej vody a kanalizácie (Papajová a kol., 2020). Podľa Atlasu Rómskych komunít 2019 (Ravasz, 2020) sa najviac takýchto lokalít nachádza v Košickom kraji, v ktorom sa nachádza aj oblasť Dolného Zemplína. Táto oblasť je etnicky zmiešaná a marginalizované skupiny obyvateľov žijú poväčšine v chudobe v úzkom kontakte so zvieratami, s čím je spojený nižší hygienický štandard a koexistencia s environmentálnym odpadom. To celkovo ovplyvňuje ich zdravotný stav a taktiež zvyšuje riziko nákazy črevnými parazitmi. Za určitých podmienok to môže predstavovať riziko aj pre celú spoločnosť. Cieľom práce bolo preto zistiť aktuálnu epidemiologickú a epizootologickú situáciu na Dolnom Zemplíne.

MATERIÁL A METÓDY

Z vybraných urbánnych a rurálnych lokalít a z oblastí s prevahou marginalizovaného obyvateľstva na Dolnom Zemplíne bolo celkovo vyšetrených 649 vzoriek trusu psov. Vzorky boli získané v spolupráci s veterinármi a majiteľmi zvierat alebo boli zozbierané na verejných priestranstvách, z voľných plôch v blízkosti ľudských obydli, preto nebolo vždy možné zistiť epizootologické údaje. Vzorky trusu boli na prítomnosť zárodokov parazitov vyšetrované štandardnou flotačnou metódou podľa Juráška, Dubinského a kol. (1993) za použitia Sheatherovho a Faustovho flotačného roztoku. Vzorky stolice obyvateľov Dolného Zemplína boli odoberané v spolupráci s detskými lekármi, sociálnymi pracovníkmi a dobrovoľníkmi. Odberové skúmavky boli rozdané respondentom spolu s informovaným súhlasom. Vzorky stolice boli označené špecifickým číslom. Oslovení respondenti poskytli taktiež aj údaje o veku, pohlaví, mieste bydliska, príslušnosti k menšine alebo k majoritnej skupine obyvateľstva. Na diagnostiku vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách humánnej

stolice bol použitý komerčne vyrábaný kit Paraprep L (Diamondal – Francúzsko). Vzorky pôdy boli odobrané v blízkosti ľudských obydli, z pieskovísk a v blízkosti veňčovísk. Všetky vzorky boli vyšetrené podľa Kazacoska (1983). Vzorky trusu, stolice aj pôdy boli po odbere skladované bez konzervácie pri 4 °C a vyšetrené do 24 hodín v laboratóriu. Výsledky parazitologických vyšetrení boli spracované pomocou tabuľkových a štatistických nástrojov MS Excel.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Doteraz sa výskytu črevných parazitárnych ochorení na Dolnom Zemplíne venovala len malá pozornosť. Pôvodcovia týchto ochorení cirkulujú pri vhodných podmienkach prostredia a za prítomnosti definitívnych hostiteľov, či medzihostiteľov v prostredí, čím predstavujú permanentné riziko nákazy pre človeka. Celkovo sa na prítomnosť vývinových štádií endoparazitov vyšetrilo 426 vzoriek ľudskej stolice od minoritnej (142 vzoriek) a majoritnej populácie (284 vzoriek) na danom území. Vajíčka helmintov sa detegovali v 10,56% vyšetrených vzoriek. Vo vzorkách majoritnej populácie, ktorá žije v štandardných hygienických podmienkach, sme podobne ako Pipiková a kol. (2017) nezistili žiadne vývinové štádiá endoparazitov. Veľmi nízku prevalenciu endoparazitov (0,59%) u majoritnej populácie na východnom Slovensku zaznamenali Papajová a Šoltys (2020). Odlišná situácia bola u obyvateľov z minoritnej skupiny (Tab. 1). V tejto skupine boli v stolici zaznamenané vajíčka *Ascaris lumbricoides* (13,38%) a *Trichuris trichiura* (6,69%). Zlá hygiena, životný štýl, koexistencia so zvieratami bez adekvátnej veterinárnej kontroly a s environmentálnym znečistením značne zvýšila riziko nákazy parazitárnym ochorením. Podobné výsledky uvádzajú vo svojich prácach aj Pipiková a kol. (2017) a Papajová a kol. (2021).

Tab. 1. Výskyt vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách stolice obyvateľov Dolného Zemplína

Eudia		Počet vzoriek (n)	Pozitívne vzorky (n)	Pozitivita (%)	95% konfidenčný interval (CI)
<i>Trichuris trichiura</i>	Majorita	142	0	0	0
	Minorita	284	19	6,69	13,28
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Majorita	142	0	0	0
	Minorita	284	38	13,38	8,75

V súčasnosti sú psy (ale aj iné domáce zvieratá) vnímané ako členovia rodín a spolu s človekom zdieľajú jeho životné prostredie a sú s ním v úzkom kontakte. Toto spolunažívanie teda môže predstavovať dôležitý zdroj kontaminácie prostredia vývinovými štádiami endoparazitov. Z celkového množstva 649 vzoriek trusu bolo na prítomnosť zárodkov endoparazitov pozitívnych 47,15%. V truse sa vyskytovali vajíčka *Toxocara canis*, *Trichuris vulpis*, *Toxascaris leonina*, *Ascaris lumbricoides* a vajíčka z čeľade Ancylostomatidae (Tab. 2).

Tab. 2. Výskyt vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách trusu psov na Dolnom Zemplíne

Psy		Počet vzoriek (n)	Pozitívne vzorky (n)	Pozitivita (%)	95% konfidenčný interval (CI)	Pomer šanci (OR)	Relatívny risk (RR)
<i>Toxocara canis</i>	Mesto	572	145	25,35	71,86	1,67	1,50
	Vidiek	77	13	16,88	18,64	0,56	0,66
<i>Ascaris</i> spp.	Mesto	572	4	0,70	2,25	0,12	0,13
	Vidiek	77	4	5,19	5,73	7,78	7,42
čeľ. Ancylostomatidae	Mesto	572	76	13,28	35,40	2,79	2,55
	Vidiek	77	4	5,19	5,73	0,35	0,39
<i>Trichuris vulpis</i>	Mesto	572	85	14,86	32,49	1,50	1,43
	Vidiek	77	8	10,40	9,40	0,66	0,69
<i>Toxascaris leonina</i>	Mesto	572	22	3,84	6,16	3,04	2,96
	Vidiek	77	1	1,30	1,43	0,32	0,33

Zaujímavým bolo zistenie, že u psov z miest Dolného Zemplína bol zistený vyšší výskyt vajíčok helmintov než u psov z vidieka, čo mohlo byť spôsobené aj tým, že len málo majiteľov psov na vidieku si dalo vyšetriť svoje zvieratá. Naopak Papajová a Šoltys (2020) zistili vyšší výskyt endoparazitóz u psov z rurálnych, než urbánnych lokalít. Najvýraznejšie rozdiely však vo výskyte endoparazitov u psov sú podľa Pipikovej a kol. (2017) medzi psami z urbánneho prostredia a psami z rurálnych oblastí s nižším hygienickým štandardom.

Výsledky štatistickej analýzy poukazujú na to, že v mestskom prostredí je aj pomer šanci nákazy u psov z mesta vyšší, než na vidieku. Naopak, pri *Ascaris* spp. bola pravdepodobnosť nákazy u psov týmto parazitom z rurálneho prostredia 7,78-krát vyššia než u psov z mesta. Je to aj očakávaný výsledok, pretože v tejto skupine psov sa nachádzali aj zvieratá z lokalít s nízkym hygienickým štandardom.

Dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje prítomnosť endoparazitov u ľudí a zvierat, je pôda kontaminovaná zárodkami endoparazitov. Vyšetřilo sa preto celkovo 133 vzoriek pôdy z rôznych oblastí Dolného Zemplína a prítomnosť vývinových štádií endoparazitov sa potvrdila až v 57,89% vyšetřených vzoriek. Najviac zastúpené boli v pozitívnych vzorkách vajíčka *Ascaris* spp., *Toxocara* spp. a *Trichuris* spp. (Tab. 3). Najvyšší výskyt vajíčok endoparazitov (72,44 %) bol vo vzorkách pôdy z oblastí s nízkym hygienickým štandardom (Tab. 3). Podobné výsledky uvádzajú aj Pipiková a kol. (2017), ako aj Papajová a Šoltys (2020). Aj spomínaní autori potvrdili výskyt vajíčok *Ascaris* spp. iba v pôdných vzorkách z lokalít s prevahou marginalizovanej skupiny obyvateľstva. V porovnaní s pôdou z mestského prostredia, bola pravdepodobnosť kontaminácie pôdy vajíčkami endoparazitov v oblastiach s nízkym hygienickým štandardom až 12,71 – krát vyššia. Výrazne na výskyt zárodkov endoparazitov v týchto oblastiach vplývajú viaceré faktory – chudoba, nedostačujúca hygiena a dezinfekcia, nízka úroveň zdravotného povedomia a zlá veterinárna starostlivosť. V mestách prispieva k nižšiemu výskytu zárodkov endoparazitov v pôde aj obmedzený a kontrolovaný pohyb psov, čím sa výrazne znižuje kontakt s prostredím kontaminovaným divo žijúcimi zvieratami, ako aj lepšia hygiena ľudí.

Tab. 3. Výskyt vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách pôdy z lokalít na Dolnom Zemplíne

Pôda	Počet vzoriek (n)	Pozitívne vzorky (n)	Pozitivita (%)	95% konfidenčný interval (CI)	Pomer šanci (OR)	Relatívny risk (RR)
<i>Toxocara</i> spp.	Mesto	35	6	2,87	6,35	0,03
	Osada	98	42	42,85	20,07	25,5
čel. Ancylostomatidae	Mesto	35	3	8,57	19,05	
	Osada	98	0	0	0	0
<i>Toxascaris leonina</i>	Mesto	35	2	5,71	12,70	5,88
	Osada	98	1	1,02	1,43	0,17
<i>Trichuris</i> spp.	Mesto	35	1	2,85	6,35	0,04
	Osada	98	42	42,85	24,50	25,5
<i>Ascaris</i> spp.	Mesto	35	0	0	0	0
	Osada	98	55	56,12	18,80	

Z našich výsledkov vyplýva, že črevné endoparazity predstavujú vážny problém na Dolnom Zemplíne najmä u ľudí z chudobných a segregovaných komunít. Preto je dôležité zamerať sa v danej lokalite aj na vplyv rôznych faktorov na výskyt a šírenie endoparazitózy, vyhodnotiť oblasti s vysokým riskom nákazy a prevenciu črevných parazitárnych infekcií v rizikových skupinách populácie.

Práca bola podporená grantovým projektom VEGA 2/0138/21 a APVV-18-0351.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kazacos K R. Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *Am J Vet Res.* 1983; 44:896-900.
- Ravasz Á. Atlas rómskych komunít 2019. Bratislava: VEDA, 2020.
- Papajová I, Šoltys J. Nematode Infections Spread in Slovakia, an European Temperate Region. *IntechOpen.* 2020.
- Papajová I, Bystrianska J, Giboda M, Becker S L, Utzinger J, Marti H. Intestinal parasites in segregated minority communities of Slovakia: results from a cross-sectional survey in children. *Acta Tropica.* 2021; 214.
- Pipiková J, Papajová I, Šoltys J, Schusterová I, Kočišová D, Toháthyová A. Segregated settlements present an increased risk for the parasite infections spread in Northeastern Slovakia. *Helminthologia.* 2017; 54(3).

ŠTÚDIUM VARIABILITY *PAENIBACILLUS LARVAE* S VYUŽITÍM MALDI-TOF MS

Ivorová S.^{1,2}, Kopčáková A.¹, Šalamúnová S.^{1,2}, Javorský P.^{1†}, Sabo R.³, Legáth J.³, Píknová M.², Pristaš P.^{1,2}

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

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

³Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Katedra farmakológie a toxikológie, Komenského 73, Košice 04181

ABSTRAKT

V posledných rokoch bolo na celom svete pozorované výrazné zhoršenie zdravotného stavu včiel. Jedným z najzávažnejších faktorov ovplyvňujúcich zdravie včelstiev na celom svete je mor včelieho plodu. Toto ničivé ochorenie bez známeho vyliečenia je spôsobené Gram-pozitívnou spóry tvoriacou baktériou *Paenibacillus larvae*. V súčasnosti sa na identifikáciu a typizáciu *P. larvae* používajú metódy založené na DNA. V našej práci boli porovnávané dve najaktuálnejšie technológie založené na DNA (rep-PCR a 16S rRNA) s MALDI-TOF MS fingerprintingom na vyhodnotenie variability *P. larvae* v strednej Európe. Zatiaľ čo analýza 16S rRNA ukázala veľmi obmedzené variácie medzi kmeňmi, zistilo sa, že MALDI-TOF MS je účinnejšia pri diferenciacii *P. larvae*. Prekvapivo sa nepozorovala žiadna jasná korelácia medzi odtlačkami prstov rep-PCR celého genómu a typizáciou založenou na MALDI-TOF MS. Naše údaje naznačujú, že profilovanie proteínov pomocou MALDI-TOF poskytuje presnú a nákladovo efektívnu metódu rýchlej identifikácie kmeňov *P. larvae* a poskytuje nový pohľad na diverzitu kmeňov ako konvenčné prístupy genotypizácie založené na DNA.

ÚVOD

Včely medonosné (*Apis mellifera*) zohrávajú dôležitú úlohu v celom ekosystéme. V posledných rokoch dochádza k ich poklesu na celom svete. Príčinou je množstvo faktorov vplývajúcich na včely, jednou z nich sú choroby. Najzávažnejšou je mor včelieho plodu. Ochorenie je spôsobené Gram-pozitívnou baktériou – *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010). Epidemiologickými štúdiami sa zistilo, že epidémie moru včelieho plodu sú spôsobené klonovo príbuznými baktériami, ktoré zdieľajú biochemické a genetické vlastnosti. Aj napriek tomu pozorujeme medzi nimi diverzitu na úrovni druhu, ktorá vedie k variáciám vo virulencii *P. larvae*. Na prevenciu voči ochoreniam je potrebné lepšie poznať mikrobiálnu biodiverzitu pod úrovňou druhu (Ashiralieva, 2006). Pri subtypizácii *P. larvae* sa všeobecne používa PCR amplifikácia opakujúcich sa elementov DNA. PCR s použitím ERIC primérov odhalila 5 genotypov *P. larvae* s rôznou virulenciou (De Carolis, 2014; Genersch, 2006; Genersch, 2010). Fingerprintingové metódy založené na DNA na genotypizáciu *P. larvae* sú časovo náročné a pracné. Pred niekoľkými rokmi spôsobila revolúciu v identifikácii vzoriek pri diagnostike v klinickej mikrobiológii metóda s názvom MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), ktorá je rýchla, nízko-nákladová a účinná pri identifikácii mikroorganizmov priamo z kolónií (De Carolis, 2014). MALDI-TOF MS umožňuje aj typizáciu baktérií, ktorú je možné využiť pri epizootologických štúdiách a pri kontrole pred vypuknutím ochorenia. Na identifikáciu konkrétnych genotypov a subtypov slúžia ako markery pri MALDI-TOF MS analýze typovo špecifické proteínové maximá v hmotnostnom spektre (Cabrolier, 2015). Cieľom tejto práce bolo porovnať MALDI-TOF MS a molekulové fingerprintingové metódy na rozlíšenie genotypov *P. larvae*.

MATERIÁL A METODIKA

V práci boli použité 4 kmene *P. larvae* (CCM 38, CCM 4484, CCM 4488, CCM 5680) z Českej zbierky mikroorganizmov v Brne, boli izolované v Českej republike. 5 kmeňov *P. larvae* bolo izolovaných z infikovaných úľov na východnom Slovensku, 2 z nich (D3 a D4) pochádzajú z Veľkej Lodiny a 3 z nich (5S, 10S a M1) z Košíc. Pomocou špáradla boli mŕtve larvy vybraté z plástov a homogenizované v 1 ml 0,9% NaCl. Alikvóty homogenizátu boli inokulované na MYPGP agar (Mueller Hinton Broth, Yeast extract, K₂HPO₄, Glucose, Sodium pyruvate; Las, CZ) a kultivované pri 37°C po dobu 48 hodín. Na izoláciu DNA boli kmene *P. larvae* kultivované 48 hodín v tekutom MYPGP médiu pri 37°C. Primárne boli naše kmene identifikované pomocou MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight*). Genómová DNA bola izolovaná pomocou Gen Elute Bacterial Genomic DNA kit (SIGMA Aldrich, USA). PCR amplifikácie boli uskutočnené pomocou C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Za účelom genetického fingerprintingu bola uskutočnená ERIC-PCR analýza, pri ktorej boli použité priméry ERIC1R a ERIC2. Na posúdenie fylogenetickéj príbuznosti bol 16S rRNA gén amplifikovaný s použitím univerzálnych primérov fD1 a rP2. DNA fragmenty boli sekvenované dideoxy sekvenačnou metódou v laboratóriách Eurofins Genomics (Eurofins Genomics Europe Shared Services GmbH, Konstanz, Germany). Získané sekvencie 16S rRNA boli porovnávané s databázou GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Program MEGA 7 bol použitý na porovnávanie viacerých sekvencií. Na porovnanie príbuznosti ERIC genotypov boli z GenBank databázy stiahnuté celé genómové sekvencie genotypov ERIC I-IV. Priemerná nukleotidová identita bola vypočítaná s použitím nástroja ANI/AAI-Matrix (voľne dostupný na <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

P. larvae, ako pôvodca ochorenia moru včelieho plodu, sa považuje za jednu z najväčších hrozieb pre populáciu včiel. Pri prevencii a kontrole infekcie je subtypizácia *P. larvae* podstatným a dôležitým epidemiologickým nástrojom, nakoľko izoláty spôsobujúce epidémie nie sú nevyhnutne geneticky identické. Na genotypizáciu *P. larvae* sa používajú rôzne metódy založené na DNA ako je aj ERIC-PCR, ktorá sa považuje za najvhodnejšiu (Genersch, 2006; Beims, 2020). Naše výsledky ukázali, že väčšina *P. larvae* z našej zbierky patrí medzi genotypy I a II na základe vzniknutých fragmentových vzorov. U izolátu 10S, ktorý bol klasifikovaný ako genotyp II, chýbal fragment o veľkosti 2800 bp a mal namiesto toho prítomný fragment o veľkosti približne 4200 bp. Aby sme mohli povedať, že sa jedná o nový doposiaľ nepopísaný genotyp je potrebné uskutočniť ďalšie štúdie. Izolát CCM38, ktorý predstavuje referenčný kmeň pre genotyp ERIC IV, sa líšil vo fragmentovom vzore od ostatných našich izolátov. Alternatívnym spôsobom na identifikáciu a subtypizáciu mikroorganizmov, oproti štandardným a používaným metódam založeným na DNA, sú techniky založené na unikátnych proteínových znakoch. Medzi tieto techniky patrí aj MALDI-TOF MS, ktorá je rýchla a jednoduchá v porovnaní s metódami založenými na DNA (Culebras, 2018). Doposiaľ bola MALDI-TOF MS použitá na analýzu poddruhov *P. larvae* len v štúdií Schäfer a kol. (2014). Všetky naše izoláty *P. larvae* boli na základe MALDI-TOF MS identifikované ako *P. larvae* s hodnotou skóre medzi ($\geq 1,7$ a < 2). Sekvenčná analýza potvrdila identifikáciu pomocou MALDI-TOF MS, t.j. všetky naše izoláty boli identifikované ako *P. larvae* s podobnosťou vyššou ako 99,4% v porovnaní so sekvenciami 16S rRNA *P. larvae* v GenBank databáze. Komparatívna sekvenčná analýza naznačuje, že variabilita *P. larvae* pozorovaná pri ERIC-PCR genómovom fingerprintingu nie je sprevádzaná diverzitou na úrovni 16S rRNA a vo všeobecnosti sú všetky kmene *P. larvae* veľmi podobné na genómovej úrovni (priemerná nukleotidová identita medzi genómovými sekvenciami

reprezentujúcimi ERIC genotypy I-IV bola extrémne vysoká – 99,6%). Vytvorili sme dendrogram založený na MALDI-TOF hmotnostných spektrách MSP, ktorý sme porovnali s výsledkami ERIC-PCR. MSP dendrogram rozdelil naše izoláty na úrovni vzdialenosti 400 a viac do 4 biotypov. Nepozorovali sme však žiadnu koreláciu medzi ERIC genotypmi a MALDI biotypmi. Izolát CCM38 patriaci do genotypu ERIC IV vytvoril samostatnú skupinu s extrémne vysokou vzdialenosťou od ERIC IV referenčného kmeňa *P. larvae* DSM 3615. Zvyšné naše izoláty patriace na základe ERIC-PCR medzi ERIC I a ERIC II genotypy boli rozdelené do dvoch príbuzných MALDI biotypov s úrovňou vzdialenosti mierne nad 400. Tento výsledok však nekoreluje s výskumom uskutočneným Schäfer a kol., ktorý vo svojej práci uvádza, že ERIC I a ERIC II genotypy môžu byť identifikované na základe hmotnostných spektier. V našich experimentoch sme boli schopný prostredníctvom MALDI-TOF MS techniky odlišiť genotyp ERIC IV od ERIC I a ERIC II genotypov, ale nie genotyp ERIC I od ERIC II, čo mohlo byť spôsobené použitím rozličných nástrojov pri analýze MALDI-TOF (Bruker Ultraflexترم alebo v našom prípade použitý Microflex mass spectrometer) alebo odlišnou kvalitou biologického materiálu. Naše výsledky naznačujú, že MALDI-TOF MS dokáže odhaliť väčšiu biodiverzitu medzi izolátmi *P. larvae* v porovnaní s metódami založenými na DNA (ERIC-PCR a 16S rRNA analýza) a teda môže byť vhodnejšia pri epizootologických štúdiách.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ashiralieva A, Genersch E. Reclassification, genotypes and virulence of *Paenibacillus larvae*, the etiological agent of American foulbrood in honeybees- a review. *Apidologie*. 2006; 37: 411-420.
- Beims H et al. Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American foulbrood. *Int. J. Med. Microbiol.* 2020; 310: 151394.
- Cabrolier N et al. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry identifies *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53: 1395-1398
- Culebras E. In *The Use of Mass Spectrometry Technology (MALDI-TOF) in Clinical Microbiology*; Cobo, F., Ed.; Academic Press: Cambridge, Massachusetts, USA, 2018; pp 213-233. ISBN: 9780128144510
- De Carolis E et al. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014; 8: 1081-1088.
- Genersch E et al. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2006; 56: 501–511.
- Genersch E. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *J. Invertebr. Pathol.* 2010; 103: S10-S19.
- Schäfer M O et al. Rapid identification of differentially virulent genotypes of *Paenibacillus larvae*, the causative organism of American foulbrood of honey bees, by whole cell MALDI-TOF mass spectrometry. *Vet. Microbiol.* 2014; 170: 291-297.

PÔDNE ROZTOČE AKO MEDZIHOSITELIA PÁSOMNÍC A FAUNISTICKÉ POZNATKY O VYBRANÝCH SKUPINÁCH PÔDNEJ FAUNY ALPÍNSKEHO STUPŇA TATIER

Jászayová A.^{1,2}, Chovancová G.³, Hurníková Z.¹

¹Parazitologický ústav SAV, v. v. i., Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

³Správa TANAP-u so sídlom v Tatranskej Lomnici

ABSTRAKT

V rámci prebiehajúceho výskumu gastrointestinálnych parazitov tatranských endemitov kamzíka vrchovského tatranského (*Rupicapra rupicapra tatrica*) a svišťa vrchovského tatranského (*Marmota marmota latirostris*) boli u týchto druhov živočíchov potvrdené pásomnice čeľade Anoplocephalidae. Medzihostiteľmi v životnom cykle pásomníc sú pôdne roztoče radu Oribatida. Cieľom štúdie bolo molekulárnymi metódami identifikovať zastúpenie infikovaných roztočov v prírodných podmienkach a určiť skladbu fauny panciernikov alpínskeho stupňa na 4 lokalitách: v Lomnickom sedle, Tomanovej, Velickej a Waksmundzkej doline a chrobákov alpínskeho stupňa aj na lokalite Furkotská dolina v Tatranskom národnom parku. Molekulárnymi metódami sme potvrdili, že 0,07% panciernikov radu Oribatida bolo infikovaných larválnymi štádiami anoplocefalidných pásomníc. Na základe morfolologickej identifikácie sme infekčné štádium potvrdili u 5 druhov panciernikov *Ceratozetes gracilis*, *Edwartzetes edwardsi*, *Trichoribates novus*, *Tectocephus velatus sarakensis* a *Scheloribates laevigatus*. Identifikovali sme 22 554 jedincov panciernikov v 101 druhoch a 33 čeľadiach. Potvrdili sme alpské a karpatské endemity *Oribatella dudichi* (1,7%) a *Metrioppia helvetica* (0,1%). Najviac zastúpeným druhom bol xerotolerantný druh *Tectocephus velatus velatus* (11,9%). Na 5 lokalitách sme zaznamenali 332 chrobákov v 55 druhoch a 7 čeľadiach. Najviac zastúpenou bola čeľaď Staphylinidae (80%). V našich vzorkách sme zaznamenali dva eudominantné druhy *Anotylus hamatus* (19,3%) a *Alpinia lohseiana* (18,4%), dva dominantné druhy a 8 subdominantných druhov. Potvrdili sme nový vzácny druh pre faunu Slovenska, *Ptiliolium sahlbergi* (Ptiliidae).

ÚVOD

Tatry sú najvyšším horským masívom v strednej Európe medzi Alpami a Kaukazom a vďaka svojmu pravému vysokohorskému rázu predstavujú pre vedu a výskum veľmi hodnotnú a zaujímavú oblasť. Na pomerne malom území sa stretávame s vysokou diferenciáciou a diverzitou stanovísk a biotických podmienok. V horskej oblasti sa zachovali vekovo diferencované refúgiá a izolované populácie rastlín a živočíchov. Tatry sú hodnotným centrom endemizmu v strednej Európe (Chovancová a Cichocki, 2010). Okrem typických vysokohorských druhov živočíchov ako kamzíka vrchovského tatranského a svišťa vrchovského tatranského sa na území zachovali nie len glaciálne relikty, ale aj endemické druhy živočíchov. Najvýznamnejšia, hoci druhovo najchudobnejšia, je fauna bezstavovcov alpínskeho stupňa. Nachádzajú sa tu druhy arkto-alpínske, alpínske a boreo-montánne. Keďže niektoré druhy pôdnych roztočov radu Oribatida pôsobia ako medzihostitelia v životnom cykle pásomníc z čeľadi Anoplocephalidae a Mesocestoididae, zamerali sme sa v našom výskume na zistenie zastúpenia jedincov infikovaných larválnymi štádiami týchto pásomníc v prírodných podmienkach a na faunistickú identifikáciu pôdnych roztočov a chrobákov alpínskeho stupňa Tatier.

MATERIÁL A METODIKA

Pôdne vzorky sme odoberali náhodne z miest, kde sme našli kamzičí a sviští trus. Výskum sme realizovali na štyroch lokalitách: Lomnické sedlo, Tomanova, Velická a Waksmundzká dolina. Chrobáky sme zbierali aj z Furkotskej doliny. Materiál sme odoberali počas rokov

2018-2021. Odobrané vzorky pôdy (350 g) sa presušali v Berleseho-Tullgrenovom aparáte po dobu 4 dní. Z prepadnutej fauny sme vyseparovali pancierniky a na ich determináciu sme použili kľúče podľa Kunsta (1971) a Weigmanna (2006). Na molekulárne analýzy sme optimalizovali protokol pre nedeštruktívnu izoláciu gDNA podľa Katza (2018). Zozbierané chrobáky sme determinovali podľa určovacích kľúčov (Assing a Schülke, 2012; Benick a Lohse, 1974; Besuchet, 1974; Besuchet a Franz, 1971). Pre spoločenstvo chrobákov bola stanovená dominancia druhov na jednotlivých lokalitách.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme na 4 lokalitách identifikovali 22 554 panciernikov, v 101 druhoch a v 33 čeľadiach. Najviac zastúpenými čeľadami boli Tectocepheidae (20,9%), Scheloribatidae (11,6%) a Oppiidae (9,5%). V rámci alpínskeho stupňa sme zaznamenali veľkú rodovú rozmanitosť. Potvrdili sme 35 druhov spoločných pre všetky lokality, s najväčšou druhovou rozmanitosťou v lokalite Velická dolina (30 druhov). Najviac jedincov panciernikov sme zaznamenali v Lomnickom sedle (31%). Najviac zastúpeným druhom bol xerotolerantný druh *Tectocepheus velatus velatus* (11,9%). Niektoré druhy, potvrdené našim výskumom, sú svojím výskytom limitované iba na stredoeurópske pohoria (*Metrioppia helvetica*, *Conoppia palmicineta*, *Mycobates carli* a *Oromurcia sudetica*). Potvrdili sme aj výskyt alpských a karpatských endemitov *Oribatella dudichi* (1,7%) a *Metrioppia helvetica* (0,1%). Molekulárnymi metódami sme spracovali 630 zmiešaných vzoriek panciernikov, zozbieraných počas sezón 2020 a 2021. Vo vyšetrených vzorkách bola potvrdená pozitivita nakazenia cysticerkoidmi 0,07%. V našich zberoch sme zaznamenali druhy, ktoré sú v literatúre uvádzané ako medzihostitelia pásomníc a to *Scheloribates laevigatus*, *S. latipes*, *Ceratozetes gracilis*, *Oppiella nova*, *Liebstadia similis*, *Achipteria coleoprata*, my sme však infekciu u týchto druhov panciernikov nezistili. Infekčné štádium sme počas morfolologickej identifikácie potvrdili u druhov *Ceratozetes gracilis*, *Edwartzetes edwardsi*, *Trichoribates novus*, *Tectocepheus velatus sarakensis* a *Scheloribates laevigatus*, pričom *T. v. sarakensis* sme ako medzihostiteľský druh potvrdili prvýkrát.

Na 5 lokalitách sme zozbierali 332 chrobákov v 55 druhoch a 7 čeľadiach. Najviac zastúpenou bola čeľaď Staphylinidae (80%). Zaznamenali sme dva eudominantné druhy *Anotylus hamatus* (19,3%) a *Alpinia lohseiana* (18,4%), dva dominantné druhy a 8 subdominantných druhov. Zistili sme výskyt koprofágneho druhu *Platystethus laevis*, ktorý sme našli na odberovom mieste spod trusu kamzíka v Tomanovej doline. Z literatúry je tento druh známy z vápencových lokalít a Mantič a Benedikt (2011) ho uvádzajú práve z oblastí s prítomnosťou kamzícieho trusu. Druh sa vyskytuje v suchších hniezdach živočíchov ale aj svištích norách (Horion 1963). Naš výskum potvrdil pre faunu Slovenska nový, vzácny druh *Ptiliolium sahlbergi* (Ptiliidae). Čeľaď Ptiliidae vo všeobecnosti obýva všetky typy rozkladajúcej sa organickej hmoty, napr. podstielku, kompost, zdochliny alebo hniezda vtákov, cicavcov, mravcov. Sú to veľmi malé jedince s veľkosťou tela 0,4–1,3 mm (Komosiński a Marczak 2016). Identifikované spoločenstvá chrobákov na jednotlivých študovaných lokalitách vykazovali značné druhové rozdiely v závislosti od abiotických a biotických faktorov charakterizujúcich jednotlivé lokality. Napriek doterajším poznatkom o druhovom zložení fauny chrobákov Tatier neexistujú údaje o rozšírení endemických, boreoalpínskych a boreomontánnych druhov, podobne sú nedostatočne preskúmané niektoré biotopy napr. podmáčané alpínske lúčne biotopy. Budúci výskum fauny týchto biotopov nepochybne prinesie ďalšie nálezy nových druhov bezstavovcov.

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Assing V, Schülke M. Die Käfer Mitteleuropas. In: Freude H, Harde KW, Lohse GA, Klausnitzer B (eds) Staphylinidae I, Band 4, Zweite neubearbeitete Auflage. Spectrum Akademische Verlag, Heidelberg. 2012; s. 560.
- Benick G, Lohse GA. 14. Tribus Callicerini (Athetae). In: Freude H, Harde KW, Lohse GA (eds) Die Käfer Mitteleuropas. Bd. 5. Staphylinidae II (Hypocyphtinae und Aleocharinae), Pse-laphidae. Goecke & Evers, Krefeld. 1974; s. 72–221.
- Besuchet C. 24. Familie: Pselaphidae. In: Freude H, Harde KW, Lohse GA (eds) Die Käfer Mitteleuropas. Bd. 5. Staphylinidae II (Hypocyphtinae und Aleocharinae), Pselaphidae. Goecke & Evers, Krefeld. 1974; s. 305–362.
- Besuchet C, Franz H. 18. Familie: Scydmaenidae. In: Freude H, Harde KW, Lohse GA (eds) Die Käfer Mitteleuropas. Bd. 3. Adephaga 2, Palpicornia, Histeroidea, Staphylinoidea 1. Goecke & Evers, Krefeld 1971; s. 271–303.
- Horion A. Faunistik der Mitteleuropäischen Käfer. Staphylinidae. 1. (Micropeplinae bis Euaesthetinae). Band 9. A. Feyel. Überlingen-Bodensee. 1963; XII + 1–412.
- Chovancová B, Cichocki W. *História poznávania fauny Tatier*. In Tatry – príroda (Koutná A., Chovancová B. eds.). Praha: Baset. 2010; s. 393–408.
- 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.
- Komosiński K, Marczak D. *Ptiliolium caledonicum* (Sharp, 1872) and *Baeocrara japonica* (Matthews, 1885) (Coleoptera: Staphylinoidea: Ptiliidae) new to Poland, with additional Polish records of *Acrotichis nana* Strand, 1946. *The Coleopterists Bulletin*. 2016; 70(1): 87–90.
- Kunst M. Nadkohorta pancířníci – Oribatei. Klíč zvířeny ČSSR, díl IV. (Daniel M., Černý V., eds). Praha : Academia. 1971; s. 531–580.
- Mantič M, Benedikt S. Nálezy drabčiekú (Coleoptera, Staphylinidae) *Platystethus laevis* Märkel et Kiesenwetter, 1848 a *Cousya nigrata* (Farmaire et Laboulbène, 1856) na Slovensku. *Folia faunistica Slovaca*. 2011; 16(1): 17–18.
- Weigmann G. Acari, Actinochaetida: Hornmilben (Oribatida). Goecke & Evers, Keltern. 2006; s. 520.

VPLYV SFINGOIDNEJ BÁZY 2-EPI-JASPINU NA ADENOKARCINÓM KRČKA MATERNICE *IN VITRO*

Kešel'áková A., Nosalová N., Bago Pilátová M., Kello M.
Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

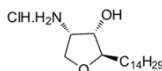
Nádorové ochorenia zostávajú aj naďalej jednou z najväčších hrozieb pre ľudské zdravie. V priebehu posledných desaťročí bola pozornosť výskumu smerovaná na prírodné produkty. Morské prostredie sa len nedávno stalo cieľom záujmu ako bohatý zdroj štruktúrne jedinečných aktívnych metabolitov. V našej práci sa venujeme zlúčenine 2-epi-jaspínu (M1), ktorá je štruktúrnym derivátom jaspínu B pochádzajúceho z morskej hubky *Jaspis* sp. M1 vykazuje antiproliferatívnu aktivitu v koncentrácii $IC_{50} = 6,5 \mu\text{mol/L}$ na bunkovej línii HeLa, ktorá bola potvrdená cytometrickou analýzou Cell Trace™ Yellow. Z cytomorfológického hľadiska sme pozorovali zníženú proliferáciu a adhérenciu buniek s morfológickými zmenami so signifikantným nárastom buniek v skoršej a neskoršej apoptóze po inkubácii s danou zlúčeninou. Detekcia zvýšenej aktivity kaspázy 3, 7 a 8 naznačuje, že bunky prechádzajú exekučnou fázou apoptózy, ktorá mohla byť aktivovaná vonkajšou signálnou dráhou.

ÚVOD

Adenokarcinóm krčka maternice je druhým najčastejším malígnym ochorením u žien s vysokou mortalitou (Sung a kol., 2021). Aj napriek dostupnej terapii, vrátane resekcie nádoru či rádioterapie, boli pozorované slabé výsledky chemoterapeutickej liečby (Marth a kol., 2017). Zlyhanie terapie a následná recidíva sú hlavnými faktormi, ktoré prispievajú k zvýšenej mortalite, preto sa výskum zameriava na vývoj nových terapeutických možností (Florea a kol., 2020). Značný počet metabolitov pochádzajúcich z morských zdrojov vykazuje protinádorový efekt prostredníctvom inhibície rastu ľudských nádorových buniek *in vitro*, *in vivo* (myšacích) modeloch a klinických štúdiách (Newman a kol., 2014). Súčasťou mechanizmu antiproliferatívneho pôsobenia je podpora tvorby voľných radikálov, zvýšeného stresu endoplazmatického retikula, indukcia apoptózy a modulácia signálnych dráh zapojených do prežívania nádorových buniek (Alves a kol., 2021). 2-epi-jaspín (M1) je izomér aktívneho prírodného produktu jaspínu B izolovaného z morskej hubky *Jaspis* sp., ktorý možno štruktúrne považovať za derivát anhydrofytosfingozínu. Fytosfingozín v ľudských nádorových bunkách vyvoláva apoptózu od kaspáz závislým aj nezávislým spôsobom (Park a kol., 2003). M1 sa javí ako potenciálne antiproliferatívna molekula a jej mechanizmus účinku je predmetom nášho výskumu.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaná zlúčenina: (2R,3S,4S)-4-amino-2-tetradecyltetrahydrofuran-3-ol hydrochloride (M1, Obr. 1)



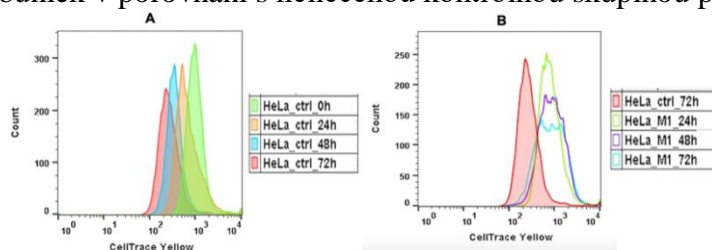
Obr. 1. 2-epi-jaspine

Bunková línia: HeLa (adenokarcinóm krčka maternice). Metódy analýzy antiproliferatívnej aktivity *in vitro*: Cell Trace™ proliferation kit, detekcia apoptózy prostredníctvom AO/PI farbenia. Metódy štúdia mechanizmu účinku antiproliferatívneho pôsobenia: prietoková cytometria (detekcia externalizácie fosfatidylserínu, detekcia aktivity kaspázy 3 a 7). Western blot analýza: kvalitatívna a kvantitatívna detekcia proteínov (kaspáza 3, kaspáza 8)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza proliferatívnej aktivity pomocou Cell Trace™ proliferation kit

Cell Trace Yellow je vysoko priepustné farbivo štiepené intracelulárnymi esterázami za vzniku fluorescenčných zlúčenín. Tie sa viažu na amíny v bunke a poskytujú stabilný signál o proliferácii buniek. Výsledky na *Obr.2B* ukázali, že M1 ($IC_{50} = 6,5 \mu\text{mol/L}$) inhibuje proliferáciu HeLa buniek v porovnaní s neliečenou kontrolnou skupinou po 72hod.

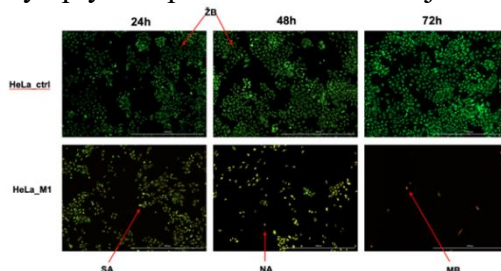


Obr. 2. Prietoková cytometrická analýza proliferácie HeLa buniek farbivom Cell Trace TMYellow.

A: neliečené skupiny HeLa buniek; B: HeLa bunky liečené M1 ($IC_{50} = 6,5 \mu\text{mol/L}$)

Analýza antiproliferatívnej aktivity pomocou dvojitého AO/PI farbenia

Akridínová oranž (AO) a propidiumjodid (PI) sú farbivá viažúce sa na nukleové kyseliny. Zatiaľ čo, AO je permeabilná a vytvára zelenú fluorescenciu, PI prechádza len cez membránu s narušenou integritou a poskytuje červený fluorescenčný signál. Na základe toho je možné bunky rozdeliť na živé, apoptotické a mŕtve bunky. Po liečení HeLa buniek so zlúčeninou M1 sme pozorovali redukciu buniek a inhibíciu proliferácie už po 24h. Po dlhšej inkubácii (48h,72h) bol viditeľný aj výrazný nárast počtu apoptotických a mŕtvych buniek v dôsledku iniciácie a progresie apoptózy vplyvom pôsobenia testovanej zlúčeniny (*Obr.3*).



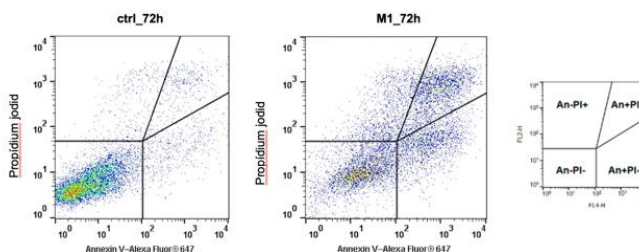
Obr. 3. Mikroskopická detekcia apoptózy prostredníctvom AO/PI farbenia.

Zelená= živé bunky, žltá= skorá apoptóza, oranžová = neskorá apoptóza, červená = mŕtve bunky

Detekcia apoptózy prostredníctvom externalizácie fosfatidylserínu

Fosfatidylserín (PS) je lokalizovaný na vnútornej strane plazmatickej membrány. V prípade, ak bunky prechádzajú apoptózou PS je externalizovaný a dostupný na detekciu konjugátom Annexín V, zatiaľ čo PI prechádza porušenou membránou buniek. Annexin V a PI sa preto používajú ako markery programovej smrti. HeLa bunky vystavené pôsobeniu testovanej zlúčeniny M1 vykazovali signifikantný nárast skorej (An+PI-) a neskorej fázy (An+PI-) apoptózy po 48h. Zároveň bol pozorovaný výrazný pokles živých buniek (An-PI-) už po 24h inkubácii (*Obr. 4*).

	živé bunky	skorá apoptóza	neskorá apoptóza	mŕtve bunky
C_24h	85,4±1,0	7,4 ± 1,1	3,6 ± 0,5	3,5 ± 1,0
M1_24h	62,5 ± 2,2**	16,8 ± 1,8	11,2 ± 0,8	9,6 ± 0,4
C_48h	89,6 ± 0,2	6,0 ± 0,9	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,4
M1_48h	45,5 ± 2,6***	18,0 ± 0,2*	23,1 ± 1,0**	13,5 ± 1,5
C_72h	87,0 ± 1,2	5,4 ± 0,6	3,4 ± 0,4	4,2 ± 0,6
M1_72h	41,9 ± 0,0***	19,0 ± 1,3*	24,4 ± 1,9**	14,8 ± 1,4



A

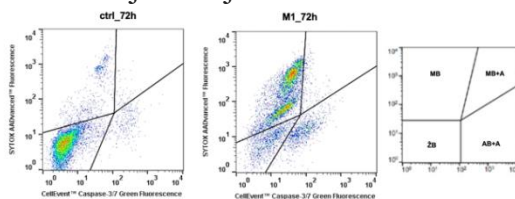
B

Obr. 4: Analýza výskytu apoptózy buniek ovplyvnených látkou M1. A: Tabuľka prezentujúca dáta analýz 3 nezávislých experimentov so smerodajnými odchýlkami. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

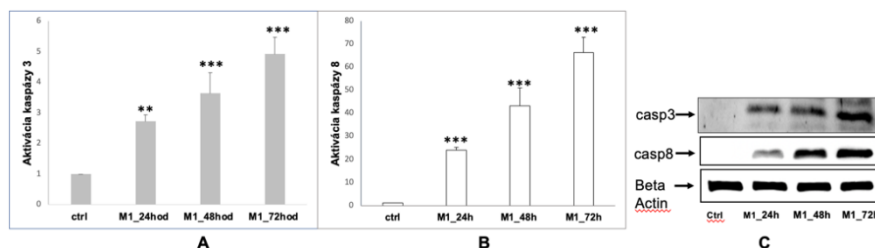
B: Reprézntatívny bodový graf po 72 hod inkubácii HeLa +M1 analyzovaný pomocou Annexin V; An-PI-=živé bunky, An+PI-=skorá apoptóza, An+PI+=neskorá apoptóza, An-PI+=mŕtve bunky

Detekcia aktivácie kaspáz pomocou prietokovej cytometrie a western blot analýzy

Apoptóza je charakterizovaná aktiváciou kaspáz prostredníctvom vonkajších alebo vnútorných signalizačných dráh. Vnútorne a vonkajšie dráhy sa zbiehajú a podporujú štiepenie exekučných kaspáz 3 a 7, ktorých zvýšená aktivita je zodpovedná za morfolgické zmeny buniek počas apoptózy. Pomocou prietokovej cytometrie sme testovali aktivitu exekučných kaspáz 3 a 7. Už po 24 hod sme pozorovali signifikantný nárast apoptotických buniek s so zvýšenou aktivitou kaspáz, zatiaľ čo po 72 hod boli prítomné prevažne mŕtve bunky bez aktivity (Obr.5). Aktivitu kaspázy 3 sme potvrdili aj western blot analýzou, ktorá vykazovala signifikantný nárast jej aktívnej formy už po 24hod (Obr.6A). Takisto sme zaznamenali aj signifikantný nárast aktívnej formy kaspázy 8 (Obr.6B), z čoho vyplýva, že apoptóza by mohla byť aktivovaná aj vonkajšou cestou.



Obr. 5: Reprézntatívny bodový graf analýzy aktivity exekučných kaspáz 3 a 7; ŽB= živé bunky, AB+A=apoptotické bunky s aktivitou, MB+A=mŕtvé bunky s aktivitou, MB= mŕtvé bunky



Obr. 6: Western blot analýza štiepných foriem kaspáz. A: Graf znázorňujúci nárast štiepnej kaspázy 3 po inkubácii s M1. B: Graf znázorňujúci stúpanie aktívnej formy kaspázy 8. C: Doplnujúci reprezentatívny obrázok western blot analýzy porovnávajúci výskyt kaspáz v HeLa bunkách liečených M1 oproti štandardu Beta-actin.

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0653/19, 1/0513/21).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alves C, Diederich M. Marine Natural Products as Anticancer Agents. *Marine drugs*. 2021; 19:8
- Florean C, Dicato M, Diederich M. Immune-modulating and anti-inflammatory marine compounds against cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2020; 80:58-72
- Marth C, et al. Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017. 28(suppl_4), iv72–iv83.
- Newman DJ, Cragg GM. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Marine drugs*. 2014; 12(1):255–278
- Park MT, et al. Phytosphingosine induces apoptotic cell death via caspase 8 activation and Bax translocation in human cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003; 9(2):878–885
- Park MT, et al. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria- mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(50):50624–50634
- Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021; 71(3):209–249

ELEKTRICKÁ STIMULÁCIA AKO MOŽNOSŤ REGENERAČNEJ TERAPIE PRI TRAUMATICKOM POŠKODENÍ MIECHY

Kokavcová M., Bačová M., Gálik J.

Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice

ABSTRAKT

Trauma miechy je závažné neurologické ochorenie, predstavujúce ďalekosiahly problém, a vylepšenie stavu pacientov patrí medzi priority mnohých vedeckých tímov po celom svete. Aj napriek intenzívnemu úsiliu, stále neexistuje klinicky schválená a účinná forma terapie na regeneráciu a funkčnú obnovu miechy po jej poškodení. Naším cieľom je skúmanie možností regeneračnej terapie založenej na kombinácii metód elektrickej stimulácie a podpornej farmakologickej liečby. V experimente sme pozorovali behaviorálne a proteínové zmeny u potkanov po kompresii miechy (15 minút/sila 40g), po ktorej sme zvieratám podkožne implantovali elektrický stimulátor (50 μ A). Analyzovali sme 4 skupiny zvierat: zvieratá po kompresii miechy Th9 s funkčným elektrickým stimulátorom (OFS+SCI), zvieratá so SCI a nefunkčným elektrickým stimulátorom (nOFS+SCI), a dve skupiny SCI zvierat, ktorým bol 7 dní po kompresii súčasne s elektrickou stimuláciou podávané protizápalové liečivo atorvastatín (OFS+SCI+ATR, nOFS+SCI+ATR). Behaviorálne testy potvrdili progresívne zlepšenie motorických a senzorických funkcií u zvierat, ktoré mali implantovaný funkčný OF stimulátor. Proteínové analýzy ukázali, že podávanie atorvastatínu v kombinácii s OF stimuláciou malo synergický účinok na proteíny pre neurofilamenty. Hladina proteínov pre novoprerastajúce vlákna (Gap-43) nepotvrdila synergický účinok OF stimulácie s ATR.

ÚVOD

Poranenie miechy (*spinal cord injury*, SCI) je definované ako poškodenie, ktorého dôsledkom môže byť čiastočná až úplná strata senzorických a motorických funkcií (Ahuja a kol., 2017). Traumatické SCI je charakterizované dvoma na seba nadväzujúcimi fázami. Primárne (iniciačné) poškodenie je priamym následkom mechanickej traumy nervového tkaniva (napr. kompresia alebo transekcija nervového tkaniva). Patofyziologické zmeny objavujúce sa po primárnom mechanickom poškodení môžu pretrvávajúť týždne až mesiace a označujú sa ako sekundárne poškodenie. Medzi sekundárne mechanizmy radíme napríklad edém, oxidatívny stres, ischémiu, zápalovú reakciu a produkciu voľných radikálov (Anwar a kol., 2016; Rowland a kol., 2008).

V súčasnosti sa vedecká komunita zaoberá vývojom rôznych liečebných postupov, ktoré by zlepšili funkčný stav pacientov po tomto závažnom poranení. Príkladom je podávanie atorvastatínu, ktorý svojimi pleiotropnými účinkami pôsobí preventívne voči osteolýze, má protizápalové a imunomodulačné účinky a podporuje vaskulogenézu (Pannu a kol., 2005).

Hlavným limitujúcim faktorom funkčnej regenerácie je neschopnosť poškodených axónov znovu obnoviť svoje prepojenie s cieľovými vláknami na opačnej strane miesta lézie. Ak nenastane opätovná inervácia, axonálne spojenie sa preruší natrvalo a dôjde k intenzívnej degenerácii buniek a okolitého tkaniva. Sľubným príkladom terapie zameranej na podporu prerastania nervových vlákien je elektrická stimulácia, ktorej cieľom je obnova prenosu nervového signálu. Na regeneráciu ascendentných a descendentných nervových dráh sa využíva technika stimulácie oscilujúcim elektrickým poľom (OF stimulácia), ktorej cieľom je podpora prerastania axónov cez miesto lézie v mieche oboma smermi. Zmena polarita elektrického poľa nastáva každých 15 minút tak, aby došlo k prerastaniu senzorických aj motorických axónov (Borgens a kol., 1999; McGinnis a Murphy, 1992; McCaig, 1987).

Jedným zo základných kritérií účinnosti liečby SCI je obnovenie motorických a senzorických funkcií, preto behaviorálne testovanie patrí medzi jedny zo základných prvkov experimentálnych štúdií (Fouad a kol., 2020). Medzi najvyužívanejšie testy patrí hodnotenie motorických funkcií zadných končatín pomocou BBB (Basso, Beattie and Bresnahan)

neurologického skóre (Basso a kol., 1995) alebo test horúcej platne na určenie vnímania bolesti (Šedý a kol., 2008).

MATERIÁL A METÓDY

Experimenty sme vykonávali na trojmesačných laboratórnych potkanoch kmeňa Wistar. Počas experimentu bola potkanom vykonaná laminektómia, a po odhalení 9. hrudníkového stavca (Th9) bola navodená kompresia miechy pomocou 40g závažia po dobu 15 minút. Po navodení traumy bol zvieratám implantovaný elektrický stimulátor (50 μ A) pre aplikáciu elektrickej stimulácie cez miesto lézie. Stimulátor bol kvôli ochrane elektrických obvodov pred implantáciou zaliatý do biokompatibilného silikónového materiálu (Duosil Express, SHERA). Polarita stimulátora sa menila každých 15 minút, po dobu 6 týždňov. K stimulátoru boli pripojené dve inertné elektródy (Pt/Ir), ktoré boli implantované do epidurálneho priestoru, a to dva segmenty kraniaálne a kaudálne od miesta lézie (Th9). Stimulátor bol umiestnený pod kožu zvieratá a zafixovaný pomocou tkanivového lepidla histoacryl (B.Braun). V priebehu siedmich dní po kompresii bol zvieratám súčasne s OF stimuláciou podávaný atorvastatín (ATR), ktorý znižuje zápalovú odpoveď. Všetkým zvieratám v experimente bola vykonaná kompresia miechy a boli rozdelené do 4 skupín: zvieratá s funkčným stimulátorom (OFS+SCI, n=5), zvieratá s nefunkčným stimulátorom (nOFS+SCI, n=5), zvieratá s funkčným stimulátorom, ktorým bol podávaný atorvastatín (OFS+SCI+ATR, n=5), zvieratá s nefunkčným stimulátorom, ktorým bol podávaný atorvastatín (nOFS+SCI+ATR, n=5). Počas 6 týždňovej doby prežívania bol zdravotný stav zvierat monitorovaný prostredníctvom vybraných behaviorálnych testov, ktorými sme sa zameriavali na motorické (BBB neurologické skóre) a senzorické funkcie (test horúcej platne). Na konci prežívania boli zvieratá humane usmrtené dekapitáciou. Odobraté tkanivo bolo homogenizované a supernatanty, ktoré sme získali centrifugáciou sme použili na stanovenie hladín proteínov prostredníctvom Western Blot analýzy. Stanovené boli hladiny pre neurofilamenty (Nf-1) a novoprerastajúce nervové vlákna (Gap-43). Pokus bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, Č.záznamu 4148/2021-220, dňa 3.5.2021.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z pozorovaní a získaných dát sme dospeli k záveru, že samotná implantácia stimulátora nespôsobovala žiadne formy obmedzenia, nebola zaznamenaná prítomnosť zápalových procesov ani nekróza okolitého tkaniva. Na základe doterajších výsledkov môžeme potvrdiť, že implantácia OF stimulátora je bezpečnou metódou, ktorá v rámci kombinovanej terapie napomáha funkčnej obnove a regenerácii poškodeného nervového tkaniva (Bačová a kol., 2019).

Počas 6 týždňovej doby prežívania sme u všetkých zvierat hodnotili motorické funkcie pomocou BBB neurologického skóre a senzorické funkcie pomocou testu horúcej platne (hot plate). Najvýraznejšie zlepšenie motorických aj senzorických funkcií sme zaznamenali v skupine zvierat OFS+SCI+ATR, čo nasvedčuje tomu, že podávanie atorvastatínu na zmiernenie zápalovej odpovede ihneď po kompresii v kombinácii s OF stimuláciou napomohlo rýchlejšej regenerácii poškodeného tkaniva. V skupine OFS+SCI sme pozorovali výrazné zlepšenie lokomočných schopností v porovnaní so skupinami zvierat, ktorým bol implantovaný nefunkčný stimulátor. Získané hodnoty v jednotlivých skupinách boli: OFS+SCI+ATR - BBB: 13, hot plate 8,8 s; OFS+SCI . BBB: 11, hot plate 10s ; nOFS+SCI - BBB: 8, hot plate 11,5 s; nOFS+SCI+ATR - BBB: 9, hot plate: 11s. Vo všeobecnosti platilo, že v skupinách zvierat s funkčným OF stimulátorom (OFS+SCI+ATR, OFS+SCI) zotavenie prebiehalo bez výraznejších komplikácií a rýchlejšie, v porovnaní so skupinami zvierat, ktoré mali implantovaný nefunkčný stimulátor (nOFS+SCI+ATR, nOFS+SCI).

Neurologické zlepšenie môže byť spôsobené aj moduláciou zápalovej odpovede. Z tohto dôvodu sme vykonali analýzy, či OF stimulácia a podávanie ATR počas 7 dní po kompresii ovplyvnili regeneráciu axónov na úrovni proteínov. Pomocou metódy Western Blot sme analyzovali hladiny proteínov pre neurofilamenty (Nf-1) a novoprerastajúce vlákna (Gap-43). Podávanie protizápalového liečiva pôsobilo na neurofilamenty neuroprotektívne, keďže zvýšenie optickej denzity sme zaznamenali vo všetkých miechových segmentoch skupín zvierat, ktorým bol podávaný ATR. Platilo to pre experimentálne skupiny s funkčným aj nefunkčným stimulátorom, optická denzita v jednotlivých skupinách klesala v poradí OFS+SCI+ATR, nOFS+SCI+ATR, OFS+SCI a nakoniec nOFS+SCI. Proteín špecifický pre novoprerastajúce vlákna (Gap-43) sme detegovali hlavne v skupine OFS+SCI v porovnaní so zvyšnými tromi skupinami. Tento trend sme sledovali v oblasti miesta poškodenia, kraniálnych a kaudálnych spinálnych segmentoch.

Z výsledkov môžeme konštatovať, že pre novoprerastajúce vlákna (Gap-43) sme nepozorovali synergický efekt podávania ATR a OF stimulácie. Naopak, v prípade proteínu pre neurofilamenty (Nf-1) možno hovoriť o synergickom účinku liečby OF stimuláciou v kombinácii s ATR. Vysvetlením môže byť fakt, že OF stimulácia napomáhala prerastaniu nových nervových vlákien, avšak synergický účinok nebol preukázaný.

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0098/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahuja CHS, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2017; 3: 1-21.
- Anwar MA, et al. Inflammogenesis of Secondary Spinal Cord Injury. *Front. Cell. Neurosci.* 2016; 10: 1-24.
- Bačová M, et al. Epidural oscillating field stimulation as an effective therapeutic approach in combination therapy for spinal cord injury. *J. Neurosci. Methods*. 2019; 311: 102-110.
- Basso DM. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *J. Neurotrauma*. 1995;12 (1): 1-21.
- Borgens RB, et al. An imposed Oscillating Electrical Field Improves the Recovery of Function in Neurologically Complete Paraplegic Dogs. *J. Neurotrauma*. 1999; 16:7: 639-657.
- Fouad K, et al. Behavioral testing in animal models of spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 2020; 333: 1-9.
- McCaig CD. Spinal neurite reabsorption and regrowth in vitro depend on the polarity of an applied electric field. *Development*. 1987.100 (1): 31-41.
- McGinnis ME, et al. The lack of an effect of applied d.c. electric fields on peripheral nerve regeneration in the guinea pig. *Neuroscience*. 1992 ; 51 (1): 231-244.
- Pannu R, et al. Attenuation of acute inflammatory response by atorvastatin after spinal cord injury in rats. *J. Neurosci. Res*, 2005; 79 (3): 340-350.
- Rowland JW, et al. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*. 2008; 25 (5).
- Schuhfried O, et al. Non-invasive neuromuscular electrical stimulation in patients with central nervous system lesions: an educational review. *J Rehabil Med*. 2012; 44 (2): 99-105.
- Šedý J, et al. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 2008; 32 (3): 550-580.

POTENCIÁLNE ANTIPROLIFERAČNÉ ÚČINKY NOVÉHO 3,5-DIARYLIZOXAZOLU

Majirská M. ¹, Takáč P. ², Kello M. ¹, Kudličková Z. ³

¹Ústav farmakológie, Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice

²Katedra farmakológie a toxikológie; UVLF, Košice

³ Ústav chemických vied, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Inovatívna liečba nádorových ochorení je stále aktuálnou problematikou s naliehavou potrebou nových selektívnych liečiv. V našich experimentoch sme sa zamerali na štúdium izoxazolových derivátov, ktoré disponujú najrôznejšími biologickými účinkami s už úspešným zavedením v klinickej praxi. Naším cieľom bolo skúmanie antiproliferatívnej aktivity 3,5-diarylizoxazolu v *in vitro* podmienkach. Metabolickým testom MTT sme preukázali, že testovaná zlúčenina DHI₁ účinne inhibovala proliferáciu buniek Jurkat (akútna T-lymfocytová leukémia). Na ostatných nádorových a nenádorových líniiach cytotoxický efekt do 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pozorovaný nebol, čo naznačuje vysokú selektivitu. Pomocou prietokovej cytometrickej analýzy sme zistili, že DHI₁ prispieva k zastaveniu bunkového cyklu buniek Jurkat vo fáze G2/M s následnou indukciou apoptózy. Naše výsledky naznačujú, že tento derivát 3,5-diarylizoxazolu má potenciálne antiproliferatívne účinky v *in vitro* podmienkach a stáva sa tak atraktívnym podkladom pre vykonanie ďalších experimentov.

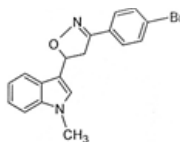
ÚVOD

Prírodné alkaloidy s izoxazolovým jadrom (1,2-oxazol) predstavujú malú skupinu látok nachádzajúcich sa v baktériách, hubách, rastlinách či morských hubkách. Napriek tomu, že ide o menšiu skupinu látok, niektoré z nich sú dávno známe a používajú sa aj v klinickej praxi (Rahbaek a Christophersen, 2001). Skupina izoxazolových derivátov je charakteristická rozličnými biologickými aktivitami ako sú antimikrobiálne, protizápalové, antivírusové či protinádorové (Sysak a Obmińska-Mrukowicz, 2017; Arya a kol., 2021). Okrem toho bolo publikovaných viac ako tridsať patentov popisujúcich možné použitie izoxazolových zlúčenín na liečbu viacerých ochorení, obzvlášť malignít (Aissa a kol., 2021). Zníženie úmrtnosti na nádorové ochorenia je hlavnou výzvou, ktorej spoločnosť čelí v tejto dobe, preto sme sa rozhodli pre bližšie poznanie a štúdium týchto zaujímavých zlúčenín.

MATERIÁL A METODIKA

Testovaná látka (Obr. 1):

- 5-(1-Methyl-1H-indol-3-yl)-3-(4-bromophenyl)-4,5-dihydroisoxazole (DHI₁)



Obr. 1. Chemická štruktúra testovanej zlúčeniny DHI₁

MTT test je kolorimetrická metóda na meranie bunkovej metabolickej aktivity. Bunky s počtom 5×10^3 /jamku boli kultivované 24 h pred pridaním testovaných zlúčenín v 96-jamkovej platni (SARSTEDT, Nümbrecht, Nemecko). Na skrining sme použili rôzne koncentrácie látok (100, 50, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) v celkovom objeme 100 μl /jamku. Po 72h inkubácii (37 °C, 5 % CO₂) sme pridali do každej jamky 10 μl roztok MTT (5 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemecko). Po 4h inkubácii pri 37°C v tme sme pridali 100 μl roztoku SDS (10 % sodium dodecyl sulfát) na rozpustenie vzniknutých kryštálov formazánu a následne opäť inkubovali 24h. Farebné zmeny sme následne vyhodnotili spektrofotometricky

pri 540 nm na Cytation™ 3 Cell Imaging Multi-Mode Reader (Biotek, Winooski, VT, USA). Určili sme hodnoty IC₅₀ testovanej látky z troch nezávislých experimentov.

Ďalšie analýzy sa uskutočnili pomocou prietokového cytometra FACSCalibur (BD Biosciences). Jurkat bunky boli nasadené v počte 5 x 10⁵ na stredne veľké Petriho misky (60 x 15mm) (SARSTEDT, Nümbrecht, Germany) a inkubované s DHI₁ v koncentrácii 30 μmol.l⁻¹ 24, 48, 72h (37°C, 5% CO₂). Na analýzu bunkového cyklu sme použili roztok Triton X-100 (0,1 %), ribonukleázu A (0,5 mg/ml) a PI (propídium jodid, 0,025 mg/ml, Sigma-Aldrich). Apoptóza bola detegovaná pomocou kitu Annexin V-Alexa Fluor® 647 (1:300, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) a PI. Na sledovanie mitochondriálneho potenciálu bol použitý roztok TMRE (Tetrametylrhodamín etyl ester perchlorát) (0.1 μmol.l⁻¹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Na analýzu proteínu PARP bola použitá protilátka Cleaved-PARP ((Asp214) Rabbit mAb), 1:300, Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, United States).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza metabolickej aktivity buniek Jurkat

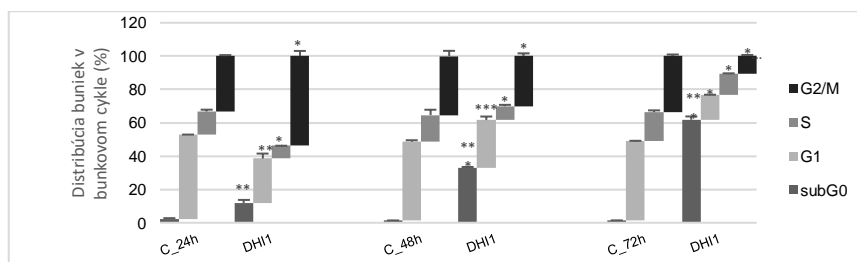
Z našich výsledkov vyplýva, že DHI₁ vykazuje antiproliferatívny efekt voči bunkovej línii Jurkat s hodnotou IC₅₀ 21,83±2,35 μmol.l⁻¹, pričom táto aktivita je vysoko selektívna, pretože na ostatných bunkových líniiach proliferácia potlačená nebola (tab. 1). Nasledujúca pracovná koncentrácia DHI₁ bola stanovená na 30 μmol.l⁻¹.

Tab.1. Hodnoty IC₅₀ (μmol.l⁻¹) testovaných látok

testované látky	Bunkové línie						
	Jurkat	HCT116	HeLa	MCF-7	MDA-MB-231	BJ-5ta	Cos-7
DHI₁	21,83±2,35	>100	>100	>100	>100	>100	>100

Analýza bunkového cyklu buniek Jurkat

Zistili sme, že DHI₁ po 24 hodinách vyvolala signifikantné zastavenie vo fáze G2/M (nárast o 20,6% buniek vo fáze G2/M v porovnaní s kontrolou). Súčasne sme zaznamenali významný nárast sub-G0 populácie buniek, ktoré sú typicky považované za apoptotické, s najvyšším vrcholom po 72 h inkubácii. Viacero štúdií zameraných na ovplyvnenie bunkového cyklu prostredníctvom derivátov izoxazolov preukázalo, že ho inhibujú v G2/M fáze (Arya a kol., 2021; Sysak a Obmińska-Mrukowicz, 2017).

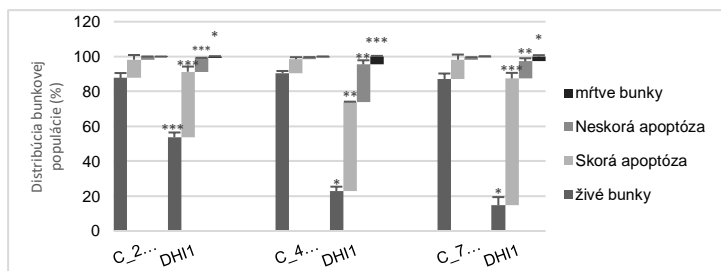


Obr. 2. Grafické znázornenie analýzy zmien bunkového cyklu v bunkách Jurkat po pôsobení DHI₁ 24, 48 a 72 hodín v porovnaní s kontrolou

Experiment bol uskutočnený trikrát nezávisle od seba a uvedené hodnoty sú priemerom týchto meraní so štatistickou signifikanciou: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Analýza apoptózy

Potvrdili sme proapoptotický účinok sledovanej látky s významným nárastom počtu skorých apoptotických buniek so sprievodným postupným poklesom počtu živých buniek s časovou závislosťou (Obr. 3).

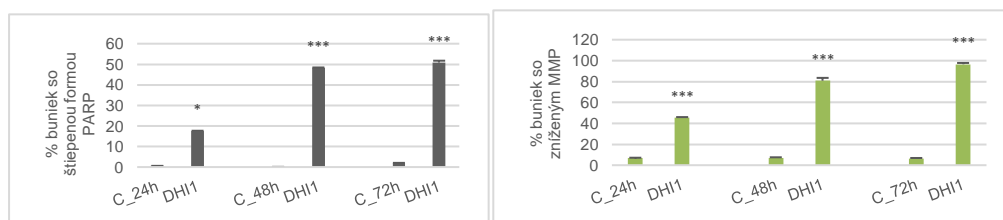


Obr. 3. Grafické znázornenie cytometrickej detekcie apoptózy prostredníctvom farbenia Annexínom V a PI v nádorových bunkách Jurkat exponovaných DHI₁

Uvádzajú sa priemerné údaje troch nezávislých experimentov so štatistickou signifikanciou: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Analýza mitochondriálnych funkcií a proteínu PARP

Kľúčovým indikátorom mitochondriálnej aktivity je rozdiel v elektrickom potenciáli medzi vonkajšou a vnútornou mitochondriálnou membránou, známy ako mitochondriálny membránový potenciál (MMP). Zníženie MMP je spájané s poruchou nielen mitochondriálnych funkcií ale aj apoptózou. V našich experimentoch sme zistili, že DHI₁ spôsobuje významný časovo závislý nárast počtu buniek so zníženým MMP vo všetkých troch expozičných časoch. PARP (poly (ADP-ribóza) polymeráza) plní dôležitú úlohu v rôznych bunkových procesoch, vrátane opravy DNA. Jeho štiepením dochádza k inhibícii funkcií tohto enzýmu. DHI₁ spôsobuje štiepenie PARP u Jurkat buniek, pričom v čase 72 hodín pôsobenia DHI₁ dosahovalo percento buniek so štiepenou formou PARP 50,87 %. Hodnoty sú uvedené na obr. č. 4.



Obr. 4. Grafické znázornenie analýzy MMP a proteínu PARP po ošetrení buniek DHI₁ v časoch 24, 48 a 72 hodín v porovnaní s kontrolou

Hodnoty sú výsledkom priemeru troch experimentov vykonaných nezávisle od seba so štatistickou signifikanciou: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Ako prví sme opísali tento nový derivát diarylizoxazolu ukazujúc jeho významné potenciálne protinádorové účinky, ktoré je ale potrebné ďalej skúmať ako v *in vitro* tak aj *in vivo* podmienkach.

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0653/19, 1/0513/21).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aissa I, et al. Glioblastoma-specific anticancer activity of newly synthesized 3,5-disubstituted isoxazole and 1,4-disubstituted triazole-linked tyrosol conjugates. In *Bioorganic Chemistry*. ISSN 0045-2068, 2021, vol. 114, 105071.
- Arya G, Kaur K, Jaitak V. Isoxazole derivatives as anticancer agent: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. In *Eur. J. Med. Chem*. ISSN 0223-5234, 2021, vol. 221, 113511.
- Sysak A, Obmińska-Mrukowicz B. Isoxazole ring as a useful scaffold in a search for new therapeutic agents. In *Eur. J. Med. Chem*. ISSN 0223-5234, 2017, vol. 137, p. 292-309.

MIKROKLÍMA A TOPOGRAFIA KRASOVÝCH ZÁVRTOV MAJÚ PODSTATNÝ VPLYV NA PÔDNE SPOLOČENSTVÁ CHVOSTOSKOKOV (HEXAPODA, COLLEMBOLA)

Marcin M.

Ústav biologických a ekologických vied, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

V štúdií sme analyzovali diverzitu a štruktúru spoločenstiev pôdnych chvostoskokov (Collembola) na topograficky a mikroklimaticky odlišných stanovištiach nezalesnených krasových závrtoch a taktiež sme posudzovali a identifikovali možné mikrorefúgiá pre pôdne taxóny Collembola. Chladné (a vlhké) habitaty reprezentovali dná závrtoch, zatiaľ čo najteplejšie (a suché) habitaty predstavovali stanovištia na strmých južných svahoch. Mikroklimatická heterogénnosť prostredia závrtoch prispela k vyššej diverzite chvostoskokov v krasovom území. Bolo pozorované, že pôdna mikroklima a topografia majú výraznejší vplyv na pôdne spoločenstvá Collembola ako obsah pôdneho organického uhlíka. Štruktúra spoločenstiev Collembola bola v súlade s mikroklimatickým charakterom jednotlivých stanovišť. V krasových závrtoch boli identifikované mikrohabitaty pre rozličné funkčné skupiny pôdnych chvostoskokov, pričom hygrofilné a mezofilné druhy preferovali chladné dná a planiny a xerofilné/xerorezistentné a teplomilné druhy skôr teplé planiny a svahy orientované na juh. Prítomnosť endemických a reliktných druhov v študovaných závrtoch poukazuje na dôležitosť týchto prírodných krasových útvarov z hľadiska ochrany prírody.

ÚVOD

V súčasnosti sa čoraz viac pozornosti venuje lokalitám označovaným ako mikrorefúgiá, ktoré môžu slúžiť ako útočisko pre terestrické článkonožce, kde napr. špecializované druhy prispôbené chladným a vlhkým podmienkam prostredia môžu prežiť nepriaznivé podmienky v rámci dlhého obdobia (Dobrowski, 2011; Suggitt a kol., 2018; Batori a kol., 2019). Napriek pribúdajúcej literatúre týkajúcej sa problematiky refúgií pôdnej fauny je potrebné viesť ďalšie výskumy zamerané na prieskum menej prebádaných krajinných útvarov a rôznych taxónov pôdnych živočíchov, ktoré ich obývajú. V štúdií predpokladáme, že pôdne spoločenstvá chvostoskokov sa na jednotlivých stanovištiach závrtoch budú líšiť v dôsledku odlišných (topografických, mikroklimatických a pôdno-chemických) podmienok prostredia. Ďalej predpokladáme, že patterny distribúcie funkčných skupín Collembola jednotlivých stanovišť budú korešpondovať s mikroklimatickým charakterom ich habitatov. Posúdená bude refugiálna kapacita krasových závrtoch pre ubiquistickú a značne abundantnú skupinu pôdnych článkonožcov, Collembola.

MATERIÁL A METODIKA

V prostredí troch nezalesnených závrtoch rôzneho tvaru, veľkosti a hĺbky pri obci Kečovo bolo v transekte z juhu na sever vybraných 5 stanovišť (2 na okolitej planine (PA, PB), svah orientovaný na juh (S) a sever (N), a dno (B) (t.j. v poradí PA, N, B, S, PB). Po odbere pôdnych vzoriek boli jedince extrahované vo vysokogradientnom extraktore (Crossley a Blair, 1991), následne boli fixované v 96% benzylalkohole a identifikované pomocou fázovo-kontrastného mikroskopu na úrovni druhu. V rámci stanovišť závrtoch sme zaznamenali nadmorskú výšku, sklon svahov a ich expozíciu a tiež parametre ako topografický index, množstvo slnečného žiarenia, počet hodín priameho slnečného žiarenia, vegetačné spoločenstvá, teplotu pôdy a pôdno-chemické parametre (obsah organického C, celkového N a pôdneho pH/H₂O). Teplota pôdy stanovišť bola kontinuálne meraná každé 4 hodiny pomocou dataloggerov v hĺbke pôdy 3 cm od 8. novembra 2020 do 7. novembra 2021. Analyzované boli kvantitatívne (priemerná abundancia; počet druhov) a kvalitatívne

(Shannonov index diverzity; Pielouov index equitability) parametre spoločenstiev chvostoskokov. Podobnosti spoločenstiev Collembola závrto a stanovišť boli analyzované pomocou ordinačnej analýzy NMS (Non-metric multidimensional scaling). Klasifikovaných bolo 6 funkčných skupín podľa ich afinity k pôdnej vlhkosti (hygrofilné, mezofilné, xerofilné/xerorezistentné) a teplote (eurytermné, adaptované na chlad a teplomilné). Patterny distribúcie funkčných skupín (pre počty druhov a priemerné abundancie) boli testované analýzou všeobecného lineárneho modelu (GLM).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Boli zistené významné rozdiely v priemernej pôdnej teplote medzi jednotlivými stanovišťami skúmaných závrto. Dná dolín možno považovať za chladné (a vlhké) habitaty, čo bolo jednoznačne potvrdené špecifickými topografickými (t.j. nízka hodnota slnečného žiarenia a vysoký topografický index naznačujúci vyššiu pravdepodobnosť akumulácie vody) a teplotnými charakteristikami (t.j. najnižšie priemerné teploty pôdy). Vo všeobecnosti svahy orientované na sever vykazovali najnižšie hodnoty slnečného žiarenia a boli o niečo teplejšie ako ich dna a zároveň teplejšie ako planiny (PA). Najteplejšie (a relatívne suché) habitaty predstavovali stanovištia na strmších svahoch orientovaných na juh. Tieto výsledky sú v súlade s údajmi z predchádzajúcich štúdií (Vilisics a kol., 2011; Kemencei a kol., 2014; Bátorí a kol., 2019, 2022). Okrem toho, stanovištia na dnách závrto sa vyznačovali veľmi nízkym množstvom pôdneho organického uhlíka pričom najvyšší obsah bol zaznamenaný na relatívne teplých stanovištiach na planine (PB). Mikroklima a heterogenita habitatov sú považované za dôležité faktory, ktoré môžu značne ovplyvniť spoločenstvá pôdnych živočíchov z hľadiska ich abundancie, druhového bohatstva a štruktúry (Vilisics a kol., 2011; Kemencei a kol. 2014; Bátorí a kol., 2022). Väčšie rozdiely v mikroklimatických podmienkach vykazovali najmä stanovištia kruhového závrto (2) so strmými svahmi, čo pravdepodobne viedlo k väčším rozdielom v parametroch spoločenstiev Collembola v porovnaní s ostatnými závrmi. Výraznejšie bol viditeľný nielen mikroklimatický, ale aj vegetačný gradient, dno tohto závrto bolo asociované s vegetáciou horských a podhorských oblastí (Hegedúšová-Vantarová a Škodová, 2014). Významné rozdiely v počte druhov boli zistené medzi mikroklimaticky kontrastnými stanovišťami dvoch susedných kruhových závrto, v ktorých bol zaznamenaný stúpajúci trend počtu druhov Collembola smerom od planiny s vysokým obsahom organického uhlíka k vnútorným častiam závrto s nízkym obsahom organického uhlíka. Zhrňujeme, že na stanovištiach ako chladné dno a teplý svah orientovaný na juh boli zaznamenané vyššie počty druhov a abundancie Collembola ako na okolitej planine a to v dôsledku priaznivejšej pôdnej mikroklimy. Vo väčšom a elipticky tvarovanom závrte bol naznačený opačný pattern, t.j. stúpajúci trend počtu druhov a indexov diverzity smerom k planine, avšak významné rozdiely v parametroch spoločenstiev Collembola sa tu nepotvrdili. Susedné závrty s podobnou morfológiou a veľkosťou ukázali aj najvyššiu podobnosť v štruktúre spoločenstiev pôdnych Collembola, hlavne v prípade teplých a suchých svahov a planín asociovaných s charakteristickými xerotermofilnými druhmi. Jedenásť druhov Collembola sa vyskytovalo výlučne len v závrtoch a predstavovali skôr druhy s nízkou abundanciou. Takéto malé populácie môžu byť ľahšie ohrozené extinkciou v dôsledku klimatických zmien. Čo sa týka distribúcie funkčných skupín Collembola, hygrofilné a mezofilné skupiny vykazovali významnú preferenciu pre najchladnejšie časti závrto (t.j. dna) a hygrofilné tiež pre stanovištia na planine (PA). Naopak xerofilné/xerorezistentné a teplomilné skupiny vykazovali jasnú preferenciu pre najteplejšie časti závrto (t.j. svahy orientované na juh) a stanovištia na planine (PA). To poukazuje na to, že závrty sú miestom zaujímavej funkčnej a pôdnej diverzity pôdnych článkonožcov, významne prispievajú k celkovej biodiverzite krasovej krajiny, čo zdôrazňuje ich dôležitosť v programoch ochrany a manažmentu prírody (Dobrowski, 2011). V tejto štúdií boli

zaznamenané vzácne karpatské a západokarpatské endemity na severne orientovaných planinách (PA), a to chladnomilný a hygrofilný druh *Orthonichiurus rectopapillatus* a teplomilný a mezofilný druh *Pumilinura loksai*. Prítomnosť takýchto vzácných prvkov pôdnej fauny s charakteristickým úzkym rozšírením poukazuje na jedinečnosť týchto krasových depresí. Zatiaľ čo globálne otepľovanie vystavuje mnohé druhy nebezpečenstvu vyhynutia v dôsledku zmeny regionálnych teplôt a režimu zrážok, topografické variácie terénu v rámci závrtovej kotliny môžu tlmiť takéto účinky vytvorením špecifických mikroklimatických podmienok, ktoré môžu faune poskytnúť vhodné podmienky prostredia k prežitiu. Takéto topograficky heterogénne útvary môžu slúžiť ako mikrorefúgiá jednak pre rôzne xerotermofilné druhy, ktoré by sa mohli rozširovať v dôsledku otepľovania a jednak pre druhy adaptované na chlad prostredníctvom akumulácie chladnejšieho vzduchu na dne takýchto útvarov.

Štúdia bola realizovaná za podpory Slovenskej Vedeckej Grantovej Agentúry, projekty VEGA 1/0346/18 a 1/0438/22 a Agentúry na Podporu Výskumu a Vývoja, projekt APVV-21-0379.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bátori Z, et al. Topographic depressions provide potential microrefugia for ground-dwelling arthropods. *Elementa: Science of the Anthropocene*. 2022; 10(1):e00084.
- Bátori Z, et al. Karst dolines provide diverse microhabitats for different functional groups in multiple phyla. *Scientific Reports*. 2019; 9:e7176.
- Crossley DA, Blair JM. A high efficiency, low-technology Tullgren type extractor for soil microarthropods. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 1991; 34(1):187-192.
- Dobrowski SZ. A climatic basis for microrefugia: The influence of terrain on climate. *Global Change Biology*. 2011; 17(2):1022-1035.
- Hegedúšová-Vantarová K, Škodová I. Rastlinné spoločenstvá Slovenska. 5. Travnino-bylinná vegetácia (Plant communities of Slovakia 5. Grassland Vegetation). Veda, Bratislava. 2014.
- Kemencei Z, et al. Microhabitat associations of land snails in forested dolinas: implications for coarse filter conservation. *Community Ecology*. 2014; 15(2):180-186.
- Suggitt AJ, et al. Extinction risk from climate change is reduced by microclimatic buffering. *Nature Climate Change*. 2018; 8(8):713-717.
- Vilisics F, et al. Small scale gradient effects on isopods (Crustacea: Oniscidea) in karstic sinkholes. *Biologia*. 2011; 66(3):499-505.

TAJOMNÉ B CHROMOZÓMY V KARYOTYPE HÁČIKOHLAVCA *ACANTHOCEPHALUS LUCII*: VPLYV PCB KONTAMINÁCIE?

Marková A.^{1,2}, Orosová M.¹

¹Parazitologický ústav SAV, Košice, Slovensko

²Katedra zoológie, UNIBA, Bratislava, Slovensko

ABSTRAKT

Cieľom predkladanej práce bola detailná karyologická analýza háčikohlavca *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala: Echinorhynchidae), črevného parazita rýb z priemyselne znečistenej vodnej nádrže Zemplínska Šírava. Karyotyp *A. lucii* pozostáva zo šiestich autozomálnych chromozómov, dvoch (♀) alebo jedného (♂) gonozomálnych chromozómov X, a jedného až troch nadpočetných B chromozómov ($2n = 8/7$, $n = 1m + 2sm + 1a(X) + 1-3B$). Metódou FISH bol detegovaný počet a umiestnenie lokusov ribozomálnych génov (18S rDNA). Kombináciou CMA₃ a DAPI farbenia bola zistená lokalizácia heterochromatínu a farbením dusičnanom strieborným potvrdená aktivita génových klastrov pre rRNA. Prítomnosť malých, metacentrických B chromozómov bola zistená vo väčšine buniek u všetkých študovaných jedincov *A. lucii*. Na základe predchádzajúcich štúdií, naznačujúcich spojitosť medzi prítomnosťou B chromozómov a znečistením prostredia predpokladáme, že vysoká hladina chemickej kontaminácie vodného ekosystému Zemplínska Šírava je príčinou vzniku týchto karyologických zmien u študovanej populácie rybích endoparazitov *A. lucii*.

ÚVOD

Dlhé roky prevádzky podniku Chemko Strážske a najmä kontinuálne vypúšťanie odpadovej vody obsahujúcej vysoké koncentrácie polychlórovaných bifenylov (PCB) do vodnej nádrže Zemplínska Šírava spôsobili, že toto rozsiahle vodné dielo patrí v súčasnosti medzi najviac PCB kontaminovaný ekosystém v Európe (Šalgovičová a Zmetáková, 2006). Chromozómy sú náchylné na poškodenie toxickými faktormi znečisteného prostredia; môžu byť indukované poruchy opravného mechanizmu buniek a následne poškodené štruktúry chromozómov (Iannuzzi a kol., 2009). Výsledkom sú aberantné bunky s rôznymi štruktúrnymi alebo funkčnými poruchami genetického materiálu, a taktiež výskyt „nadpočetných“ B chromozómov (Ludewig a Robertson, 2013). Pri hodnotení vplyvu environmentálneho znečistenia môžu byť nápomocné biomarkery, akými sú práve cytogenetické zmeny (Nielsen a kol., 1996).

Parazitické organizmy sa začali čoraz častejšie využívať v environmentálnych štúdiách vďaka svojej schopnosti akumulovať kontaminanty o koncentracii mnohonásobne prevyšujúcej koncentráciu polutantov v tkanivách hostiteľa (Sures a kol., 2017). Ako bioindikátory kvality prostredia sa často študujú háčikohlavce (Acanthocephala). Z pohľadu karyológie sú tieto endoparazity zriedka študovanou skupinou; údaje o chromozómoch sú známe len u 13 druhov z celkového počtu 1327 háčikohlavcov (Špakulová a Casanova, 2004). Diploidný počet varíruje od $2n = 5$ do $2n = 16$ a mechanizmus determinácie pohlavia je XX u samičiek a X0 u samcov. Moderné metódy ako fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH), bola aplikovaná len u dvoch druhov rodu *Pomphorhynchus* (Bombarová a kol., 2007).

V predkladanej práci sa zameriavame na posúdenie možného vplyvu znečisteného vodného prostredia na mikro- a makroštruktúru chromozómov črevného parazita rýb *A. lucii* a zároveň na detailnú cytogenetickú analýzu technikami molekulárnej cytogenetiky.

MATERIÁL A METODIKA

Po vypitvaní 55 ostriežov zelenkavých (*Perca fluviatilis*) z vodnej nádrže Zemplínska Šírava bolo získaných 39 háčikohlavcov *A. lucii*. Z nich bolo na cytogenetické štúdium použitých 21 samcov a 14 samíc, 4 ďalšie jedince boli fixované v 100% etanole a použité na izoláciu genomickej DNA (gDNA). Živé parazity boli inkubované v 0,025 % kolchicíne (1 hod),

následne v hypotonickom roztoku 0,075 KCl (4 až 6 hod) a fixované v zmesi kyseliny octovej a metanolu (1:3) po dobu 15 - 30 minút. Preparáty boli pripravené „hot plate“ technikou (Orosová a Špakulová, 2018), farbené boli po dobu 25-35 min v 5% roztoku Giemsa, opláchnuté destilovanou vodou a vysušené pri izbovej teplote. gDNA *A. lucii* bola izolovaná pomocou CTAB extrakcie. 18S rDNA sonda bola pripravená PCR amplifikáciou (35 cyklov: 94 °C, 30s; 60 °C, 30s; 72 °C, 90s) pomocou špecifických primerov a značená nick transláciou s biotínom-16-dUTP. Metóda FISH bola realizovaná podľa práce Orosová a Špakulová (2018) - eliminácia RNA prebehla pôsobením 100 µg/ml RNase A v 2× SSC (1 h pri 37 °C) a denaturácia DNA vplyvom 70 % formamidu v 2× SSC (3 min 30 s pri 68 °C). Pripravená hybridizačná zmes (označená sonda, kompetičná DNA a dextran sulfát), denaturovaná pri teplote 90 °C, bola v objeme 10µl aplikovaná na každé podložné sklíčko. Hybridizácia prebiehala vo vlhkej komôrke pri 37 °C počas noci (~20 h). Detekcia signálu bola zabezpečená Cy-3-konjugovaným streptavidínom a chromozómy boli kontrastne zafarbené 0,5 µg/ml DAPI v DABCO antifade médiu. Diferenciálne farbenia (DAPI, CMA₃, AgNO₃) prebehli podľa práce Orosová a kol. (2021).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Základná diploidná sada chromozómov *A. lucii* pozostáva z ôsmich chromozómov ($2n = 8$) u samíc a siedmich chromozómov u samcov, pričom šesť je autozomálnych (metacentrické a submetacentrické) a jeden (samec) alebo dva (samička) sú pohlavné chromozómy X (akrocentrické); $2n = 8/7$; $n = 1m + 2sm + 1a (X)$. Dĺžka chromozómov klesala plynule, najväčší pár chromozómov meral 2,9 µm a najmenší 1,7 µm. Na žiadnom páre chromozómov nebola zreteľná sekundárna konstriktoria. Každé študované individuum *A. lucii* obsahovalo okrem štandardnej sady chromozómov aj malé nadpočetné metacentrické B chromozómy, ktorých počet v jednotlivých bunkách kolísal od jedna, dva, po najčastejšie tri.

Doteraz existujú informácie o karyotype troch geograficky vzdialených populácií *A. lucii*, z Bulharska (Mutafova a kol., 1997), z vodnej nádrže Ružín (Špakulová a kol., 2002) a súčasné štúdiá z nádrže Zemplínska Šírava (obe lokality SR). Základný súbor chromozómov vykazuje relatívne vysokú podobnosť ako v diploidnom počte, celkovej morfológii prvých dvoch autozomálnych chromozómových párov a pohlavného chromozómu X a aj typ určenia pohlavia XX/X0 je rovnaký. Populácie sa však prekvapivo líšia v polohe centroméry tretieho páru autozomálnych chromozómov. Kým u oboch slovenských populácií háčikohlavcov je tento pár submetacentrický, u bulharských parazitov je definovaný ako subtelocentrický. Jednou z hypotetických možností evolučnej reštrukturalizácie chromozómu č. 3 je intrachromozomálna zmena bez vplyvu na počet chromozómov, t. j. pericentrická inverzia, výsledkom ktorej je chromozóm s posunutou centromérou do submetacentrickej polohy. Pericentrické inverzie sú v cytogenetickej divergencii živočíšnych druhov celkom bežné a boli zdokumentované aj u háčikohlavcov *Pomphorhynchus laevis* a *P. tereticollis* (Bombarová a kol., 2007). Rozdiely sú zreteľné aj pri porovnávaní absolútnych dĺžok odpovedajúcich chromozómov. Avšak tie pravdepodobne predstavujú náhodnú variáciu spôsobenú kondenzačným efektom (Preeti a Saiyad, 2011) a taktiež vysokou mierou subjektivity pri meraniach jednotlivých chromozómov.

Študované populácie *A. lucii* sa však markantne líšia v počtoch nadpočetných B chromozómov. U oboch slovenských populácií *A. lucii*, v oboch prípadoch pochádzajúcich zo silne znečistených vodných nádrží, boli zaznamenané B chromozómy. V genómoch sa vyskytovali v rôznych počtoch, od 1 po 5 u parazitov z Ružína a od 1 po 3 u nami študovanej populácie. U háčikohlavcov *A. lucii* pochádzajúcich z relatívne čistej bulharskej rieky Iskar neboli B chromozómy v bunkách nájdené. Hypotéza o možnej spojitosti výskytu nadpočetných B chromozómov a znečistením životného prostredia bola diskutovaná v niekoľkých prácach, prevažne u rýb a myší (Camacho, 2004), ale aj u parazitických

organizmov (Špakulová a Casanova, 2004). Háčikohlavce sú známe svojou schopnosťou kumulovať v tkanivách vysoké koncentrácie ťažkých kovov a PCB zlúčenín (Brázová a kol., 2012). Vysoko pravdepodobnou možnosťou generovania nadpočetných B chromozómov v genóme *A. lucii*, môže byť dlhodobý mutagénny vplyv kontaminovaného ekosystému Zemplínskej Šíravy na chromozómový komplement. Túto hypotézu podporujú aj výsledky práce Špakulová a kol. (2002) realizované na populácii *A. lucii* z Ružína.

Diferenciačné farbenie odhalilo len veľmi malé bloky heterochromatínu. CMA₃⁺ signály boli pozorované na koncoch všetkých chromozómov. V rámci B chromozómov, pre ktoré býva typický vysoký podiel heterochromatínových oblastí, DAPI a CMA₃ farbenie výskyt týchto repetitívnych oblastí nepotvrdilo. Originálne bola u druhu *A. lucii* aplikovaná metóda rDNA-FISH, ktorá prvýkrát odhalila jeden hybridizačný signál na pohlavnom chromozóme u samcov a dva u samic. Organizátor jadierka (NOR) je preto u druhu *A. lucii* lokalizovaný na pohlavnom chromozóme. Použitím striebrenia sa potvrdila funkčnosť a aktivita organizátora jadierka, čo sa prejavilo existenciou jediného jadierka počas meiotického delenia. AgNO₃ taktiež pozitívne zvýraznil NOR na univalente pohlavného chromozómu, teda v mieste identifikovanom pomocou 18S rDNA FISH.

Práca bola podporená projektmi APVV 18-0467, VEGA 2/0126/20 a SAV-AV ČR-21-03.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bombarová M, et al. Divergent location of ribosomal genes in chromosomes of fish thorny-headed worms, *Pomphorynchus laevis* and *Pomphorynchus tereticollis* (Acanthocephala). *Genetica*. 2007; 131:141-149.
- Brázová T, Hanzelová V, Miklisová D. Bioaccumulation of six PCB indicator congeners in a heavily polluted water reservoir in Eastern Slovakia: Tissue specific distribution in fish and their parasites. *Parasitol Res*. 2012; 111:779-786.
- Camacho J.P.M. (ed.) B Chromosomes in the Eukaryote Genome, 2004, Karger Cytogenet Genome Res. 2004; 106, No. 2-4.
- Iannuzzi L, et al. Chromosome analyses in dairy cows exposed to dioxins and dioxin-like PCBs using the SCE test. *Ital J Anim Sci*. 2009; 8:93-95.
- Ludewig G, Robertson LW. Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2013; 334:46-55.
- Mutafova T, Nedeva I, Kanev I. Chromosomes of *Acanthocephalus lucii*. *J Helminthol*. 1997; 71:261-262.
- Nielsen PS, et al. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers: effect of GSTM1 and NAT2 genotype on adduct levels. *Carcinogenesis*. 1996; 17:1021-1027.
- Orosová M, Špakulová M. Tapeworm chromosomes: their value in systematics with instructions for cytogenetic study. *Folia Parasitol*. 2018; 65:001.
- Sures B, et al. Parasite responses to pollution: What we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. *Parasite Vector*. 2017; 10:65.
- Šalgovičová D, Zmetáková Z. Polychlorinated biphenyls in muscle tissue of freshwater fish in East Slovakia. *J Food Nutr Res*. 2006; 45:171-178.
- Špakulová M., Casanova J.C. Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenet. Genome Res*. 2004; 106:222-229.
- Špakulová M, Kráľová-Hromadová I, Dudiňák V. Karyotype of *Acanthocephalus lucii*: the first record of supernumerary chromosomes in thorny-headed worms. *Parasitol Res*. 2002; 88:778-780.

POROVNANIE SÉROVÝCH KONCENTRÁCIÍ VITAMÍNU D U PACIENTOV DISPENZARIZOVANÝCH NA INTERNEJ KLINIKE V ROKOCH 2019 A 2021

Massarová P.¹, Žigová L.¹, Vranecová K.¹, Hrubá O.¹, Chomaničová N.², Adamičková A.²,
Valášková S.², Payer J.³, Jackuliak P.³, Kyselovič J.^{2,4}, Gažová A.¹

¹Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, LFUK, Bratislava

²Jednotka klinického výskumu, V. Interná klinika nemocnica Ružinov, Bratislava

³V.interná klinika, LF UK, Bratislava

⁴Ústav farmakológie a toxikológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

O širokej škále významných biologických účinkov vitamínu D sa vďaka početným štúdiám dozvedáme stále viac. Pre organizmus je to nevyhnutný steroidný hormón, ktorého hladinu však ovplyvňuje celý rad faktorov. Vysoká prevalencia deficiencie vitamínu D v populácii je problémom, pretože predstavuje zvýšené riziko výskytu rôznych ochorení, vrátane civilizačných, ich závažnejšieho priebehu aj vyššej mortality. Cieľom tejto práce bolo porovnať hladiny vitamínu D u pacientov v roku 2019 a v roku 2021 a overiť hypotézu, či s nárastom informovanosti o dôležitosti vitamínu D a miery suplementácie, aj kvôli pandémie SARS-CoV-2, došlo k zlepšeniu jeho statusu u pacientov. Vyhodnotili sme údaje z chorobopisov pacientov dispenzarizovaných na V. internej klinike LF UK v Bratislave – Ružinove. Okrem porovnania oboch rokov sme skúmali aj vzťah medzi hladinami vitamínu D a vekom, respektíve BMI pacientov, kde sme predpokladali negatívnu koreláciu. Výsledky vzťahu medzi vekom a hladinou vitamínu D vyšli nejednoznačne. Negatívna korelácia medzi BMI a hladinou vitamínu D vyšla bez štatistickej významnosti. Hlavnú hypotézu sme nepotvrdili, nakoľko rozdiel medzi statusom vitamínu D u pacientov roku 2019 a 2021 nie je štatisticky významný, hoci vplyvom celosvetových udalostí, paradoxne, nestúpol, ale klesol.

ÚVOD

Vitamín D, napriek tomu, že je známy ako jeden zo štyroch vitamínov rozpustných v tukoch, je steroidný hormón. Existuje v dvoch formách: ako vitamín D₃ živočíšneho pôvodu a vitamín D₂ rastlinného pôvodu. Len 10 až 20 % vitamínu D získava organizmus z potravy, zvyšok by mal byť zabezpečený endogénnou syntézou v koži. Jej efektívnosť však môže negatívne ovplyvňovať celý rad faktorov od veku, genetickej výbavy, farby pleti, cez počasie, zemepisnú šírku, znečistenie ovzdušia, až po spôsob obliekania, používanie opaľovacích krémov a dobu strávenú v exteriéri (Holick, 2020; Martens a kol., 2020).

Kľúčovou funkciou vitamínu D je zachovávanie rovnováhy vápnika a fosfátov a teda udržiavanie zdravia kostí. V posledných rokoch je však vitamín D predmetom intenzívneho výskumu vďaka jeho pleiotropným extraskeletálnym účinkom. Tie sú sprostredkované genómovou cestou, kedy pôsobením vitamínu D dochádza k regulácii expresie veľkého počtu génov s dopadom na mnohé systémy v organizme. Najčastejšie je nedostatok vitamínu D spájaný s civilizačnými ochoreniami ako onkologické ochorenia či diabetes mellitus, s ochoreniami kardiovaskulárneho a nervového systému. Zdôrazňované sú predovšetkým imunomodulačné vlastnosti vitamínu D, keďže imunitný systém zohráva rolu aj pri všetkých vyššie uvedených ochoreniach (Saponaro a kol., 2020).

Aj z týchto dôvodov je deficiencia vitamínu D v populácii celosvetovým problémom. Viac než 40 % Európanov trpí nedostatkom vitamínu D (< 20 ng/ml) a z toho 13% má hladinu vitamínu D kriticky nízku (< 12 ng/ml). Pri kriticky nízkych hladinách vitamínu D sa výrazne zvyšuje riziko výskytu mnohých ochorení, vrátane infekcií, či rizika vážnejšieho priebehu ochorení a aj mortality (Amrein a kol., 2020).

Odporúčania americkej Národnej akadémie medicíny z roku 2011 patria medzi tie, na ktoré sa autori najčastejšie odvolávajú. Podľa nich sa má hladina vitamínu D udržiavať dávkou 600

IU/denne u dospelých do 70 rokov a 800 IU/denne u starších nad 70 rokov (Institute of Medicine, 2011).

S nárastom počtu dôkazov o pleiotropných účinkoch vitamínu D sa však ozýva viac hlasov kritizujúcich tieto odporúčania a presadzujúcich užívanie vyšších dávok (väčšinou 1000 až 2000 IU/denne), za účelom udržania celkového zdravia organizmu a nielen prevencie chorôb kostí. Popularita vitamínu D stúpala medzi odborníkmi, ale aj u laickej verejnosti, a po výživových doplnkoch bežne dostupných v dávkach vyšších než 600 IU/deň je v poslednom období silný dopyt.

MATERIÁL A METODIKA

V našej práci sme porovnávali hodnoty sérových koncentrácií 25-hydroxyvitamínu D, ktorý sa používa ako marker statusu vitamínu D, stanovených u pacientov dispenzarizovaných na V. internej klinike LF UK a Univerzitetnej nemocnice Bratislava – Ružinov v roku 2019 a v roku 2021. Hodnoty, spoločne s ďalšími údajmi o pacientoch (vek, pohlavie, BMI), boli stiahnuté z chorobopisov z nemocničného informačného systému Medea. Získané dáta boli štatisticky vyhodnotené v programe GraphPad Prism s využitím nepárového t-testu a korelácie podľa Pearsona. Štatistickú významnosť výsledku podmieňuje $p \leq 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci práce boli vyhodnotené údaje spolu o 310 pacientoch (111 z roku 2019 a 199 z roku 2021) z toho 54 % boli muži (56 % v roku 2019 a 52 % v roku 2021). Priemerné hodnoty hladín vitamínu D, BMI a veku sú zhrnuté v Tab. 1.

Tab. 1. Priemerné hodnoty hladín vitamínu D, BMI a veku pre roky 2019 a 2021

	2019			2021		
	muži	ženy	spolu	muži	ženy	spolu
vitamín D (ng/l)	22,80 ±12,61	19,63 ±10,06	21,40 ±11,61	19,17 ±10,97	20,01 ±11,79	19,57 ±11,35
BMI (kg/m ²)	29,62 ±5,58	27,62 ±5,07	28,50 ±5,08	29,78 ±7,25	30,71 ±7,82	30,26 ±7,53
vek (roky)	61,65 ±13,79	62,84 ±15,73	62,17 ±14,61	73,13 ±11,89	76,57 ±11,25	74,77 ±11,69

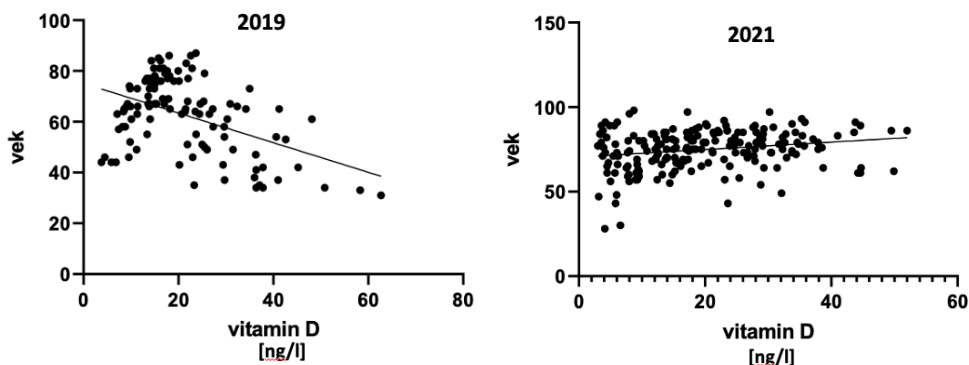
Priemerná hladina vitamínu D u pacientov v roku 2019 bola 21,40 ±11,61 ng/l a v roku 2021 19,57 ±11,35 ng/l. Rozdiel nie je štatisticky významný ($p = 0,1785$). Pacientky v roku 2019 mali hladinu vitamínu D priemerne 19,63 ±10,06 ng/l oproti 20,01 ±11,79 ng/l v roku 2021. Mužskí pacienti v roku 2019 mali hladinu vitamínu D priemerne 22,80 ±12,61 ng/l oproti 19,17 ±10,97 ng/l v roku 2021. Rozdiel nie je štatisticky významný ani vo výsledkoch oddelene pre ženy ($p = 0,8471$) a mužov ($p = 0,0531$). Všetky priemerné koncentrácie vitamínu D sa pohybovali na hranici deficiencie (< 20 ng/ml). Hranicu mierne prekračuje hodnota celkovej priemernej koncentrácie vitamínu D za rok 2019 (21,40 ±11,61 ng/l) a priemernej koncentrácie u mužov v roku 2019 (22,80 ±12,61 ng/l).

V hodnotách veku pacientov z roku 2019 a 2021 je štatisticky významný rozdiel ($p < 0,0001$) a rovnako aj vo veku skupiny žien a mužov (v oboch prípadoch $p < 0,0001$).

Štatisticky významný rozdiel je v hodnotách BMI žien ($p = 0,0306$), ktoré z priemernej hodnoty 27,62±5,07 v roku 2019 vzrástlo na 30,71 ±7,82 v roku 2021. Medzi celkovými hodnotami BMI ($p = 0,0508$) a hodnotami BMI mužov ($p = 0,9044$) nie je štatisticky významný rozdiel.

Negatívna korelácia vo vzťahu medzi hladinou vitamínu D a hodnotou BMI sa síce potvrdila pre údaje mužov a žien oddelene aj spolu v oboch rokoch, v ani jednom prípade však výsledok nie je štatisticky významný.

Vek štatisticky významne negatívne koreluje s hladinou vitamínu D (muži a ženy spolu) v roku 2019 ($R^2 = 0,2157$; $p < 0,0001$) (Obr. 1). Naopak, štatisticky významná pozitívna korelácia je medzi hladinou vitamínu D a vekom (muži a ženy spolu) v roku 2021 ($R^2 = 0,04609$; $p = 0,0023$) (Obr. 1).



Obr. 1. Negatívna korelácia hladiny vitamínu D a veku v roku 2019 a pozitívna korelácia tých istých parametrov v roku 2021

Výsledky korelácie hladiny vitamínu D a veku mužov a žien oddelene pre oba roky sú nekonzistentné. Parametre pozitívne korelujú, okrem skupiny mužov v roku 2019. Štatisticky významná je však len korelácia vitamín D a vek v skupine mužov v roku 2021 ($R^2 = 0,1024$; $p = 0,0009$).

Rok 2021 bol značne ovplyvnený pandemiou SARS-CoV-2. Hypotézu o tom, že zvýšená miera suplementácie vitamínu D v populácii pomôže zlepšiť status vitamínu D sme nepotvrdili – rozdiel oproti roku 2019 nie je štatisticky významný. Silnými faktormi sú však aj heterogenita vitamínu D v populácii a efektívnosť suplementácie vitamínu D vo zvyšovaní jeho koncentrácie v organizme, ktoré sú pre problematiku vitamínu D charakteristické. Negatívna korelácia hodnoty BMI a hladiny vitamínu D sa prejavila bez štatistickej významnosti.

Táto práca bola podporená z prostriedkov UK/96/2022.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Amrein K, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2020, roč. 74, č. 11, s. 1498–1513 [cit. 27.11.2021]. ISSN 0954-3007, 1476-5640.
- Institute of Medicine, 2011. *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D* [online]. Washington, D.C.: National Academies Press [cit. 11.7.2022]. ISBN 978-0-309-16394-1.
- Holick M, 2020. Sunlight, UV Radiation, Vitamin D, and Skin Cancer: How Much Sunlight Do We Need? V: Jörg REICHRATH, ed. *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer* [online]. Cham: Springer International Publishing, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, s. 19–36 [cit. 24.2.2022]. ISBN 978-3-030-46226-0.
- Martens M, Emmert S a Boeckmann L, 2020. Sunlight, Vitamin D, and Xeroderma Pigmentosum. V: Jörg REICHRATH, ed. *Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer* [online]. Cham: Springer International Publishing, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, s. 319–331 [cit. 24.2.2022]. ISBN 978-3-030-46226-0.
- Saponaro F, Saba A a Zucchi R, 2020. An Update on Vitamin D Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, roč. 21, č. 18, s. 6573 [cit. 23.2.2022]. ISSN 1422-0067.

MONITORING VÝVOJA SILÁŽNEJ ZRELOSTI RÔZNYCH HYBRIDOV KUKURÍC

Mitřík A.¹, Mitřík T.², Maskaľová I.¹

¹Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF, Košice

²FEEDLAB s.r.o., Spišská Nová Ves

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo identifikovať a kvantifikovať vzťahy medzi zaradením hybridov kukurice (*Zea mays* L.) do zrelostných skupín FAO a medzi obsahom sušiny v dynamike vegetačného vývoja v podhorskej oblasti. V práci sú zhrnuté výsledky z 9 pokusov (2016 až 2021: 140 rôznych hybridov, 20 zrelostných skupín FAO). Obsah sušiny sme stanovovali kombináciou gravimetrického stanovenia a merania obsahu vody vo vysušených vzorkách metódou NIRS. Dynamiku vývoja obsahu sušiny sme hodnotili na úrovni kalendárnych dní. Hodnotenie na úrovni kalendárneho dňa (ďalej „deň“) má dostatočnú výpovednú hodnotu a je pre praktické použitie vhodnejšie. Silážnu zrelosť sme definovali termínom dosiahnutia obsahu sušiny 30%. V jednotlivých pokusoch bola v priemere dosiahnutá na 273. deň, avšak v širokom rozsahu 40 dní. Z výsledkov vyplýva, že používanie zrelostných skupín FAO nepredstavuje vhodnú základňu pre odhad silážnej zrelosti.

ÚVOD

Silážna zrelosť kukurice je charakterizovaná obsahom sušiny (a koncentráciou živín, avšak obsah sušiny predstavuje prvý a základný faktor. Cieľom pestovateľov silážnej kukurice je dosiahnuť na každej parcele v čase zberu obsah sušiny okolo 300 g.kg⁻¹. Pri tomto obsahu sušiny celej rastliny dosahuje sušina zrna hodnotu 500 g.kg⁻¹ (Daynard a Hunter, 1975) a so stúpajúcim obsahom sušiny klesá stráviteľnosť škrobu aj neutrálne detergentnej vlákniny (Di Marco a kol., 2002). Vtedy je dosahované aj optimálne vegetačné štádium (zrelosti) nielen z hľadiska produkčnej účinnosti (Ferraretto a Shaver, 2012), ale aj z hľadiska minimalizácie strát odtokom silážnych štiav (Bastiman a Altman, 1985). V tejto práci sme sa zamerali na gravimetrické meranie obsahu sušiny na rôznych úrovniach skupín zrelosti FAO a na rôznych úrovniach vegetačnej zrelosti v priebehu niekoľkých pestovateľských sezón v podhorskej oblasti. Základným cieľom tejto práce bolo charakterizovať a vyhodnotiť vzťah medzi zaradením hybridov do zrelostných skupín FAO a dosahovaním silážnej zrelosti v priebehu vegetačného vývoja. Sledovali sme silážnu zrelosť (deň dosiahnutia obsahu sušiny 30%) ako rozhodujúci parameter na 2 úrovniach: 1. silážnej zrelosti a kalendárneho dňa; 2. silážna zrelosť a skupina FAO.

MATERIÁL A METODIKA

V priebehu šiestich pestovateľských sezón (2016 – 2021) sme v spolupráci s producentmi a predajcami osív silážnych hybridov kukurice vykonali 9 skupinových pokusov na troch lokalitách v regióne stredného a severného Spiša (Nová Ľubovňa, Poprad, Smižany). Výber hybridov do každého jednotlivého pokusu určovali dodávatelia osív (16 spoločností). Celkom bolo testovaných 140 rôznych hybridov silážnych kukuríc s rozsahom skupín FAO od 120 do 400 (priemerná opakovateľnosť zaradenia hybridov do pokusov dosiahla hodnotu 1,96). Celkom bolo vykonaných 1 320 analýz v nasledujúcom rozčlenení: Poprad 2016: 91 analýz; Nová Ľubovňa: 2016 – 2021: 1 025 analýz; Smižany: 2020 – 2021: 204 analýz. Termín výsevu hybridov závisel vždy na aktuálnych podmienkach danej pestovateľskej sezóny a realizoval sa v prvom možnom termíne, kedy už boli dosiahnuté vhodné podmienky pre výsev kukuríc. Výsevy sa uskutočnili v intervale 35 kalendárnych dní (od 24.4. do 20.5. t. j. medzi 108. a 143. kalendárnym dňom) pneumatickými sejačkami v rozsahu 4 – 8 riadkov s rozstupom 75 cm na dĺžku minimálne 100 metrov a s hustotou výsevu 75 – 85 tisíc jedincov na hektár. Odbery vzoriek celých rastlín sa začínali v období začiatku mliečnej zrelosti a

pokračovali v cca 7 – 10 dňových intervalov do čo najvyššieho stupňa zrelosti a vegetačného vývoja. Do pokusov boli zaradené hybridy silážnych kukuríc, ktoré boli zaradené do 20 rôznych skupín FAO (Tab. 1). Najviac meraní obsahu sušiny (Tab. 1) bolo vykonaných v skupinách FAO od 170 do 260 (>70 meraní/skupina - viac ako 5%-ný podiel z celkového počtu meraní). Po viac ako 100 meraní obsahu sušiny (7,5% podiel) bolo vykonaných v skupinách FAO: 170, 200, 210, 220, 230 a 240. Absolútne najviac meranou a hodnotenou bola skupina FAO 230 s celkovým počtom 236 meraní. Jednotlivé vzorky tvorilo 5 – 20 reprezentatívnych rastlín (priemerný počet 8,78) nasledujúcich za sebou v stredných riadkoch výsevného pásu odrezaných 15-20 cm nad zemou. Odoberané vzorky boli ihneď transportované do laboratória, kde boli na originálnom technickom zariadení vlastnej konštrukcie mechanicky posekané na častice s maximálnou dĺžkou 3 cm. Posekaná hmota bola dôkladne mechanicky zhomogenizovaná (premiešaná), a až potom boli odoberané laboratórne vzorky s hmotnosťou 500 – 750 gramov, ktoré boli vysušené pri teplote do 60°C v sušiarňach Memmert UFE 500 a UFE 700. Po sušení (16 – 24 hodín) boli vzorky odvážené a bol vypočítaný laboratórny obsah sušiny. Vysušené vzorky boli pomleté na mlynch RETCH SM-100 a TWISTER (prepad na 1mm site). Nutričné parametre (obsah sušiny, dusíkaté látky, hrubý tuk, popol, NDV, ADV, škrob, vodorozpustné cukry a stráviteľnosť NDV 30 hod. in vitro) boli analyzované NIRS prístrojom Antaris II FT-NIR Analyzer (výrobca THERMO SCIENTIFIC) s využitím vlastných validovaných kalibračných modelov. Celkový obsah sušiny bol vyhodnotený na základe laboratórneho obsahu sušiny a na základe obsahu sušiny meraného metódou NIRS. Štatistické vyhodnotenia sme vykonali programom NCSS 12 (2022; 64 bit) - verzia 12.0.18 - NCSS LLC (použité metódy: ANOVA, lineárna regresia, nelineárna polynómická regresia).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab.1. Obsah sušiny FAO skupín, rozsah sledovaného obdobia a silážna zrelosť

	n	SUŠINA (g.kg ⁻¹)									KALENDÁRNY DEŇ				SILÁŽNA ZRELOSŤ	
		Ø	SD	95% DIS*	95% HIS*	MIN	MAX	rozsah	Ø	MIN	MAX	rozsah	kalendárny deň			
FAO zrelostná skupina	120	10	328,30	gijklmnp	58,11	287	370	241	414	173	257	236	279	43	248	± 47,39
	130	12	280,92		67,33	238	324	191	425	234	251	228	283	55	259	± 146,45
	140	14	300,71	jkmnqr	71,57	259	342	200	440	240	246	228	268	40	247	± 104,10
	160	24	281,17	mnqr	73,19	250	312	162	413	251	253	228	283	55	259	± 89,06
	170	100	259,11		65,02	246	272	156	412	256	250	217	294	77	263	± 66,90
	180	92	278,50	gijklmnpqr	69,21	264	293	163	445	282	251	221	294	73	256	± 99,26
	190	75	243,48	af	51,55	232	255	145	346	201	248	217	283	66	271	± 43,49
	200	137	258,46		57,53	249	268	155	422	267	252	221	294	73	269	± 83,49
	210	102	241,41	af	52,25	231	252	147	381	234	251	221	283	62	277	± 64,40
	220	154	235,01	acf	51,64	227	243	152	386	234	251	217	294	77	277	± 54,83
	230	236	239,69	acf	51,25	233	246	154	361	207	252	217	283	66	274	± 51,85
	240	117	240,37	af	50,46	231	250	147	373	226	251	221	294	73	278	± 58,77
	250	86	228,14	acdfh	44,58	219	238	154	337	183	251	221	294	73	291	± 59,20
	260	72	225,98	acdfh	42,38	216	236	157	329	172	251	221	283	62	291	± 57,92
	270	35	228,71	acf	45,58	213	244	134	319	185	255	227	283	56	284	± 46,69
	280	10	212,31	a	39,78	184	241	157	288	131	252	227	280	53	> 300	-
	290	19	214,85	acdf	39,63	196	234	146	273	127	250	221	283	62	> 300	-
	300	14	208,88	acdf	38,73	187	231	155	273	118	250	221	280	59	> 300	-
340	6	203,04	a	36,27	165	241	146	248	102	247	217	274	57	> 300	-	
400	5	197,02	a	20,26	172	222	172	216	44	251	227	280	53	> 300	-	
Ø	218		245,11		53,44	233	257	134	445	222	251	217	294	69	> 300	-

*DS a HIS: dolný a horný interval spoľahlivosti; SD – štandardná odchýlka; MIN – minimum; MAX – maximum; hodnoty v stĺpcoch s identickým indexovým označením sú významne odlišné (P<0,01)

Obsah sušiny sa medzi jednotlivými skupinami FAO štatisticky významne odlišoval (P<0,01) s veľkými rozdielmi medzi jednotlivými skupinami. V meraniach 746 hybridov z najpočetnejšie zaradených skupín FAO (200 – 240) sme v obsahu sušiny nezistili štatisticky významnú rozdielnosť (Tab. 1), čo ilustruje aj rovnomerné rozloženie hodnôt štandardných

odchýlok, intervalov spoľahlivosti, minimálnych a maximálnych hodnôt. Tieto výsledky zreteľne naznačujú, že zaradenie do skupiny FAO nevystihuje a nepopisuje vývoj silážnej zrelosti. Vývoj obsahu sušiny bol sledovaný v rozsahu od 217. po 294. kalendárny deň. Priemerný obsah sušiny za jednotlivé sledované obdobia každej skupiny FAO bol v rozsahu 134 až 445 g.kg⁻¹ s celkovým priemerom 245,11 g.kg⁻¹ (Tab. 1). Priemerné obsahy sušiny na úrovni jednotlivých hybridov sa významne štatisticky odlišovali (P<0,01). Naše výsledky sú v súlade so zmenami obsahu sušiny nameranými v priebehu vegetačného vývoja dvoch hybridov s 10 dňovým rozdielom v rýchlosti dozrievania (7 meraní/21 dní) v experimente Row (2015), ktoré taktiež vykazovali vysoko významné štatistické rozdiely na úrovni obsahu sušiny (P<0,01). Silážna zrelosť na úrovni jednotlivých hybridov bola dosahovaná relatívne rovnomerne rozdelená, avšak vo veľmi širokom časovom úseku: od 236. po 290. kalendárny deň (44 dní). 17 hybridov zo 140 (12%) nedosiahlo hranicu silážnej zrelosti do 290. kalendárneho dňa. Priebeh vegetačného vývoja u jednotlivých hybridov na úrovni kalendárnych dní dosahuje štatisticky významne rozdielnu mieru nerovnosti kriviek (P 0,00).

Tab. 2 Silážna zrelosť – návrh rozdelenia zrelostných skupín

skupina	SM minimum	SM maximum	rozsah dní	Charakteristika skupiny	kalendárny priemer	počet hybridov	pracovný názov
1	236	250	14	veľmi skoré	246	10	SM250
2	253	263	10	skoré	259	21	SM260
3	265	276	11	stredné	271	41	SM270
4	277	289	12	neskoré	282	42	SM280
5	> 290			veľmi neskoré	299	26	SM290

Pre všetky hybridy sme na základe regresných vzťahov vyhodnotili termín dosiahnutia silážnej zrelosti (SM – silage maturity) t.j. poradový (kalendárny) deň roku, v ktorom je predpoklad, že bude dosiahnutý obsah sušiny 30% (celý súbor 1 320 meraní). Na rovnomerné rozdelenie hybridov do skupín podľa silážnej zrelosti sme použili techniku rozdeľovania (zhlukovania/klastrovania), ktorá je štandardnou metódou v štatistickej aplikácii NCSS 12. Získali sme tak rovnomerné rozdelenie do piatich skupín (SM 250 – SM 290) a rozsahy skupín sa pohybujú od 10 do 14 dní (Tab. 2). Vzťah medzi FAO skupinou jednotlivých hybridov a medzi ich hodnotou silážnej zrelosti je veľmi voľný a dosahuje veľmi nízky a nepreukazný koeficient nelineárnej polynomickej regresie R² 0,428. U všetkých hybridov je vzťah medzi novovytvorenou silážnou skupinou (SM) a hodnotou priradenej FAO skupiny veľmi voľný. Veľmi jasne dokumentuje slabiny používania skupiny FAO pre odhad silážnej zrelosti.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bastiman B, Altman JFB. Losses at various stages in silage making. Research and Development. Agriculture. 1985; 2: 19-25.
- Daynard TB, Hunter RB. Relationships among whole-plant moisture, grain moisture, dry matter yield, and quality of whole plant corn silage. Can. J. Plant Sci. 1975; 55: 77-84
- Di Marco ON, et al. Effect of maize crop maturity on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). Animal Feed Science and Technology. 2002; 99:37–43.
- Ferraretto LF, Shaver RD. Meta-analysis: Effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. The Professional Animal Scientist. 2012; 28:141–149.
- Row CA. Corn Plant Maturity Effect on Yield and Nutritional Quality; Corn Silage Inoculation on Performance of Cattle Fed Silage with or without Live Yeast Added. Theses and Dissertations in Animal Science. 2015; 110.
- NCSS 2022 Statistical Software (2022). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss.

POTENCIÁLNE PROTINÁDOROVÉ ÚČINKY NOVÉHO SYNTETIZOVANÉHO PYROLIDÍNU V *IN VITRO* PODMIENKACH NA MODELI KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU

Nosálová N., Bago Pilátová M., Kešeľáková A., Kello M.
Ústav farmakológie, LF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Kolorektálny karcinóm patrí medzi najčastejšie príčiny úmrtnosti súvisiace s nádorovými ochoreniami. Pyrolidíny pre svoj antiproliferatívny potenciál patria k mnohým študovaným molekulám, ktoré by sa mohli využiť na liečbu kolorektálneho karcinómu. Cieľom našej práce bolo skúmať účinok zlúčeniny SS13 ((2*S*,3*S*,4*R*)-2-tridecylpyrolidín-3,4-diol hydrochlorid) na nádorovej bunkovej línii HCT116. BrdU proliferačný test potvrdil antiproliferatívny účinok SS13 s hodnotou IC₅₀ 6,46 ± 2,84 μmol/L. V dôsledku zníženého mitochondriálneho potenciálu a uvoľnenia cytochrómu c do cytozolu bol pyrolidín SS13 schopný aktivovať vnútornú apoptotickú dráhu. Navyše SS13 indukoval poškodenie DNA v bunkách HCT116, čo je pravdepodobne výsledkom oxidatívneho stresu spôsobeného akumuláciou voľných radikálov kyslíka a dusíka v bunke. Na základe prezentovaných výsledkov predpokladáme, že pyrolidín SS13 by mohol predstavovať zlúčeninu so sľubným antiproliferatívnym potenciálom.

ÚVOD

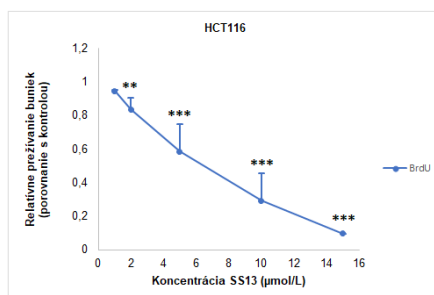
Kolorektálny karcinóm je malígne ochorenie, ktorého prvotnými príznakmi sú polypy vyskytujúce sa na epiteli hrubého čreva alebo konečníka (Rustgi, 2007). Vo svete pribúda každoročne približne 1,36 miliónov prípadov (Sung a kol., 2021). Pyrolidíny sú cyklické amíny patriace do skupiny molekúl, ktoré sú v súčasnosti študované na liečbu nádorových ochorení. Ich pyrolidínová štruktúra je súčasťou mnohých prírodných alkaloidov, aminokyselín, liekov a iných prírodných látok (National Center for Biotechnology Information, 2004). Vo viacerých štúdiách bol pozorovaný antiproliferatívny potenciál pyrolidínov a ich derivátov. Tieto nasýtené organické zlúčeniny sú schopné indukovať rôzne formy bunkovej smrti ako napr. apoptózu (Kumar a kol., 2019), paraptózu (Park a kol., 2018), či autofágiu (Bello a kol., 2018). V našej práci sme sa zamerali na štúdium potenciálneho antiproliferatívneho efektu molekuly s pyrolidínovou štruktúrou na *in vitro* modeli buniek kolorektálneho karcinómu.

MATERIÁL A METODIKA

V práci sme testovali účinok (2*S*,3*S*,4*R*)-2-Tridecylpyrolidín-3,4-diol hydrochlorid (SS13), ktorý bol syntetizovaný na Katedre organickej chémie Ústavu chemických vied UPJŠ (Fábianová a kol., 2021) na nádorovú bunkovú líniu kolorektálneho karcinómu HCT116. Bol použitý BrdU proliferačný test, prietoková cytometria (stanovenie mitochondriálneho membránového potenciálu, detekcia voľných radikálov kyslíka a dusíka, stanovenie hladín p-H2A.X a 2-oxoguanínu), western blot analýza (detekcia cytochrómu c, detekcia enzýmov SOD1 (superoxid dismutáza) a SOD2, stanovenie hladín p-ATM kinázy), štatistická analýza.

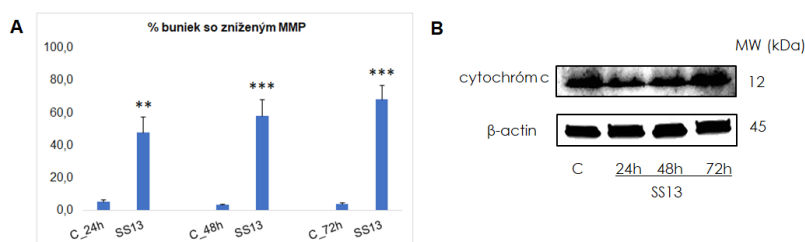
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na určenie inhibičnej koncentrácie (IC₅₀) a na overenie antiproliferatívneho efektu testovanej zlúčeniny bol vykonaný BrdU proliferačný test, ktorý je založený na inkorporácii 5-bromo-2-deoxyuridínu (BrdU) do novosyntetizovanej DNA a jeho odovzdávaní dcérskym bunkám počas bunkového delenia. Výsledok tohto testu ukázal, že pyrolidín SS13 inhibuje proliferáciu nádorových buniek HCT116 v koncentráciách 2-15 μmol/L (Obr. 1). Z výsledkov bola vypočítaná hodnota IC₅₀: 6,46 ± 2,84 μmol/L.



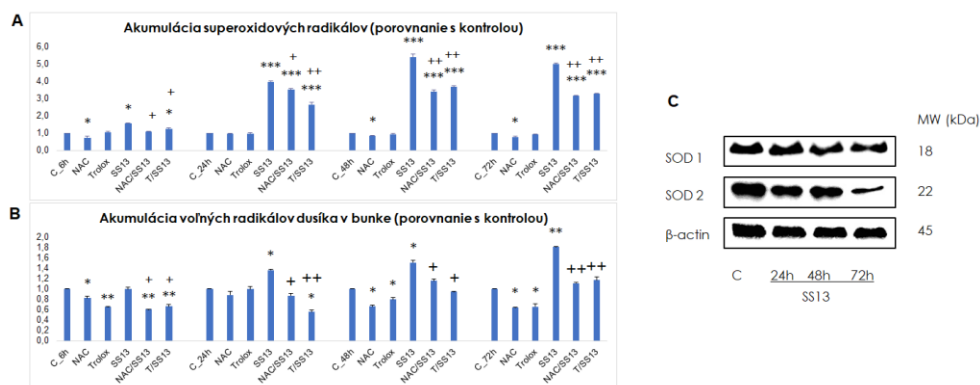
Obr. 1 Efekt pyrolidínu SS13 na proliferáciu buniek HCT116. Dáta ukazujú priemerné hodnoty \pm smerodajnú odchýlku troch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Počas aktivácie vnútornej dráhy apoptózy dochádza k zvýšeniu permeability vonkajšej mitochondriálnej membrány s následným uvoľnením cytochrómu c do cytozolu. Prvým náznakom, že môže ísť o vnútornú cestu bolo zníženie mitochondriálneho membránového potenciálu (MMP), čo súvisí s poškodením mitochondrií. Pomocou prietokovej cytometrie sa analyzoval vplyv pyrolidínu SS13 na MMP v nádorových bunkách, pričom bol pozorovaný signifikantný nárast populácie buniek so zníženým MMP v závislosti od času inkubácie nádorových buniek s testovanou zlúčeninou (Obr. 2A). Ako dôsledok zníženého MMP dochádza k uvoľneniu apoptogénnych proteínov, ku ktorým patrí aj cytochróm c, do cytozolu. V nádorových bunkách kolorektálneho karcinómu inkubovaných s pyrolidínom SS13 boli dokázané zvýšené hladiny cytochrómu c (Obr. 2B).



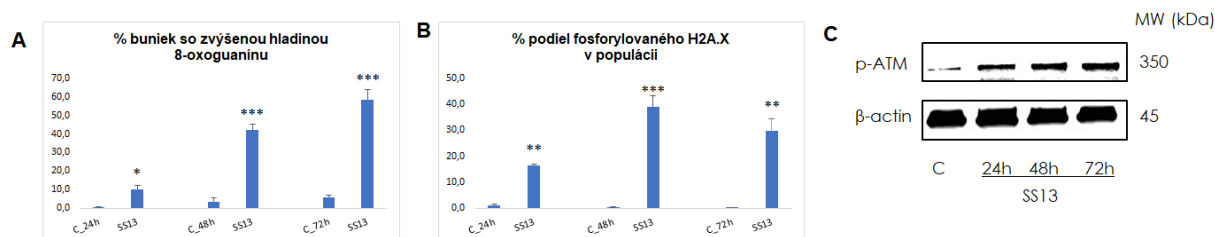
Obr. 2 Efekt testovanej zlúčeniny SS13 na MMP pomocou prietokovej cytometrie (A). Western blot analýza cytochrómu c (B). Dáta ukazujú priemerné hodnoty \pm smerodajnú odchýlku troch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Poškodenie mitochondrií môže súvisieť aj s oxidatívnym stresom v bunke, ktorý môže byť vyvolaný aj radikálmi kyslíka a dusíka. Tieto voľné radikály sa podieľajú na poškodení DNA a bunkových organel. Z našich výsledkov vyplýva, že v bunkách inkubovaných s pyrolidínom SS13 dochádza k akumulácii voľných radikálov už po 6 h inkubácie, pričom sa množstvo voľných radikálov kyslíka (Obr. 3A) a dusíka (Obr. 3B) signifikantne zvyšuje s časom inkubácie. V bunkách, ktoré boli predliečené NAC (N-acetylcysteín) a troloxom dochádzalo k menej výraznej akumulácii voľných radikálov, vďaka ich antioxidačnému pôsobeniu (Obr. 3A, B). Následkom oxidatívneho stresu dochádza v bunkách k aktivácii antioxidačných enzýmov ako napr. SOD, kataláza a pod., ktorých úlohou je vychytávať voľné radikály. Ak sú tieto enzýmy inhibované, dochádza k nerovnováhe medzi tvorbou a vychytávaním voľných radikálov, čoho dôsledkom je akumulácia voľných radikálov v bunke. Naše výsledky preukázali signifikantnú inhibíciu enzýmu SOD2 a miernu inhibíciu enzýmu SOD1 najmä po 72h inkubácií buniek HCT116 s testovanou zlúčeninou (Obr. 3C).



Obr. 3 Efekt SS13 na hladiny superoxidových radikálov (A), voľných radikálov dusíka (B) a antioxidačných enzýmov SOD (C). Dáta poukazujú na priemerné hodnoty \pm smerodajná odchýlka troch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontrola; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs. SS13.

Oxidatívny stres spôsobený účinkom testovaného pyrrolidínu SS13 môže byť spojený aj s poškodením DNA. Ako hlavný biomarker poškodenia DNA je 8-oxoguanín, ktorého hladiny boli v nádorových bunkách HCT116 zvýšené už po 24h inkubácii buniek s pyrrolidínom SS13. Následkom poškodenia DNA dochádza k zvýšeniu fosforylácie ďalších proteínov, ku ktorým môžeme zaradiť kinázu ATM a histón H2A.X. Z našich výsledkov vyplýva, že hladiny všetkých biomarkerov boli v nádorových bunkách kolorektálneho karcinómu signifikantne zvýšené (Obr. 4).



Obr. 4 Analýza 8-oxoguanínu (A) a fosforylovaného H2A.X (B) v bunkách po SS13 pomocou prietokovej cytometrie. Western blot analýza fosforylácie kinázy ATM (C). Dáta poukazujú na priemerné hodnoty \pm smerodajná odchýlka troch nezávislých experimentov. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. kontrola; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ vs. SS13.

Táto štúdia vznikla vďaka podpore grantovej agentúry Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA 1/0653/19, 1/0513/21).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bello C, et al. Induction of cell killing and autophagy by amphiphilic pyrrolidine derivatives on human pancreatic cancer cells. *European journal of medicinal chemistry*. 2018; 150: 457–478
- Fábiánová D, et al. A straightforward approach toward cytotoxic pyrrolidine alkaloids: Novel analogues of natural broussonetines. *Tetrahedron*. 2021; 96:132380.
- Kumar RS, et al. Spirooxindole-pyrrolidine heterocyclic hybrids promotes apoptosis through activation of caspase-3. In: *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2019; 27: 2487–2498.
- Park SS, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate reverses Bcl-xL-mediated apoptotic resistance to doxorubicin by inducing paraptosis. In: *Carcinogenesis*. 2018; 39: 458–470.
- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. In: *Genes & development*. 2007; 21: 2525–2538.
- Sung H, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021; 71: 209–249.
- PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 31268, Pyrrolidine; [cited 2020 Nov. 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrrolidine>

VPLYV MODULÁCIE VNÚTROBUNKOVÝCH SIGNÁLNYCH DRÁH NA AKTIVITU TRANSPORTNÉHO PROTEÍNU BCRP A ÚČINOK FOTODYNAMICKEJ TERAPIE S HYPERICÍNOM

Romanovová M., Jendželovská Z., Majerník M., Barčáková I., Jendželovský R., Fedoročko P.
*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla
Jozefa Šafárika v Košiciach*

ABSTRAKT

Mnohé predklinické a klinické štúdie poukazujú na prínos rastlinnej látky, hypericínu (HY), vo fotodynamickej diagnostike (PDD) a terapii (PDT) nádorových ochorení. Avšak bolo dokázané, že transportný proteín BCRP, ktorý je častokrát nadmerne exprimovaný v nádorových bunkách, je zodpovedný za zníženú akumuláciu HY, a teda aj za pokles efektivity samotnej fotodynamickej terapie s hypericínom (HY-PDT). Bližšia identifikácia interakcií medzi HY a proteínom BCRP by tak mohla prispieť k optimalizovaniu účinku tejto perspektívnej protinádorovej liečby. V našich experimentoch sme sa zamerali na potenciálnu účasť troch signálnych proteín kináz (PKC δ , JNK1, EGFR) v regulácii aktivity transportného proteínu BCRP s využitím štyroch ľudských nádorových bunkových línií s rôznou mierou expresie BCRP (A549, HT-29, RPMI-8226, RPMI-8226/MR20) a piatich modulátorov vybraných signálnych molekúl s inhibičným (Rot, Tyr, SP, Lico) alebo indukčným efektom (TPA). Jedným zo stanovených cieľov bolo overiť, či inhibícia alebo indukcia signálnych molekúl môže ovplyvniť mieru akumulácie HY v nádorových bunkách a následnú fotocytotoxicitu HY-PDT. V leukemických bunkách RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20 sme pozorovali signifikantný nárast cytotoxického účinku HY-PDT po pôsobení inhibítorov molekúl EGFR (Tyr) a JNK (SP, Lico). Avšak pôsobením modulátorov kinázy PKC δ (TPA, Rot) nebola efektivita HY-PDT v týchto bunkách ovplyvnená. V prípade buniek A549 bol najvýraznejší účinok na HY-PDT zaznamenaný vplyvom Lico, inhibítora JNK1, a v prípade buniek HT-29 pôsobením Rot, inhibítora kinázy PKC δ . Okrem toho sme vo všetkých bunkových líniách po pôsobení daných modulátorov zaznamenali aj signifikantný nárast intracelulárnej hladiny HY. Na základe dosiahnutých výsledkov predpokladáme, že zvýšená efektivita HY-PDT mohla byť dôsledkom potlačenia expresie a/alebo aktivity transportného proteínu BCRP. Získané výsledky tak poukazujú na možnú účasť všetkých vybraných signálnych proteínov v regulácii proteínu BCRP v závislosti od konkrétnej bunkovej línie.

ÚVOD

Nedávno bolo preukázané, že nadmerná expresia transportného proteínu BCRP z rodiny ABC prenášačov vedie k zníženej intracelulárnej akumulácii fotosenzibilnej látky, hypericínu (HY) (Vargová a kol., 2018; Jendželovský a kol., 2019), ktorý má potenciál vo fotodynamickej diagnostike (HY-PDD) a terapii (HY-PDT) niektorých nádorových ochorení (Jendželovská a kol., 2016). Zvýšeným efluxom HY z bunky tak zapríčiňuje rezistenciu nádorových buniek na HY-PDD a HY-PDT, k čomu pravdepodobne dochádza cez priame a/alebo nepriame interakcie prostredníctvom vnútrobunkových signálnych dráh. Objasnenie podstaty a intracelulárnej lokalizácie interakcií medzi HY a proteínom BCRP by mohlo zvýšiť efektívnosť a selektívnosť HY-PDD, resp. HY-PDT.

MATERIÁL A METODIKA

Reagencie. Hypericín (HY; HPLC grade), TPA (induktor PKC δ), rottlerin (Rot; inhibítor PKC δ), tyrfostín AG1478 (Tyr; inhibítor EGFR), SP600125 (SP; inhibítor JNK1, JNK2 a JNK3), likochalkón A (Lico; inhibítor JNK1).

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 za štandardných podmienok (teplota 37°C, 95% vlhkosť, 5% CO₂). Pre stanovenie vplyvu modulátorov na efektivitu HY-PDT a akumuláciu HY boli bunky nasadené do 6-jamkových platní a predinkubované s modulátormi po dobu 30 min. Následne bol pridaný HY vo vybraných koncentráciách (0,1 a 0,5 μM) a po 16 hod od pridania HY boli bunky vystavené jednorazovej dávke svetla (3,15 J.cm⁻²) o vlnovej dĺžke 595 nm (fotoaktivácia HY = HY-PDT). Po 24 a 48 hod bol analyzovaný celkový počet buniek, viabilita a bunková smrť. Obsah HY v bunkách bol analyzovaný po 16 hod od jeho pridania (bez fotoaktivácie).

Analýza celkového počtu buniek a viability. Počty buniek a ich viabilita boli stanovené s využitím prístroja Beckman Coulter Vi-Cell™ XR Cell Viability Analyzer.

Externalizácia fosfatidylserínu a viabilita. Na analýzu vplyvu jednotlivých zásahov na externalizáciu fosfatidylserínu a viability bol použitý komerčný kit BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). Bunky zozbierané 24 a 48 hod po HY-PDT boli opláchnuté v roztoku HBSS, inkubované v pufrí s obsahom Annexin V-FITC a farbené propídium jodidom (PI). Vzorky boli analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCalibur.

Intracelulárna akumulácia hypericínu. Intenzita fluorescencie HY bola analyzovaná 16 hod po pridání HY k bunkám prietokovým cytometrom BD FACSCalibur v FL-2 kanáli (585/42 nm).

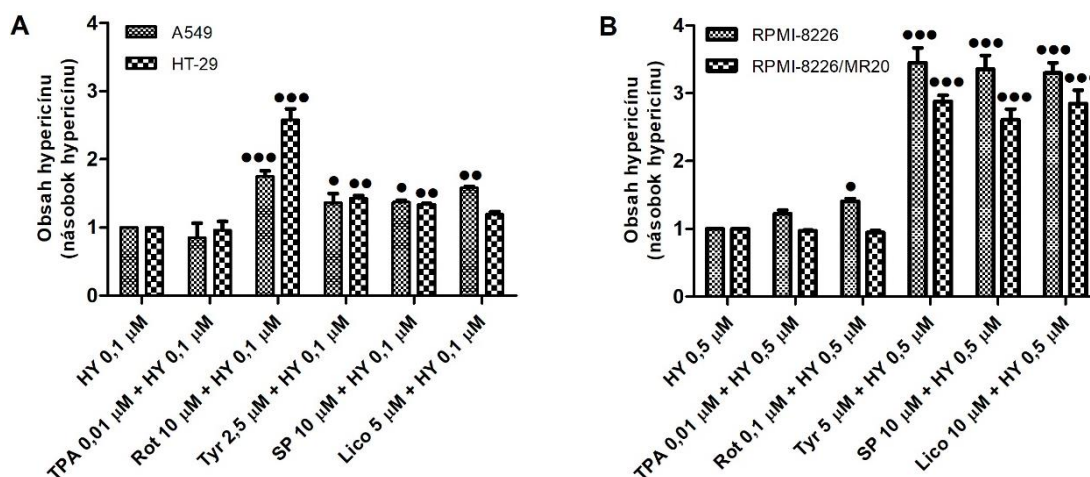
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Zvýšená rezistencia nádorových buniek na HY-PDT môže byť okrem iného spojená so zvýšenou aktivitou efluxných systémov, čo zapríčiňuje nedostatočnú intracelulárnu akumuláciu hypericínu (HY), ktorý je substrátom efluxnej pumpy BCRP (Jendželovský a kol., 2019). S cieľom obmedziť rezistenciu a podporiť zlepšenie terapeutických postupov v PDT a PDD sme sa zamerali na bližšiu identifikáciu mechanizmov a signálnych molekúl zapojených do regulácie transportného proteínu BCRP, predovšetkým v kontexte interakcií medzi HY a proteínom BCRP. Keďže viacero štúdií (Ding a kol., 2021; Harris a kol., 1995; Porcelli a kol., 2014) vrátane našich predošlých výsledkov poukázali na možnosť účasti signálnych molekúl PKCδ, EGFR a JNK1 v regulácii expresie BCRP, v ďalších experimentoch sme sa zamerali na sledovanie efektivity HY-PDT a miery intracelulárnej akumulácie HY po 30 min predinkubácii buniek s modulátormi daných signálnych molekúl.

Naše výsledky poukázali na významný nárast cytotoxicity HY-PDT vplyvom inhibítorov EGFR (Tyr) a JNK (SP, Lico) v leukemických bunkách RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20. Po pôsobení uvedených inhibítorov výrazne klesla viabilita (~35% a menej) u oboch bunkových línií v porovnaní so samotnou HY-PDT (~60% v bunkách RPMI-8226 a ~95% v bunkách RPMI-8226/MR20). Tento pokles viability bol sprevádzaný znížením celkového počtu buniek a koreloval aj s výsledkami analýzy externalizácie fosfatidylserínu a viability, kde sme zaznamenali významný a veľmi výrazný pokles percenta živých buniek a nárast percenta mŕtvych a sekundárne nekrotických buniek. Modulátory kinázy PKCδ (TPA, Rot) výrazne neovplyvnili účinky HY-PDT v leukemických bunkách. Avšak práve Rot ako inhibítor PKCδ mal najvýraznejší dopad na cytotoxický, aj cytostatický účinok HY-PDT v bunkách kolorektálneho karcinómu HT-29, kde značne znížil viabilitu spolu s celkovým počtom buniek a významne zvýšil percento apoptotických a sekundárne nekrotických buniek v porovnaní so samotnou HY-PDT. V bunkách pľúcneho karcinómu A549 mal rovnaký efekt inhibítor kinázy JNK1, Lico.

Keďže úspešnosť PDT závisí aj od množstva fotosenzibilizátora v nádorových bunkách (Kiesslich a kol., 2006), bolo naším ďalším cieľom overiť, či za nárastom efektivity HY-PDT stojí vyšší obsah HY. Zistili sme, že za vyšší cytotoxický efekt HY-PDT v bunkových líniách RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20 po pôsobení Tyr, SP a Lico môže byť zodpovedná práve

vyššia miera intracelulárnej akumulácie HY. Zaznamenali sme približne 3-násobný nárast obsahu HY v týchto bunkách vplyvom všetkých troch modulátorov (Obr. 1B). Nižší, ale významný nárast intracelulárnej hladiny HY sme pozorovali aj v bunkách A549 po predinkubácii s Rot a Lico a v bunkách HT-29 po predinkubácii s Rot (Obr. 1A). Aj v tomto prípade výsledky korelujú s nárastom účinnosti HY-PDT. Na základe dosiahnutých výsledkov predpokladáme, že za nárastom intracelulárneho obsahu HY, a teda aj vyššej efektivity HY-PDT, by mohlo stáť potlačenie expície a/alebo aktivity transportného proteínu BCRP. Okrem toho je možné predpokladať, že na regulácii BCRP v nádorových bunkách sa môžu podieľať všetky tri signálne molekuly, avšak účasť konkrétnej kinázy závisí od konkrétnej bunkovej línie (RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20 – EGFR a JNK1; A549 – JNK1; HT-29 – PKC δ). Naše predpoklady však bude potrebné potvrdiť v ďalších experimentoch.



Obr. 1. Obsah nefotoaktivovaného HY v bunkách A549, HT-29 (A), RPMI-8226 a RPMI-8226/MR20 (B) Výsledky sú prezentované ako priemer \pm SD z troch nezávislých opakovaní a sú vyjadrené ako násobky skupiny ovplyvnenej samotným HY. Experimentálne skupiny ovplyvnené kombinovaným zásahom boli štatisticky porovnané so skupinami ovplyvnenými samotným hypericínom (• $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$)

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0022/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ding B. et al. CASK silence overcomes sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma through activating apoptosis and autophagic cell death. *Front. Oncol.* 2021; 11:681-683.
- Harris M. S. et al. Hypericin inhibits cell growth and induces apoptosis in retinal pigment epithelial cells: possible involvement of protein kinase C. *Curr. Eye Res.* 1995; 15:255-262.
- 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. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation a toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. *Biomed. Pharmacother.* 2019; 109:2173-2181.
- Kiesslich T. Cellular mechanisms and prospective applications of hypericin in photodynamic therapy. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13:2189-2204.
- Porcelli L. et al. The EGFR pathway regulates BCRP expression in NSCLC cells: role of erlotinib. *Curr. Drug Targets.* 2014; 15:1322-1330.
- Vargová J. et al. Hypericin affects cancer side populations via competitive inhibition of BCRP. *Biomed. Pharmacother.* 2018; 99:511-522.

OVERENIE RELEVANTNOSTI *IN VITRO* MODELOV POLARIZÁCIE MAKROFÁGOV NA ZÁKLADE TRANSKRIPTOMICKEJ ANALÝZY

Ryniková M.¹, Adamková P.¹, Hradická P.², Štofilová J.³, Demečková V.¹

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

²Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Nórsko

³Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

V súčasnej dobe sa čoraz viac skúma úloha makrofágov v patológii mnohých ochorení, vrátane rakoviny. Keďže tieto výskumy sú často realizované *in vitro*, je potrebné použiť protokoly polarizácie M1 a M2 makrofágov, ktoré budú čo najlepšie reflektovať stav *in vivo*. Z tohto dôvodu sme si za cieľ tejto štúdie zvolili porovnanie dvoch najviac využívaných protokolov na polarizáciu makrofágov. Keďže zmeny v expresii génov sú považované za spoľahlivý indikátor polarizačného stavu bunky, makrofágy sme porovnávali na úrovni ich transkriptómov. Naša štúdia preukázala významné rozdiely v génovej expresii medzi zvolenými modelmi. Na základe porovnania diferenciálnej génovej expresie a “GO enrichment“ analýzy predstavujú M1 makrofágy polarizované podľa Halvorsen a kol. (2015) vhodnejší model klasicky aktivovaných makrofágov. Keďže expresia génov spojených s M2 fenotypom bola nízka v oboch zvolených modeloch, je potrebné optimalizovať polarizačný protokol alternatívne aktivovaných makrofágov.

ÚVOD

Makrofágy predstavujú dôležité bunky vrodeneho imunitného systému a majú nezastupiteľnú úlohu v likvidácii patogénov, ale aj v odstraňovaní poškodených buniek (Mills a Ley, 2014). Čoraz viac sa zdôrazňuje ich úloha v patogeneze mnohých ochorení, ako napríklad ateroskleróza, chronické zápalové ochorenia a rakovina. Funkcia a diferenciácia makrofágov sa najčastejšie skúma *in vitro* s využitím monocytov izolovaných z periférnej krvi alebo immortalizovaných monocytárných línii. Z monocytov vzniká vplyvom stimulov prítomných v mikroprostredí viacero funkčných subtypov makrofágov, avšak zjednodušene ich môžeme rozdeliť na dva základné typy: klasicky aktivované (M1), ktoré sa podieľajú predovšetkým na likvidácii patogénov a obranných reakciách, a alternatívne aktivované (M2), ktoré majú úlohu v reparácii tkaniva (Shapouri-Moghaddam a kol., 2018). Na diferenciáciu makrofágov z monocytov v *in vitro* podmienkach sa využívajú dva základné protokoly, pričom vo vedeckej komunite stále nie je jednotný názor, ktorý protokol je spoľahlivejší na štúdium prozápalových M1 a reparačných M2 makrofágov. Prvý protokol využíva pre vznik M1 makrofágov aktivátor PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), zatiaľ čo vznik M2 makrofágového subtypu je výsledkom pôsobenia vitamínu D3 (1,25-(OH)₂-vitamín D3). Druhý protokol využíva na polarizáciu makrofágov predovšetkým cytokínové stimuly. Účinkom PMA na monocyty sa indukuje tvorba „M0“ makrofágov, z ktorých sa následne pôsobením kombinácie lipopolysacharidu (LPS) a interferónu gama (INF-γ) polarizujú M1 makrofágy a pôsobením interleukínov (IL) 4 a IL-13 sa polarizuje M2 subtyp. Sledovanie zmien génovej expresie predstavuje vhodný spôsob ako určiť polarizačný status bunky (Murray, 2017). Keďže výskum makrofágov stále prebieha predovšetkým v *in vitro* podmienkach, vhodne zvolený model je nevyhnutný na správnu simuláciu *in vivo* podmienok a pochopenie funkcií makrofágov a ich úlohy v patogeneze ochorení.

MATERIÁL A METODIKA

Bunky ľudskej monocytárnej línie THP-1 (ECACC, Salisbury, Veľká Británia) boli kultivované v RPMI médiu s 10 % FBS (Biosera, Nuaille, Francúzsko) pri 37°C a 5 % CO₂. Následne boli THP-1 bunky polarizované na M1 a M2 makrofágy podľa dvoch zvolených protokolov: protokol A (Hradická a kol., 2020), ktorý využíva PMA a vitamín D3, a protokol

B (Halvorsen a kol., 2015), ktorý využíva PMA na polarizáciu M0 makrofágov a následne cytokínové stimuly na polarizáciu M1 a M2 makrofágov. RNA bola extrahovaná z buniek podľa optimalizovaného protokolu (Toni a kol., 2018), pričom boli vykonané tri chloroformové extrakcie. Koncentrácia a čistota RNA bola stanovená pomocou spektrofotometra NanoDrop™ One^C UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Integrita RNA bola vyhodnotená na základe elektroforézy na 1,5 % agarózovom géli. Všetky vzorky boli uskladnené pri -20°C až do následnej analýzy. Príprava RNA knižnice, sekvenovanie a štatistická analýza RNA-seq dát bola zabezpečená komerčne dostupnou NGS firmou Novogene Europe (Cambridge, Veľká Británia).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V analýze diferenciálnej génovej expresie sme sa zamerali predovšetkým na gény, ktoré sú asociované s M1 a M2 polarizačným statusom makrofágov a sú popisované v literatúre (Tab. 1). Gény *NOS2* a *CD80* a ich produkty sú považované za významné markery M1 makrofágov (Shapouri-Moghaddam a kol., 2018). Gén *NOS2* bol najviac exprimovaný v M1 bunkách modelu A. Kým po pridaní M1 cytokínových stimulov k M0 bunkám v modeli B nedošlo k zvýšeniu expresie tohto génu, v M2 bunkách bol gén *NOS2* upregulovaný. Podľa predpokladu bola expresia génu *CD80* zvýšená v M1 a znížená v M2 bunkách modelu B. V spomínanom modeli však vykazovali M0 makrofágy vyššiu expresiu *CD80* ako plne diferencované M1 makrofágy v modeli A. Medzi významné markery M2 makrofágov zaradujeme gény *ARG1* a *MRC1* (Murray, 2017). Model A preukázal očakávanú upreguláciu *ARG1* v makrofágoch M2 oproti M1. Avšak v modeli B nebol zistený rozdiel v expresii *ARG1* medzi M0, M1 a M2 makrofágmi. Napriek tomu, že je receptor *MRC1* typický pre M2 makrofágy, zvýšenú expresiu jeho génu sme zaznamenali len v M1_A bunkách.

Tab. 1. Diferenciálna expresia génov typických pre M1 a M2 fenotypy

Gén	M1_A vs.	M1_B vs.	M2_B vs.	M1_A vs.	M1_B vs.	M1_A vs.	M2_A vs.	
	M0_B	M0_B	M0_B	M2_A	M2_B	M1_B	M2_B	
M1	<i>NOS2</i>	6,38		4,01	6,02	-2,14	4,47	
	<i>CD80</i>	-2,35	4,52	-3,32		7,85	-6,94	
	<i>IL1A</i>		2,84		5,14	2,6	-2,68	-5,29
	<i>IL1B</i>	2,85	3,48	1,37	14,33	2,12		-12,96
	<i>IL23A</i>			-1,98		2,67	-1,73	1,25
	<i>TNF</i>				1,46	5,5	-1,25	1,5
	<i>CCL1</i>	6,37	5,58		9,64	8,93		
	<i>CXCL9</i>		4,82			19,51	-19,32	
	<i>CXCL10</i>		9,43			14,84	-13,24	-3,75
	<i>CXCL13</i>					4,29	-3,63	
M2	<i>ARG1</i>				-6,25		-6,11	
	<i>MRC1</i>	3,74					3,58	
	<i>CCL8</i>		11,83			12,26	-11,19	
	<i>CCL18</i>				6,57	2,9		
	<i>CCL22</i>	-4,54	-4,72	-3,13		-1,58		
	<i>CCL24</i>	-7,4	-5,82	-6,87				

Hodnoty v tabuľke sú vyjadrené ako \log_2 FC. FC – Fold Change; IL – interleukín; TNF – faktor nádorovej nekrózy; CCL – C-C chemokín; CXCL – C-X-C chemokín; NOS2 – syntáza oxidu dusnatého 2; ARG1 – argináza 1; MCR1 – manózový receptor makrofágov 1

Expresia génov pre M1 cytokíny a chemokíny bola výraznejšie upregulovaná v M1 bunkách modelu B. V prípade expresie génov pre M2 chemokíny a cytokíny sme pozorovali menšie rozdiely nielen medzi makrofágovými subtypmi, ale aj zvolenými modelmi. V M2 makrofágoch oboch modelov bol z M2 génového bloku upregulovaný len gén *CCL22* v porovnaní s M1 makrofágmi, ale jeho expresia bola znížená v porovnaní s M0 makrofágmi.

V prípade modelu B je možným vysvetlením nízkej expície génov typických pre M2 fenotyp použitie pomerne vysokej koncentrácie PMA (61,68 ng/ml) na polarizáciu M0 buniek, z ktorých boli následne polarizované M2 makrofágy. PMA spôsobuje polarizáciu monocytov na makrofágy, avšak koncentrácia vyššia ako 50 ng/ml inhibuje polarizáciu M2 makrofágov (Baxter a kol., 2020). Podľa protokolu A sme na polarizáciu M2 makrofágov použili aktívny vitamín D3, ktorý sa bežne považuje za stimulant polarizácie M2 makrofágov (Wasnik a kol., 2018). Niektoré štúdie však uvádzajú jeho vplyv na zvýšenú produkciu inflamačných cytokínov a zvýšenie antimikrobiálnej odpovede, čo je bežne asociované s M1 fenotypom (Muvva a kol., 2020). Pravdepodobne preto nebudú mať bunky stimulované vitamínom D3 profil génovej expície typický pre M2 makrofágy.

Na základe "GO Enrichment" analýzy sa M1_B bunky javia ako vhodnejší model klasicky aktivovaných makrofágov oproti M1_A. Gény podieľajúce sa na zápalovej odpovedi a obrane organizmu voči patogénom (GO:0098542, GO:0051607, GO:0009615, GO:0002253, GO:0009617, GO:0002757, GO:0031349, GO:0002694 a i.) boli viac zastúpené v makrofágoch M1_B v porovnaní s M1_A. Pravdepodobne je to z dôvodu, že PMA vytvára fenotyp, ktorý je len podobný M1 fenotypu (Baxter a kol., 2020). Zatiaľ čo sa v modeli A makrofágové subtypy od seba výrazne neodlišovali, v modeli B mali makrofágy M2 oproti M1 upregulované gény súvisiace s organizáciou extracelulárneho matrixu (GO:0043062, GO:0030198, GO:0005581) a oproti M0 gény súvisiace s angiogenezou (GO:0048514, GO:0001525). Tieto procesy sú potrebné pre úspešnú regeneráciu a reparáciu poškodeného tkaniva, čo sú funkcie štandardne asociované s alternatívne aktivovanými M2 makrofágmi (Mills a Ley, 2014).

Výsledky transkriptomickéj analýzy naznačujú, že samotné PMA nie je dostatočným stimulantom pre vznik M1 fenotypu, preto je model polarizácie B využívajúci následnú stimuláciu pomocou cytokínov spoľahlivejší na získanie M1 makrofágov. Diferenciálna expresia génov aj "GO Enrichment" analýza preukázali, že M2 makrofágy polarizované podľa oboch protokolov nemajú zvýšenú expresiu génov asociovaných s M2 fenotypom. Zároveň sa veľmi neodlišujú od buniek, ktoré vznikli stimuláciou pomocou PMA (M0_B, M1_A). Z tohto dôvodu usudzujeme, že ani jeden zo zvolených protokolov nie je vhodný na diferencovanie spoľahlivých M2 makrofágov. Možným riešením je optimalizácia protokolu B, predovšetkým koncentrácie a času pôsobenia PMA.

Táto štúdia bola financovaná z grantových projektov VEGA 1/0393/20 a VVGS-2022-2195.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baxter E W et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M(IFN γ +LPS), M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes. *J Immunol Methods*. 2020; 478:112721.
- Halvorsen B et al. Increased expression of NAMPT in PBMC from patients with acute coronary syndrome and in inflammatory M1 macrophages. *Atherosclerosis*. 2015; 243(1): 204-10.
- Hradicka P et al. A novel lactic acid bacteria mixture: macrophage-targeted prophylactic intervention in colorectal cancer management. *Microorganisms*. 2020; 8(3):387.
- Mills C D, Ley K. M1 and M2 macrophages: the chicken and the egg of immunity. *J Innate Immun*. 2014; 6(6):716-726.
- Murray P J. Macrophage polarization. 2017; 79:541-566.
- Muvva J R et al. Polarization of human monocyte-derived cells with vitamin D promotes control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Front Immunol*. 2020; 10:3157.
- Shapouri-Moghaddam A et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018; 233(9):6425-6440.
- Toni L S et al. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*. 2018; 5:599-608.
- Wasnik S et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D suppresses M1 macrophages and promotes M2 differentiation at bone injury sites. *JCI Insight*. 2018; 3(17):e98773.

DETEKCIA CHROMOZÓMOVÝCH TRANSLOKÁCIÍ METÓDOU FISH PO EXPOZÍCII MIKONAZOLU NA BOVINNÉ LYMFOCYTY

Sedláková S., Schwarzbacherová V., Bučan J., Holečková B., Galdíková M.
Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo zistiť potenciálny genotoxický účinok mikonazolu na bovinné lymfocyty *in vitro*. Lymfocyty dvoch donorov boli exponované mikonazolu v koncentráciách 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po dobu 24 h a 48 h. Metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie sme zisťovali prítomnosť chromozómových translokácií. Žiadna z testovaných koncentrácií mikonazolu neindukovala vznik chromozómových translokácií. Pozorované však boli numerické aberácie. U donora č.1 boli zaznamenané pri 24 h *in vitro* expozícii a koncentrácii mikonazolu 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dva prípady trizómií 1. páru chromozómov. U donora č. 2 bola jedna trizómia 1. páru chromozómu prítomná pri koncentrácii mikonazolu 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ po expozícii 24 h aj 48 h. Po 48 h boli detegované u donora č. 1 tri trizómie 1. ($p < 0,05$) a dve trizómie 5. páru chromozómov pri koncentrácii mikonazolu 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a pri koncentrácii 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bola v jednom prípade pozorovaná trizómia 5. páru chromozómov. Trizómia 5. páru chromozómov bola v jednom prípade pozorovaná pri koncentrácii mikonazolu 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (48 h) u donora č. 2.

ÚVOD

In situ hybridizácia je cytogenetická technika umožňujúca detekciu, kvantifikáciu a lokalizáciu nukleových kyselín vo vnútri buniek alebo tkanív s vysokým rozlíšením. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) je cytogenetická metóda používaná na detekciu chromozómových abnormalít (Bishop a kol., 2010). Podstata je založená na hybridizácii sondy DNA s jej komplementárnou sekvenciou na chromozómových preparátoch, ktoré boli predtým fixované na podložných sklíčkach (Volpi a kol., 2018). Dve komplementárne vlákna nukleových kyselín sa za vhodných podmienok ľahko navzájom rekombinujú a vytvárajú duplex (DNA:DNA alebo RNA:RNA) známy ako hybrid (Young a kol., 2020). Sondy sú značené fluorescenčným farbivom, tzv. fluorochrómom. Metóda sa používa na chromozómy v štádiu metafázy, pri sledovaní jadier v interfáze, ale aj pri vyšetrení z čerstvých materiálov, napr. odtlačkov biopťátov alebo kultivovaných buniek (Repiská a kol., 2020). FISH sa uplatňuje pri detekcii genetických zmien, ktoré zapríčiňujú vznik nádorov (Gozzetti a kol., 2000), pri hodnotení genotoxicity (Šivíková a kol., 2013), ale aj na zistenie možných infekčných mikróbov a parazitov, napr. malárie v ľudských krvných bunkách (Ciu a kol., 2016).

MATERIÁL A METODIKA

V pokuse bola použitá venózna krv sterilne odobraná od dvoch donorov – teliat (*Bos taurus*), samčieho pohlavia, krížencov slovenského strakatého a holšteinsko-frízskeho dobytky. **Kultivácia.** Kultivácia lymfocytov periférnej krvi dobytky prebiehala pri 37 °C po dobu 72 h zmiešaním kultivačného média a 0,2 ml krvi. 24 h a/alebo 48 h pred ukončením kultivácie bola pridaná testovaná látka – mikonazol v koncentráciách 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Po ukončení kultivácie a spracovaní sme si na podložné sklo kvapli kvapku bunkovej suspenzie a nechali dôkladne uschnúť preparát. Sklá sme si dôkladne prezreli pod fázovým mikroskopom a diamantovým perom vyznačili oblasť obsahujúcu najviac metafáz. **Denaturácia preparátu.** Následne sme sklá so vzorkami denaturovali v 2 x SSC po dobu 30 min pri 72 °C a nakoniec po 1 min v 0,1 x SSC (laboratórna teplota); 0,07 mol.l⁻¹ NaOH (lab. teplota); 0,1 x SSC (4 °C); 2 x SSC (4 °C); 70 %, 85 % a 96 % etanole (lab. teplota). **Prehybridizácia sondy.** Hybridizačnú zmes pozostávajúcu zo 7 μl master mixu (MM); 0,5 μl

salmon DNA; 1,2 µl cot DNA a 1,2 µl sondy (zelená pre 1. pár chromozómov, červená pre 5. pár) sme vložili do termocykléra (30-45 min) na prehybridizáciu sondy.

Hybridizácia. Nakoniec sme prehybridizovanú hybridizačnú zmes aplikovali na sklo so vzorkou, prikryli krycím sklom, okraje oblepili lepidlom a nechali hybridizovať vo vlhkej komôrke počas noci pri 37 °C.

Vymývanie a farbenie. Na druhý deň sme vymyli nešpecificky naviazanú sondy v 2 x SSC pri izbovej teplote počas 5 min; v 0,4 x SSC + 0,3 % Igepale počas 2 min pri 72 °C a nakoniec sme sklá ponorili do 2 x SSC laboratórnej teploty na 1 min. Vzorky sme zafarbili pomocou fluorescenčného farbiva (DAPI) a pozorovali pod fluorescenčným mikroskopom pri 100 x zväčšení. U oboch zvierat sme pri každej testovanej koncentrácii mikonazolu vyhodnotili 500 metafáz a výsledky sme porovnali s negatívnou kontrolou – DMSO (dimetylsulfoxid). Štatistická analýza numerických aberácií bola vykonaná pomocou chí kvadrátového testu. Hodnoty sú uvedené ako % trizómií (\pm štandardná odchýlka).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Za translokácie sú považované výmeny určitých častí úsekov medzi chromozómami. Jednoduché translokácie sú charakteristické prenosom určitého segmentu z jedného miesta na druhé. Tento proces je uskutočnený v rámci jedného chromozómu alebo medzi homologickými, prípadne nehomologickými chromozómami (Holečková a kol., 2021). V našom experimente s mikonazolom neboli pozorované ani u jedného zo zvierat chromozómové translokácie v žiadnej z uvedených koncentrácií v oboch expozičných dobách (24 h, 48 h). Vo všeobecnosti sa chromozómové abnormality rozdeľujú na numerické aberácie (euploidie – monoploidie, polyploidie a aneuploidie – monozómie, trizómie) a štrukturálne prestavby (Holečková a kol., 2021). V našom pokuse boli pozorované numerické aberácie (zmeny v počte chromozómov).

Tab. 3. Výsledky numerických aberácií – trizómií po 24 h in vitro expozícii mikonazolom na boviné lymfocyty

chromozóm č.	24 h							
	% trizómií (\pm SD)							
	DMSO		5 µg.ml ⁻¹		10 µg.ml ⁻¹		25 µg.ml ⁻¹	
	1	5	1	5	1	5	1	5
donor č. 1	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0,4 \pm 0,063	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00
donor č. 2	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0,2 \pm 0,045	0 \pm 0,00

DMSO – dimetylsulfoxid (negatívna kontrola) 0,1 %

U zvierat'a č.1 boli zaznamenané pri 24 h in vitro expozícii a koncentrácii mikonazolu 5 µg.ml⁻¹ dva prípady trizómií 1. páru chromozómov. U zvierat'a č. 2 bola jedna trizómia 1. páru chromozómu prítomná pri koncentrácii mikonazolu 25 µg.ml⁻¹ po expozícii 24 h aj 48 h.

Tab. 4. Výsledky numerických aberácií - trizómií po 48 h in vitro expozícii mikonazolom na boviné lymfocyty

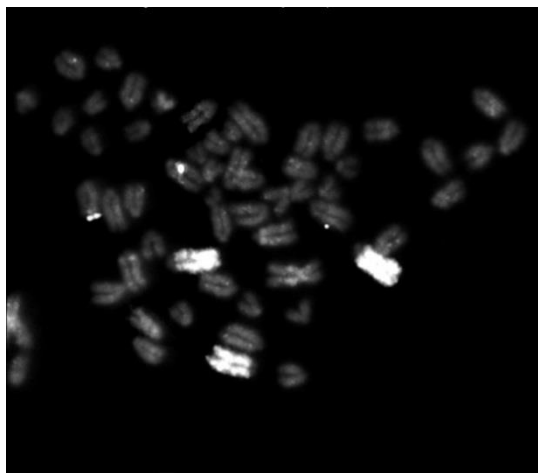
chromozóm č.	48 h							
	% trizómií (\pm SD)							
	DMSO		5 µg.ml ⁻¹		10 µg.ml ⁻¹		25 µg.ml ⁻¹	
	1	5	1	5	1	5	1	5
donor č. 1	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0,6 \pm 0,077*	0,4 \pm 0,063	0 \pm 0,00	0,2 \pm 0,045
donor č. 2	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0 \pm 0,00	0,2 \pm 0,045	0,2 \pm 0,045	0 \pm 0,00

DMSO - dimetylsulfoxid (negatívna kontrola) 0,1 %

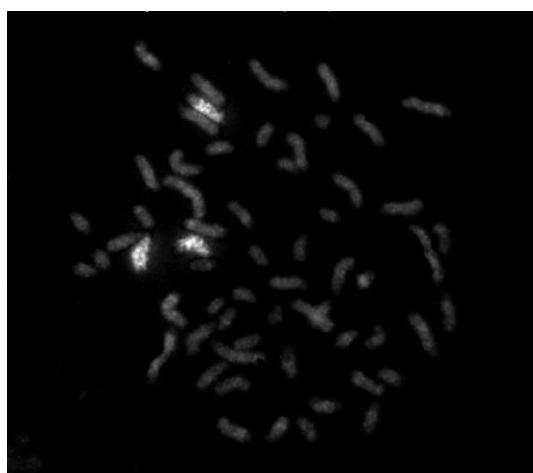
* - štatistická významnosť (p < 0,05), použitý chí kvadrátový test

Po 48 h boli detegované u zvierat'a č. 1 tri trizómie 1. (p < 0,05) a dve trizómie 5. páru chromozómov pri koncentrácii mikonazolu 10 µg.ml⁻¹ a pri koncentrácii 25 µg.ml⁻¹ bola

v jednom prípade pozorovaná trizómia 5. páru chromozómov. Trizómia 5. páru chromozómov bola v jednom prípade pozorovaná pri koncentrácii mikonazolu $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (48 h) u zvierat'a č. 2.



Obr. 1. Trizómia 1. páru chromozómov
(c $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 48h)



Obr. 2. Trizómia 5. páru chromozómov
(c $25 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 48 h)

Výsledky sme porovnali s inými konazolmi. Podľa Galdíková a kol. (2010) tebukonazol obsiahnutý v prípravku Orius 25W testovaný pri koncentrácii $6 \mu\text{g.ml}^{-1}$ najčastejšie spôsobuje monozómie a trizómie 5. páru chromozómov hovädzeho dobytka. Toto tvrdenie potvrdzuje aj Šivíková a kol. (2013), ktorí zistili, že testovaný tebukonazol v koncentráciách 6 - $15 \mu\text{g.ml}^{-1}$ spôsobuje trizómie a monozómie identifikované v súvislosti s chromozómami 5 a 7. Produkt Prosaro pozostávajúci z prothiokonazolu a tebukonazolu, ktorý bol testovaný v koncentráciách 1,5 a $3 \mu\text{g.ml}^{-1}$ indukoval vznik monozómií a trizómií chromozómov 1 a 5 (Holečková a kol., 2013).

Zo získaných výsledkov vyplýva, že mikonazol síce nespôsobil chromozómové translokácie, avšak boli pozorované numerické aberácie, na základe ktorých môžeme uvažovať o genotoxickom účinku.

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla na základe podpory Vedeckej grantovej agentúry prostredníctvom grantu VEGA 1/0166/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ciu Ch., Shu W., Li P. Fluorescence *in situ* Hybridization: Cell-Based Genetic Diagnostic and Research Applications. *Front. Cell Dev. Biol.* 2016; 4:89.
- Galdíková M. et al. Identification of chromosome and aberrations after exposure to pesticide in bovine lymphocytes. *F. Toxicol. & Pest Control.* 2010; 2:5-9.
- Gozzetti A., Beau M. Fluorescence *in situ* hybridization: Uses and limitations. *Semin. In Hemat.* 2000; 37:320-333.
- Holečková B. a kol. Effect of triazole pesticide formulation on bovine culture cells. *Jour. of Environ. Science and Health.* 2013; 48:1080-1088.
- Holečková B. a kol. Chromosomal Aberrations in Cattle. *Genes.* 2021; 12:1330.
- Repiská V. a kol. *Lekárska biológia a genetika 2.* UK v Bratislave. 2020; ISBN 978-223-4929-1.
- Šivíková K. a kol. Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to *in vitro* tebuconazole-based fungicide. *Chemosphere.* 2013; 92:555-562.
- Volpi E., Bridger J. M. FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *Biotechniques.* 2018; 45:4.
- Young et al. A technical review and guide to RNA fluorescence *in situ* hybridization. *PeerJ.* 2020; 8:e8806.

VÝSKYT BAKTERIOCÍN-PRODUKUJÚCICH KMEŇOV *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* V DENTÁLNYCH BIOFILMOCH ĽUDÍ NA SLOVENSKU

Sondorová M.¹, Šurín Hudáková N.¹, Kačírová J.¹, Tamášová M.², Kučera J.², Maďar M.¹

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

²Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Streptococcus salivarius je bežne sa vyskytujúci člen humánnej orálnej mikrobioty, ktorý kolonizuje orálnu dutinu a horné dýchacie cesty v priebehu niekoľkých hodín po narodení. Niektoré kmene *S. salivarius* aj vďaka produkcii bakteriocínov sú schopné konkurencie a úspešne inhibujú bakteriálne patogény podieľajúce sa na rôznych orálnych ochoreniach. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť prítomnosť bakteriocín-produkujúcich kmeňov *S. salivarius* s inhibičnou aktivitou v dentálnych biofilmoch Slovákov. Vzorky dentálneho biofilmu odoberané od 40 zdravých ľudí boli kultivované na Mitis Salivarius agare a krvnom agare. U izolátov bola hodnotená inhibičná aktivita pre potenciál produkcie bakteriocínov na základe antagonistického testu voči indikátorovému kmeňu *Micrococcus luteus* DSM 1790. Izoláty vykazujúce inhibičnú aktivitu boli podrobené identifikácii pomocou PCR metódy s použitím párov primerov pre 16S rRNA gén a druhovo špecifický *gtfK* gén pre *S. salivarius*. Okrem toho boli identifikované kmene *S. salivarius* analyzované na prítomnosť štruktúrnych génov kódujúcich salivaricíny A, B a 9. Z vyselektovaných 55 izolátov iba 15 izolátov vykazovalo inhibičnú aktivitu voči indikátorovému kmeňu, pričom 13 z nich bolo identifikovaných ako *S. salivarius* na základe sekvenovania 16S rRNA a *gtfK* génu. U dvoch kmeňov *S. salivarius* boli detegované gény pre salivaricín A, zatiaľ čo u ostatných neboli preukázané žiadne zo skúmaných salivaricínov. Výsledky tejto štúdie síce poukazujú na nižší výskyt bakteriocín-produkujúcich kmeňov u Slovákov, avšak kmene, u ktorých neboli detegované sledované salivaricíny, môžu byť potenciálnymi producentmi iných alebo dokonca nových bakteriocínov so sľubnou inhibičnou aktivitou.

ÚVOD

Orálna dutina poskytuje biotop pre viac ako 700 bakteriálnych druhov, ktoré sa nachádzajú v prirodzenej homeostatickej rovnováhe so svojim hostiteľom. Tieto bakteriálne druhy zohrávajú zásadnú úlohu v rámci zachovania orálneho zdravia (Zhang a kol., 2022). Orálne komenzálne druhy, ako je napríklad *S. salivarius*, sú bohatým zdrojom bakteriocínov vykazujúcich celý rad rôznych bioaktívnych vlastností. Expresia bakteriocínov sa považuje za dôležitú probiotickú vlastnosť vzhľadom na ich schopnosť priamo inhibovať patogénne baktérie (Li a kol., 2021). Väčšina bakteriocínov produkovaných kmeňmi *S. salivarius*, nazývaných aj salivaricíny, bola charakterizovaná ako lantibiotické peptidy. Navyše je pozoruhodné, že niektoré kmene *S. salivarius* sú schopné produkovať viac ako jeden salivaricín, pričom každý z nich má odlišné genetické determinanty pre produkciu, jedinečnú štruktúru peptidu a špecifické spektrum antimikrobiálnej aktivity (Barbour a kol., 2020). Na základe viacerých charakteristík vrátane produkcie salivaricínov sú kmene *S. salivarius* sľubnými kandidátmi na vývoj orálnych probiotických prípravkov proti infekčným orálnym ochoreniam (Masdea a kol., 2012).

MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie bolo zaradených 40 zdravých dospelých ľudí bez systémových a orálnych ochorení s priemerným vekom 26 ± 5 rokov. Všetci účastníci poskytli informovaný súhlas s účasťou na štúdiu. Realizácia tejto štúdie bola schválená Etickou komisiou Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach a Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice Louisa Pasteura v Košiciach (číslo rozhodnutia 2021/EK/11068). Vzorky dentálneho biofilmu boli odoberané pomocou sterilnej kyrety do 400 μ l fosfátom pufrovaného fyziologického

roztoku. Pred prípravou jednotlivých desiatkových riedení boli vzorky dôkladne vortexované (Vortex V-1 plus, Biosan, Riga, Lotyšsko) až do ich úplnej homogenizácie. Ako selektívne pevné médium bol použitý Mitis Salivarius agar (MSA), ktorý slúži na izoláciu niektorých druhov streptokokov vrátane *S. salivarius*. Na MSA platne bolo naočkovaných 25 µl suspenzie z jednotlivých riedení a platne boli kultivované v termostate pri 37 °C počas 48 hodín za aeróbných podmienok. Následne boli selektované solitárne kolónie s mukoidným rastom, ktoré boli preočkované na krvný agar (KA). Po 48 hodinovej aeróbnej kultivácii pri 37 °C boli získané izoláty mikroskopicky a makroskopicky charakterizované. Pred ich identifikáciou bol vykonaný antagonistický test voči *M. luteus* DSM 1790, kde bola sledovaná inhibičná aktivita jednotlivých izolátov. V rámci antagonistického testu bola pripravená štandardizovaná suspenzia, a to resuspendovaním solitárnych kolónii izolátov a indikátorového kmeňa *M. luteus* DSM 1790 v 3 ml fyziologického roztoku, pričom bola dosiahnutá turbidita 0,5 McFarland pri vlnovej dĺžke 565 nm (DEN-1 McFarland denzitometer, Biosan, Riga, Lotyšsko). Potom bolo 100 µl suspenzie s indikátorovým kmeňom naočkované na Mueller Hinton Agar (MHA) a následné bolo na jednotlivé štvrtiny kvapnutých na povrch agaru 25 µl suspenzie izolátov. Okrem toho bola zahrnutá do tohto testu aj pozitívna (*S. salivarius* K12) a negatívna kontrola (fyziologický roztok). Izoláty, ktoré vykazovali inhibičnú aktivitu, boli identifikované pomocou PCR na základe génu 16S rRNA (univerzálne primery) a špecifického *gtfK* génu (kódujúci glukozyltransferázu K) pre *S. salivarius*. Zároveň izoláty, ktoré boli identifikované ako *S. salivarius* boli podrobené detekcii bakteriocínov, konkrétne salivaricínu A (*salA*), B (*sboB*) a 9 (*sivA*). Použité primery a PCR podmienky sú uvedené v Tab. 1.

Tab. 1. Primery a PCR podmienky pre detegované gény

Gén	Sekvence primero (5' to 3')	PCR podmienky
16S rRNA	AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG CGGTTACCTTGTTACGACTT	94 °C 5 min, 30× [94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3 min] 72 °C 10 min
<i>gtfK</i>	GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT	95 °C 13 min, 30× [95 °C 30 s, 66 °C 30 s, 72 °C 1 min] 72 °C 5 min
<i>salA</i>	GTAGAAAATATTTACTACATACT GTTAAAGTATTCGTAAGACTGATG	95 °C 10 min, 30× [94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 65 °C 30s] 70 °C 5 min
<i>sboB</i>	GTGAATTCTCTTCAAGAATTGACTCTT AAAATATTCATACCGCTCTTCC	95 °C 10 min, 30× [95 °C 30 s, 40 °C 30 s, 65 °C 30 s] 65 °C 5 min
<i>sivA</i>	AAAAAGGCGCTTCTATATCCATGA ATCTTACCTCAAACCTTTTAAGTCCATT	95 °C 5 min, 30× [95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 65 °C 30s] 70 °C 5 min

Na všetky PCR reakcie sa použila DNA izolovaná pomocou Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, USA). Kvalita a kvantita extrahovanej DNA bola analyzovaná spektrofotometricky s použitím NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pred vykonaním PCR. Amplifikácia prebiehala v termocykléri (TPProfessional Basic, Biometra GmbH, Göttingen, Nemecko), pričom reakčná zmes (50 µl) obsahovala 2 µl (100 ng) templátovej DNA, OneTaq 2X Master Mix so štandardným pufrom (New England Biolabs, Foster City, USA), vodu bez nukleáz a príslušné primery v koncentrácii 33 µM. V rámci každej PCR reakcie bola zahrnutá negatívna kontrola (voda bez nukleáz). Ako pozitívna kontrola v prípade salivaricínu A a B bol použitý kmeň *S. salivarius* K12 a u salivaricínu 9 kmeň *S. salivarius* M18. Produkty amplifikácie boli vizualizované elektroforézou na agarózovom géli s použitím GelRed pod UV svetlom a následne sa odoslali na Sangerovo sekvenovanie do spoločnosti Microsynth (Viedeň, Rakúsko). Získané sekvencie sa spracovali v programe Geneious 8.0.5 a porovnávanie sekvencií bolo vykonané online nukleotidovým algoritmom BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z dentálnych biofilmov 40 ľudí bolo izolovaných celkovo 55 izolátov Gram-pozitívnych kokov s typickým retiazkovým usporiadaním, pričom prítomnosť α -hemolýzy na KA bola variabilná. Aj keď sa sekvenovaním potvrdia gény pre produkciu salivaricínov, skutočne nie všetky salivaricíny musia byť produkované ako aktívne peptidy. Napríklad u *S. salivarius* NU10 boli detegované štruktúrne gény kódujúce salivaricín A a 9, avšak bol schopný produkovať iba salivaricín 9 v jeho aktívnej forme (Barbour a kol., 2014). Z dôsledku toho bol v tejto štúdii najprv vykonaný antagonistický test, pričom spomedzi 55 izolátov len 15 vykazovalo inhibičnú aktivitu voči indikátorovému kmeňu. Následne bolo 15 izolátov podrobených identifikácii, kde sa preukázalo, že 12 bolo identifikovaných ako *S. salivarius*. Na základe BLASTn analýzy v prípade 16S rRNA génu vykazovali bakteriálne izoláty homológiu v rozmedzí 99,28% až 99,82% v rámci porovnania v oboch nr/nt aj 16S rRNA databázach s viacerými kmeňmi *S. salivarius*. Avšak na definitívne potvrdenie identifikácie izolátov sa použila PCR s druhovo-špecifickými párami primerov pre *gtfK* gén. Produkty PCR s veľkosťou približne 544 bp boli prítomné u 13 testovaných kmeňov a získané sekvencie mali 99,78 až 100% podobnosť s viacerými kompletnými genómami a viacerými *gtfK* génmi kmeňov *S. salivarius*. Na druhej strane iba pri detekcii génu kódujúceho salivaricín A bol pozitívny produkt u dvoch testovaných kmeňov *S. salivarius*, pričom vykazovali 99,38% a 99,08% homológiu v rámci BLASTn analýzy. Doposiaľ sú známe salivaricín A a jeho varianty, ktoré sa vzájomne líšia substitúciou niektorých aminokyselín (SalA1 – SalA5), ďalej salivaricín B, G32, 9, E a D (Hols a kol., 2019). Na základe toho možno predpokladať, že kmene, u ktorých neboli detegované skúmané salivaricíny, mohli produkovať iné už spomínané alebo nové bakteriocíny, prípadne iné antimikrobiálne látky.

Táto publikácia vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0788/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Zhang M, Whiteley M, Lewin GR. Polymicrobial Interactions of Oral Microbiota: a Historical Review and Current Perspective. *mBio*. 2022; 13:e0023522.
- Li X, et al. Safety assessment of *Streptococcus salivarius* DB-B5 as a probiotic candidate for oral health. *Food Chem Toxicol*. 2021; 153:112277.
- Barbour A, Wescombe P, Smith L. Evolution of Lantibiotic Salivaricins: New Weapons to Fight Infectious Diseases. *Trends Microbiol*. 2020; 28:578-93.
- Masdea L, et al. Antimicrobial activity of *Streptococcus salivarius* K12 on bacteria involved in oral malodour. *Arch Oral Biol*. 2012; 57:1041-47.
- Barbour A, Philip K. Variable characteristics of bacteriocin-producing *Streptococcus salivarius* strains isolated from Malaysian subjects. *PLoS One*. 2014; 9:e100541.
- Hols P, et al. Mobilization of Microbiota Commensals and Their Bacteriocins for Therapeutics. *Trends Microbiol*. 2019; 27:690-702.

MIKROBIOTA KOŽE PSOV – ZLOŽENIE A MOŽNOSTI JEJ PROSPEŠNEJ MODULÁCIE

Štempelová L.^{1,2}

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV v.v.i., Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Dermatologické ochorenia psov a s nimi spojené kožné infekcie sú mnohokrát príčinou návštev veterinárnych ambulancií. Navyiac, liečbu týchto ochorení komplikuje antibiotická rezistencia baktérií. Z týchto dôvodov sme sa zamerali na štúdium mikrobioty kože zdravých psov a psov trpiacich dermatologickými ochoreniami. Následne sme sa zamerali na hodnotenie antimikrobiálneho účinku organických kyselín, rastlinných zložiek a medov, ktoré by mohli byť potenciálne aplikovateľné v rámci lokálneho manažmentu dermatologických ochorení psov. V našej štúdii sme z kože zdravých psov kultivačnými metódami vyizolovali pestrú škálu bakteriálnych druhov, predovšetkým koaguláza-pozitívne a koaguláza-negatívne stafylokoky, zriedkavo streptokoky a gramnegatívne baktérie. Z kožných lézií psov, ktorým bolo diagnostikované dermatologické ochorenie bolo vyizolovaných 21 bakteriálnych kmeňov, z ktorých najčastejšie identifikovaným bol *Staphylococcus pseudintermedius* (13/21). Na základe fenotypových a genotypových vlastností všetkých získaných izolátov boli vybrané bakteriálne kmene proti ktorým sme testovali antimikrobiálny účinok látok naturálneho pôvodu. Na základe hodnôt MIC boli najefektívnejšie organické kyseliny, predovšetkým kyselina octová a propiónová. Z rastlinných zložiek preukázala najvýraznejší antimikrobiálny účinok kyselina tanínová. Z testovaných medov boli najnižšie hodnoty MIC zistené pri mede manuka.

ÚVOD

Koža psov je kolonizovaná rozmanitou bakteriálnou populáciou (Hoffmann a kol., 2014). Mnoho vonkajších, ale aj vnútorných faktorov, alergické kožné ochorenia, endokrinopatie alebo prítomnosť ektoparazitov môžu zapríčiniť rozvoj kožných infekcií a dermatitídy (Loeffler and Lloyd, 2018). Kožné izoláty psov sa vyznačujú prítomnosťou dôležitých faktorov virulencie a tiež antibiotickou rezistenciou, čo značne komplikuje terapiu dermatologických ochorení (Bertelloni a kol., 2021).

MATERIÁL A METODIKA

Kožné stery boli odobraté od 30 zdravých psov (z 8 častí tela) a z kožných lézií 14 psov, ktorým bolo diagnostikované dermatologické ochorenie. Stery boli inokulované na selektívne a neselektívne živné média: Brain Heart Infusion, Mannitol Salt Agar, MacConkey Agar (Becton Dickinson, USA), Pseudomonas Agar (Himedia, India) a kultivované za 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 boli použité testovacie stripy Liofilchem MIC (Taliansko). Na vyhodnotenie rezistencie boli použité tabuľky hraničných hodnôt EUCAST v. 11 (2021). Na hodnotenie vlastností baktérií ako je tvorba želatíny, proteáz, lipázy, slizu, DNázy, hemolyzínov a schopnosť hydrolyzovať škrob boli použité živné média s prídavkom testovaných zložiek. Stanovenie produkcie biofilmu sa uskutočnilo pomocou spektrofotometrického testu kryštálovou violetou podľa predtým publikovanej metódy Toledo-Arana a kol. (2001) s malými modifikáciami, ako popísala Bujňáková a Kmeť (2012). Enzymatická aktivita bola stanovená pomocou komerčnej súpravy API ZYM (bioMérieux, Francúzsko). Na testovanie antimikrobiálnej aktivity organických kyselín, medov a rastlinných zložiek bola použitá mikrodilučná metóda. MIC bola stanovená ako najnižšia koncentrácia kyseliny, ktorá inhibovala rast kmeňa (stanovenie použitím resazurínu a pozorovaním zmeny sfarbenia), ale stále vykazovala mierne viditeľný rast na platni. Minimálna baktericídna koncentrácia (MBC) bola stanovená ako najnižšia koncentrácia kyseliny, ktorá inhibovala rast v jamke a nevykazovala žiadny viditeľný rast na platni. Hodnoty MIC a MBC boli vyjadrené ako aritmetické priemery trojitých testov a štandardná odchýlka. Podľa pomeru MBC/MIC bola stanovená antibakteriálna aktivita. Pomer MBC/MIC ≤ 4 , účinok sa považoval za baktericídny, ale ak bol pomer MBC/MIC > 4 , účinok bol definovaný ako bakteriostatický.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z kože zdravých psov bolo vyizolovaných 136 bakteriálnych kmeňov. Najväčšie množstvo izolátov predstavovali stafylokoky 66,9 % (91/136), ostatné grampozitívne baktérie predstavovali 14,7 % (20/136) a gramnegatívne baktérie 18,9 % (25/136). Následne sme sa zamerali na stanovenie vlastností 74 stafylokokových kmeňov, ktoré boli vybrané na základe MSP dendrogramu. Pri testovaní rezistencie na antibiotiká bolo najviac kmeňov rezistentných na chloramfenikol (73 %), penicilín (67 %), nasledovala rezistencia na erytromycín (42 %), teracyklín (26 %) a oxacilín (20 %). Použitím súpravy API ZYM bola najvýraznejšia aktivita pozorovaná pri kyslej a alkalickéj fosfatáze. S výnimkou jedného kmeňa (*S. capitis*) bola zistená schopnosť tvorby biofilmu u všetkých testovaných kmeňov. Metodikou s použitím Congo red agaru bola tvorba slizu zistená u 82,4 % kmeňov. Hemolytickú aktivitu sme pozorovali u 63,5 % kmeňov, pričom β -hemolýza bola zistená u všetkých testovaných kmeňov (36/36) druhu *S. pseudintermedius*, 4/6 kmeňov druhu *S. aureus* a 2/3 kmeňov druhu *S. epidermidis*. Tvorba DNázy bola potvrdená u 84 %, tvorba lipázy u 64 % a tvorba želatínázy u 54 % testovaných stafylokokov. Z kožných lézií psov bolo odobratých 16 vzoriek (9: atopická dermatitída, 3: otitída, 4: iné kožné ochorenia). Viac ako polovica izolátov 13/21 bola identifikovaná ako *S. pseudintermedius*, 2 kmene ako *S. aureus*, 1 kmeň *S. hominis*, 1 kmeň *S. epidermidis*, 2 kmene *Pseudomonas aeruginosa*, 1 kmeň *Bacillus megaterium*, 1 kmeň *Enterobacter cloacae*. β -hemolýza bola potvrdená u 15/17 stafylokokových kmeňov a 1 kmeňa *P. aeruginosa*, α -hemolýza bola pozorovaná u kmeňa *B. megaterium*. Pri stanovovaní ostatných fenotypových vlastností sme sa zamerali na stafylokokové kmene. Zistili sme, že 88,2 % kmeňov bolo schopných tvoriť DNÁzu, rovnaké percento kmeňov tvorilo lipázu, 53 % kmeňov tvorilo želatínázu a proteázy. Na testovanie antimikrobiálnej aktivity bolo vybraných 14 kožných izolátov (Tab. 1.).

Tab. 1. Testované bakteriálne kmene

Testované baktérie	Kmeň	Vlastnosti
<i>Staphylococcus aureus</i>	CE24	β -hemolýza, DNÁza, želatínáza, biofilm, kazeináza, lipáza
	BO4	β -hemolýza, DNÁza, želatínáza, biofilm, lipáza, E+C rezistencia
<i>S. capitis</i>	ME17	DNÁza, biofilm, lipáza, CD rezistencia
<i>S. epidermidis</i>	AL7	Sliz, biofilm, kazeináza, lipáza, P+E+OX rezistencia, mecA gén
<i>S. hominis</i>	AG3	Sliz, biofilm, E+C rezistencia
<i>S. haemolyticus</i>	RI3	Sliz, biofilm, DNÁza, želatínáza, lipáza, E+C+OC rezistencia
<i>S. pseudintermedius</i>	TB13	β -hemolýza, DNÁza, želatínáza, sliz, biofilm, kazeináza, lipáza, P rezistencia
	OG9	β -hemolýza, DNÁza, želatínáza, sliz, biofilm, kazeináza, lipáza, P+E+TE+C+OC rezistencia
<i>Enterococcus faecium</i>	AA14	nezistená rezistencia na antibiotiká
<i>Streptococcus canis</i>	BS10	TE+ E rezistencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BAS1	lasI - lasR acyl-homoserine lactone quorum-sensing systems, rhlI - rhlR acyl-homoserine lactone quorum-sensing systems, lasB elastase, plc phospholipase C, CIP+COT resistance
<i>Bacillus cereus</i>	AE13	TE rezistencia
<i>Escherichia coli</i>	EL13	<i>fyuA</i> siderophore yersiniabactin, <i>Tsh</i> temperature-sensitive hemagglutinin, <i>iroN</i> siderophore salmochelin
<i>Klebsiella oxytoca</i>	AX10	<i>YbtS</i> yersiniabactin, <i>EntB</i> enterobactin, AMP resistance

Napriek využívaniu organických kyselín ako potravinových konzervačných látok a kŕmnych prísad (Papatsiros a kol., 2012; Stanojević-Nikolić a kol., 2016), antimikrobiálne spektrum mnohých z nich stále nie je dostatočne preskúmané. Tiež chýbajú informácie týkajúce sa ich využitia vo veterinárnej dermatológii. Testované organické kyseliny sú prirodzene sa vyskytujúce kyseliny prítomné v mnohých potravinách, mliečnom cukre, v gastrointestinálnom trakte alebo na koži ľudí a zvierat. Výsledné hodnoty MIC organických kyselín proti testovaným baktériám sú uvedené v tabuľke č. 2. Všetky testované organické kyseliny vykazovali baktericídny účinok proti baktériám kože psov s výnimkou ich bakteriostatického účinku proti kmeňu *B. cereus*. Na základe hodnôt MIC možno hodnotiť, že najsilnejší účinok bol zistený u kyseliny octovej a kyseliny propiónovej. Naopak, najslabšou kyselinou bola kyselina L-askorbová. Najcitlivejšími izolátmi boli: *S. capitis* (MIC 1,7 mg/ml \pm

1,0) a *S. hominis* (MIC 1,9 mg/ml \pm 0,9). Naopak, najrezistentnejšími baktériami boli oba kmene druhov *S. aureus* (BO4 MIC 4,7 mg/ml \pm 4,5; CE24 4,4 mg/ml \pm 4,5).

Tab. 2. Minimálna inhibičná koncentrácia organických kyselín, medov a rastlinných zložiek proti bakteriálnym kmeňom izolovaným z kože psov

Organické kyseliny	MIC rozsah (mg/ml)	MIC priemer	MIC Gram-pozit. baktérie	MIC Gram-negat. baktérie
Kyselina L-mliečna	1,3 - 4,0	2,2 \pm 0,8	2,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,9
Kyselina propionová	0,8 - 2,0	1,6 \pm 0,7	1,7 \pm 0,7	1,3 \pm 0,5
Kyselina octová	0,5 - 2,0	1,4 \pm 0,5	1,5 \pm 0,6	1,0 \pm 0,0
Kyselina maslová	0,4 - 2,7	2,0 \pm 0,8	2,1 \pm 0,8	1,7 \pm 0,5
Kyselina glykolová	1,0 - 2,0	1,7 \pm 0,5	1,7 \pm 0,5	1,7 \pm 0,5
Kyselina jantárová	0,8 - 4,0	2,6 \pm 1,1	2,4 \pm 1,0	3,3 \pm 0,9
Kyselina L-askorbová	4,0 - 16,0	7,9 \pm 4,5	7,2 \pm 4,4	10,7 \pm 3,8
Kyselina citrónová	0,8 - 5,3	2,7 \pm 1,3	2,3 \pm 1,2	4,0 \pm 0,0
Rastlinné zložky				
Betulín	6,7 - 16,0	12,3 \pm 4,1	13,5 \pm 3,9	8,5 \pm 1,7
Guaiazulén	10,7 - 32,0	20,3 \pm 7,1	21,9 \pm 7,3	15,1 \pm 1,3
Chinín	0,3 - 16,0	2,7 \pm 4,1	1,3 \pm 1,4	7,3 \pm 6,1
Kurkumín	1,7 - 16,0	4,7 \pm 5,0	2,2 \pm 0,7	12,9 \pm 4,4
Kyselina glycirhizínová	1,7 - 16,0	9,8 \pm 4,5	8,7 \pm 4,1	13,3 \pm 3,8
Kyselina tanínová	0,04 - 8,0	1,0 \pm 2,0	0,4 \pm 0,3	3,3 \pm 3,3
Piperín	1,2 - 32,0	22,2 \pm 10,8	25,2 \pm 10,1	12,1 \pm 5,5
Quercetin	8,0 - 26,7	16,0 \pm 5,8	16,5 \pm 6,4	14,2 \pm 2,5

Medy	MIC rozsah (%)	MIC priemer	MIC Gram-pozit. baktérie	MIC Gram-negat. baktérie
Med kvetový	23,3 - 46,7	35,5 \pm 5,9	35,9 \pm 6,6	33,9 \pm 1,6
Med lipový	10,0 - 30,0	20,7 \pm 5,8	19,5 \pm 6,1	25,0 \pm 0,0
Med agátový	25,0 - 45,0	36,2 \pm 7,1	36,4 \pm 7,3	35,6 \pm 6,3
Med manuka	8,3 - 45,0	13,7 \pm 9,1	13,0 \pm 10,1	16,1 \pm 0,8
Med lesný	16,7 - 40,0	26,2 \pm 6,1	25,5 \pm 6,3	28,9 \pm 4,2

Medy boli využívané už v minulosti na liečbu rán, ekzémov a zápalov. V súčasnosti so stúpajúcim výskytom rezistencie baktérií na antibiotiká sú opäť predmetom mnohých štúdií (Mandal a Mandal, 2011). Antimikrobiálny efekt testovaných medov sme pozorovali v pomerne vysokých koncentráciách, a preto z praktického hľadiska ich aplikácie na kožu nemajú veľký význam. Z testovaných medov preukázal najvýraznejší antimikrobiálny účinok med manuka. Najnižšie hodnoty MIC boli zistené u kmeňa *S. canis* (MIC 8,3 % \pm 2,4), naopak najvyššie hodnoty MIC boli zistené u kmeňa *E. faecium* (45,0 % \pm 0,0).

Z testovaných rastlinných zložiek bola najúčinnější kyselina tanínová a chinín (o testovaných 13 kmeňov (okrem *E. faecium*)). Kyselina tanínová je prítomná v mnohých potravinách vrátane čaju, kakaových bôbov, hrozna a jahôd (Chung a kol., 1993). Najnižšie hodnoty MIC kyseliny tanínovej boli zistené u kmeňa *S. hominis* (MIC 0,04 mg/ml), najrezistentnejším kmeňom bola *K. oxytoca* (MIC 8,0 mg/ml \pm 0,0).

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0006/20.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Loeffler A, Lloyd DH. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Vet J.* 2018; 235:73-82.
- Hoffmann AR et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS ONE.* 2014; 9:e83197.
- Bertelloni F et al. Virulence and antimicrobial resistance in canine *Staphylococcus* spp. isolates. *Microorganisms.* 2021; 9:515.
- Bessède E et al. Matrix-assisted laser-desorption/ionization BIOTYPED: experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17:533-8.
- EUCAST (2021) Break point 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
- Toledo-Arana A et al. The Enterococcal surface protein, Esp, is involved in *E. faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 67:4538-4545.
- Bujňáková D, Kmeť V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Fol Microbiol.* 2012; 57:263-267.
- Papatsiros VG, Billinis C. The prophylactic use of acidifiers as antibacterial agents in swine. *Antimicrobial Agents; Bobbala, V., Ed.; IntechOpen: London, Uk, 2012; pp. 295-310.*
- Stanojević-Nikolić S et al. Antimicrobial activity of lactic acid against pathogen and spoilage microorganisms. *J Food Process Preserv.* 2016; 40:990-998.
- Mandal DM, Mandal S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1(2): 154-160.
- Chung K et al. Inhibition of selected food-borne bacteria by tannic acid, propyl gallate and related compounds. *Lett App Microbiol.* 1993; 17, 29-32.

“ZA TO MÔŽE LIŠAJNÍK!“ ALEBO ZMENY SPRÁVANIA LABORATÓRNYCH ZVIERAT PO PODÁVANÍ ATRANORÍNU

Šimko P., Urbanská N., Leškaničová A., Kisková T.

Katedra fyziológie živočíchov, PF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Atranorín (ATR) je sekundárnym metabolitom niektorých lišajníkov. V našom experimente sme skúmali jeho účinok na zdravý organizmus *in vivo*. Pracovali sme s potkanmi kmeňa Sprague-Dawley (n=24), ktoré sme si rozdelili do štyroch skupín. Prvá a druhá skupina boli kontrolné. Prvá skupina (n=6) pozostávala zo zdravých intaktných (♂INT) samcov. Druhú skupinu (♀n=6) tvorili zdravé intaktné (INT) samice. Tretiu a štvrtú skupinu (♂ATR/n=6 a ♀ATR/n=6) tvorili zvieratá, ktorým sa na dennej báze podával ATR *per os* v koncentrácii 10 mg/kg hmotnosti v roztoku 10% etanolu po dobu jedného mesiaca. Zvieratá sme vo veku troch mesiacov podrobili behaviorálnemu testovaniu. Skúmali sme taktiež prírastok hmotnosti s tým súvisiaci. Z našich výsledkov vyplýva, že ATR ovplyvňuje správanie laboratórnych zvierat. ATR v dávke 10 mg/kg hmotnosti nie je toxický a mohol by byť využitý v budúcom výskume.

ÚVOD

Lišajníky tvoria skupinu symbiotických organizmov zložených zo zelenej riasy, alebo sinice a huby. Po stáročia sú využívané v medicíne, alebo iných odvetviach a sú zdrojom potravy pre širokú škálu ľudí a zvierat (Crawford, 2015). Atranorín (ATR), produkt sekundárneho metabolizmu lišajníkov, je aromatický depsid vykazujúci širokú škálu pozitívnych vlastností, akými je napríklad antibakteriálny, antifungálny, antiinflamačný, cytotoxický, antivirálny či imunomodulačný účinok (Studzinska-Sroka a kol., 2017). Niektoré štúdie sa zaoberajú vplyvom ATR najmä na nádorové modely *in vitro*. Jedným z takýchto príkladov je i štúdia od Majchrzak-Celińskiej a kol. (2022), zaoberajúca sa podpornou liečbou glioblastómu pomocou ATR. V nej, autori preukázali pozitívny efekt ATR v dávke 25 μ M na viabilitu A-172 buniek, v dávke 50 μ M na viabilitu T98G a v dávke 25 μ M na viabilitu U-138 MG nádorových bunkových línií mozgu (Majchrzak-Celińska a kol., 2022). V súčasnosti však nie je k dispozícii žiadna štúdia, ktorá by sa zaoberala vplyvom ATR na zdravý živý organizmus *in vivo*.

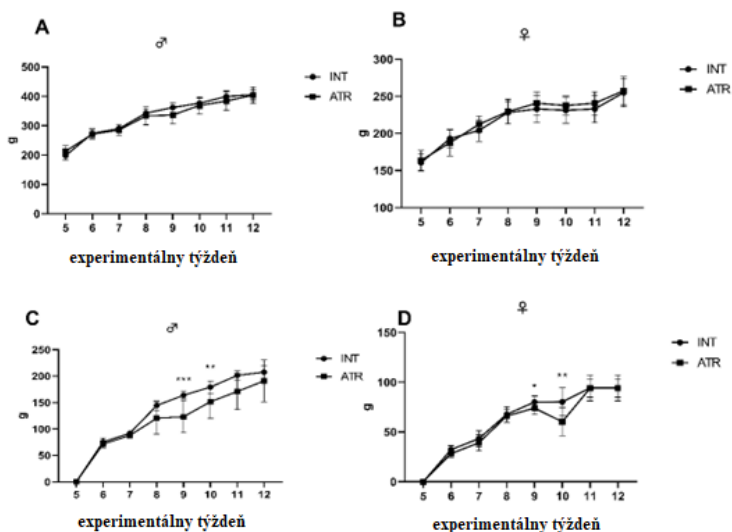
MATERIÁL A METODIKA

ATR bol vyextrahovaný z lišajníka *Pseudovernia furfuracea*. Experimentálnu vzorku tvorilo 24 laboratórnych potkanov kmeňa Sprague-Dawley rozdelených do štyroch skupín. Prvé dve skupiny tvorili intaktné samce a samice, tretiu a štvrtú skupinu tvorili samce a samice, ktorým sa podával ATR na dennej báze v koncentrácii 10 mg/kg hmotnosti *per os* počas jedného mesiaca. Laboratórne potkany sme vo veku troch mesiacov podrobili behaviorálnemu testovaniu za účelom zmerania stupňa úzkosti a aktivity exploračného správania. Na tento účel sme si zvolili vyvýšený krížový labyrint (EPM) a test otvoreného poľa (OFT). V EPM sme sledovali čas v otvorených ramenách, frekvenciu defekácie, počet vztýčení, komfortné správanie a počet prechodov cez stred labyrintu. V OFT to boli udalosti ako celková prejdená dráha, priemerná rýchlosť, čas strávený na perifériách a v strede poľa, taktiež počet vztýčení, komfortné správanie a defekáciu. Údaje sme vyhodnocovali v štatistickom programe GraphPad Prism 8.0.1 a to na základe normálneho rozdelenia dát príslušným testom a posttestom. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka (SD).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

TELESNÁ HMOTNOSŤ A PRÍRASTOK HMOTNOSTI

Sledovanie prírastku telesnej hmotnosti je veľmi užitočným indikátorom zdravotného stavu organizmu (Khanna a kol., 2022). ATR neovplyvnil telesnú hmotnosť laboratórných zvierat počas experimentu, avšak počas niektorých týždňov ju signifikantne znížil (týždne 9 a 10; Obr. 1). Myslíme si, že práve administrácia ATR (počas 8 až 12 experimentálneho týždňa) spôsobila pokles hmotnosti. Spotreba vody ani potravy ovplyvnená nebola (dáta nie sú zobrazené).



Obr. 1. Telesná hmotnosť (A,B) a prírastok hmotnosti (C, D) u samcov (A, C) a samíc (B, D) v INT a ATR skupinách. Dáta sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia vs INT * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ a *** $P < 0.001$

BEHAVIORÁLNA ANALÝZA

V EPM signifikantne vzrástol počet prechodov cez stred v oboch ATR skupinách ($P < 0.05$). Čas strávený v otvorených ramenách bol taktiež značne predĺžený v oboch ATR skupinách ($P < 0.001$ a $P < 0.05$). Početnosť defekácie sa zvýšila po administrácii ATR pri oboch pohlaviach v porovnaní s INT skupinami ($P < 0.01$). Tieto výsledky svedčia o znížení hladiny úzkosti experimentálnych ATR zvierat v porovnaní s INT skupinami. Dlhší čas strávený v otvorených ramenách a zvýšený počet prechodov zvierat stredom labyrintu znamená nižší stupeň úzkosti u zvierat (Belovicova a kol., 2017). Zvýšená frekvencia defekácie pri oboch ATR skupinách počas behaviorálneho testovania môže indikovať anabolický efekt ATR v kostrovom svalstve.

Tab. 5. Vyvýšený krížový labyrint

	♂		♀	
	INT	ATR	INT	ATR
vztyčovanie	21.33 \pm 8.78	22.5 \pm 11.98	23.83 \pm 10.96	27.17 \pm 11.86
čistenie	3.33 \pm 1.86	2.83 \pm 1.47	2.00 \pm 1.41	1.67 \pm 1.21
defekácia	1.17 \pm 0.72	2.08 \pm 0.51**	0.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.89**
prechody cez stred	3.67 \pm 3.01	6.00 \pm 2.83*	7.83 \pm 3.43	13.17 \pm 6.77*
čas v otvorených ramenách	1.17 \pm 2.86	35.17 \pm 47.20***	16.17 \pm 15.45	52.83 \pm 38.93*

Dáta sú vyjadrené ako priemer \pm SD. Signifikancia vs INT * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ a *** $P < 0.001$. Vztyčovanie, čistenie, defekácia a prechody cez stred sú vyjadrené počtom opakovaní, čas v otvorených ramenách je vyjadrený v sekundách.

V OFT sme zaznamenali vo zvýšenej miere počet vztyčovaní pri oboch ATR skupinách ($P < 0.01$ a $P < 0.001$). Frekvencia defekácie sa zvýšila po podávaní ATR pri oboch pohlaviach v porovnaní s INT skupinami ($P < 0.05$ a $P < 0.01$). Počet čistení, čas strávený v strede poľa a na perifériách, prejdená dráha a priemerná rýchlosť zostali nezmenené.

Tab. 6. Test otvoreného poľa

	♂		♀	
	INT	ATR	INT	ATR
vztyčovanie	9.33 \pm 7.57	19.00 \pm 8.05**	12.00 \pm 6.00	24.17 \pm 3.60***
čistenie	5.33 \pm 2.80	5.17 \pm 2.23	5.17 \pm 1.72	4.33 \pm 1.03
defekácia	0.17 \pm 0.41	1.17 \pm 1.17*	0.67 \pm 0.82	2.17 \pm 1.47**
čas v centre	0.70 \pm 0.91	1.11 \pm 1.51	0.80 \pm 0.72	2.81 \pm 3.83
čas na perifériách	360.40 \pm 28.76	371.58 \pm 6.59	362.22 \pm 24.58	374.16 \pm 15.48
prejdená dráha	290.88 \pm 168.58	266.55 \pm 134.95	341.85 \pm 136.72	400.65 \pm 88.26
priemerná rýchlosť	0.79 \pm 0.43	0.71 \pm 0.36	0.95 \pm 0.44	0.79 \pm 0.29

Dáta sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia vs INT * $P < 0.05$ a ** $P < 0.01$. Vztyčovanie, čistenie a defekácia sú vyjadrené počtom opakovaní. Čas v strede a čas na perifériách sú vyjadrené v sekundách. Prejdená dráha je vyjadrená v metroch a priemerná rýchlosť v $m \cdot s^{-1}$

Tento výskum bol podporený vďaka grantovej schéme VEGA (VEGA-1/0658/20) a schéme VVGS (VVGS-PF-2022-2136).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Belovicova K, et al. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip. Toxicol.*, 2017; 10(1): p. 40-43.
- Crawford S, Lichens Used in Traditional Medicine. 2015; p. 27-80.
- Khanna D, et al. Body Mass Index (BMI): A Screening Tool Analysis. *Cureus*, 2022; 14(2): p. e22119-e22119.
- Majchrzak-Celinska A, et al. Lichen Secondary Metabolites Inhibit the Wnt/ β -Catenin Pathway in Glioblastoma Cells and Improve the Anticancer Effects of Temozolomide. *Cells*, 2022; 11(7): p. 1084.
- Studzinska-Sroka E, Galanty A, Bylka W. Atranorin - An Interesting Lichen Secondary Metabolite. *Mini Rev Med Chem*. 2017; 17(17):1633-1645. doi: 10.2174/1389557517666170425105727. PMID: 28443519.

TRANSPORT Mn CEZ EPITEL TENKÉHO ČREVA HYDINY POMOCOU *IN VITRO* MODELU USSING CHAMBER

Tokarčíková K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat CBv SAV, Košice

ABSTRAKT

Stopové prvky zdieľajú počas prestupu bunkovou stenou spoločné transportné mechanizmy, čo ovplyvňuje ich absorpciu z tráviaceho traktu a ich utilizáciu v organizme. Štúdia bola zameraná na sledovanie transportu Mn cez črevný epitel hydiny v *ex vivo* podmienkach. Kinetika transportu rôznych koncentrácií Mn (0, 10, 20, 50, 100 ppm) bola sledovaná a porovnávaná v rôznych úsekoch tenkého čreva dospelých nosníc (duodenum, jejunum, ileum). Ako model črevnej absorpcie sme použili komôrkový systém Ussing chamber, kde sme sledovali transcelulárny a paracelulárny transport Mn cez črevný epitel pomocou indikátorov (kofeín a Lucifer yellow - LY) počas 120 min. inkubácie. Vitalitu a integritu čreva sme sledovali meraním transepiteliálneho odporu membrány (TEER) a prípravou histologických preparátov. Naše výsledky ukázali, že transport Mn a celkový koeficient črevnej permeability Mn nebol ovplyvnený jeho koncentráciou ani segmentom tenkého čreva, aj keď bol zaznamenaný trend vyššej akumulácie Mn v epiteli ilea. Zvýšená permeabilita markerov a hodnôt TEER, a narušenie integrity črevného epitelu (histologické vyhodnotenie) boli zaznamenané po 120 min. inkubácie črevného epitelu v komôrkach Ussing chamber. Zdá sa, že štúdie transportu stopových prvkov použitím systému Ussing chamber umožňujú sledovať prestup stopových prvkov cez črevný epitel *ex vivo* a predpovedať ich črevnú absorpciu v *in vivo* podmienkach.

ÚVOD

Mangán je esenciálny stopový prvok nevyhnutný pre správnu funkciu fyziologických a biochemických procesov v organizme (McDowel, 2003). Využitie Mn v organizme závisí od jeho chemickej formy, od absorpcie z tráviaceho traktu a jeho biovyužitelnosti. Hlavným miestom absorpcie Mn ako aj ostatných stopových prvkov je tenké črevo (Tufarelli a Laudadio, 2017). Na posúdenie absorpcie stopových prvkov, prestupu látok cez črevnú bariéru, a sledovanie rôznych biologických procesov v čreve sa využívajú rôzne *in vitro* modely minimalizujúce použitie zvierat v experimente. Medzi takéto modely patrí aj model Ussing chamber vyvinutý na meranie transportu iónov, živín a liekov naprieč rôznymi epitelovými tkanivami (Tor, 2015). Tento model možno definovať ako systém založený na difúzii a používa sa na meranie transepiteliálneho transportu rozpustenej látky cez membránu. Výhodou tejto metódy je možnosť použitia rôznych častí čreva v *ex vivo* podmienkach, možnosť sledovania absorpcie rôznych látok pri zachovaní morfológických a fyziologických vlastností čreva a použitie minimálneho počtu zvierat. Nevýhodou je krátky čas vitality črevného epitelu (do 150 min.) a veľké medzidruhové a individuálne rozdiely v sledovaných parametroch (Nunes, 2015).

Cieľom našej štúdie bolo pomocou modelu črevnej absorpcie Ussing chamber sledovať paracelulárny a transcelulárny transport Mn cez črevnú stenu hydiny a porovnať prestup rôznych koncentrácií Mn cez jednotlivé úseky tenkého čreva hydiny (duodenum, jejunum, ileum). Integrita a priepustnosť črevného epitelu počas inkubácie bola posúdená na základe biofyzikálnych parametrov črevnej steny (transepiteliálna elektrická rezistencia (TEER)) a pomocou indikátorov (LY a kofeín) počas 120 min. inkubácie. Každých 30 min. inkubácie boli sledované aj histologické zmeny v tenkom čreve.

MATERIÁL A METODIKA

Ex vivo model črevnej absorpcie Ussing chamber je komôrkový systém zložený z 2 častí, akceptorovej a donorovej časti. Každá časť je pripojená k obehovému systému zabezpečujúceho udržiavanie teploty komôrok na 37 °C a neustály prívod zmesi plynov (95% O₂ a 5 % CO₂) pre zachovanie vitality tkaniva. Základným roztokom, v ktorom sme črevo počas celej inkubácie udržiavali bol Krebs-Henseleitov tlmivý roztok (KHB) s pH 7,4. Do KHB roztoku v donorovej časti sme pridávali indikátory (LY, kofeín) a 4 rôzne koncentrácie Mn (0, 10, 20, 50, 100 ppm). Do strednej časti komôrky, ktorá slúži ako semipermeabilná membrána, sme vložili časť črevného tkaniva zbaveného serózy o veľkosti 1,5 – 2 cm. Použité segmenty tenkého čreva z dospelých nosníc (duodenum, jejunum, ileum) sme odoberali postupne počas celkovej anestézie zvierat, čím sme zabezpečili čerstvosť tkaniva. Kvôli eliminovaniu individuálnych rozdielov medzi zvieratami, sme z jedného zvierat'a použili všetky úseky tenkého čreva, ktorý sme inkubovali pri všetkých koncentráciách Mn (n=6). V roztoku akceptorovej časti komôrky sme merali koncentráciu Mn a indikátorov prestupujúcich cez črevnú stenu každých 30 min., počas 120 min. inkubácie. V pravidelných časových intervaloch bola meraná TEER pomocou elektród vyrobených z chirurgickej ocele vložených do oboch častí Ussing chamber. Na konci inkubácie bolo črevo odobraté na ďalšie analýzy- histologické vyšetrenie alebo uchovávané na -20°C.

Koncentrácie Mn v akceptorovej a donorovej časti a v tkanive čreva sme stanovili pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko). Koncentrácie fluorescenčného indikátora LY sme namerali pomocou spektrofluorimetra (Lumina fluorescence spectrometer, Thermo scientific) a koncentrácie kofeínu v tlmivom roztoku pomocou vysokotlakovej kvapalinovej chromatografie s reverznou fázou a UV detekciou (RP-HPLC, Ulitimate 3000, Dionex). V jednotlivých časových intervaloch boli časti čreva odoberané a fixované vo formalíne a histologicky vyhodnotené svetelnou mikroskopiou. Na základe získaných koncentrácií Mn a indikátorov boli vypočítané koeficienty relatívnej permeability Mn, LY a kofeínu. Experiment bol schválený rozhodnutím ŠVPS SR, číslo rozhodnutia o schválení projektu: Ro 3098/2020-220 z 27.8.2020.

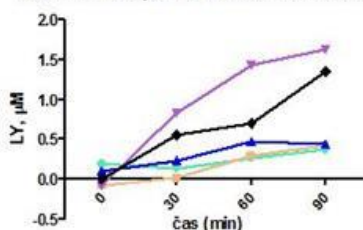
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prestup markerov paracelulárneho a transcelulárneho transportu (LY a kofeín) cez črevný epitel duodena a jejuna a ich koncentrácie v akceptorovej časti komôrky počas inkubácie sú znázornené na Obr. č 1 až 4. Výťažnosť oboch markerov transportu varíovala od 96 až 104%. Koeficient relatívnej permeability (P_{app}) paracelulárneho markera LY sa pohyboval v rozmedzí od 3,8 do $9,7 \times 10^5$ $\mu\text{M}/\text{cm}/\text{s}$, čo poukazuje na neporušenie integrity črevného epitelu počas inkubácie. Signifikantné rozdiely P_{app} oboch markerov transportu sme medzi jednotlivými úsekmi čreva nezaznamenali.

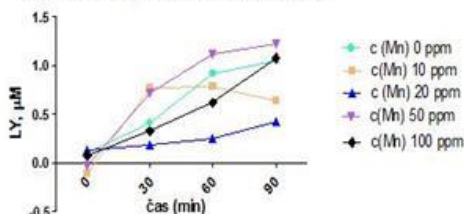
Koeficient relatívnej permeability Mn nebol ovplyvnený koncentraciami Mn a ani sa nelíšil medzi jednotlivými úsekmi tenkého čreva (Obr. 5). Koeficient depozície Mn v črevnom epiteli nebol ovplyvnený úsekom čreva ani koncentraciami Mn (Obr. 6), avšak bol zaznamenaný trend vyššej akumulácie Mn v epiteli ilea v porovnaní s duodenum a jejunom, hlavne pri koncentrácii Mn 50 ppm. Sčítaním oboch koeficientov (koeficient relatívnej permeability Mn a koeficient depozície Mn v tkanive) sme vypočítali celkový koeficient črevnej permeability Mn (Obr. 7), ktorý nebol ovplyvnený žiadnym zo sledovaných parametrov (koncentrácie Mn, úseky tenkého čreva- duodenum, jejunum, ileum). Na záver môžeme konštatovať, že použité markery paracelulárneho a transcelulárneho transportu a vitality črevného epitelu sú vhodné na štúdium transportu Mn a niektorých stopových prvkov. Systém Ussing chamber tak umožňuje bližšiu aproximáciu priepustnosti a môže predpovedať črevnú absorpciu stopových prvkov *in vivo* podmienkach. Na základe histologického poškodenia črevného epitelu, narastajúcich P_{app} transportných ukazovateľov

a zvýšených hodnôt TEER bola potvrdená narušená integrita črevného epitelu po 120 min. inkubácie v KHB, preto je potrebné dobu znížiť na 90 min. a rovnako sme vylúčili koncentrácie Mn 100 ppm, ktoré poškodili epitel. Celkový koeficient črevnej permeability Mn nebol ovplyvnený jeho koncentráciou ani segmentom tenkého čreva zrejme kvôli značným individuálnym rozdielom v sledovaných parametroch, čo znamená zvýšenie počtu sledovaných vzoriek.

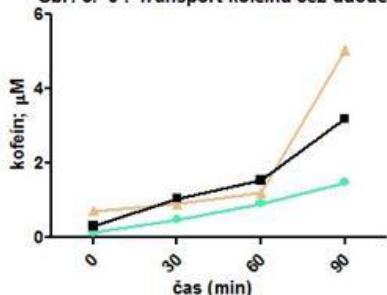
Obr. č. 1: Transport indikátora LY cez duodenum



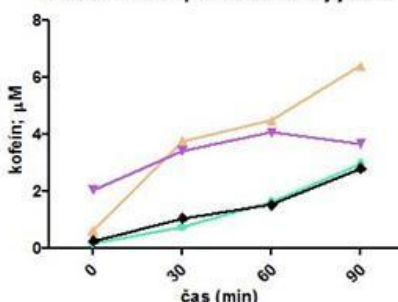
Obr. č. 2: Transport indikátora LY cez jejunum



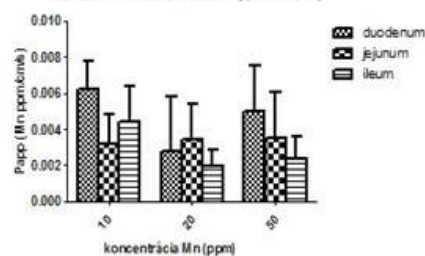
Obr. č. 3: Transport kofeínu cez duodenum



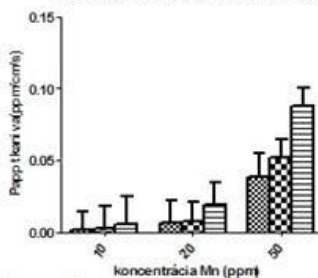
Obr. č. 4: Transport kofeínu cez jejunum



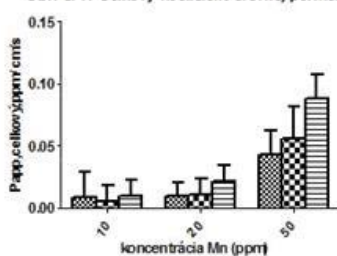
Obr. č. 5: Koeficient relatívnej permeability



Obr. č. 6: Koeficient depozície Mn v tkavine



Obr. č. 7: Celkový koeficient črevnej permeability



POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla na základe podpory VEGA 1/0008/21, Doktorgrant APP0295.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Mcdowell, L.R. Manganese: Minerals in Animals and Human Nutrition. 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, BV, 2003; p. 335-356
- Nunes, R., Silva, C., Chaves, L. Tissue-based in vitro and ex vivo models for intestinal permeability studies. Woodhead Publishing, Portugal, 2016; 236 p.
- Tor, L. Epithelial Cell Models, General Introduction., SpringerOpen, New York, 2015; ISBN 978-3-319316104-4. p. 341.
- Tufarelli V, Laudadio V. Manganese and its role in poultry nutrition: an overview. J. Exp. Biol. Agric. ISSN 2320-8694, 2017; vol. 5, no. 6, p. 749-754.

VÝSKYT *CLOSTRIDIOIDES (CLOSTRIDIUM) DIFFICILE* U HOSPITALIZOVANÝCH PACIENTOV

Toporová A.¹, Čurová K.¹, Lovayová V.¹, Nagyová M.¹, Siegfried L.¹, Kamlárová A.², Novotný M.³

¹ Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11, Košice, Slovensko

² Centrum klinického a predklinického výskumu MEDIPARK, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11, Košice, Slovensko

³ Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Univerzitná nemocnica Louisa Pasteura v Košiciach, Rastislavova 43, 040 01, Košice, Slovensko

ABSTRAKT

Clostridioides difficile (CD) sa v súčasnosti považuje za jednu z hlavných príčin nozokomiálnych infekcií získaných v nemocnici a predstavujú závažný zdravotný problém. CD je sporulujúca tyčinka variabilnej veľkosti, ktorej spóry sú odolné voči vysokým teplotám. Tento patogén je súčasťou črevnej mikroflóry u 5% zdravých jedincov. Príčinou vysokej incidencie a závažných foriem infekcie *Clostridioides difficile* (CDI) sú hypervirulentné kmene CD medzi, ktoré patria 027, 176, 106, 078, 017, produkujú toxíny (toxín A, toxín B, prípadne aj tretí tzv. binárny toxín). Majú schopnosť epidemicky sa šíriť v nemocniciach. V tejto štúdií bolo cieľom potvrdiť prítomnosť CD od pacientov, ktorí boli hospitalizovaní v UNLP v Košiciach.

ÚVOD

Nozokomiálne infekcie spôsobené grampozitívnou, anaeróbnou, sporulujúcou baktériou CD majú nielen celosvetovo, ale už aj na Slovensku rastúci trend výskytu. K rizikovým faktorom vzniku CDI zaraďujeme vek pacientov nad 65 rokov, polymorbiditu, dlhodobú hospitalizáciu, zákroky na hrubom čreve a mnoho ďalších faktorov (Krehel'ová a Sinajová, 2018). Toxigénne aj netoxigénne kmene CD sa vyskytujú bežne v prírode v odpadových a povrchových vodách a sú súčasťou črevnej mikroflóry zvierat a ľudí. CD môže byť pôvodcom patologických stavov v hrubom čreve, ktoré vznikajú ako následok liečby širokospektrálnymi antibiotikami, ktoré eliminujú črevnú mikroflóru čreva. Klostrídie adherujú na sliznicu hrubého čreva a produkujú toxíny. Toxín A (enterotoxín) a toxín B (cytotoxín), ktoré poškodzujú epitel a postupne aj hrubšie vrstvy črevnej steny, čo sa prejaví gastrointestinálnymi ťažkosťami rôznej závažnosti od miernej hnačky cez pseudomembranóznou kolitídu až po toxický megakolon (Hurych a kol., 2021, Liptáková a kol., 2019).

MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie bolo zaradených 50 vzoriek stolice od pacientov s podozrením na klostrídiu infekciu, ktorí boli hospitalizovaní v Univerzitetnej nemocnici Louisa Pasteura (UNLP) v Košiciach. V laboratóriu klinickej mikrobiológie UNLP boli vzorky vyšetrené na prítomnosť enzýmu glutamátdehydrogenázy (GDH) a toxínov A/B imunochromatografickým (ICH) testom (Intermedical CLOSTRIDIUM TRIO TOXIN A/B/GDH). Pre ďalšie testovanie boli použité GDH pozitívne a toxín A/B pozitívne/negatívne vzorky stolíc, ktorých bolo celkovo 50. Vzorky stolice boli až do kultivácie uskladnené pri -20 °C. Kultivácia CD je veľmi náročný a zdĺhavý proces. V súčasnosti sa pre kultiváciu CD využíva tzv. metóda alkoholového šoku. Vzorka stolice sa zmieša spolu s 96% etanolom v pomere 1:1 a následne je zvortexovaná. Inkubuje sa po dobu 45 až 60 minút pri izbovej teplote. Suspenzia o objeme 500 µl je inokulovaná na selektívny agar pre CD (Brazier, Oxoid) s obsahom cykloserínu a cefoxitínu. CD sa kultivuje v anaerostate (Whitley A35 Anaerobic workstation, Don

Whitley Scientific) pri teplote 35-37 °C po dobu 48-72 hodín. Vyrastené kolónie boli identifikované metódou hmotnostnej spektrometrie MALDI TOF (Bruker Daltonics). Následné všetky kmene CD boli testované multiplexnou PCR s cieľom zistiť prítomnosť génov *tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB* a 16S rDNA, ktorá slúži ako pozitívna kontrola DNA izolácie. Pomocou agarózovej elektroforézy boli analyzované všetky PCR produkty vyšetřovaných génov. Vyhodnotené boli prostredníctvom systému Gel DocTMEZ System (BIO-RAD). Citlivosť kmeňov CD bolo vyhodnocovaná pomocou kvalitatívnej metódy diskového difúzneho testu. Testovali sme 6 AL (metronidazol, vankomycín, tigecyklín, doxycyklín, teicoplanin, rifampicin). Antimikrobiálna citlivosť bola vyhodnotená pomocou automatického analyzátora inhibičných zón BACMED 6iG2, ktorý zmeral požadovanú inhibičnú zónu. Výslednú hodnotu prepočítal na hodnotu MIC a výsledok bol uložený v systéme fotografií PACS spolu s terapeutickým účinkom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom našej práce bolo potvrdiť prítomnosť CD od pacientov, ktorí boli hospitalizovaní na 10 oddeleniach v UNLP v Košiciach. U pacientov bola CDI diagnostikovaná na základe vyšetřenia stolice rýchlotestom CD pre enzým GDH a toxín A/B. Do štúdie boli zahrnuté GDH pozitívne a toxín pozitívne/negatívne stolice. Pozitívny výsledok kultivácie bol zaznamenaný pri všetkých 50 pacientoch. Zhoda v detekcii toxínov medzi imunochromatografickým testom a PCR metódou bola zaznamenaná pri 26 vzorkách (52%). Multiplexnou PCR boli u izolátov CD detekované 3 toxíny (toxín A, toxín B a binárny toxín). Toxín A a toxín B bol potvrdený pri všetkých izolátoch CD. Binárny toxín bol potvrdený v 34 vzorkách stolice. V našom analyzovanom súbore pacientov dominoval RT 176 (n=34), ktorý patrí medzi hypervirulentné RT. Ďalšími potvrdenými ribotypmi boli RT 001 (n=11), RT 005 (n=1), RT 020 (n=1), RT 014 (n=2), RT 010 (n=1). K najčastejšie vyskytujúcim RT patria RT 176, RT 027, RT 001, čo potvrdzuje aj štúdia z Českej republiky, kde dominujú RT 176 a RT

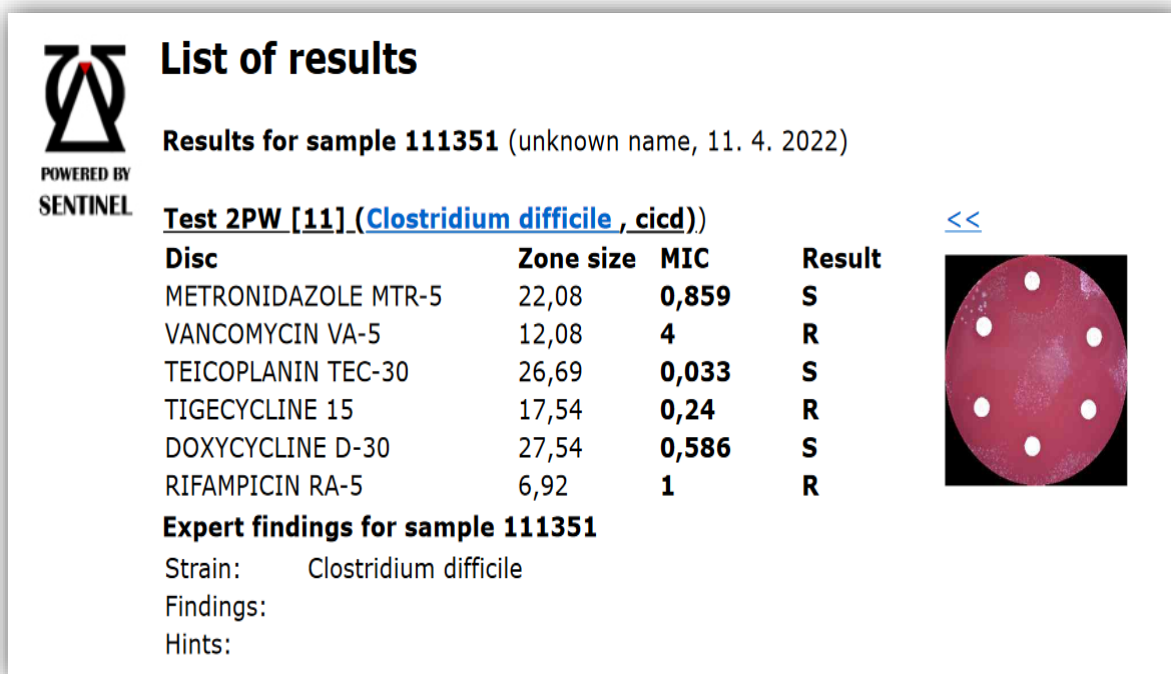


Obr.1. BACMED 6iG2 automatický analyzátor inhibičných zón



Obr. 2. Testovaná ATB zostava CD

001 a koreluje s našimi výsledkami (Krúťová a Nyč, 2017). V tejto štúdií sme testovali antimikrobiálnu citlivosť diskovou difúznou metódou pomocou automatického analyzátora inhibičných zón BACMED 6iG2. Pri všetkých izolátoch bola stanovená antimikrobiálna citlivosť na 6 antimikrobiálnych látok (metronidazol, vankomycín, teicoplanin, tigeicyklín, doxycyklín, rifampicin).



Obr. 3. Automatické meranie veľkosti inhibičnej zóny a systémové prepočítanie na hodnotu MIC (Minimálna inhibičná koncentrácia)

Rezistencia na vankomycín a tigeicyklín bola potvrdená u jedného izolátu a koreluje s výsledkami štúdie (Sholeh a kol., 2020), kde tiež uvádzajú rezistenciu na vankomycín len vo výnimočných prípadoch. Štúdia z Číny (Tang a kol., 2016) však nepreukázala žiadnu rezistenciu na vankomycín. V našej štúdií bola u 37 izolátov potvrdená rezistencia na rifampicin, a potvrdzuje, tak výsledky štúdie (Mutai a kol., 2021), kde bola taktiež potvrdená vysoká miera rezistencie na dané ATB.

Výskum bol realizovaný s podporou projektov TRANSFEC 2019/34-UPJŠ-6 a VVGS-2019-1300.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hurych et al., Lékařská mikrobiologie. 2021; 3:108.
- Kreheľová M, Sinajová, E. Možnosti laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných Clostridium difficile. Newslab. 2018; 9 : 86-90.
- Krúťová M, Nyč O. Clostridium difficile stále aktuálny. Rozhledy v chirurgii. 2017; 10: 411-414.
- Liptáková A, et al., Lekárska mikrobiológia. 2019; 407: 410. ISBN 9788089631919
- Mutai WC, et al., High Prevalence of Multidrug-Resistant Clostridioides difficile Following Extensive Use of Antimicrobials in Hospitalized Patients in Kenya. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology
- Shohel, et al. Antimicrobial resistance in Clostridioides (Clostridium) difficile derived from humans: a systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance & Infection Control. 2020; 9:158
- Tang et al. The incidence and drug resistance of Clostridium difficile infection in Mainland China: a systematic review and meta-analysis. Scientific reports. 2016; 6:37865

VPLYV METÓDY SPRACOVANIA VÝBEROVEJ KÁVY NA OBSAH BIOAKTÍVNYCH A AROMATICKÝCH LÁTOK

Várady M.¹, Tauchen J.², Fraňková A.², Klouček P.², Popelka P.¹

¹Katedra hygieny, technológie a bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

²Katedra kvality a bezpečnosti potravín, Česká zemědělská univerzita, Praha

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť vplyv rôznych metód spracovania, ako je suchá, mokrá, medová, anaeróbna fermentácia a karbonická macerácia na antioxidačnú aktivitu, bioaktívne a aromatické zlúčeniny v pražených výberových kávach *Coffea arabica* z rôznych krajín pôvodu (Nikaragua, Etiópia, Burundi, Peru). Výberová káva sa považuje za najkvalitnejšiu na trhu, avšak jej kvalita sa každým rokom znižuje a preto sa vyvíjajú nové metódy jej pozberového spracovania. Pri kávach spracovaných novými metódami si zákazník všimne hlavne sensorické zmeny, no nedozvie sa o významných bioaktívnych, zdraví prospešných zlúčeninách, alebo potenciálnych nebezpečenstvách, ktoré sa v káve nachádzajú. Preto skúmanie nových metód spracovania kávy a ich vplyvu na obsah bioaktívnych a aromatických látok a zároveň poskytovanie týchto informácií farmárom, pražiarom a zákazníkovi je veľmi dôležité. Typ spracovania kávy v našej práci signifikantne ovplyvnil obsah bioaktívnych a aromatických látok vo výberových kávach, a z našich výsledkov je zrejmé, že hlavne káva spracovaná anaeróbnou fermentáciou si udržala najvyššiu úroveň bioaktívnych zlúčenín s antioxidačnou aktivitou, avšak v závislosti od krajiny pôvodu.

ÚVOD

Kávové nápoje sú v posledných rokoch jednou z najobľúbenejších komodít. Výberové kávy *Coffea arabica* majú štandardizovaný proces výroby charakterizovaný kvalitou a jedinečnosťou pôvodu, od kritérií výberu plantáží až po prípravu. Výberová káva obsahuje zmes chemických (bioaktívnych) a aromatických zlúčenín, ktoré zohrávajú dôležitú úlohu vo výslednom kávovom nápoji a môžu byť ovplyvnené pozberovým spôsobom spracovania. Farmári, ktorí spracovávajú výberové kávy, používajú nové metódy na udržanie kvality a antioxidačnej aktivity kávy. Základné spôsoby spracovania ako napr. suché alebo mokré, dopĺňajú v poslednom čase nové inovatívne spôsoby spracovania, napr. anaeróbna fermentácia (AF) a karbonická macerácia (CM) (Junior a kol., 2021). Káva spracovaná AF alebo CM, má výrazne odlišnú chuť od káv spracovaných tradičnými metódami fermentácie, a má pravdepodobne aj rozdielne fyzikálno-chemické a sensorické vlastnosti (Cortés-Macías a kol., 2022). Spracovanie kávových plodov je najdôležitejší proces, ktorý vedie k eliminácii poškodených kávových zŕn, zvýšeniu kvality a sensorického skóre kávových nápojov. Predpokladáme, že rôzne spôsoby spracovania môžu výrazne ovplyvniť obsah bioaktívnych a aromatických zlúčenín vo výberových kávach. Cieľom bolo zistiť vplyv metód spracovania (suchá, mokrá, medová, anaeróbna fermentácia a karbonická macerácia) na obsah bioaktívnych a aromatických látok vo výberových kávach z rôznych krajín pôvodu.

MATERIÁL A METODIKA

V pokuse bola použitá 100 % *C. arabica*. Vzorka kávy Nikaragua boli spracované mokrou a medovou metódou. Káva Etiópia bola spracovaná dvoma metódami AF-EAO a AF-ACR, pri AF-EAO sa kávové zrná sušia priamo na afrických posteliach a pri AF-ACR sa sušia pod vakmi vysoko v horách. Káva Burundi bola spracovaná suchou metódou a AF. Káva Peru bola spracovaná suchou metódou a CM. Vzorky zelenej kávy (0,25 kg) sme pražili pri 215 °C, 10 min, s dobou vývoja 90 s v pražičke kávy Probatone 5 (Probat, Emmerich am Rhein, Nemecko). Meranie obsahu celkových polyfenolov (TP), celkových flavonoidov (TF) a celkovej antioxidačnej kapacity (AC) bolo už popísané (Várady a kol., 2022). Kofeín (CAF) a kyselina chlorogénová (CGA) boli analyzované pomocou HPLC Ultimate 3000

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Aromatické zlúčeniny boli extrahované mikroextrakciou v tuhej fáze (SPME) a analyzované GC-MS Agilent 7200 7890 GC/Q-TOF (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Štatistické analýzy boli realizované programom GraphPad Prism 9.2.0 (332) 2021 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) s použitím jednosmernej analýzy rozptylu a Tukeyho - *post hoc* testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kávy Etiópia a Burundi spracované AF mali najvyšší obsah TP (27,3 - 31,8 µg GAE/mg) (Tab. 1.). Spracovanie AF zvýšilo AC, TP a TF, čo zároveň znížilo obsah tanínu, ktorý je zodpovedný za adstringentné vlastnosti a horkosť kávy. Obsah TF v káve Peru bol výrazne vyšší ($P<0,001$) pri spracovaní suchou metódou ako CM, čo súviselo s teplotou praženia, kvalitou kávy a krajinou pôvodu (Várady a kol., 2020, 2021). Rovnováha zlúčenín vytvorených a degradovaných počas praženia ukázala, že AC káv, bola výrazne vyššia pri káve Peru spracovanej CM ($P<0,05$) ako pri suchom spracovaní. Kávy Burundi mali najvyššiu AC s vyššími hodnotami pre suché spracovanie ($P<0,05$). Pri AF zotrávajú kávové zrná dlhšie v kávových bobuliach a preto bioaktívne zlúčeniny sú pravdepodobne viac chránené pred následnou degradáciou počas praženia v porovnaní s inými metódami spracovania, avšak v závislosti od krajiny pôvodu. Metódy spracovania kávy neboli relevantné pre obsah CGA, ktorý bol pravdepodobne chránený v dôsledku svetlého praženia (215 °C, 10 minút). So zvyšujúcim sa stupňom praženia, zvyčajne klesá obsah CGA a zvyšuje sa obsah CAF, ktorý závisí od krajiny pôvodu a doby praženia, pričom svetlejšie pražené kávy obsahujú viac CAF ako tmavo pražené kávy (Król a kol., 2020). V našom pokuse obsah CAF nebol ovplyvnený metódou spracovania a bol najvyšší v káve Nikaragua.

Tab. 1. Vplyv metód spracovania výberovej kávy z rôznych fariem na bioaktívne látky

Káva	Metóda	TP	TF	AC	CGA	CAF
		(µg GAE/mg)	(µg QE/mg)	(µg TE/mg)	(µg/1000 µg)	
Nikaragua	Mokrú	26.2	2.82	72.4	8.19	12.6
	Medová	26.3	3.43	64.7	7.49	12.1
Etiópia	AF-EOA	28.9	4.71	84.1	8.67	10.7
	AF-ACR	27.3	4.52	70.9	7.17	9.66
Burundi	Suchá	25.3	4.79	128.8	6.66	10.1
	AF	31.8	4.74	105.4*	6.47	9.83
Peru	Suchá	25.1	4.20**	59.5	8.74	11.1
	CM	23.3	2.22	85.7*	7.34	10.4
	SD	5.26	0.72	15.72	0.93	1.38
	<i>P</i>	0.03	<0.001	<0.001	0.117	0.266

TP, celkové polyfenoly; TF, celkové flavonoidy; AC, antioxidačná kapacita; CGA, k. chlorogénová; CAF, kofeín; AF, anaeróbna fermentácia; EAO, ACR, techniky sušenia; CM, karbonická macerácia. * $P<0,05$, ** $P<0,001$ rozdiely v rámci farmy.

V našom pokuse bola látka 2-furánmetanol (21,52 – 32,53 %) a kyselina octová (Tab. 2) najrozšírejšími aromatickými zlúčeninami v súlade s výsledkami Wu a kol. (2022). Rozdiely boli hlavne medzi spracovaním suchým, AF a CM. Pri AF existuje riziko podkvasenia alebo prekvasenia, čo môže viesť k produkcii nadmerného množstva k. octovej, k. butánovej, alebo k. propiónovej, čo môže spôsobiť nežiaducu chuť a vôňu kávy (Haile a Kang, 2019). Vo výberových kávkach je žiaduca aromatická k. 2-metylbutánová, ktorá bola prítomná iba v niektorých vzorkách analyzovanej kávy a táto kyselina vytvára ovocnú, kyslú a fermentovanú arómu. Nízke zastúpenie látky 2,3-butándiol (0,13 - 0,39 %) v kávkach Etiópia a Burundi je spojené s potenciálnymi defektnými kávovými zrnami a prekvasením. Rozdiely

v aromatických látkach u kávy Burundi a Peru v rámci jednej farmy boli pravdepodobne spôsobené rôznymi metódami spracovania. Výsledky ukázali, že spôsob spracovania kávy ovplyvnil obsah bioaktívnych a aromatických látok vo všetkých výberových kávach, avšak pri anaeróbnej fermentácii sa zachoval vyšší obsah bioaktívnych zlúčenín v závislosti od krajiny pôvodu kávy.

Tab. 2. Vplyv metódy spracovania výberovej kávy z rôznych fariem na aromatické látky

Káva	Metóda	Č.1	Č.2	Č.3	Č.4	Č.5	Č.6	Č.7
		Relatívny podiel (%)						
Nikaragua	Mokrú	0.54	0.78	Nd	28.33	0.172	Nd	16.50
	Medová	0.29***	Nd	0.40	32.53	0.19	Nd	15.41
Etiópia	AF-EOA	0.24	Nd	Nd	28.50	0.19	0.37	23.51
	AF-ACR	0.22	0.45	0.44	21.52	Nd	0.39	21.33
Burundi	Suchá	Nd	Nd	Nd	23.29	0.19	0.13	Nd
	AF	0.2**	1.04*	Nd	30.73	0.17	Nd	15.51**
Peru	Suchá	0.13	Nd	Nd	23.23	0.14	Nd	Nd
	CM	Nd	Nd	1.13*	30.99	0.38**	Nd	Nd
	SD	0.02	0.05	0.05	4.45	0.01	0.02	3.72
	P	<0.001	<0.001	0.029	0.006	0.003	0.003	<0.001

Č.1, etenylester k. propánovej; Č.2, k. butánová, 2-metyl; Č.3, 2,3-butándión; Č.4, 2-furánmetanol, Č.5, 1H-pyrol, 1-(2-furanylmetyl); Č.6, 2,3-butándiol; Č.7, k. octová; AF, anaeróbna fermentácia; EAO, ACR, techniky sušenia; CM, karbonická macerácia.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ *** $P < 0,001$ rozdiely v rámci farmy.

Táto práca bola podporená z Národného štipendijného programu Slovenskej republiky na podporu mobility doktorandov (www.saia.sk) a vedeckou grantovou agentúrou MŠ SR a SAV (VEGA 1/0073/22).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cortés-Macías ET, et al. Impact of post-harvest treatments on physicochemical and sensory characteristics of coffee beans in Huila, Colombia. *Postharvest Biol Technol* 2022; 187:111852.
- Haile M, Kang WH. The role of microbes in coffee fermentation and their impact on coffee quality. *J Food Qual* 2019; 2019:4836709.
- Junior DB, et al. Microbial fermentation affects sensorial, chemical, and microbial profile of coffee under carbonic maceration. *Food Chem* 2021; 342:128296.
- Król K, et al. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *Eur Food Res Technol* 2020; 246:33-39.
- Várady M, et al. Effect of preparation method and roasting temperature on total polyphenol content in coffee beverages. *Czech J Food Sci* 2020; 38:417-421.
- Várady M, et al. Heavy-metal contents and the impact of roasting on polyphenols, caffeine, and acrylamide in specialty coffee beans. *Foods* 2021; 10:1310.
- Várady M, et al. Effects of total dissolved solids, extraction yield, grinding, and method of preparation on antioxidant activity in fermented specialty coffee. *Fermentation* 2022; 8:375.
- Wu H, et al. Impact of roasting on the phenolic and volatile compounds in coffee beans. *Food Sci Nutr* 2022; 10:2408-2425.

POHYBOVÉ CHARAKTERISTIKY ROPUCHY ZELENEJ V URBÁNNOM PROSTREDÍ

Vargová V.¹, Balogová M.¹, Gulyás K.¹, Kaňuch P.^{1,2}, Uhrin M.¹

¹Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice, SR

²Ústav ekológie lesa, SAV, Zvolen, SR

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo získať poznatky o dĺžke pohybov, vzdialeností od reprodukčnej plochy a veľkosti domovského okrsku (*home range perimeter*; HRP) troch populácií ropuchy zelenej v urbánnom prostredí mesta Košice a zároveň porovnať a určiť rozdiely v týchto pohybových charakteristikách medzi lokalitami a pohlavím jedincov. Údaje o polohách jedincov získané metódou rádio-telemetrie potvrdili kratšie vzdialenosti od reprodukčnej plochy u samcov v porovnaní so samicami zodpovedajúce tendencii samcov zdržiavať sa pri vodných plochách počas obdobia párenia. Veľkosti zaznamenaných pohybov sa líšili medzi lokalitami a obdobím v roku, ale nie medzi pohlaviami. Naopak, pohlavie bolo rozhodujúcim faktorom pri veľkostiach HRP, ktoré boli väčšie u samíc.

ÚVOD

Prežitie obojživelníkov v urbanizovanom prostredí závisí od ich ekologických nárokov a schopnosti prispôbiť sa novým podmienkam (Hamer a McDonnell, 2008). Ropucha zelená (*Bufo viridis*) je schopná úspešne kolonizovať aj veľké mestá (Kaczmarski a kol., 2019), avšak jej pohybové charakteristiky z tohto prostredia nie sú zatiaľ známe. V urbánnom prostredí dokážu úspešne prežívať na lokalitách so stálymi alebo aj dočasnými vodnými plochami, zväčša pokrytými vegetáciou, s dostatočnými úkrytovými možnosťami a menšou návštevnosťou ľudí, ako rušivého faktora. Sú to napríklad okraje miest, opustené priemyselné zóny alebo parky vystupujúce v meste ako oázy zelene (Kaczmarski a kol., 2019; Zhelev a kol., 2021). V prírodných habitatoch mali jedince tohto druhu limitované pohybové schopnosti (max. celková dĺžka pohybu 784 m; Sinsch a Leskovar, 2011) a malú veľkosť home range-u (~0.25 ha, Indermaur et al. 2009), pričom v mestskom habitate by mohli byť tieto charakteristiky ešte viac obmedzené kvôli bariéram, ako budovy, ploty a cesty (Hamer a McDonnell, 2008). Ropucha zelená, podobne ako iné obojživelníky s dvojfázovým cyklom života, sa označuje ako indikátor kvality a zdravia prostredia, preto informácie o spôsobe jej života môžu pomôcť nielen k manažmentu prostredia za účelom jej ochrany, ale aj k monitorovaniu a udržaniu zdravého prostredia pre obyvateľov miest.

MATERIÁL A METODIKA

Populácie ropuchy zelenej sa študovali v mestských parkoch alebo rekreačných plochách (Mestský park – MSP, Sídlisko KVP – KVP, Zuzkin park – ZUZ; 48.7° N, 21.2° E), v ktorých bola prítomná stála alebo dočasná reprodukčná vodná plocha. Poloha a pohyb jedincov bol sledovaný rádio-telemetricky s využitím tri-elementovej Yagi antény, prijímača (Icom R20, frekvenčné pokrytie 0.150 – 3304.999 MHz) a rádio-vysielačky typov BD-2 (0,9 g; Holohil Systems Ltd., Kanada) a PicoPip (Ag379) (0,45 g; Lotek Wireless Inc., Kanada). Vysielačky BD-2 boli adultným jedincom osadené pomocou ručne vyrobeného opasku zloženého z rybárskeho silonu (0,28 mm) prevlečeného cez stredový tunel tela vysielačky, ktorý bol ďalej prevlečený cez pružnú silikónovú hadičku (s vonkajším \varnothing 1,5 mm). U vysielačiek typu PicoPip (Ag379), bez stredového tunela, bol silon nahradený tenkou krajčírskou niťou obmotanou okolo tela vysielačky. Hmotnosť vysielačky a opaska nesmela presahovať 10 % hmotnosti jedinca (Bartelt a kol., 2004). Osadenie vysielačiek na ropuchy prebiehalo počas noci na mieste odchyty alebo v miestnosti s vhodnou teplotou (18–24 °C), kde boli jedince po odchyte prenesené v plastovom boxe a nasledujúci večer vypustené späť na lokalitu. Poloha takto označených jedincov bola kontrolovaná pravidelne počas dňa aj

nocí, celkový počet návštev lokalít za dve sezóny bol 173. V geografickom softvéri Quantum GIS 3.16.14 boli určené dĺžky pohybov jedincov (funkcia “Distance matrix“), vzdialenosti polôh výskytu jedincov od reprodukčnej plochy (funkcia “Distance to nearest hub“), ako aj veľkosti obvodu domovského okrsku (HRP), ktoré boli vypočítané algoritmom “Minimum bounding geometry“. HRP nebolo určené pre jedince s počtom záznamov ich výskytu menej ako 3. Štatistická analýza dát prebehla v programe R 4.2.1 pomocou balíka Rcmdr (Fox a kol., 2022). Číslo výnimky od Ministerstva životného prostredia, na základe ktorej prebiehali spomínané výskumné aktivity je 7278/2021-6.3.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

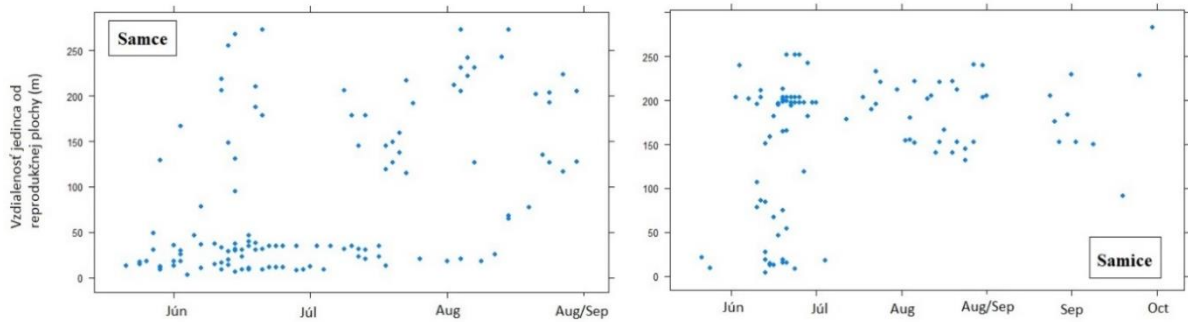
Celkovo bolo do štúdie v sezóne roku 2021 (jún-október) a 2022 (júl-september) použitých 28 vysielaciek a odchytených 47 jedincov (22 samíc, 25 samcov). Vplyv pohlavia na priemerné dĺžky pohybov jedincov ropuchy zelenej ($N_{\text{pohybov samíc}}=84$, $N_{\text{pohybov samcov}}=95$) sa v trojfaktorovom teste ANOVA ukázal ako nevýznamný ($p \leq 0,305$), pričom boli určené štatisticky významné rozdiely v priemernej dĺžke pohybov jedincov medzi lokalitami ($p \leq 0,00005$) a mesiacmi v roku ($p \leq 0,029$). Predovšetkým priemerná dĺžka pohybov všetkých jedincov (49 m) na lokalite MSP bola v porovnaní s ostatnými lokalitami takmer dva krát väčšia (Tab. 1). Tieto hodnoty mohli byť ovplyvnené obdobím zberu dát, keďže len na tejto lokalite boli dáta zbierané navyše počas celého septembra a začiatkom októbra 2021, teda mimo reprodukčnej sezóny, kedy môžu jedince migrovať ďalej od reprodukčnej plochy.

Tab.1. Prehľad výsledných hodnôt pohybov samcov a samíc za jednotlivé lokality

Lokalita	Dĺžky pohybov samíc				Dĺžky pohybov samcov				Max celková dĺžka pohybov jedinca pre lokalitu (m)
	Max (m)	Priemer (m)	Medián (m)	Min (m)	Max (m)	Priemer (m)	Medián (m)	Min (m)	
KVP	67	33	25	4	57	20	19	1	689
MSP	130	48	27	3	209	51	38	5	873
ZUZ	167	33	9	1	43	20	19	2	366

Pohlavie a lokalita boli významným faktorom vysvetľujúcim rozdiely medzi vzdialenosťami jedincov od reprodukčnej plochy, spoločne s obdobím v roku, kedy boli polohy jedincov od reprodukčnej plochy zisťované, čo dokazuje aj výsledok interakcie týchto troch faktorov ($F=6.9660$, $p \leq 0,001$). Vzdialenosti samcov od vodnej plochy boli v mesiacoch jún, júl a v prvej polovici augusta kratšie v porovnaní so vzdialenosťami u samíc (Obr. 1). Zdržiavanie sa samcov pri vodnej ploche aj niekoľko týždňov na rozdiel od samíc, ktoré po párení a nakladení vajícok odchádzajú, je typické pre druhy semi-akvatických obojživelníkov, ako napr. *Bufo bufo* (Reading a Clarke, 1983). Prítomnosť samcov v blízkosti vodnej plochy sa zhoduje s obdobím rozmnožovania, ktoré v strednej Európe prebieha hlavne od marca do júna, ale vzhľadom na teplotu a vlhkosť prostredia môže trvať aj dlhšie (Kaczmarek a kol., 2019). Vzdialenosti výskytu samcov a samíc od vodnej plochy boli špecifické pre každú lokalitu, pričom najväčšie priemerné hodnoty boli zistené opäť u jedincov z MSP, čo zrejme zodpovedá charakteru danej lokality. MSP s približnou plochou 13 ha je spomedzi troch lokalít najväčším parkom so súvislou zelenou plochou bez výraznejších bariér a rušivého vplyvu človeka v nočných hodinách kvôli jeho uzatváraniu. Kdežto zvyšné dve rozlohou menšie lokality (KVP-0.8 ha, ZUZ-2.2 ha) sú ovplyvnené vyšším rušením nočnej aktivity ropúch človekom a výraznou zástavbou budov a ciest, ktoré môžu pôsobiť ako bariéry pohybu a rozptylu jedincov (Hamer a McDonnell, 2008). Priemerná veľkosť HRP určená celkovo pre 13 samíc a 15 samcov, bola najväčšia pre jedince z MSP (Tab. 2). Podobne ako pri vzdialenostiach k reprodukčnej ploche, sa pohlavie ukázalo byť rozhodujúcim faktorom pre veľkosť hodnôt HRP ($p \leq 0,007$), kým vplyv lokality na HRP bol hraničný ($p \leq 0,054$).

Vzdialenosť od reprodukčnej plochy v závislosti od mesiacov v roku



Obr. 1. Porovnanie hodnôt vzdialeností samcov a samíc od reprodukčnej plochy v priebehu júna až októbra

Väčšie veľkosti obvodu domovského okrsku u samíc oproti samcom sú zrejme odrazom ich častejšieho spätného zachytenia vo vzdialenejších bodoch ich výskytu, hlavne v MSP. Študované populácie sú jediné známe úspešne prežívajúce populácie ropúch zelených v meste Košice, a ako také je potrebné poznať ich charakteristiky, ekologické nároky a faktory ovplyvňujúce ich prežitie v danom prostredí. Vzhľadom na rýchlo meniace sa podmienky mesta (plánovaná prestavba fontán a ich okolia, údržba čistoty vody vo fontáne) je táto potreba veľmi aktuálna.

Tab. 2. Prehľad priemerných hodnôt a HRP (m) pre jednotlivé lokality a podľa pohlavia

Lokalita	Priemerná veľkosť/populáciu	Priemerná veľkosť u samíc	Priemerná veľkosť u samcov
	HRP (m)	HRP (m)	HRP (m)
KVP	90	110	78
MSP	198	227	157
ZUZ	125	232	61

Práca bola podporená projektami Vega (1/0298/19) a vvgs-pf-2020-1437 a prebiehala v súlade s platnou výnimkou Ministerstva životného prostredia č. 6598/2020-6.3.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bartelt PE, Peterson CR, Klaver RW. Sexual differences in the post-breeding movements and habitats selected by western toads (*Bufo boreas*) in southeastern Idaho. *Herpetologica*. 2004; 60:455-467.

Fox J, et al. Package 'Rcmdr'. 2022. <http://cran.ma.imperial.ac.uk/web/packages/Rcmdr/Rcmdr.pdf>

Hamer AJ, McDonnell MJ. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. *Biol Conserv*. 2008; 141:2432–2449.

Indermaur L, et al. Behavior-based scale definitions for determining individual space use: requirements of two amphibians. *Am Nat*. 2009; 173:60-71.

Kaczmarek M, Szala K, Kloskowski J. Early onset of breeding season in the green toad *Bufo viridis* in Western Poland. *Herpetozoa*. 2019; 32:109.

Reading CJ, Clarke RT. Male breeding behaviour and mate acquisition in the common toad, *Bufo bufo*. *J Zool*. 1983; 201:237-246.

Sinsch U, Leskovar C. Does thermoregulatory behaviour of green toads (*Bufo viridis*) constrain geographical range in the west? A comparison with the performance of syntopic natterjacks (*Bufo calamita*). *J Therm Biol*. 2011; 36:346-354.

Zhelev Z, Mollov I, Tsonev S. Fluctuating asymmetry in meristic morphological traits of *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) (Anura: Bufonidae): Application for assessing environmental quality of two semi-natural habitats in Plovdiv city, Bulgaria. *Acta Zool Bulg*. 2021; 73:401-407.

ZMENY AKTIVITY SULFOTRANSFERÁZY 1A1 V SPOJITOSTI S KARCINÓMOM PROSTATY

Vilčková M.¹, Jurečková J.¹, Kliment J.², Škereňová M.³, Híveš M.¹, Dušenka R.²,
Knoško Brožová M.¹, Kmeťová Sivoňová M.¹

¹ Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

² Urologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta a UNM, Martin

³ Martinské centrum pre medicínu Biomed, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

ABSTRAKT

Významným enzýmom druhej fázy biotransformácie je sulfotransferáza 1A1, ktorá sa podieľa na eliminácii širokého spektra endogénnych, ako aj exogénnych látok. Predpokladá sa, že jej aktivita sa môže meniť vplyvom genetických variácií, najmä jednonukleotidových polymorfizmov (SNP). To môže viesť k nerovnováhe medzi elimináciou a aktiváciou karcinogénov a viesť k rozvoju nádorových ochorení, vrátane karcinómu prostaty. Preto sme sa ako prví rozhodli študovať dva polymorfizmy *SULT1A1* (*rs1968752* a *rs1042157*) na riziko vzniku a klinicko-patologické charakteristiky karcinómu prostaty. Génové polymorfizmy boli študované pomocou Taqman SNP assays u 525 pacientov s karcinómom prostaty a 551 zdravých jedincov nad 50 rokov. Výsledky našej štúdie potvrdili protektívny/nezmenený účinok polymorfných genotypov na vznik ochorenia (*rs1968752*: OR=0,89, 95% CI 0,65-1,27; *rs1042157*: OR=1,03, 95% CI 0,71-1,47; $p>0,05$), ako aj na hladiny sérového PSA. U vysokorizikových pacientov s Gleasonovým skóre vyšším/rovný 7 poukázala na signifikantnú asociáciu s *rs1042157* polymorfnými genotypmi (*CT*, *TT*; OR=2,87, 95% CI 1,52-5,44; $p<0,05$). Preto stanovenie *rs1042157* polymorfizmu by mohlo byť jedným z genetických markerov karcinómu prostaty najmä u jedincov s GS \geq 7.

ÚVOD

Počas života sme vystavení širokému spektru xenobiotík, na ich detoxikáciu si náš organizmus vyvinul komplexný systém biotransformácie (Liska a kol., 1998). Biotransformácia je proces, pri ktorom sa endogénne a exogénne zlúčeniny premieňajú na polárnejšie produkty, ktoré sú následne ľahšie eliminované z organizmu (Almazroo a kol., 2016). Formálne sa biotransformácia delí na reakcie fázy I. a fázy II. Reakcie fázy I. zahŕňajú transformáciu materskej zlúčeniny na viac polárny metabolit (metabolity) vnesením funkčných skupín (-OH, -NH₂, -SH) (Jančová a kol., 2011). Významným enzýmom fázy II biotransformácie je sulfotransferáza 1A1 (*SULT1A1*). Je členom rodiny sulfotransferáz (Arslan a kol., 2011, Bardakci a kol., 2008). Gén *SULT1A1* je lokalizovaný na chromozóme 16p12.1-p11.2 kóduje enzým *SULT1A1*. Gén *SULT1A1* je polymorfný a jeho alely kódujú 4 rôzne alozýmy *SULT1A1* *1, *SULT1A1**2, *SULT1A1**3, *SULT1A1**4, ktoré sa líšia tepelnou stabilitou a enzýmovou aktivitou (Raftogianis a kol., 1997). Vedecká literatúra naznačuje súvislosť medzi zmenenou detoxikáciou a vznikom rôznych ochorení, vrátane nádorových (Liska a kol., 1997). Jedným z najčastejších nádorových ochorení u mužov je karcinóm prostaty. V roku 2020 bolo na celom svete odhadovaných viac ako 1 414 000 nových prípadov karcinómu prostaty. Severná Európa má najvyššiu incidenciu podľa veku (ASR). V roku 2020 bolo na celom svete odhadovaných viac ako 375 000 úmrtí na karcinóm prostaty (Gandagia a kol., 2021). Dôležitú úlohu vo výskume nádorových ochorení zohráva charakterizácia nových markerov, ktoré by napomohli pri včasnej diagnostike. Preto sme sa rozhodli študovať vplyv génových polymorfizmov *SULT1A1* (*rs1968752* a *rs1042157*) na riziko vzniku karcinómu prostaty u slovenskej populácii.

MATERIÁL A METODIKA

Génové polymorfizmy *SULT1A1* génu sme zisťovali u 525 pacientov s karcinómom prostaty a 551 zdravých jedincov nad 50 rokov, ktorí boli diagnostikovaní a liečení na Urologickej

klinike JLF a MFN v Martine. Diagnóza karcinómu prostaty bola verifikovaná na základe histopatologického vyhodnotenia biopsie prostaty. *SULT1A1* polymorfizmy boli vyšetrené z DNA izolovanej zo vzoriek krvi Na amplifikáciu úsekov obsahujúcich sledované polymorfizmy sme použili TaqMan SNP assay (Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA). Program PCR pozostával z nasledujúcich krokov: 30 s pri 60°C, aktivácia polymerázy a denaturácia DNA počas 3 minút pri 95°C, po ktorej nasleduje opakovanie 40 cyklov: 95°C 15 s, 60°C 1 min a posledný krok 30 s pri 60°C. Pre porovnanie frekvencií výskytu genotypov a alel u pacientov s karcinómom prostaty a u zdravých jedincov sme použili chí-kvadrát test. Za štatisticky významné považujeme tie rozdiely v proporciách, pre ktoré boli hodnoty p menšie ako 0,05.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerný vek zdravých jedincov zaradených do štúdie bol $65,7 \pm 9,0$ rokov a u pacientov s karcinómom prostaty $67,4 \pm 7,9$ rokov. Porovnaním sérových hladín PSA sme zistili signifikantne zvýšené hodnoty PSA u pacientov s karcinómom prostaty v porovnaní so zdravými jedincami (38.3 ± 4.2 ng/ml vs. 3.6 ± 0.2 ng/ml; $p < 0,05$). U 25% pacientov s karcinómom prostaty bolo Gleasonovo skóre nižšie ako 7 a u 75% pacientov bolo vyššie resp. rovné 7. Výskyt frekvencií špecifických *SULT1A1* alel/genotypov u pacientov s karcinómom prostaty a u zdravých jedincov je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1. Riziko vzniku karcinómu prostaty v spojitosti s *SULT1A1* génovými polymorfizmami (*rs1968752* a *rs1042157*).

Genotyp	OR (95% CI)	p
<i>SULT1A1 (rs1968752)</i>		
TT	1.00 (ref.)	
TG	0,92 (0.65-1.29)	0,62
GG	0,89 (0.63-1.28)	0,54
<i>SULT1A1 (rs1042157)</i>		
CC	1.00 (ref.)	
CT	1,07 (0.82-1.39)	0,63
TT	1,03 (0.72-1.48)	0,87

Ako vyplýva z tabuľky 1, sledovaním asociácie medzi *rs1968752* a *rs1042157* polymorfizmami a rizikom vzniku karcinómu prostaty sme zistili protektívny/nezmenený účinok polymorfných genotypov na vznik ochorenia (*rs1968752*: OR=0,86, 95% CI 0,65-1,27; *rs1042157*: OR= 1,03, 95% CI 0,71 - 1,47; $p < 0,05$). Tieto polymorfizmy neboli zatiaľ študované u slovenskej populácie pacientov s karcinómom prostaty. Štúdia Arikawa a kol. (2021) sledovala vzťah medzi polymorfizmami enzýmov druhej fázy biotransformácie vrátane *rs1968752* a cirkulujúcim hladinami pohlavných hormónov u postmenopauzálnych žien prevažne kaukazskej populácie. Zistili pozitívnu asociáciu medzi hladinami estrónu a *rs1968752* rizikovým genotypom.

SULT1A1 rs1042157 polymorfizmus sa vyskytuje v 3'netranslatovanej oblasti *SULT1A1* génu, pričom sa predpokladá, že vedie k zníženiu aktivity enzýmu. Táto hypotéza bola potvrdená výsledkami štúdie Xu a kol. (2010), ktorí poukázali na to, že 3'-UTR SNP (*rs6839* a *rs1042157*) sú významne spojené s enzymatickou aktivitou *SULT1A1* u kaukazskej populácie, nie však u afroamerickej. Podobne aj neskoršia štúdia Sanchez-Spitmana a kol. (2018), potvrdila, že pacientky s karcinómom prsníka a s nízkou aktivitou *SULT1A1* mali vyššie sérové koncentrácie endoxifénu a 4-hydroxytamoxifénu, ktoré sú metabolizované *SULT1A1* enzýmom.

V ďalšej časti sme sa zamerali na analýzu vplyvu *SULT1A1 rs1968752* a *rs1042157* genotypov s hladinami sérového PSA a Gleasonovým skóre u pacientov s karcinómom prostaty (Tab. 2). Pacientov s karcinómom prostaty sme rozdelili do dvoch skupín na základe hodnôt sérového PSA (do 10 ng/ml a nad/rovný 10 ng/ml). Ani u jedného z polymorfizmov sme nezistili signifikantnú asociáciu so zmenami v hladinách sérového PSA. Avšak zaujímavé výsledky sme získali v prípade Gleasonovho skóre. Analýza vplyvu *rs1042157* polymorfných genotypov (*CT*, *TT*) na Gleasonovo skóre u pacientov s karcinómom prostaty poukázala na signifikantnú asociáciu u pacientov s vysokorizikovým karcinómom $GS \geq 7$ (OR = 2,87, 95 % CI 1,52 – 5,44; $p < 0,05$).

Záverom môžeme konštatovať pozitívnu koreláciu *rs1042157* mutantných genotypov s rizikom vzniku karcinómu prostaty najmä u jedincov s $GS \geq 7$ a stanovenia tohto jednonukleotidového polymorfizmu by mohlo byť jedným z genetických markerov karcinómu prostaty.

Tab. 2. Vzťah medzi *SULT1A1 (rs1968752)* polymorfizmom a hladinami sérového PSA a Gleasonovým skóre. Vzťah medzi *SULT1A1 (rs1042157)* polymorfizmom a hladinami sérového PSA a Gleasonovým skóre

	<i>SULT1A1 (rs1968752)</i>			<i>SULT1A1 (rs1042157)</i>		
	<i>TT</i>	<i>TG</i>	<i>GG</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>
PSA						
< 10 ng/ml	36	111	73	71	107	38
≥10 ng/ml	36	110	79	74	118	32
OR (95% CI)	1.00	0,99 (0,58- 1,69)	1,08 (0,62-1,89)	1.00	1,06 (0,69- 1,61)	0,81 (0,45-1,43)
P	-	0,97	0,78	-	0,79	0,46
Gleasonovo skóre						
< 7	19	46	39	42	42	17
≥ 7	54	166	103	93	179	51
OR (95% CI)	1.00	1,27 (0,68-2,35)	0,92 (0,49-1,76)	1.00	0,8 (0,45-1,43)	2,87 (1,52-5,45)
P	-	0,44	0,82	-	0,46	0,001

Táto práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0014/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Liska DJ. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev* 3. 1998; 187-98.
- Almazroo O, Miah M, Venkataramanan R, *Clin. Liver. Dis.* 2016; 21: 1-20.
- Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. Phase II. Drug metabolizing enzymes.
- Arslan S, Silig Y, Pinarbasi H. Sulfotransferase 1A1 Arg213His polymorphism and prostate cancer risk. *Experimental and therapeutic medicine.* 2011; 2: 1159-1162.
- Bardakci F et al. Sulfotransferase 1A1 polymorphism and susceptibility to primary brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 109-114.
- Raftogianis RB et al. Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in human: association of common SULT1A2 and SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239, 298-304.
- Gandagia G, et al. Epidemiology and prevention of prostate cancer. *Eur Urol Oncol.* 2021; 4, 877-892.

VPLYV KYSELINY ACETYLSALICYLOVEJ NA EXPRESIU PROTEÍNOV BAX A BCL-2 V ĽUDSKÝCH GINGIVÁLNYCH FIBROBLASTOCH

Vranecová K.¹, Chomaničová N.², Adamičková A.², Žigová L.¹, Massárová P.¹, Hrubá O.¹, Kyselovič J.^{2,3}, Gažová A.¹

¹Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, LF UK, Bratislava
²Jednotka klinického výskumu, V. Interná klinika, LF UK, Bratislava
³Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Kyselina acetylsalicylová (ASA) patrí vďaka svojim antiflogistickým, analgetickým, antipyretickým a antiagregačným účinkom k najčastejšie používaným liečivám. Preukázaný bol aj jej pozitívny efekt na diferenciáciu kmeňových buniek zubnej drene, čo otvára nové možnosti jej využitia napr. v bunkovej terapii. Predpokladá sa, že kombináciou bunkovej terapie s konvenčnými liečivami možno zvýšiť nielen parakrinné účinky kmeňových buniek, ale aj ich prežitie v mieste poškodenia. Naším cieľom preto bolo vyhodnotiť vplyv ASA na viabilitu ľudských gingiválnych fibroblastov (HGF) a relatívnu expresiu vybraných regulátorov apoptózy (BAX, BCL-2) *in vitro*. HGF v 5. pasáži boli ovplyvnené ASA (30 μ M, 100 μ M) po dobu 24 hodín. Metódou prietokovej cytometrie sme HGF charakterizovali a stanovili ich viability. Zmeny v relatívnej expresii proteínov BAX a BCL-2 sme sledovali pomocou metódy Western Blotting. Výsledky prietokovej cytometrie preukázali, že ASA v nami použitých koncentráciách nemá negatívny vplyv na viabilitu HGF. V prípade relatívnej expresie proteínov BAX a BCL-2 a ich vzájomného pomeru (BAX/BCL-2) došlo k signifikantnému zvýšeniu vo vzorkách HGF ovplyvnených 100 μ M ASA. Naše výsledky poukazujú na fakt, že použitie bežnej terapeutической dávky ASA, v našom prípade vytvorená koncentrácia 30 μ M, pravdepodobne nemá vplyv na indukciu apoptózy HGF, čo môže byť prospešné pri jej potenciálnom využití v oblasti bunkovej terapie.

ÚVOD

Nesteroidné protizápalové liečivá (NSAID) predstavujú skupinu liečiv, ktorá je rôznorodá z hľadiska chemickej štruktúry a mechanizmu účinku (Lomakin a Gruzdev, 2011). Kyselina acetylsalicylová (ASA) sa bežne používa ako nesteroidné antiflogistické liečivo, ktoré zasahuje do mnohých biologických dráh (de Souza Rendohl a kol., 2021). Má potenciál ireverzibilne inhibovať enzým cyklooxygenázu 1 (COX), ktorá sa zúčastňuje kaskády v syntéze tromboxánov (TX) a ochranných prostaglandínov a reverzibilne inhibuje cyklooxygenázu 2, ktorá sa zúčastňuje na syntéze prozápalových prostaglandínov (PG). ASA blokuje premenu kyseliny arachidónovej na PG a bráni tvorbe eikozanoidov (Biondo-Simões a kol., 2021), čím blokuje aj prejavy zápalovej reakcie a bolesti (Zafarmand a kol., 2022). Zistilo sa, že ASA okrem antiagregačného a antiflogistického účinku moduluje diferenciáciu buniek zubnej drene (Divya a kol., 2021). Štúdie taktiež dokazujú, že liečba s ASA je schopná výrazne zlepšiť osteogénnu diferenciáciu (Liu a kol., 2015). To podporuje predpoklad, že ASA by mohla podporiť funkcie kmeňových buniek a byť široko používaná v bunkovej terapii (Abd Rahman, 2021). Dôležitá je však dávka, v ktorej sa ASA aplikuje a aké koncentrácie v organizme vytvorí. Pri vyšších koncentráciách dokáže indukovať apoptózu, čo v regeneratívnej terapii síce nie je žiaduce, ale tento efekt môže byť využitý v liečbe niektorých druhov onkologických ochorení. Apoptóza je aktívny metabolický proces sprevádzaný zmenami v proteosyntéze. Rovnováha medzi antiapoptotickým proteínom BCL-2 a proapoptotickým BAX sa môže farmakologickou moduláciou narušiť, čoho následkom vznikajú antiapoptické alebo proapoptické zmeny v bunkách (Bloch a kol., 2021; Zimmermann a kol., 2000).

MATERIÁL A METODIKA

Bunkovým modelom použitým v našej práci bola kultúra ľudských gingiválnych fibroblastov (HGF). HGF sme kultivovali pri štandardných kultivačných podmienkach (5% CO₂, 37°C) v kompletnom kultivačnom médiu pozostávajúcom z Dulbecco's modified Eagle's medium-Low glucose + 10% Fetal bovine serum + 1% 100U/ml streptomycín/ 100µg/ml penicilín (Sigma-Aldrich). Po dosiahnutí 80% konfluencie sme HGF pasážovali. HGF v 5.pasáži boli následne ovplyvnené dvomi koncentraciami ASA po dobu 24 hod. Vzorky HGF boli rozdelené do troch skupín, kde prvá skupina predstavovala kontrolné vzorky bez ovplyvnenia ASA, druhá skupina predstavovala vzorky ovplyvnené 30 µM koncentraciou ASA korelujúcou s bežnou terapeutickou dávkou 500 mg, a tretia skupina predstavovala vzorky ovplyvnené 100 µM koncentraciou ASA, čo by predstavovalo terapeutickú dávku viac ako 1500 mg.

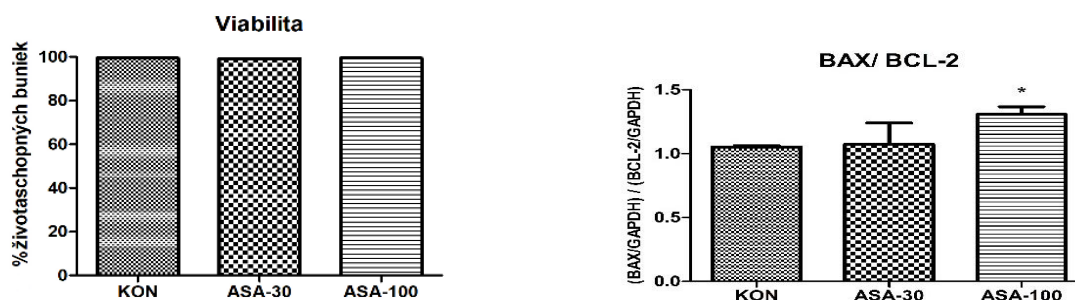
Prietokovou cytometriou (MACSQuant Analyze, Miltenyi Biotec) sme analyzovali viabilitu HGF a prítomnosť povrchových markerov (CD73, CD90, CD105) špecifických pre bunky mezenchýmového pôvodu. Získané dáta analýzy sme následne vyhodnotili v programe MACSQuant (Miltenyi Biotec).

Metódou Western blotting sme detekovali relatívnu expresiu proteínov BAX a BCL-2 normalizovanú na relatívnu expresiu referenčného proteínu GAPDH. Na detekciu proteínovej expresie bola použitá chemiluminiscenčná reakcia s luminolom. Kvantitatívne vyhodnotenie jednotlivých nálezov na membráne sme vykonali denzitometrickou analýzou v programe ImageQuant TL Toolbox version 8.1 (GE Healthcare, UK).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Viabilita HGF analyzovaná prietokovou cytometriou sa medzi jednotlivými skupinami vzoriek HGF významne nemenila. Vo všetkých prípadoch percento životaschopných buniek presahovalo hodnotu 95% (Obr. 1). Prietokovou cytometriou sme analyzovali aj pozitivitu HGF na povrchové markery typické pre bunky mezenchýmového pôvodu (CD73, CD90, CD105). Kontrolná skupina HGF, ako aj skupiny ovplyvnené ASA sa javili ako vysoko pozitívne na prítomnosť týchto markerov. Z hľadiska bunkovej apoptózy a jej možného ovplyvnenia ASA sme sa zamerali na sledovanie relatívnej expresie proapoptického BAX a antiapoptického BCL-2 proteínu pomocou metódy Western blotting. Expresia BAX a BCL-2 a ich pomer (BAX/BCL-2) má potenciálny prognostický a prediktívny význam bunkovej apoptózy (Khodapasand a kol., 2015). Naše výsledky preukázali signifikantný nárast pomeru BAX/BCL-2 (Obr. 2). Tento pomer nám udáva, či došlo k antiapoptickým alebo proapoptickým zmenám. Nízky pomer BAX/BCL-2 je charakteristický pre bunky rezistentné voči apoptóze, zatiaľ čo vysoký pomer BAX/BCL-2 je typický pre bunky senzitivné, náchylnejšie na apoptózu (Raisova a kol., 2001). Podľa štúdie z roku 2015 sa inhibičný účinok ASA na viabilitu mezenchýmových kmeňových buniek pozoroval už pri koncentrácii 50 µM, zatiaľ čo pri bunkách rakoviny prsníka sa signifikantná inhibícia viability zaznamenala až pri koncentrácii 1000 µM (Maity a kol., 2015). Tento výsledok môže korelovať s našim výsledkom, kde pri vyššej koncentrácii ASA (100 µM) došlo k signifikantným zmenám apoptických regulátorov BAX a BCL-2. Taktiež sa v spomenutej štúdii analyzoval pomer BAX/BCL-2, ktorého hodnota sa podobne, ako v prípade výsledkov našej práce, zvyšovala s rastúcou koncentraciou ASA. Ďalšia štúdia, v ktorej sa aplikovala ASA v koncentrácii 500-5000 µM po dobu 24 hodín na mezenchýmové kmeňové bunky, preukázala proapoptické zmeny (Zafarmand a kol., 2022). Tento údaj nám potvrdzuje predpoklad vychádzajúci aj z našej práce, že vysoké koncentrácie ASA môžu podporiť indukciu apoptózy. Koncentrácia ASA 30µM, ktorú sme použili v našej práci, bola prepočítaná na plazmatickú koncentráciu ASA v organizme po užití bežnej terapeutickej dávky 500 mg. Nakoľko naše výsledky nepreukázali významné ovplyvnenie pomeru

BAX/BCL-2 v prípade vzoriek HGF ovplyvnených 30 μ M koncentraciou ASA, môžeme predpokladať, že ASA v bežnej terapeutickú dávku pravdepodobne nemá vplyv na indukciu apoptózy HGF. To môže byť prospešné pri jej potenciálnom využití v oblasti bunkovej terapie a regeneratívnej medicíny.



Obr. 1. Grafické znázornenie % životaschopných HGF po 24 hod ovplyvnení kyselinou acetylsalicylovou. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SEM, $n=3$.

Obr. 2. Pomer relatívnych expresií proteínov BAX a BCL-2, ktoré predikujú možné apoptické zmeny. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SEM, $n=3$.

KON= kontrolná skupina; ASA-30= skupina ovplyvnená 30 μ M ASA; ASA-100= skupina ovplyvnená 100 μ M ASA.

Predložená práca bola finančne podporená vedeckými grantami: UK/156/2022, VEGA 1/0378/21, APVV-18-0103

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abd Rahman F. Gene expression profiling on effect of aspirin on osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells. *BDJ Open*. 2021; 7:35. <https://doi.org/10.1038/s41405-021-00090-5>
- Biondo-Simões MDLP, et al. Acetylsalicylic acid (Aspirin®) and liver regeneration: experimental study in rats. *Rev Col Bras Cir*. 2021; 48, e20213164. <https://doi.org/10.1590/0100-6991e-20213164>
- Bloch NB, et al. The conformational stability of pro-apoptotic BAX is dictated by discrete residues of the protein core. *Nature Communications*. 2021; 12:4932. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25200-7>
- de Souza Rendohl E, et al. The influence of acetylsalicylic acid on bone regeneration: systematic review and meta-analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2021; 59: E1–E16. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.08.051>
- Divya TC, et al. Drug Repurposing for Tooth Regeneration: The Promising Premises. *J Pharm Bioallied Sci*. 2021; 13:S957–S959. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_67_21
- Liu Y, et al. Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. *J Dent Res*. 2015; 94, 209–218. <https://doi.org/10.1177/0022034514557672>
- Lomakin NV, Gruzdev AK. Cyclooxygenase inhibitors and antiplatelet effect of acetylsalicylic acid. selective approach to nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cardiological practice. *Kardiologija*. 2011; 51:47–52.
- Raisova M, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol*. 2001; 117:333–340. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01409.x>
- Zafarmand SS, et al. Aspirin impacts on stem cells: Implications for therapeutic targets. *Tissue Cell*. 2022; 74, 101707. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101707>
- Zimmermann KC, et al. Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria. *Neoplasia*. 2000; 2:505–513. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900120>

ANALÝZA VÝSKYTU DEDIČNÝCH OČNÝCH OCHORENÍ NEMECKÝCH OVČIAKOV A ČESKOSLOVENSKÝCH VLČIAKOV NA SLOVENSKU

Zubrický P., Trbolová A.

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Univerzitná veterinárna nemocnica, Klinika malých zvierat, Komenského 73, 041 81 Košice

ABSTRAKT

Poruchy zraku môžu byť navodené rôznymi príčinami. Špecifickú skupinu predstavujú ochorenia, ktoré sú na základe dedičnosti prenášané z rodiča na potomstvo. Cieľom našej práce bola analýza výskytu dedičných očných ochorení u nemeckého ovčiaka a československého vlčiaka a ich porovnanie. Jedinci oboch plemien boli podrobení komplexnému oftalmologickému vyšetreniu. Do našej štúdie bolo zahrnutých 105 jedincov plemena československý vlčiak a 38 jedincov plemena nemecký ovčiak. Z doteraz získaných výsledkov vyplýva, že napriek istému spoločnému genetickému pozadiu oboch plemien, vo vzťahu k výskytu jednotlivých očných ochorení možno pozorovať určité plemenné odlišnosti. Kým u nemeckých ovčiakov bola najčastejšie sa vyskytujúcou dedične podmienenou očnou anomáliou chronická superficiálna keratitída, u československého vlčiaka to bola retinálna dysplázia.

ÚVOD

Výskyt dedičných očných ochorení predstavuje výrazne obmedzujúci faktor pre chov i pracovné využitie psov. Základným predpokladom na ich potlačenie v populácii je presná identifikácia najčastejšie sa vyskytujúcich sa očných anomálií s posúdením miery ich závažnosti a dedičnosti. V jednotlivých plemenách psov sú popisované konkrétne predispozície k určitým očným patológiám, avšak tieto u československého vlčiaka zatiaľ popísané neboli.

Československý vlčiak je jedinečné plemeno psov, ktoré vzniklo hybridizáciou nemeckých ovčiakov s divokými karpatskými vlkami v 50. rokoch minulého storočia ako vojenský experiment (Smetanová a kol., 2015). Cieľom kríženia bolo vytvoriť nový rad psov vykazujúcich pozitívne vlastnosti nemeckého ovčiaka (napr. temperament a ovládateľnosť), ale aj niektoré vlastnosti vlka vrátane zdravia, sily a nočného videnia (Sommese a kol., 2021). Genetické pozadie plemena, ktorého časť pochádza od nemeckého ovčiaka poskytlo určité rizikové alely génov, ktoré spôsobili výskyt určitých dedičných ochorení akými sú dwarfizmus a degeneratívna myelopatia respektíve dysplázia bedrového kĺbu (Karneva a kol., 2017). Avšak nie je známe aký vplyv má na výskyt očných ochorení, keďže v tomto smere populácia československého vlčiaka cielene skúmaná doposiaľ nebola. K dispozícii nie sú ani údaje o očných ochoreniach vlkov. Pri nemeckých ovčiakoch sú najčastejšie popisované očné ochorenia distichíáza, plazmóm, korneálna dystrofia, chronická superficiálna keratitída (pannus), perzistentná pupilárna membrána, katarakta, degenerácia tyčínok, retinálna dysplázia, mikropapila, limbálny melanóm (ACVO Genetics Committee, 2019).

MATERIÁL A METODIKA

Štúdia bola vykonaná v súbore 105 jedincov plemena československý vlčiak (ČSV) a 38 jedincov plemena nemecký ovčiak (NO). Všetky psy boli s preukazom o pôvode, boli rôznej vekovej štruktúry a oboch pohlaví. U každého jedného psa bolo prevedené klinické oftalmologické vyšetrenie zahrňujúce nasledovné úkony: posúdenie orientácie v prostredí, vykonanie neurooftalmologických testov (obranná reakcia, rohokový reflex, pupilárny reflex, oslňujúca reakcia), meranie vnútroočného tlaku za použitia rebound tonometru (Icare, Tiolat, Fínsko), meranie produkcie slz pomocou Shirmerovho testu (STT, Shirmerove prúžky, Dioptrix, Francúzsko), posúdenie predného segmentu oka využitím biomikroskopie

štrbinovou lampou (Kowa 17, Tokyo, Japonsko), posúdenie iridokorneálneho uhla pomocou diagnostických šošoviek (Koepe, USA), vyšetrenie zadného očného segmentu s použitím mydriatik (1% tropicamid, Unipharma, Slovensko), priameho oftalmoskopu Heine (Optotechnik GmbH, Nemecko), monokulárneho nepriameho oftalmoskopu (Pan Opticophthalmoscope, Welch Allyn, USA) a nepriameho oftalmoskopu (Heine Omega 600, Optotechnik GmbH, Nemecko), s dvojistou asferickou šošovkou (Volk 20D, Volk, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najčastejšie diagnostikovaným očným ochorením u nemeckého ovčiaka bola chronická superficiálna keratitída (CKS), ktorá bola oftalmologickým vyšetrením potvrdená u 3 jedincov (7,9 %). NO s pozitívnym nálezom boli vo veku od 3 do 6 rokov. CKS je tiež známe pod názvami pannus nemeckých ovčiakov, Überreiterov syndróm alebo degeneratívny pannus (Ledbetter a Gilger, 2013). Wilcock a Njaa (2016) uvádzajú, že ide o ochorenie najčastejšie sa vyskytujúce nielen u nemeckého ovčiaka, ale aj fenotypovo podobných plemien. Avšak pri plemene československý vlčiak napriek podobnému nielen fenotypu ale aj genotypu nebol z celého súboru doteraz nami vyšetrených jedincov potvrdený jediný nález CKS. K ďalším očným ochoreniam diagnostikovaných v plemene nemecký ovčiak patrili 1x plazmóm (2,6 %), 2x perzistentná pupilárna membrána vo forme iris to iris (5,3%), ale aj 1x subkapsulárna katarakta na zadnej kapsule šošovky (2,6 %), 1x folikulárna konjunktivitída (2,6 %) a 1x upchatie slzného kanálíka (2,6 %). Celkovo 29 (76,3%) nemeckých ovčiakov bolo bez nálezu akéhokoľvek očného ochorenia a 33 jedincov (86, 8%) bez výskytu dedičnej očnej anomálie.

V plemene československý vlčiak bolo zo 105 psov 87 jedincov z hľadiska očného zdravia klinicky úplne zdravých, čo predstavuje 82,8 %. Bez výskytu dedične podmienených očných ochorení bolo až 96 ČSV (91,4 %). U 18 jedincov boli diagnostikované očné anomálie rôznej etiológie a závažnosti, od klinicky bezvýznamných nálezov až po stav ovplyvňujúci videnie. Z menej závažných ochorení, ktorých nositelia môžu byť podľa odporúčení The American College of Veterinary Ophthalmologists (ACVO, 2019) využiteľní v chove, bola u 1 psa zistená PPM vo forme iris to iris (0,9%), u 4 jemná retinálna dysplázia (3,8%). Taktiež u 3 šteniat (2,8%) boli vo veku 8 týždňov na sietnici prítomné retinálne záhyby, avšak pri opakovanom vyšetrení v 6 mesiaci života bol klinický obraz sietnice úplne zdravý u všetkých uvedených jedincov. U 9 starších jedincov (8,6%) vo veku od 8 do 14 rokov bola zaznamenaná prítomnosť jemnej dedične nepodmienennej subkapsulárnej katarakty na posteriórnej časti puzdra šošovky (7,6%) a nukleárnej sklerózy (0,95%), vo všetkých prípadoch bez výrazného ovplyvnenia kvality videnia. U jednej 5 ročnej sučky (0,95%) boli diagnostikované súbežne viaceré závažné diagnózy a to hypoplázia zrakového nervu, sublúxácia šošovky a primárny glaukóm, ktoré klinicky vyústili do slepoty.

Približný počet výskytu zachytených očných ochorení (dedične podmienených i získaných) je u oboch plemien porovnateľný. Spoločne diagnostikovaným ochorením u oboch plemien bola len PPM vo forme iris to iris a dedične nepodmienená subkapsulárna katarakta na posteriórnej časti puzdra šošovky. Z dedičných očných ochorení bol u NO najčastejším ochorením pannus, u československých vlčiakov retinálna dysplázia. Z hľadiska porovnania výskytu očných anomálií podľa veku, najviac očných nálezov u NO bolo vo veku 3-6 rokov, kým u československých vlčiakov to bolo vo veku nad 8 rokov vo forme senilnej katarakty. Na základe dosiaľ získaných výsledkov konštatujeme, že napriek istému spoločnému genetickému prelinaniu, nemajú tieto plemená v súčasnosti predispozície k identickým očným ochoreniam.

Táto práca vznikla vďaka podpore VEGA 1/0194/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- ACVO Genetics Committee. Ocular Disorders Presumed to be Inherited in Purebred Dogs. 12th edn. American College of Veterinary Ophthalmologists. 2021.
- Karneva K, et al. Genetic predisposition to diseases of the breed Czechoslovakian wolfdog. Tradition and Modernity in Veterinary Medicine. 2017; 1:45-52.
- Ledbetter EC, Gilger BC. Diseases and surgery of the canine cornea and sclera. In: Gelatt KN, Gilger BC, Kern TJ, eds. Veterinary Ophthalmology. 5th ed. Ames. 2013;1012.
- Smetanová M, et al. From Wolves to Dogs, and Back: Genetic Composition of the Czechoslovakian Wolfdog. PLoS ONE. 2015;10(12).
- Sommese A, Valsecchi P., Pelosi A, Prato-Previde E. Comparing behavioural characteristics of Czechoslovakian Wolfdogs, German shepherds and Labrador retrievers in Italy and the Czech Republic. Animal Behaviour Science. 2021; 237.
- Wilcock BP, Njaa BL. Special Senses (Chapter 5). In: M. Grant Maxie (ed.), Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Vol. 1, Sixth Edition. 2016; 407-508.

VPLYV EXPRESIE PROTEÍNOV VEGF-A A IGF-1 NA PROGNÓZU PACIENTOV S OCHORENÍM COVID-19

Žigová L.¹, Vranecová K.¹, Massarová P.¹, Hrubá O.¹, Chomaničová N.², Adamičková A.², Valášková S.², Kužma M.³, Jackuliak P.³, Payer J.³, Kyselovič J.^{2,4}, Gažová A.¹

¹Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, LFUK, Bratislava

²Jednotka klinického výskumu, V. Interná klinika nemocnica Ružinov, Bratislava

³V. interná klinika nemocnica Ružinov, LFUK, Bratislava

⁴Ústav farmakológie a toxikológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Závažný priebeh ochorenia COVID-19 je spájaný s masívnym uvoľňovaním prozápalových cytokínov a proangiogénnych faktorov, medzi ktoré zaraďujeme aj vaskulárny endotelový faktor-A (VEGF-A). VEGF-A ovplyvňuje permeabilitu a rast krvných ciev a podieľa sa na regulácii intersticiálneho edému, ktorý sa vyskytuje pri syndróme akútnej respiračnej tiesne (ARDS). Kľúčovú úlohu v patogenéze ARDS môže okrem zápalových mediátorov a VEGF-A zohrávať aj inzulínu-podobný rastový faktor-1 (IGF-1). Početné výskumy naznačujú zmenené regulácie rastových faktorov VEGF-A a IGF-1 u pacientov so zápalovými ochoreniami pľúc. Naším cieľom bolo identifikovať pomocou metódy Western Blot hladiny relatívnej expresie proteínov rastových faktorov VEGF-A a IGF-1, ktoré môžu zasahovať do signálnych molekulových dráh ovplyvňujúcich prognózu prejavov závažného priebehu ochorenia COVID-19. Výsledky preukázali zvýšenú expresiu proteínu VEGF-A u pacientov, ktorí podľahli ochoreniu vyvolaným vírusom SARS-CoV-2 v porovnaní s kontrolným súborom pacientov a pacientmi, ktorí sa z ochorenia vyliečili. Nízka hladina expresie proteínov IGF-1 bola spojená s vyššou mortalitou pozitívnych pacientov, čo môže naznačovať protektívnu úlohu zvýšených hladín IGF-1 na rozvoj ARDS.

ÚVOD

Ochorenie COVID-19, ktoré spôsobuje vírus SARS-CoV-2 vstupuje do cieľových hostiteľských buniek pomocou endocytózy, ktorá je sprostredkovaná receptorom angiotenzín konvertujúci enzým-2 (ACE-2). Po prieniku vírusov do bunky sa vírusy môžu replikovať a šíriť do iných cieľových buniek a orgánov. Vírusová záťaž môže spôsobiť nadmernú reaktivitu imunitného systému a viesť k uvoľňovaniu prozápalových cytokínov a proangiogénnych faktorov. Cytokínová búrka je priamo spojená so zhoršením priebehu ochorenia, ku ktorému sa pripája hypoxia, zápal endotelu, narušenie vaskulárnej homeostázy, poruchy zrážanlivosti krvi, rozvinutie syndrómu akútnej respiračnej tiesne a multiorgánové zlyhanie (Jadaun a Chatterjee, 2022). Hypoxia je primárnym patofyziologickým spúšťačom angiogenézy. V prostredí s nízkou koncentráciou kyslíka sa v endotelových bunkách akumuluje a stabilizuje hypoxiou indukovaný faktor-1 (HIF-1), ktorý má schopnosť indukovať génovú expresiu vaskulárneho endotelového rastového faktora (VEGF) (Serebrovska a kol., 2020). Najviac preštudovaným je gén VEGF-A, ktorého kľúčový význam spočíva v regulácii vaskulárnej permeability a intersticiálneho edému, ktorý sa vyskytuje pri syndróme akútneho respiračného zlyhania - ARDS (Madureira a Soares, 2021). ARDS sa považuje za jednu z hlavných komplikácií ochorenia COVID-19. Dôležitú úlohu v patogenéze ARDS hrajú okrem mediátorov zápalu a VEGF aj inzulínu-podobný rastový faktor-1 (IGF-1). Rastový faktor IGF-1 je polypeptidový hormón, produkovaný najmä pečeňovými bunkami, s rôznymi biologickými funkciami, ako je proliferácia, rast a vývoj tkaniva a ochrana mitochondrií. IGF-1 je tiež dôležitým mediátorom pre embryonálny vývoj a postnatálny rast (Martín-Estal et al. 2016). Taktiež sa zapája do regulácie imunitného systému (Myers a kol., 1992). Rôzne štúdie preukázali úlohu IGF-1 pri zápalových ochoreniach, ako je astma (Lee a kol., 2014), pľúcna fibróza (Krein a Winston, 2002), obštrukčná choroba pľúc (CHOCHP) (Kythreotis a kol., 2009) alebo ARDS (Ahasic a kol., 2012).

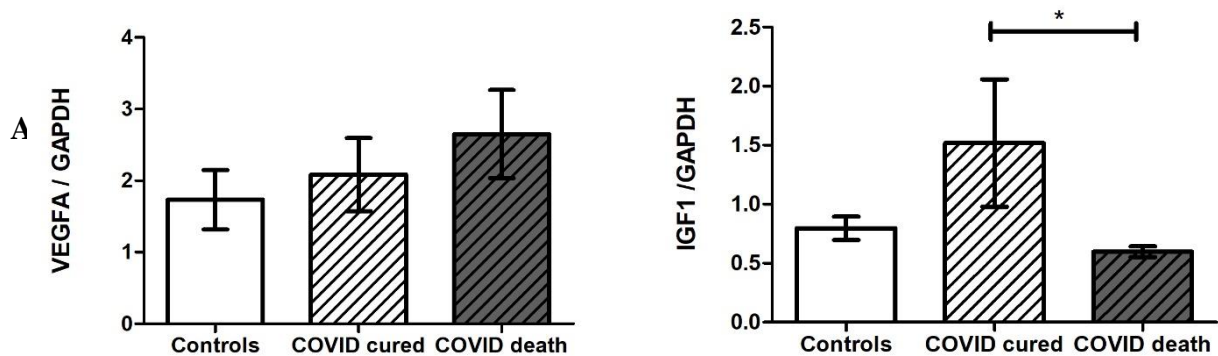
MATERIÁL A METODIKA

V našej práci sme sa zamerali na analýzu rastových faktorov VEGF-A a IGF-1, ktoré môžu zasahovať do signálnych dráh ovplyvňujúcich prognózu ochorenia COVID-19. Vzorky krvi boli odobraté pacientom vo veku od 59 do 94 rokov, ktorí v tom čase neprekonali ochorenie COVID-19 a tvorili kontrolnú skupinu pacientov (n=6) a COVID-19 pozitívnych pacientov hospitalizovaných na „covidovom“ oddelení V. internej kliniky Univerzitnej Nemocnici v Ružinove (n=12). S odstupom času sa v skupine COVID-19 pozitívnych identifikovali pacienti, ktorí aj po hospitalizácii ochoreniu podľahli (n=6) a pacientov, ktorí ochorenie prekonali (n=6). Vzorky plaziem boli podrobené stanoveniu relatívnej expresie proteínov rastového faktora VEGF-A a IGF-1, normalizované na relatívnu expresiu referenčného proteínu GAPDH. Vzorky boli nanosené do 14% polyakrylamidového gélu a separované na základe ich molekulovej hmotnosti. Separované proteíny sa následne odtlačili (preblotovali) na polyvinylidénfluoridovú (PVDF) membránu. Po zablokovaní membrán v 5% roztoku hovädzieho sérového albumínu (BSA) boli membrány inkubované 60 minút primárnou protilátkou proti VEGF-A a IGF-1. Následne prebehla inkubácia sekundárnou protilátkou. Po inkubácii primárnej a sekundárnej protilátky a pridaní chemiluminiscenčného substrátu Immobilon Forte Western HRP Substrate došlo k detekcii proteínov pomocou prístroja ImageQuant LAS 500. Denzitometrická analýza získaných nálezov na membráne bola vykonaná pomocou programu ImageQuant TL. Grafické a štatistické hodnotenie prebehlo v programe GraphPad Prism. Na vyhodnotenie údajov bola použitá štatistická metóda analýzy rozptylu ANOVA a Pearsonova korelácia.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom našej práce bolo analyzovať relatívnu expresiu proteínov VEGF-A a IGF-1 u COVID-19 pozitívnych pacientov. Najvyššiu relatívnu expresiu proteínu VEGF-A sme pozorovali u pacientov, ktorí ochoreniu COVID-19 podľahli, v porovnaní s ostatnými skupinami pacientov. Zvýšené hladiny VEGF-A u pacientov, ktorí ochoreniu podľahli, môžu súvisieť s hypoxiou a úlohou VEGF-A v hypoxickom prostredí ako dôležitého regulátora angiogenézy, vaskulárnej permeability a intersticiálneho edému.

Naše výsledky ďalej ukázali, že v závažnej forme ochorenia COVID-19 spojenej s úmrtím pacientov došlo k významnému poklesu relatívnej expresie proteínov IGF-1 v porovnaní s pacientmi, ktorí ochorenie prekonali. Závislosť veku a indexu telesnej hmotnosti (BMI) pacientov s hladinou IGF-1 nebola významná. Tento výsledok našej práce je podporený viacerými štúdiami, ktoré sa zaoberali skúmaním hladiny IGF-1 u pacientov so zápalovými ochoreniami pľúc, ako je napríklad CHOCHP. Pri akútnej exacerbácii CHOCHP bola zistená významne nižšia hladina rastového faktora IGF-1 v porovnaní s pacientmi so stabilnou CHOCHP (Ye a kol., 2012; Kythreotis a kol., 2009). Hladina IGF-1 bola študovaná aj u pacientov s ARDS. Signifikantne nižšie hladiny IGF-1 boli namerané u pacientov, ktorí ochoreniu podľahli, v porovnaní s pacientmi s ARDS, ktorí prežili, pričom sa našiel aj pozitívny súvis nižších hladín IGF-1 s vyššou úmrtnosťou pacientov s ARDS. Výsledné údaje prierezovej štúdie Ahasic a kol. z roku 2012 tiež naznačujú, že zvýšená hladina IGF-1 môže pôsobiť ako ochranný faktor pri rozvoji ARDS (Ahasic a kol., 2012), ktorý patrí medzi hlavné komplikácie závažného priebehu ochorenia COVID-19. Preto predpokladáme, že zvýšená hladina IGF-1 v organizme môže mať potenciál v zlepšení prognózy pacientov s ochorením COVID-19. Molekulárne mechanizmy, ktorými k tomu dochádza si však budú vyžadovať ďalšie podrobné skúmania.



Obr. 1 Relatívna expresia rastových faktorov VEGF-A a IGF-1 vo vzorkách plaziem pacientov, ktorí podľahli ochoreniu COVID-19 ($n=6$), pacienti, ktorí prekonali ochorenie ($n=6$) a kontrolná skupina COVID-negatívnych pacientov ($n=6$).

Údaje sú vyjadrené ako priemer \pm SEM. Pacienti, ktorí ochoreniu COVID-19 podľahli mali signifikantne nižšiu expresiu proteínov rastového faktora IGF-1 v porovnaní s pacientmi, ktorí ochorenie prekonali. Legenda grafu: Controls: plazma negatívnych pacientov; COVID Cured: plazma pacientov vyliečených z ochorenia COVID-19; COVID Death: plazma pacientov, ktorí ochoreniu COVID-19 podľahli.

Projekt bol sponzorovaný finančnou podporou APVV-20-0101, UK/165/2022.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahasic A M, Zhai R, Su L, Zhao Y, Aronis K N, Thompson B T, Mantzoros Ch S, Christiani D C. IGF1 and IGFBP3 in acute respiratory distress syndrome. *Eur J Endocrinol.* 2012; 166: 121–129.
- Jadaun P K, Chatterjee S. COVID-19 and dys-regulation of pulmonary endothelium: implications for vascular remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2022; 63, 69–77.
- Krein P M, Winston B W. Roles for Insulin-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor- β in Fibrotic Lung Disease. *Chest.* 2002; 122: 289S–293S.
- Kythreotis P, Kokkini A, Avgeropoulou S, Hadjioannou A, Anastasakou E, Rasidakis A, Bakakos P. Plasma leptin and insulin-like growth factor I levels during acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Pulm Med.* 2009; 9: 11.
- Lee H, Kim S R, Oh Y, Cho S H, Schleimer R P, Lee Y Ch. Targeting insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 signaling pathways. A novel therapeutic approach for asthma. *Am J Respir Cell Mol Bio.* 2014; 50: 667–677.
- Martín-Estal I, De La Garza R G, Castilla-Cortázar I. Intrauterine Growth Retardation (IUGR) as a Novel Condition of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) Deficiency. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2016; 170: 1–35.
- Madureira G, a Soares R. The misunderstood link between SARS-CoV-2 and angiogenesis. A narrative review. *Pulmonology.* 2021; S2531-0437(21)00160-4.
- Myers M G., Backer J M, Sun X J, Shoelson S, Hu S P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White M F. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 10350–10354.
- Serebrovska Z O, Chong E Y, Serebrovska T V, Tumanovska L V, Xi L. Hypoxia, HIF-1 α , and COVID-19: from pathogenic factors to potential therapeutic targets. *Acta Pharmacol Sin.* 2020; 41:1539–1546.
- Ye M, Yu H, Yu W, Zhang G, Xiao L, Zheng X, Wu J. Evaluation of the significance of circulating insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Int Med Res.* 2012; 40: 1025–1035.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2022

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XVII. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2022

Prvé vydanie

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

Tlač: Univerzitná knižnica a edičné stredisko UVLF v Košiciach

ISBN 978-80-974246-2-6