

CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2023

Zborník zo seminára doktorandov venovaného
pamiatke akademika Boďu

XVIII. ročník

Košice, 9. a 10. november 2023

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2023

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

XVIII. ročník

Košice, 9. a 10. november 2023

**Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný pamiatke
akademika Bod'u
9. a 10. november 2023
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

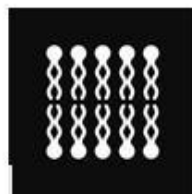
Recenzovali:

doc. RNDr. Beáta Holečková, PhD., UVLF v Košiciach
MVDr. Monika Drážovská, PhD., UVLF v Košiciach

Organizačný a programový výbor:

MVDr. Dušan Fabian, DrSc., ÚFHZ CBv SAV
doc. MVDr. Jana Koščová, PhD., UVLF v Košiciach
RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

Neprešlo jazykovou úpravou



CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

OBSAH

PROCESSES OF ABSORPTION, DISTRIBUTION AND EXCRETION OF THYMOL IN THE RABBITS ORGANISM	
Bačová K., Zitterl-Eglseer K., Ráuber G. K., Plachá I.	7
STANOVENIE ÚČINKU SKYRÍNU S VYBRANÝMI CHEMOTERAPEUTIKAMI V BUNKÁCH KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU	
Barčáková I., Jendželovská Z., Jendželovský R., Fedoročko P.	10
BIODIVERZITA A MOLEKULOVÉ ADAPTÁCIE NA HYPERSALINNÉ PROSTREDIA V RODE IDIOMARINA	
Brestovičová S., Kisková J., Nosáľová L., Píknová M., Pristaš P.	13
VÝSKYT ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE U BAKTÉRIÍ <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH Z HYDINY	
Dančová N., Gregová G., Szabóová T., Regecová I.	16
REPLIKAČNÁ KINETIKA KEMEROVO VÍRUSU (ROD <i>ORBIVIRUS</i>) V MYŠACÍCH FIBROBLASTOCH A ŠTÚDIUM INTERFERÓNOVEJ ODPOVEDE	
Fedorková D., Schusterová P., Peňazziová K., Csank T.	19
BIOKONJUGÁTY PROTEÍN-DNA: SYNTÉZA, CHARAKTERIZÁCIA ŠTRUKTÚRY a KINETIKA SAMO-USPORIADANIA	
Fedorová V., Šipošová K., Humeník M.	22
VPLYV KAROTICKEJ ENDARTEREKTÓMIE NA INDUKCIU ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE	
Furman M., Némethová M., Mačáková L., Sihotský V., Kopolovets I., Virág M., Mucha R.	25
PREVALENCIA VÝSKYTU SUBKLINICKEJ LAMINITÍDY U DOJNÍC POČAS A PO PRVEJ LAKTÁCIÍ V CHOVE	
Gomulec P.	28
PRÍTOMNOSŤ TECHNOLOGICKY NEŽIADUCICH BAKTÉRIÍ A ICH VARIABILITA ZASTÚPENIA V RÔZNYCH DRUHOCH SUROVÉHO Mlieka	
Hanzelová Z., Dudriková E., Lovayová V., Výrostková J., Regecová I.	31
KONDICIOVANÉ MÉDIUM Z KMEŇOVÝCH BUNIEK INDUKUJE DIFERENCIÁCIU A PRERASTANIE NEURITOV SH-SY5Y	
Hudáková N., Petroušková P., Maloveská M., Vozár, J., Mudroňová D., Čížková D.	34
SLEDOVANIE PROCESU BIODEGRADÁCIE BIOMATERIÁLU	
Korim F., Vdoviaková K.	37
ÚČINOK KOMBINOVANEJ TERAPIE PRI LIEČBE TRAUMATICKÉHO POŠKODENIA MIECHY	
Magurová M., Bačová M., Gálik J.	40
KONŠTRUKCIA KNÍŽNICE CDR3 VOČI ZÁPADONÍLSKEMU VÍRUSU	
Maľarik T., Bhide K., Kulkarni A., Jozefiaková J., Talpašová L., James K., Čurlík J., Bhide M.	43
ASSESSMENT OF NEW RADIOGRAPHIC TRAITS IN CANINE HIP DYSPLASIA (CHD)	
Marešová S., Kuricová M., Fuchs J.	46
KARYOLOGICKÁ ANALÝZA DRUHU <i>ACANTHOCEPHALUS ANGUILLAE</i>	
Marková A., Orosová M.	49
VPLYV ENDOPARAZITÓZY NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU, METANOGENÉZU A MIKROBIOTU JAHNIAT <i>IN VIVO</i> A <i>IN VITRO</i>	
Mikulová K.	52

RIADENÉ USMERNENIE FERMENTÁCIE V KUKURIČNÝCH SILÁŽACH	
Mitrik A., Mitrik T., Maskaľová I.	55
MORFOLOGICKÉ A FUNKČNÉ ZMENY GASTROINTESTINÁLNEHO TRAKTU ASOCIOVANÉ S PORUCHAMI AUTISTICKÉHO SPEKTRA U PSEUDO GERM-FREE (PGF) ANIMÁLNEHO MODELU	
Németová D., Gancarčíková S., Lauko S., Hrčková G., Hajdučková V., Pačuta I., Sashova Tomova A., Rašková B., Ostatníková D.	58
PORUŠENIE PRINCÍPU PROPORCIONALITY PRI USTANOVENIACH ZÁKONA Č. 39/2007 O UDEĽOVANÍ POKÚT VETERINÁRNYM LEKÁROM	
Pajtašová J.	61
MAGNETICKÁ SEPARÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN MODIFIKOVANÝMI MAGNETICKÝMI NANOPARTIKULAMI	
Pavlová A., Kočíková B., Urda Dolinská M., Beňová E., Zeleňák V., Zeleňáková A., Vilček Š., Jacková A.	64
MMP9 AKO POTENCIONÁLNY BIOMARKER KARCINÓMU PANKREASU	
Roškovičová V., Kaľuchová J., Večurkovská I., Mašlanková J., Mareková M., Radoňák J.	67
EXPRESIA RECEPTORA GABA_B V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH	
Rušinová L., Kovaříková, V., Špirková, A., Šefčíková, Z., Pisko, J., Koppel, J., Fabian, D., Čikoš, Š.	70
VYUŽITIE SYNBIOTÍK NA ZMIERNENIE ČREVNEJ DYSBIOZY A GASTROINTESTINÁLNYCH PRÍZNAKOV PORÚCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA	
Ryniková M., Adamková P., Gancarčíková S., Lauko S., Hajdučková V., Raskova B. Sashova Tomova A., Demečková V.	73
TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL ATRANORÍNU: SKÚMANIE JEHO ÚČINKOV NA NÁDORY MOZGU	
Šimko P., Urbanská N., Mattová S., Kisková T.	76
SYNTÉZA CDR3 PEPTIDOV VOČI SARS-COV-2	
Talpašová L., Kulkarni A., Víglaský J., Jozefiaková J., Maľarik T., Bhide K., Čurlík J., Bhide M.	79
ANTIDEPRESÍVNY POTENCIÁL SEKUNDÁRNEHO METABOLITU LIŠAJNÍKOV - ATRANORÍNU	
Urbanská N., Šimko P., Kisková T.	82
VPLYV POLYMORFIZMOV CYP1A2 NA VZNIK KARCINÓMU PROSTATY	
Vilčková M., Jurečeková J., Kliment J., Škereňová M., Dušenka R., Knoško Brožová M., Kmeťová Sivoňová M.	85
VÝSKYT SUPEROXIDDISMUTÁZY 1 V NÁDOROCH PANKREASU	
Vrzgula M., Mihalik J., Benický M., Gaško R., Krehel'ová A., Hodorová I.	88
ENTEROCÍNY A ICH INHIBIČNÝ ÚČINOK NA METICILÍN-REZISTENTNÉ STAFYLOKOKY	
Zábolyová N., Lauková A., Pogány Simonová M.	91
ANALÝZA VÝSKYTU RETINÁLNEJ DYSPLÁZIE U PLEMENA ČESKOSLOVENSKÝ VLČIAK – ZÁKLAD ŠTÚDIE DEDIČNEJ PREDISPOZÍCIE	
Zubrický P., Trbolová A., Miluchová M.	94

PROCESSES OF ABSORPTION, DISTRIBUTION AND EXCRETION OF THYMOL IN THE RABBITS ORGANISM

Bačová K.¹, Zitterl-Eglseer K.², Räufer G. K.², Plachá I.¹

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

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

ABSTRACT

Thymol is a major constituent of *Thymus vulgaris* L. with beneficial effects on the animal organism. The purpose of this study was the detection of thymol in plasma, tissues, large intestinal content and faeces and the investigation its bioavailability and metabolic path in the rabbit organism. Forty-eight rabbits were divided into control and experimental group with thymol addition (250 mg/kg feed). Thymol was administered for 21 days and then withdrawn for 7 days. We confirmed intensive absorption of thymol from the gastrointestinal tract, our results pointed to metabolism and accumulation in kidney tissue and intensive metabolic and excretion processes in the liver. Some metabolic processes were present also after thymol withdrawal as a consequence of caecotrophy. Thymol as a lipophilic substance was found only in trace amounts in fat and muscle tissue as a consequence of its conversion into hydrophilic metabolite and greater elimination in the rabbit organism. In this work, the thymol metabolic path in the rabbit organism was determined for the first time after its sustained oral administration.

INTRODUCTION

To our knowledge, bioaccessibility, bioavailability, and metabolism of phenolic compounds have been studied *in vitro* in humans (Rubió et al., 2014a; Rubiό et al., 2014b) and in chickens (Oceľová, 2017). No information is available about absorption, distribution, and deposition of natural compounds at target sites in the rabbit organism. One of the crucial aspects of the beneficial effect of natural compounds is the amount present in the gut as a result of their release from feed, and their consequent ability to pass through the intestinal barrier. Oral bioavailability represents the fraction of administered thymol reaching the systemic circulation and is a key parameter that affects its efficacy. Therefore, to propose an appropriate dose, the study of its oral bioavailability has received significant attention (Placha et al., 2022). To describe the metabolic processes of thymol in an organism, we chose the rabbit as a model animal because it represents an appropriate model for the evaluation of the bioavailability of nutrients. The efficiency of the rabbit's digestion depends in large part on the production and ingestion of caecotrophes, which must be considered as an integral part of the rabbit's digestion system (Hirakawa, 2001; Irlbeck, 2001).

MATERIAL AND METHODS

After weaning at 35 days of age, 48 rabbits of both sexes (meat line M91) were randomly divided into a control group (CG) fed a standard diet and an experimental group (EG) fed a standard diet into which 250 mg/kg of thymol was incorporated in powder form ($\geq 99.9\%$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). The rabbits received feed with thymol addition for 21 days (56 d of age) and for the next 7 days (63 d of age) the thymol was withdrawn. Eight rabbits in each group were killed at 56 or 63 d of age.

To determine the thymol content in plasma, blood (1.5 ml) from eight rabbits was collected from the marginal ear vein (*vena auricularis*) into heparinized Eppendorf tubes. The gastrointestinal tract was removed from the body cavity and was divided into small intestine, caecum, and colon. Obtained samples of gut content and intestinal wall together with plasma, liver, kidney, muscle (*musculus longissimus dorsi*), spleen, fat and faeces were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. All samples were collected at both experimental days (56 or 63 d of age).

Detection of thymol in samples of plasma, gut content, tissues and faeces was performed using headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled with the mass spectrometry method as described Bacova et al. (2020) and Placha et al. (2019).

Data collected were analysed using the Kolmogorov-Smirnov test for normal and non-normal distribution. The Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test was used to determine the differences between plasma and tissues or caecal, colon content and faeces. Results are presented as mean value \pm standard error of mean (SEM). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Correlations of thymol concentrations between plasma and intestinal wall, plasma and liver, and liver and kidney were analysed using nonparametric Spearman's Rank Correlation and expressed as Spearman's correlation coefficient (r_s). Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Significant correlation ($r_s = -1.00$, $p < 0.01$) between thymol content in the intestinal wall and plasma in our experiment indicates intensive absorption of thymol from the intestine. Placha et al. (2019) and Ocel'ová et al. (2018) also confirmed the intensive absorption of thymol from all intestinal segments in broiler chickens after four weeks of diet supplementation with thyme essential oil. They found significant correlation between thymol content in plasma and individual intestinal segments. Although we found six times lower concentration of thymol in plasma during its addition and seven times lower after its withdrawal (even if only in trace amounts) in comparison with the intestinal wall, we can confirm that some metabolic processes were still active after thymol withdrawal from feed.

Ocel'ová (2017) detected thymol in the liver at a level of 8.9 % of its concentration in the intestinal wall and observed significant correlation between thymol concentrations in liver and plasma, and liver and intestinal wall, which might indicate sufficient absorption of thymol from the intestinal wall to the liver through the *vena portae*. We found 15 % (with thymol) and 29 % (without thymol) of thymol in liver compared with its content in the intestinal wall, and significant correlation between thymol concentrations in plasma and liver ($r_s = 0.7857$, $p < 0.05$). These results are in agreement with the findings of Písarčíková et al. (2017) and Ocel'ová (2017) who confirmed the presence of thymol metabolites in the duodenal wall of broiler chickens after sustained consumption of thyme essential oil and confirmed the key role of the intestine in the metabolism of thymol.

In the present study, a significantly higher level of thymol in the kidney in comparison with liver tissue and plasma confirmed its metabolism and/or accumulation in this organ. Our results are in agreement with our previous study (Ocel'ová, 2017), in which we detected a significantly higher thymol concentration in the kidney of chickens with thyme essential oil diet supplementation. Takada et al. (1979) and Kohlert et al. (2002) demonstrated that although the liver is the most important organ for biotransformation, kidney microsomes demonstrate more effective metabolic processes than liver or intestinal microsomes. The significantly higher content of thymol in the kidney and the correlation between liver and kidney ($r_s = 0.7381$, $p < 0.05$) in our study also confirm the intensive metabolism in kidney tissue. However, further study of renal metabolism mechanisms is necessary to confirm these findings.

Our results showed that thymol was efficiently absorbed from the intestinal lumen and intensive metabolic processes in liver and kidney were observed, while accumulation in fat and muscle tissue was low, probably due to its intensive biotransformation into hydrophilic substances which were then excreted. We confirmed some metabolic processes involving thymol even after its withdrawal from feed, as a consequence of caecotrophy.

Finally, metabolic processes of plant compounds should be understood at molecular level to establish its suitable concentration for a beneficial effect on animal health.

ACKNOWLEDGMENTS

The current experiment was financed with funds from the Scientific Grant Agency of the Ministry for Education, Science, Research and Sport of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (Vega 2/0009/20) and was supported by the Austrian Federal Ministry for Science, Research and Economics, OeAD, Ernst-Mach Grant Action Austria-Slovakia (ICM-2019-13685) and Open-Mob-2022-01 and CNR-SAS-2022-02.

REFERENCES

- Bacova K, et al. Effect of thymol addition and withdrawal on some blood parameters, antioxidative defence system and fatty acid profile in rabbit muscle. *Animals*. 2020; 10:1248.
- Hirakawa, H. Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Rev.* 2001; 31:61-80.
- Irlbeck, NA. How to feed the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) gastrointestinal tract. *J. Anim. Sci.* 2001; 79:E343-E346.
- Kohlert C, et al. Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *J. Clin. Pharmacol.* 2002; 42:731-737.
- Oceľová V, et al. Thymol in the intestinal tract of broiler chickens after sustained administration of thyme essential oil in feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2018; 103:204-209.
- Oceľová, V. Plant additives in relation to the animal gastrointestinal tract and metabolism of their main compounds. Dissertation thesis 2017; Košice: SAV, Institute of Animal Physiology.
- Pisarčíková J, et al. Identification and quantification of thymol metabolites in plasma, liver and duodenal wall of broiler chickens using UHPLC-ESI-QTOF-MS. *Biomed. Chromatogr.* 2017; 31:e3881.
- Placha I, Bacova K, Plachy L. Current Knowledge on the Bioavailability of Thymol as a Feed Additive in Humans and Animals with a Focus on Rabbit Metabolic Processes. *Animals*, 2022; 12:1131.
- Placha I, et al. Effect of thymol on the broiler chicken antioxidative defence system after sustained dietary thyme oil application. *Br. Poult. Sci.* 2019; 60:589-596.
- Rubió L, et al. Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chem.* 2014a; 149:277-284.
- Rubió L, et al. Metabolite profiling of olive oil and thyme phenols after a sustained intake of two phenol-enriched olive oils by humans: Identification of compliance markers. *Food Res. Int.* 2014b; 65:59-68.
- Takada M, et al. On the metabolic detoxication of thymol in rabbit and man. *J. Toxicol. Sci.* 1979; 4:341-350.

STANOVENIE ÚČINKU SKYRÍNU S VYBRANÝMI CHEMOTERAPEUTIKAMI V BUNKÁCH KOLOREKTÁLNEHO KARCINÓMU

Barčáková I., Jendželovská Z., Jendželovský R., Fedoročko P.

Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ

ABSTRAKT

Konvenčná chemoterapia nádorových ochorení je často sprevádzaná závažnými vedľajšími účinkami, ktoré môžu viesť až k jej predčasnému ukončeniu. Riešením by mohlo byť súčasné použitie bezpečnejších látok, schopných zvýšiť citlivosť nádorových buniek voči terapii. Medzi takéto liečivá by mohol patriť aj skyrín, látka prírodného pôvodu, vyznačujúca sa niektorými priaznivými fyzikálno-chemickými vlastnosťami a protinádorovými účinkami. V tejto práci sme si dali za cieľ preskúmať vzájomný efekt skyrínu a vybraných chemoterapeutík v nádorových bunkách a pokúsiť sa stanoviť mechanizmus jeho účinku. MTT test ukázal, že skyrín v bunkách kolorektálneho karcinómu HCT 116 s normálnym nádorovým supresorovým proteínom p53 zvýšil efektivitu 5-fluorouracilu, no takmer eliminoval účinok cisplatiny. V bunkách neexprimujúcich p53 (HCT 116 p53^{-/-}) skyrín štatisticky signifikantne inhiboval účinok cisplatiny, mitoxantrónu aj doxorubicínu. Efekt skyrínu teda do určitej miery závisel od p53 statusu buniek. Následne sme sa mechanizmus jeho účinku pokúsili odhaliť s využitím analýzy tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS) prietokovou cytometriou. Ani v jednej bunkovej línii skyrín neindukoval tvorbu ROS. Naopak, mal značný antioxidantný účinok. Naše výsledky teda naznačujú, že by skyrín mohol mať využitie ako chemopreventívna látka a v niektorých prípadoch ako senzibilizátor nádorových buniek voči 5-fluorouracilu. Pre potvrdenie týchto predpokladov a charakterizáciu jeho účinku na molekulárno-biologickej úrovni však bude potrebný ďalší výskum.

ÚVOD

Skyrín je sekundárny metabolit syntetizovaný viacerými druhmi húb a lišajníkov, patriaci medzi bisantrachinóny. Štruktúrne je podobný hypericínu (HY), prírodnej látke so značným potenciálom využitia v protinádorovej terapii či diagnostike (Jendželovská a kol., 2016). Skyrín sa v porovnaní s HY vyznačuje lepšou hydrofilitou, spojenou s nižšou tendenciou agregovať vo vodných roztokoch a podobnou mierou preferenčnej akumulácie v nekrotickom tkanive, ktoré je bežnou súčasťou solídnych nádorov (Wang a kol., 2016). Okrem toho v poslednom období pribúdajú dôkazy o jeho protinádorovej aktivite (Koul a kol., 2016; Babinčák a kol., 2021). Napriek tomu, že mechanizmus pôsobenia skyrínu nie je objasnený, môže predstavovať sľubný senzibilizátor nádorových buniek, ktorý by v kombinácii s iným terapeutickým prístupom mohol zvýšiť citlivosť buniek voči liečbe, zvrátiť ich prípadnú rezistenciu či umožniť aplikáciu nižšej koncentrácie toxických liečiv. Naším cieľom bolo teda zhodnotiť kombinovaný efekt skyrínu s vybranými chemoterapeutikami v bunkách kolorektálneho karcinómu a identifikovať niektoré faktory prispievajúce k jeho protinádorovej aktivite.

MATERIÁL A METODIKA

Reagencie. Skyrín (HPLC grade) rozpustený v DMSO (zásobný roztok s koncentráciou 5 mM), cisplatina (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU), mitoxantrón (MTX), doxorubicín (DOX).

Bunkové línie. V experimentoch bola použitá bunková lúnia ľudského kolorektálneho karcinómu HCT 116 a od nej odvodená bunková lúnia HCT 116 p53^{-/-}, ktorá neexprimuje proteín p53. Obe bunkové línie boli kultivované v inkubátore pri teplote 37°C, vlhkosti 95% a 5% CO₂ v atmosfére s využitím kompletného média McCoy's obohateného o 10% FBS, komerčnú zmes antibiotík a antimykotík a gentamicín (50 µg/ml).

Test metabolickej aktivity buniek (MTT test). S cieľom stanoviť vplyv kombinovaného účinku skyrínu s vybranými chemoterapeutikami na metabolickú aktivitu nádorových buniek boli bunky HCT 116 a HCT 116 p53^{-/-} nasadené v počte 10 000 na jamku do 96-jamkovej platničky a po 24 h inkubácie k nim bol pridaný skyrín v koncentrácii 10 µM. Po 24 h predinkubácii buniek so skyrínom k nim boli pridané jednotlivé chemoterapeutiká. Použité koncentrácie chemoterapeutík, vybrané na základe výsledkov prípravných experimentov (údaje nie sú prezentované), v ktorých samostatne inhibovali metabolickú aktivitu buniek maximálne o 20%, boli nasledovné: CDDP – 10 µM, 5-FU – 10 µM, MTX – 0,1 µM a DOX – 0,05 µM. Kombinovaný účinok bol analyzovaný v dvoch časových intervaloch (24 h a 48 h) pridaním žltej tetrazoliovej soli MTT (0,5 mg/ml), ktorá je živými, resp. metabolicky aktívnymi bunkami metabolizovaná na fialové kryštály formazánu. Metabolizácia MTT bola zastavená po 4 h pridaním 10% SDS, ktorý zabezpečil rozpustenie formazánu a nasledujúci deň bola odmeraná jeho absorbancia pri vlnovej dĺžke $\lambda = 584$ nm prístrojom FLUOStar Optima. MTT test bol realizovaný v triplikátoch pre každú experimentálnu skupinu v minimálne troch nezávislých opakovaníach.

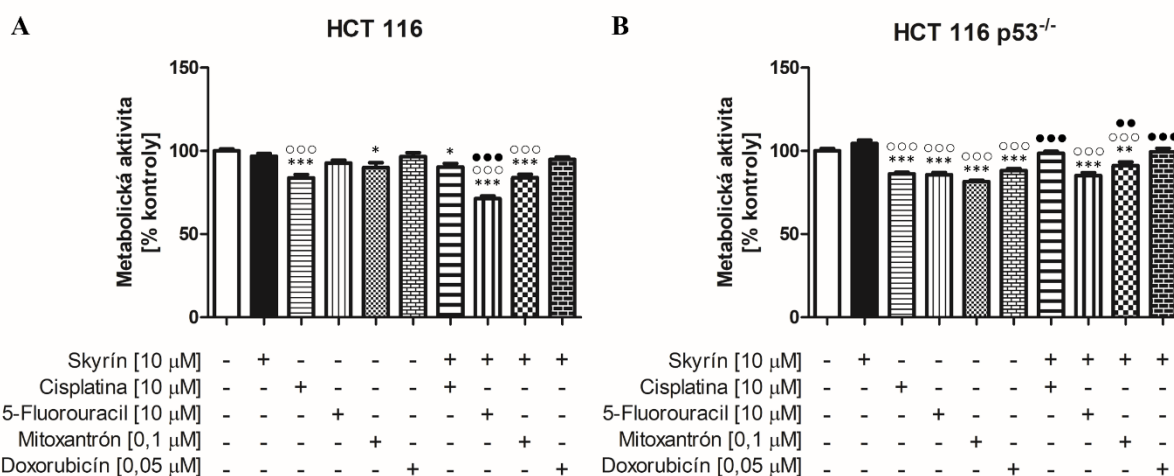
Analýza tvorby reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Bunky boli po 24 h a 48 h inkubácii so skyrínom premyté v PBS, resuspendované v HBSS a následne k nim bol pridaný dihydrorodamín-123 vo finálnej koncentrácii 0,1 µM. Napokon boli bunky inkubované pri 37°C a 5% CO₂ 15 minút a analyzované prietokovým cytometrom BD FACSAria II SORP. Fluorescencia bola detegovaná prostredníctvom kanálu FITC (505 nm LP DM, 525/50 BP) po excitácii modrým laserom (488 nm). Ako pozitívna kontrola boli využité bunky ovplyvnené peroxidom vodíka v koncentrácii 0,05%.

Štatistická analýza. Štatistická signifikancia bola vypočítaná pomocou analýzy variancie (ANOVA) doplnenej o Tukey post-test.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe nových poznatkov o vlastnostiach a biologickej aktivite skyrínu sa táto prírodná látka javí byť sľubným senzibilizátorom nádorových buniek. V našej práci sme sa zamerali na stanovenie jeho vplyvu na metabolickú aktivitu nádorových buniek v kombinácii so štyrmi rôznymi konvenčnými chemoterapeutikami (CDDP, 5-FU, MTX, DOX). Experimenty boli uskutočnené s využitím dvoch bunkových línií líšiacich sa expresiou nádorového supresorového proteínu p53, pretože predchádzajúce experimenty ukázali, že efekt skyrínu v súvislosti s inhibíciou metabolickej aktivity a indukciou apoptózy nádorových buniek bol výraznejší v bunkách s normálnym p53 (wt p53) (Babinčák a kol., 2021). Navyše efektivita mnohých chemoterapeutík závisí práve od správnej funkcie tohto proteínu, ktorý je dôležitým regulátorom bunkovej smrti či mechanizmov opravy DNA (Tilsed a kol., 2022). Bez ohľadu na p53 status buniek, skyrín nemal vplyv na efekt žiadneho zo štyroch vybraných protinádorových liečiv po 24 h ich vzájomného pôsobenia (údaje nie sú prezentované). Po dlhšom časovom intervale (48 h) sme však pozorovali viaceré zmeny (Obr. 1). V bunkách HCT 116 skyrín štatisticky významne zvýšil účinnosť 5-FU, keď ich metabolická aktivita klesla z $92,7 \pm 5,2\%$ (samotný 5-FU) na $71,4 \pm 4,8\%$. Okrem toho skyrín mierne zvýšil efektivitu MTX, avšak štatistická významnosť sa potvrdila iba v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou a nie voči bunkám ovplyvneným samotným MTX. Na druhej strane sme pozorovali negatívny vplyv skyrínu na účinok CDDP. Metabolická aktivita buniek ovplyvnených kombináciou skyrínu a CDDP vzrástla takmer na úroveň neovplyvnených buniek. DOX nemal vplyv na metabolickú aktivitu buniek HCT 116 samostatne ani po predinkubácii so skyrínom. V porovnaní s bunkovou líniou HCT 116 (wt p53) boli bunky HCT 116 p53^{-/-} prekvapivo citlivejšie voči pôsobeniu všetkých štyroch chemoterapeutík. Skyrín však v týchto bunkách značne znížil efektivitu CDDP, MTX a DOX, pričom metabolická aktivita buniek ovplyvnených kombináciou skyrínu a CDDP, resp. DOX bola porovnateľná s neovplyvnenou

kontrolou. Na rozdiel od HCT 116, v bunkách HCT 116 p53^{-/-} skyrín nemal vplyv na účinok 5-FU. Tieto výsledky bude v budúcnosti potrebné potvrdiť analýzami zameranými na detekciu bunkovej smrti, napríklad analýzou externalizácie fosfatidylserínu a viability buniek. Podľa práce Koul a kol.(2016) by za protinádorovým účinkom skyrínu mohla byť indukcia tvorby ROS. Analyzovali sme teda vplyv skyrínu na intracelulárnu hladinu ROS v oboch bunkových líniiach v dvoch časových intervaloch (24 h a 48 h) a zistili sme, že skyrín neindukoval nárast hladiny ROS v žiadnej experimentálnej skupine. Naopak, vo všetkých štyroch prípadoch klesla fluorescencia rodamínu-123 približne na 50% úrovne neovplyvnenej kontroly, čo poukazuje na značnú antioxidantnú aktivitu, ktorá bola doteraz v súvislosti so skyrínom študovaná iba „cell-free“ metódami a výsledky neboli jednoznačné (Prokopiev a kol., 2023). Antioxidantná aktivita skyrínu by tiež mohla vysvetliť nižšiu efektivitu CDDP v oboch bunkových líniiach, pretože medzi jej mechanizmy účinku patrí aj produkcia ROS (Tilsed a kol., 2022).



Obr. 1 Vplyv skyrínu, vybraných chemoterapeutík a ich vzájomnej kombinácie na metabolickú aktivitu buniek HCT 116 (A) a HCT 116 p53^{-/-} (B). Metabolická aktivita bola analyzovaná 48 h po pridaní chemoterapeutík. Výsledky (priemer ± SD z minimálne troch nezávislých opakovaní) sú vyjadrené ako percento metabolickej aktivity buniek v porovnaní s neovplyvnenou kontrolou (100%). Štatisticky boli porovnané všetky experimentálne skupiny s neovplyvnenou kontrolnou skupinou (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) a skupiny ovplyvnené kombinovaným zásahom so skupinami ovplyvnenými samotným skyrínom (○○○ $p < 0,001$) a skupinami ovplyvnenými samotným príslušným chemoterapeutikom (●● $p < 0,01$; ●●● $p < 0,001$).

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaŠ SR a SAV č. VEGA 1/0003/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Babinčák M. et al. Death receptor 5 (TNFRSF10B) is upregulated and TRAIL resistance is reversed in hypoxia and normoxia in colorectal cancer cell lines after treatment with skyrin, the active metabolite of hypericum spp. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1646.
- Jendželovská Z. et al. Hypericin in the light and in the dark: two sides of the same coin. *Front. Plant Sci.* 2016; 7:560.
- Koul M. et al. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Planta Med.* 2016;82(4):344-355.
- Prokopiev I. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of quinones from *Cetraria laevigata*. *Nat Prod Res.* 2023;1-5.
- Tilsed M. et al. Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. *Front. Oncol.* 2022;12:960317.
- Wang C. et al. Synthesis and Evaluation of ¹³¹I-Skyrin as a Necrosis Avid Agent for Potential Targeted Radionuclide Therapy of Solid Tumors. *Mol Pharm.* 2016;13(1):180-189.

BIODIVERZITA A MOLEKULOVÉ ADAPTÁCIE NA HYPERSALINNÉ PROSTREDIA V RODE IDIOMARINA

Brestovičová S., Kisková J., Nosáľová L., Píknová M., Pristaš P.
Katedra mikrobiológie, Prírodovedecká fakulta, Ústav biológie a ekológie, UPJŠ

ABSTRAKT

Druhy rodu *Idiomarina* sú izolované z prostredí so zvýšenou salinitou. V našej práci sme analyzovali genómy 2 izolátov rodu *Idiomarina*, izolovaných z bývalých soľných baní v lokalitách Solotvino (Ukrajina) a Solivar pri Prešove (Slovensko). Komparatívna genomická analýza ukázala, že podobnosť študovaných izolátov Sol25 a HP20-50 s genómami známych druhov *Idiomarina* spp. dostupnými v NCBI databáze dosahuje menej ako 95% na nukleotidovej úrovni (ANI - Average Nucleotide Identity), čo naznačuje, že nami študované izoláty patria pravdepodobne k novým druhom rodu *Idiomarina*. Genomická analýza taktiež ukázala významnú redukciu veľkostí genómov, ktorá je pravdepodobne výsledkom adaptácie na oligotrofné hypersalinné prostredie. Celogenómové analýzy môžu prispieť k pochopeniu diverzity a mechanizmov molekulových adaptácií halofilných mikroorganizmov.

ÚVOD

Voľne žijúci bakteriálny rod *Idiomarina* patrí do radu Alteromonadales dobre preštudovanej triedy Gammaproteobacteria. Čelad' Idiomarinaceae obsahuje dva rody *Idiomarina* a *Aliidiomarina* (Huang a kol., 2012). Do rodu *Idiomarina* v súčasnosti radíme 31 druhov (<https://www.bacterio.net/genus/idiomarina>). Genómy baktérií rodu *Idiomarina* majú redukovanú veľkosť (menej ako 3 Mbp, oveľa menšiu ako veľkosť genómov iných zástupcov radu Alteromonadales) a všetky sú izolované z prostredia so zvýšenou salinitou (Qin a kol., 2019). Táto redukcia genómu je interpretovaná ako molekulová adaptácia na hypersalinné prostredie a je výsledkom trofickej špecializácie rodu *Idiomarina* (Qin a kol., 2019). V našej práci sme analyzovali genómy dvoch izolátov rodu *Idiomarina* izolovaných z bývalých soľných baní v lokalite Solotvino (Ukrajina) a Solivar pri Prešove (Slovensko), teda z prostredí časovo i priestorovo izolovaných od doteraz známych lokalít výskytu baktérií rodu *Idiomarina*. Cieľom práce bolo poznanie diverzity a fylogeografie halofilných druhov rodu *Idiomarina* a analýza molekulových adaptácií na hypersalinné prostredia v tomto rode.

MATERIÁL A METODIKA

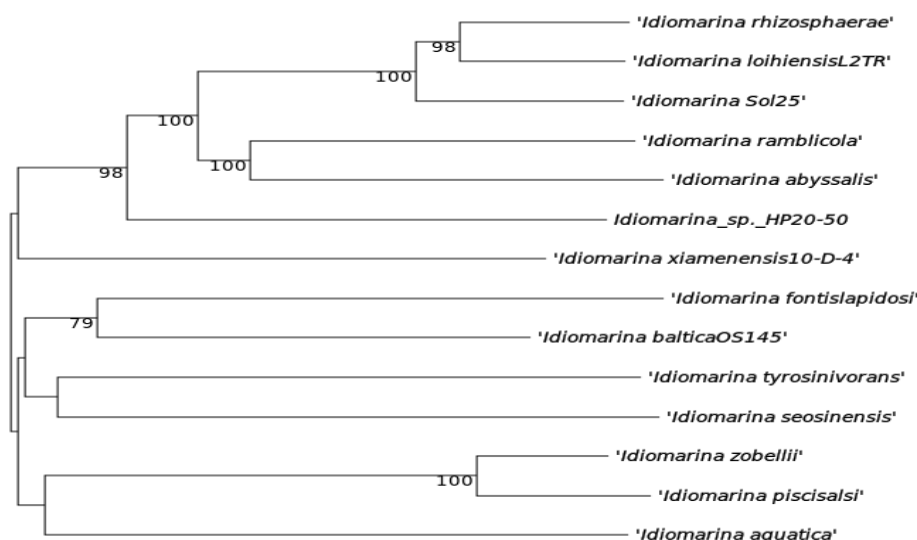
Bakteriálne izoláty použité v tejto práci boli získané z dvoch lokalít – lokalita Solotvino, jazero Kunigunda na Ukrajine (47°57'20" N 23°52'16" E) a lokalita Solivar v Prešove (48°59'0.706" N, 21°16'59.124" E). V oboch prípadoch bola voda odoberaná do sterilných prepravných nádob, z ktorých bolo 100 µl použitých na primárny záchyt na R2A médium (Merck, Darmstadt, Germany) s 5% NaCl. Kultivácia prebiehala pri laboratórnej teplote 25°C. Bola stanovená početnosť kultivovateľných baktérií a následne sme izoláty podrobili ďalšej analýze a identifikácií. Celková DNA bola izolovaná pomocou GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) podľa pokynov výrobcu z nočných kultúr v LB médiu s 5% NaCl. Amplifikácia časti génu pre 16S rRNA bola vykonaná univerzálnymi bakteriálnymi primermi fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a rP2 (5'-ACGGCTACCTGTTACGACTT-3'). Celogenómové sekvenovania sa uskutočnili v komerčnej firme Eurofins Genomics, Nemecko s využitím technológie Illumina NovaSeq 6000 S4 PE150XP. Príbuznosť izolátov a ich fylogenetické zaradenie sme stanovili na základe ANI hodnôt pomocou JSpeciesWS online nástroja (<https://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/#analyse>).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z hypersalinného prostredia soľanky bývalých soľných baní v lokalite Solotvino a Solivar pri Prešove sme izolovali 2 extrémne halofilné izoláty identifikované na základe 16S rRNA sekvencií ako *Idiomarina* spp. Geologicky pochádzajú obe soľné ložiská z obdobia miocénu a ide o evapority, ktoré sú pozostatkom neogénneho mora z obdobia pred 17.5 až 16.4 miliónmi rokov a jedná o geologicky podobné lokality (Hohenegger a kol. 2014). Podľa Chonka a kol. (2013) sa salinita v Solotvine pohybuje od 15,53 g/l povrchovej vrstvy do 153,64 g/l v hĺbke siedmich metrov, ale maximálne úrovne obsahu soli v jazerách Solotvino dosahujú 247-270 g/l (Lemko a kol., 2009). Na lokalite Solivar priemerná salinita dosahovala až 311 g/l. Celogenómovou analýzou sme získali drafty genómov oboch izolátov. Genóm izolátu Sol25 izolovaného z lokality Solotvino mal veľkosť 2,8 Mbp a genóm izolátu HP20-50 izolovaného z lokality Solivar mal veľkosť 2,7 Mbp. Oba izoláty teda vykazovali redukciu genómu podobnú ostatným druhom rodu *Idiomarina* (Tab.1). Pre poznanie biodiverzity a fylogeografie halofilných druhov rodu *Idiomarina* sme získané genómy porovnali s 12 genómami druhov rodu *Idiomarina* verejne dostupných v databáze NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=idiomarina>). Priemerná nukleotidová identita (ANI hodnota) bola pri porovnaní s najbližším príbuzným druhom v prípade genómu Sol25 na úrovni 91% a v prípade HP20-50 na úrovni 80%, hraničná hodnota pre zaradenie do rovnakého druhu je 95%. Najbližších príbuzných našich izolovaných genómov môžeme vidieť na fylogenetickom strome skonštruovanom na serveri TYGS (Obr.1), pre genóm Sol25 sú to *I. rhizosphaerae* a *I. loihiensis*, pre genóm HP20-50 sú to *I. ramblicola* a *I. abyssalis*. Fylogenetický strom (Obr.1) znázorňuje fylogenetickú príbuznosť na základe sekvencií celého genómu a je odvodený zo vzdialeností GBDP (*Genome BLAST Distance Phylogeny*) vypočítaných zo sekvencií genómu. ANI hodnoty a údaje z fylogenetického stromu nám naznačujú, že naše izoláty patria do rodu *Idiomarina*, ale pravdepodobne pôjde o celkom nové, doteraz neznáme druhy. Fylogeografická analýza naznačuje (Tab.1), že neexistuje žiadna korelácia medzi genetickou príbuznosťou jednotlivých druhov rodu *Idiomarina* alebo geografickou lokalitou, z ktorej boli izolované.

Druh	Geografický pôvod	Prostredie	Veľkosť genómu (Mb)
<i>Idiomarina loihiensis</i>	Havaj	Hydrotermálny prieduch	2,8
<i>Idiomarina baltica</i>	Baltské more	Povrchová morská voda	2,8
<i>Idiomarina xiamenensis</i>	Čína	Povrchová morská voda	2,9
<i>Idiomarina aquatica</i>	Španielsko	Soľanka	3
<i>Idiomarina fontislapidosi</i>	Španielsko	Pôda	2,9
<i>Idiomarina ramblicola</i>	Španielsko	Soľanka	2,7
<i>Idiomarina piscisalsi</i>	Thajsko	Pla-ra ryba	2,6
<i>Idiomarina zobellii</i>	Tichý oceán	Oceán, hĺbka 4000-5000m	2,6
<i>Idiomarina abyssalis</i>	Kórea	Morský sediment	2,6
<i>Idiomarina tyrosinivorans</i>	Taiwan	Povrchová morská voda	2,4
<i>Idiomarina seosinensis</i>	Kórea	Saltern	2,7
<i>Idiomarina rhizosphaerae</i>	Čína	Pôda	2,9
<i>Idiomarina Sol25</i>	Ukrajina	Soľná baňa	2,8
<i>Idiomarina HP20 -50</i>	Slovensko	Soľanka, soľná baňa	2,7

Tab.1 Porovnanie druhov na základe geografického pôvodu, prostredia odkiaľ boli izolované a veľkosti genómov.



Obr.1 Porovnanie podobnosti genómov Sol25 a HP20-50 s dostupnými genómami *Idiomarina* spp. na základe ANI hodnôt.

Redukcia genómu v rode *Idiomarina* (o 37% až 65%) v porovnaní s inými rodmi vo svojej evolučnej histórii nám ponúka jedinečnú príležitosť preskúmať proces genómovej redukcie u voľne žijúcich baktérií. Aby baktérie prežili v extrémnych prostrediach, musia si vyvinúť špeciálne adaptačné schopnosti, z ktorých základnou a najdôležitejšou je získavanie živín. Genomické analýzy ukazujú, že druhy rodu *Idiomarina* stratili veľa génov súvisiacich s využívaním cukru, čo naznačuje, že redukcia genómu súvisí s trofickou špecializáciou (Qin a kol. 2019). Keďže hypersalinné prostredie je pomerne chudobné na živiny je menší genóm, menší obsah G+C párov (v prípade Sol25: 47.2 a v prípade HP20-50: 46.8) a malá veľkosť buniek (0,35 μm šírka a 0,7–1,8 μm dĺžka) adaptívnou výhodou.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Hohenegger J, Coric S, Wagreich M. Timing of the middle miocene Badenian stage of the central Paratethys. 2014 *Geologica Carpathica*, 65(1):55.
- Huang SP et al. *Aliidiomarina teiwanensis* gen. nov., sp. nov., isolated from shallow coastal water. 2012 *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:155-161.
- Qin QL, et al. Trophic specialization results in genomic reduction in free-living marine *Idiomarina* bacteria. 2019 *MBio.* 10(1):10-1128.
- Chonka Y, et al. Physicochemical and Microbiological Monitoring of Solutvino Salt Lakes. *Balneo Research Journal.* 2013. 4(3):115-120.
- Lemko IS, et al. Natural curative factors of the Solutvino Salt Lakes. *Natural Resources and Environmental Issues*, 2009 15:175.

VÝSKYT ANTIBIOTICKEJ REZISTENCIE U BAKTÉRIÍ *E. COLI* IZOLOVANÝCH Z HYDINY

Dančová N.¹, Gregová G.¹, Szabóová T.¹, Regecová I.²

¹Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF, Košice

²Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Antibiotiko-rezistentné *E. coli* sú jedným z hlavných bakteriálnych patogénov, ktoré sa prenášajú potravinami a zapríčiňujú rozličné alimentárne ochorenia v humánnej populácii. Táto práca sa uskutočnila s cieľom preskúmať výskyt druhu *E. coli* vo vzorkách trusu a mäsa hydiny, určiť fylogenetickú príslušnosť, profil antibiotickej rezistencie a vyhodnotiť jej potenciálnu hrozbu pre ľudské zdravie. Najčastejšími fylogenetickými skupinami boli A (37,79 %), D (26,66 %) a B1 (24,44 %). Najmenej izolátov patrilo do skupiny B2 (6,67 %) a 2 izoláty neboli identifikované. Dominantná rezistencia bola zistená voči ampicilínu (86,67 %), tetracyklínu (48,89 %) a kotrimoxazolu (44,44 %), najnižšia zasa voči tigecyklínu (8,89 %) a ceftazidímu (2,22 %). Pozorovaná bola aj prevalencia multirezistentných kmeňov. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že hydina predstavuje vhodný rezervoár antibiotiko-rezistentných kmeňov *E. coli*, ktoré môžu byť potenciálne veľkou hrozbou pre ľudí, a to buď pri priamom kontakte s hydinou, prostredím alebo prostredníctvom potravinového reťazca.

ÚVOD

Komenzálna *Escherichia coli* (*E. coli*) je súčasťou bakteriálnej populácie tvoriacej fyziologickú mikrofóru čreva ľudí, zvierat aj vtákov. Podľa prevalencie virulentných faktorov, podmienok hostiteľa a prostredia môže byť zároveň aj oportúnnym patogénom spôsobujúcim intestinálne alebo extraintestinálne infekčné ochorenia (Sevilla-Navarro a kol., 2022). Neracionálna a nadmerná aplikácia antibiotík (ATB) v živočíšnej výrobe má za následok rozvoj a šírenie ATB rezistencie u potravinových patogénov a v súčasnosti je jednou z najväčších hrozieb pre zaistenie bezpečnosti produkovaných potravín (Aworth a kol., 2021). ATB sa v chovoch hydiny bežne podávajú pri liečbe a prevencii infekčných ochorení, ale v minulosti sa využívali na stimuláciu rastu (Islam a kol., 2023). V jednotlivých fázach chovu hydiny a produkcie mäsa a mäsových výrobkov existuje hneď niekoľko možných ciest kontaminácie. Pomerne vysoká miera ATB rezistencie bola potvrdená u čerstvo vyľiahnutých jedincov, ktorá pochádzala z vertikálneho prenosu genetickej informácie alebo z prostredia samotnej liahne. K rozsiahlemu prenosu rezistentnej *E. coli* dochádza aj v rámci krídlov, ako aj medzi pracovníkmi a prostredím farmy (Khong a kol., 2022). Ku kontaminácii mäsa baktériou *E. coli* môže dôjsť v priebehu porážania, keď sa poškodí gastrointestinálny trakt a obsah sa vyleje na jatočné telo, ale aj pri spracovávaní mäsa a výrobe hydinových mäsových výrobkov nedodržiavaním hygienických podmienok a správnej výrobných praxe (Adzitey a kol., 2021).

MATERIÁL A METODIKA

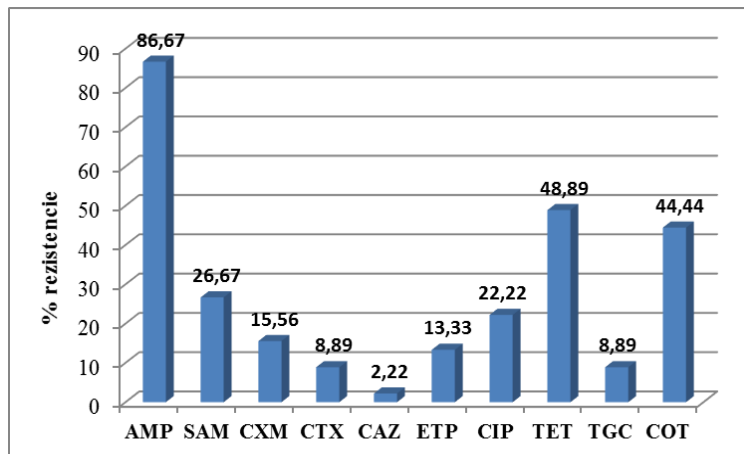
Odobraté vzorky trusu a mäsa hydiny sa spracovali, zriedili a naočkovali na povrch endoagaru. Charakteristické kolónie s kovovým leskom sa preočkovali na povrch mäsopeptonového agaru a chromagaru. Použitím komerčných biochemických testovacích súprav (INDOLtest, OXItest, OFtest, VPtest a ENTEROtest 24 N) sa na základe charakteristického fenotypového prejavu zrealizovala druhová identifikácia bakteriálnych kmeňov *E. coli*. Na potvrdenie identifikácie sa ešte vykonala PCR analýza zameraná na detekciu špecifického cieľového génu 16S rRNA vo vyšetrovaných izolátoch. Fylogenetická typizácia bola uskutočnená prostredníctvom triplexovej PCR podľa metodiky Doumith a kol. (2012), s optimalizovanými podmienkami a s následným zatriedením skúmaných *E. coli* do

skupín a podskupín, ako uvádza Escobar-Páramo a kol. (2006). Testovanie antibiotickej citlivosti *E. coli* na 20 ATB sa stanovilo modifikovanou mikrodilučnou metódou podľa CLSI VET01-S2 (2013) a EUCAST (2017) prostredníctvom diagnostickej súpravy Bel-Miditech.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe typického rastu na jednotlivých agaroch, výsledkov biochemických testov a druhej identifikácie pomocou metódy PCR bolo potvrdených celkovo 45 izolátov *E. coli*. Podľa získaných výsledkov fylogenetickú analýzu možno skonštatovať, že väčšina izolátov patrila do skupiny A (37,79 %), po ktorej nasledovala skupina D (26,66 %) a skupina B1 (24,44 %). Najmenej izolátov bolo priradených do skupiny B2 (6,67 %) a 2 izoláty neboli identifikované. Rovnaké výsledky vo svojej štúdiu zaznamenal aj Aworh a kol. (2021), kde väčšina skúmaných izolátov pochádzajúcich z hydiny taktiež patrila do fylogenetických skupín A a B1. Vo všeobecnosti však platí, že *E. coli* vo fyloskupinách A a B1 sú komenzály, v B2 a D zasa patogény (Mosquito a kol., 2015). Zvyčajne najvirulentnejšia je fyloskupina B2 (Aworh a kol., 2021).

Mnoho krajín pri chove zvierat určených na produkciu potravín, vrátane hydiny, používa pomerne veľké množstvá ATB a mnohé z nich zohrávajú dôležitú úlohu aj pri liečbe infekčných ochorení v humánnej medicíne (Jibril a kol., 2021). K najčastejšie podávaným ATB patria tetracyklíny, penicilíny, sulfónamidy, makrolidy, polymyxíny a aminoglykozidy. Naše výsledky z testovania antibiotickej citlivosti ukázali, že z 20 testovaných ATB bola celkovo najvyššia miera rezistencie zistená voči ampicilínu (86,67 %), po ktorom nasledoval tetracyklín (48,89 %), kotrimoxazol (44,44 %) a ampicilín + sulbaktám (26,67 %). Znížená citlivosť bola detegovaná voči tigecyklínu (8,89 %) a ceftazidímu (2,22 %). Celkový profil ATB rezistencie vyšetovaných izolátov *E. coli* je zhrnutý v grafe č. 1.



Graf 1. Celkový profil ATB rezistencie vyšetovaných izolátov *E. coli*

AMP = ampicilín, SAM = ampicilín + sulbaktám, CXM = cefuroxím, CAZ = ceftazidím,

ETP = ertapeném, CIP = ciprofloxacín, TET = tetracyklín, TGC = tigecyklín, COT = kotrimoxazol

Interpretačný program systému Miditech automaticky vygeneroval nasledujúce mechanizmy rezistencie: Fluoroq.Incompl.Resistance, t.j. neúplná fluórochinolónová rezistencia (31,11 %), Penicillinase:low (22,22 %), Susp.carbap./metalo-betal.-ase (15,56 %) a Penicillinase:high! (6,67 %) zodpovedné za rezistenciu voči β -laktámovým antibiotikám a Multiresistance! (2,22 %).

U takmer polovice vyšetovaných vzoriek sme potvrdili aj multirezistenciu (MDR), pričom kmene boli priradené hlavne do fylogenetických skupín A a B1, v menšej miere do skupiny D. To je v súlade so zisteniami štúdií Olowe a kol. (2019) a Aworh a kol. (2021), ktorých

MDR kmene takisto boli začlenené do fyloskupín A a B1. Jedná sa však o veľmi znepokojujúci fakt, nakoľko komenzálne MDR kmene by mohli odovzdať genetickú informáciu menej virulentným kmeňom *E. coli* alebo dokonca iným bakteriálnym druhom a vyvolať tak negatívny dopad v sektore verejného zdravia. Zaujímavým zistením bola multirezistencia u 4 kmeňov voči 7 ATB (AMP-SAM-CXM-ETP-TGC-TET-COT alebo AMP-SAM-CXM-CTX-ETP-CIP-TET) a u 2 skúmaných kmeňov sa potvrdila odolnosť až voči 8 ATB súčasne (AMP-SAM-CXM-CTX-ETP-TGC-TET-COT). V štúdiu Mgaya a kol. (2021) bola potvrdená vysoká frekvencia MDR kmeňov a niekoľko z nich rovnako vykazovalo odolnosť až voči 7 ATB naraz. Obdobný profil ATB rezistencie *E. coli* izolátov vo svojom experimente zaznamenal aj Aworh a kol. (2021).

Nárast populácie, zmeny v trendoch a ekonomický rozvoj prispievajú k stále sa zvyšujúcemu dopytu po mäse a mäsových výrobkoch z hydiny (Ribeiro a kol., 2023). So stúpajúcou úrovňou živočíšnej produkcie je spojená aj rastúca spotreba ATB (Abdalla a kol., 2021). Získané výsledky jasne poukazujú na neustále stúpajúci výskyt rezistentných a multirezistentných kmeňov *E. coli* prítomných v potravinách živočíšneho pôvodu. Predovšetkým hydina je ideálnym rezervoárom antibiotiko-rezistentných *E. coli*, ktoré predstavujú potenciálne riziko pre zdravie ľudí. Preto je potrebné znížiť spotrebu ATB a zamerať sa na aplikáciu prírodných aditív zvieratám určeným na produkciu potravín, ako aj zlepšiť bezpečnostné opatrenia a monitoring výskytu ATB rezistencie, čím by sa v živočíšnej výrobe zabránilo jej ďalšiemu šíreniu.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou Operačného programu Integrovaná infraštruktúra v rámci projektu: Dopytovo-orientovaný výskum pre udržateľné a inovatívne potraviny, Drive4SIFood 313011V336, spolufinancovaný Európskym fondom regionálneho rozvoja. Podporila ho aj Kultúrno-vzdelávacia grantová agentúra MŠVVaŠ SR, projekt KEGA 001UVLF-4/2022.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Abdalla SE, Et al. From farm-to-fork: *E. coli* from an intensive pig production system in South Africa shows high resistance to critically important antibiotics for human and animal use. *Antibiotics*. 2021; 10(2):178.
- Adzitey F, Phenotypic antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from raw meats, ready-to-eat meats, and their related samples in One health context. *Microorganisms*. 2021; 9(2): 326.
- Aworh MK, et al. Genetic relatedness of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2021; 10:1-13.
- CLSI. Document VET01-S2 : Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Wayne, USA. 2013; 1-168.
- Doumith M, et al. Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(9):3108-10.
- Escobar-Páramo P, et al. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*. 2006; 8(11): 1975-84.
- EUCAST. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 2.0. Växjö, Sweden. 2017; 1-43.
- Islam MS, et al. A systematic review on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in poultry and poultry environments in Bangladesh between 2010 and 2021. *BioMed Research International*. 2023.
- Jibril AH, et al. Association between antimicrobial usage and resistance in *Salmonella* from poultry farms in Nigeria. *BMC Vet Res*. 2021; 17(1):234.
- Khong MJ, et al. Antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolated from poultry litter. *Poult Sci*. 2022; 102(1):102305.
- Mgaya FX, et al. Occurrence of multidrug resistant *Escherichia coli* in raw meat and cloaca swabs in poultry processed in slaughter slabs in Dar es Salaam, Tanzania. *Antibiotics*. 2021; 10(4):343.
- Mosquito S, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* phylogroups are associated with antibiotic resistance and duration of diarrheal episode. *ScientificWorldJournal*. 2015; 2015:610403.
- Ribeiro J, et al. Antibiotic resistance among gastrointestinal bacteria in broilers: A review focused on *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*. *Animals*. 2023; 13(8):1362.
- Sevilla-Navarro S, et al. Antimicrobial resistance trends of *Escherichia coli* isolates: A three-year prospective study of poultry production in Spain. *Antibiotics*. 2022; 11(8):1064.

REPLIKAČNÁ KINETIKA KEMEROVO VÍRUSU (ROD *ORBIVIRUS*) V MYŠACÍCH FIBROBLASTOCH A ŠTÚDIUM INTERFERÓNOVEJ ODPOVEDE

Fedorková D., Schusterová P., Peňazziová K., Csank T.

Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Kemerovo vírus (KEMV) patrí do rodu *Orbivirus*. Je to kliešťami prenášaný arbovírus, ktorého rezervoármi sú voľne žijúce hlodavce a vtáky. Informácie o replikačnom cykle KEMV a indukcii interferónovej (IFN) odpovede sú limitované. Zámerom práce je štúdium replikačnej kinetiky v myšacích fibroblastoch L-929 a štúdium expresie génov RIG-1, MDA5, IFN regulačného faktora (IRF) 3, IRF 7, IFN- α a IFN- β . Replikačný cyklus KEMV bol ukončený v priebehu 6-8 hodín po infekcii (hpi). Vrchol množstva intracelulárneho vírusu bol 24 hpi, s čím korelujú aj najvyššie hladiny expresie mRNA RIG-1 a MDA5. Hladiny mRNA IRF7, IFN- α a IFN- β stúpali až do 32 hpi a vrchol extracelulárneho vírusu nastal 48 hpi. V predkladanom príspevku prezentujeme prvotné výsledky štúdie indukcie IFN odpovede po infekcii spôsobenej kliešťami prenášaným KEMV.

ÚVOD

KEMV je neobalený kliešťami prenášaný zoonotický arbovírus (ICTV, 2023). Experimentálna infekcia makakov rhesus spôsobila meningitídu a polyradikulitídu (Libíková a kol., 1970). Napriek tomu, že sa KEMV spájal s ochoreniami centrálného nervového systému u ľudí (Libíková a kol. 1978) sa im v súčasnosti nevenuje pozornosť. Vrodená antivírusová imunitná odpoveď je do veľkej miery závislá od úspešnej IFN odpovede. Hlavným PAMP orbivirusov je ich genóm tvorený 10 segmentami dsRNA (Tytell a kol., 1967), ktorá môže byť rozpoznávaná cytozólomými receptormi RIG-1 a MDA5. Tieto aktivujú signalizačné dráhy vrodenej imunity a aktivujú tvorbu IFN (Jensen a Thomsen, 2012). Mechanizmy, ktorými nastáva indukcia produkcie IFN po infekcii KEMV doposiaľ neboli študované. Z toho dôvodu sme sa v našej štúdií zamerali na expresiu RIG-1, MDA5, IRF-3 a -7, ktoré pôsobia ako induktory tvorby IFN- α a IFN- β .

MATERIÁL A METODIKA

Použitý KEMV izolát bol dvakrát pasážovaný na L-929 (ATCC®, CCL-1TM) myšacích fibroblastoch, derivovaných zo spojivového tkaniva. Bunky sme kultivovali v médiu DMEM, doplnenom o fetálne bovinné sérum a antibiotiká.

Po adsorpcii vírusu sme bunky premyli čistým ľadovým DMEM a v stanovených časoch sme odoberali zvlášť kultivačné médium a bunky. V oboch frakciách bol vírus kvantifikovaný pomocou plak-formačného testu a množstvo infekčného vírusového potomstva bolo vyjadrené ako priemer plak-formačných jednotiek (PFU)/ml triplikátov.

IFN odpoveď sme sledovali pomocou RT-qPCR na základe expresie génov (Tab. 1.) zúčastňujúcich sa na antivírusovej odpovedi. Bunky boli 6, 8, 12, 24 a 32 hpi premyté ľadovým DMEM a lyzované Trizolom (ThermoFisher Scientific). RNA sme prepísali do cDNA pomocou RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific). Všetky uvedené testy sme vykonávali v triplikátoch.

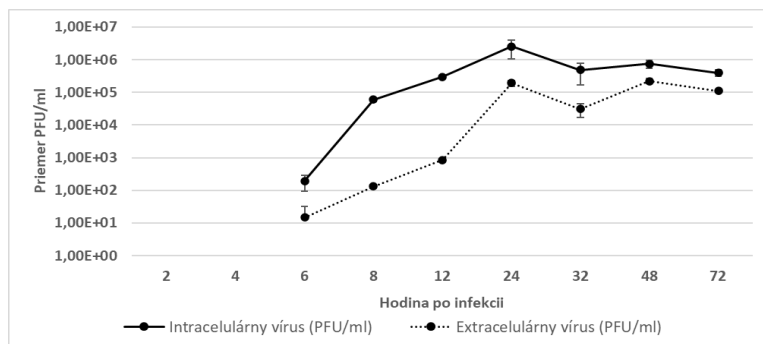
Gén	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')	Referencia
β -aktín	TCCATCATGAAGTGTGACGT	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT	(Gilsbach a kol., 2006)
RIG-1	GAAGATTCTGGACCCACCT	ATTGGGCCCTTGTTGTTCTT	(Lefkopoulos a kol., 2020)
MDA5	TGATGCACTATTCCAAGAACTAACA	TCTGTGAGACGAGTTAGCCAAG	(Kumpunya a kol., 2022)
IRF7	GAGACTGGCTATTGGGGGAG	GACCGAAATGCTTCCAGGG	(Lefkopoulos a kol., 2020)
IFN- α 5	CCTGTGTGATGCAACAGGTC	TCACTCCTCCTTGCTCAATC	(Lee a kol., 2022)
IFN- β	CTGGAGCAGCTGAATGGAAAG	CTTGAAGTCCGCCCTGTAGGT	(Lefkopoulos a kol., 2020)

Tab. 1 Primery použité pri RT-qPCR analýze

Štatistickú významnosť sme hodnotili použitím dvoj-cestného testu ANOVA ($P < 0,0001$) a Tukeyho porovnávacím testom, kde sme porovnávali zmenu expresie vybraných génov v čase. Vplyv infekcie oproti negatívnej kontrole v každom čase sme hodnotili nepárovým t-testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

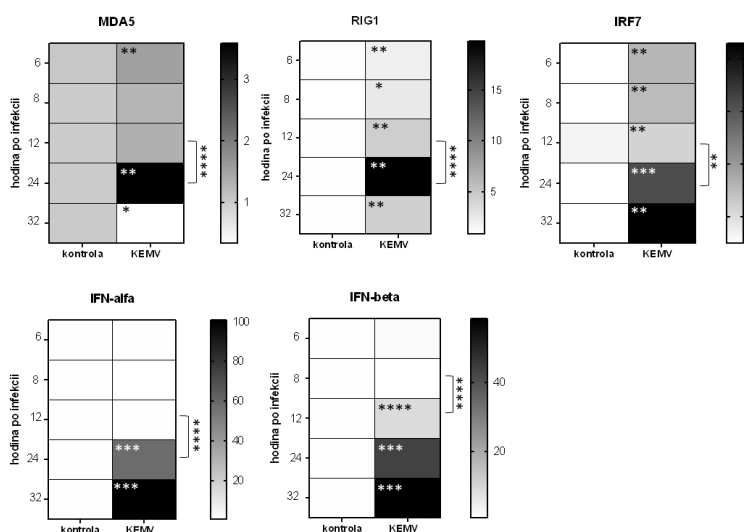
Na určenie replikačnej kinetiky KEMV vo fibroblastoch v daných časoch sme stanovili titer intra- a extra- celulárneho vírusu. Do 4 hpi sme nezaznamenali žiadne vírusové častice. Prvé vírusové častice sme detegovali 6 hpi, kedy titer intracelulárneho vírusu bol $1,93 \times 10^2$ PFU/ml a extracelulárneho vírusu $1,5 \times 10^1$ PFU/ml. Do 24 hpi množstvo intracelulárneho vírusu stúpalo, pričom vrchol ($2,53 \times 10^6$ PFU/ml) dosiahol 24 hpi a v ďalších časoch, až do 72 hpi titer vírusu klesal (Graf 1.). Výrazný cytopatický efekt sme pozorovali v 24 hpi. Vrchol extracelulárneho vírusu nastal 48 hpi ($2,22 \times 10^5$ PFU/ml) (Graf 1.). Naše výsledky replikácie KEMV



Graf 1. Jednokroková rastová krivka KEMV (MOI 1) na myšacích fibroblastoch

a v množstve vírusového potomstva môžu byť zapríčinené rozdielom v pôvode buniek. Primárne embryonálne bunky sú ideálnym hositeľom pre kultiváciu vírusov, nakoľko sú takmer identické s bunkami za *in vivo* podmienok. Okrem toho, rovnako ako hlodavce, aj vtáky sú považované za možných rezervoárov KEMV (Safonová a kol., 2020).

V ďalšej časti štúdie sme sledovali expresiu génov zúčastňujúcich sa vo vrodenej antivírusovej imunite. RIG-1 a MDA5 sú bez stimulácie exprimované na nízkej úrovni (Kang



Obr. 1. Génová expresia vybraných receptorov, transkripčného faktora a interferónov po infekcii KEMV (MOI=1) v L-929. Signifikantné výsledky Tukeyho porovnávacieho testu sú vyjadrené v heat mapách spojovníkmi a signifikantné výsledky nepárového t-testu sú zobrazené v jednotlivých hodinách po infekcii.

na fibroblasoch sa približujú výsledkom Mayer a kol., 1964. V tomto prípade použili primárnu kultúru kuracích embryonálnych buniek. Latentná perióda predstavovala 3-4 hpi. Virióny boli zaznamenané 6-7 hpi a vírus dosiahol maximum replikácie 10-12 hpi ($7,5 \times 10^8$ PFU/ml). Rozdiely v dĺžke replikačného cyklu

a kol., 2004). RIG-1 bola oproti MDA5 až $6 \times$ vyššia. V nasledujúcich hodinách došlo ku poklesu expresie oboch génov (Obr. 1.). IRF3 je konštitutívne exprimovaný transkripčný faktor IFN typu I a pôsobí v počiatočnej fáze vírusovej infekcie, kedy vzniká prevažne IFN- β . Expresia IRF7 v neskoršej fáze infekcie je stimulovaná IFN- α/β (Sato a kol. 1998; Takaoka a Yanai, 2006). V sledovaných časoch

sme po infekcii KEMV nedetegovali zvýšenie mRNA IRF3 (dáta nie sú uvedené).

Avšak, v 24 hpi sme oproti 12 hpi zaznamenali 3× nárast mRNA IRF7, ktorý dosiahol vrchol 32 hpi (Obr.1.). Signifikantne zvýšenú hladinu mRNA IFN-β sme zaznamenali už v 12 hpi a ku signifikantnému nárastu hladiny IFN-α došlo 24 hpi. Hladiny IFN-α a IFN-β sa zvyšovali až do 32 hpi, kedy došlo ku 100× (IFN-α) a 40× (IFN-β) zvýšeniu oproti 6 hpi (Obr.1.). Naše výsledky dokazujú schopnosť KEMV produktívne infikovať myšacie fibroblasty s následnou indukciou IFN odpovede. Na základe mRNA analýz môžeme však len predpokladať, že je táto IFN odpoveď RLR-dependentná. Štúdia bude doplnená o proteínové analýzy, o analýzy translokácie transkripčných faktorov do jadra hostiteľských buniek za použitia inhibítorov jednotlivých signalizačných dráh.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF č. 13/2023 „Antivírusový účinok IFN typu I na replikáciu kliešťami prenášaných orbivirusov“ a VEGA č. 1/0354/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Giltsbach R, et al. Norepinephrine transporter knockout-induced up-regulation of brain alpha2A/C-adrenergic receptors. *J Neurochem.* 2006 Feb;96(4):1111-20
- ICTV. Family: Sedoreoviridae Genus: Orbivirus. 2023. Dostupné na internete: <https://ictv.global/report/chapter/sedoreoviridae/sedoreoviridae/orbivirus>
- Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol.* 2012; 86(6):2900-10.
- Kang DC, et al. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene.* 2004; 23(9):1789-800.
- Kumpunya S, et al. cGAS deficiency enhances inflammasome activation in macrophages and inflammatory pathology in pristane-induced lupus. *Front Immunol.* 2022, 13.
- Lee HK, et al. Rag2 Deficiency Enhances Susceptibility to Systemic Mouse Adenovirus Type 1 Infection. *Intervirology.* 2022; 65 (3):134-143.
- Lefkopoulos S, et al. Repetitive Elements Trigger RIG-I-like Receptor Signaling that Regulates the Emergence of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Immunity.* 2020 Nov 17;53(5):934-951
- Libíková H, et al. Orbiviruses of Kemerovo complex and neurological diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 1978; 166 (1-4): 55-263.
- Libíková H, Tesarova J, Rajcani J. Experimental infection of monkeys with Kemerovo virus. *Acta Virol.* 1970; 14 (1):64-69.
- Mayer V, et al. Some biological and physico-chemical properties of Kemerovo virus. *Acta virol.* 1964; 8:302-311.
- Safonová MV, et al. Genetic Diversity of Kemerovo Virus and Phylogenetic Relationships Within the Great Island Virus Genetic Group. *Ticks and Tick-borne Diseases.* 2020; 11(2).
- Sato M, et al. Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Lett.* 1998; 441: 106-110
- Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol.* 2006; 8:907-922.
- Tytell AA, et al. Inducers of interferon and host resistance. 3. Double-stranded RNA from reovirus type 3 virions (reo 3-RNA). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1967; 58: 1719-1722.

BIOKONJUGÁTY PROTEÍN-DNA: SYNTÉZA, CHARAKTERIZÁCIA ŠTRUKTÚRY a KINETIKA SAMOUSPORIADANIA

Fedorová V.¹, Šipošová K.¹, Humeník M.²

¹Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, SAV, Košice, Slovensko

²Katedra biomateriálov, Fakulta technických vied, Univerzita Bayreuth, Bayreuth, Nemecko

ABSTRAKT

Nanomateriály na báze proteínov disponujú výnimočnými vlastnosťami so širokým aplikačným potenciálom. Obzvlášť významné sú proteíny, ktoré vďaka procesom samousporiadania môžu tvoriť morfológicky odlišné štruktúry na základe vonkajších podmienok. Navyše, povrch peptidov či proteínov je možné chemicky modifikovať vhodným ligandom, čím dané biomolekuly nadobúdajú špecifické štrukturálne a funkčné vlastnosti. Medzi takéto proteíny patrí aj rekombinantný pavúčí proteín. Jeho modifikácia použitím vybraných DNA oligonukleotidov umožňuje vznik proteín-DNA biokonjugátov, ktoré si zachovávajú vlastnosti pavúčieho vlákna spolu s novonadobudnutými vlastnosťami DNA-oligonukleotidov. Pochopenie procesu samousporiadania, vplyvu experimentálnych podmienok, prítomnosti iónov a detailný popis vznikajúcich štruktúr je dôležitým krokom pre vývoj nanomateriálov na báze proteínových biokonjugátov s praktickým využitím.

ÚVOD

Nanomateriály zložené z biologických makromolekúl nachádzajú široké uplatnenie v rôznych oblastiach a vďaka ich výnimočným vlastnostiam, ako sú biodegradabilita, biokompatibilita či absencia imunitnej odpovede, ponúkajú potenciálne riešenie pre množstvo otázok. Takéto vlastnosti nachádzame aj v pavúcom proteíne, ktorý navyše disponuje vysokou tuhosťou, pevnosťou a tiež mechanickou silou (Heidebrecht a Scheibel, 2013). Tento tzv. pavúčí hodváb radíme do skupiny funkčných amyloidov, proteínov, ktoré podliehajú procesu spontánneho samousporiadania štruktúr, ktoré je charakteristické usporiadaním tvoreným krížovými β -listami (Knowles a Buehler, 2011). Získanie prirodzeného pavúčieho vlákna je náročné kvôli často kanibalistickému a teritoriálnemu správaniu sa pavúkov. Riešením sa stáva príprava rekombinantných pavúčích vlákien v hostiteľskom organizme, prevažne použitím *E. coli*. Takto je získavaný aj rekombinantný pavúčí proteín eADF4(C16) (ďalej označovaný ako „C16“) odvodený od vlečného proteínu fibroínu 4 (ADF4) z európskeho záhradného pavúka *Araneus diadematus* obsahujúci 16 opakovaní modulu C. Táto sekvencia navyše ponúka možnosť chemickej modifikácie, vďaka čomu môžu byť pavúčie vlákna využité na tvorbu nanomateriálov s výnimočnými štruktúrnymi či funkčnými vlastnosťami (Humeník a kol., 2014, 2020). Cieľom tejto práce bolo syntetizovať biokonjugáty tvorené pavúčim rekombinantným proteínom C16 a pripojenými DNA oligonukleotidmi TBA15 a TBA29 a analyzovať kinetiku ich samousporiadania do organizovaných nanoštruktúr, fibríl, v rôznych experimentálnych podmienkach. Detailne bol študovaný vplyv rôznej koncentrácie fosfátových, sodných a draselných iónov. Pre fosfátové ióny, KPi , je známe, že indukujú tvorbu fibrilárnych štruktúr pavúčieho proteínu (Humeník a Scheibel, 2014b), zatiaľ čo ióny Na^+ a K^+ sú dôležité pre správne priestorové usporiadanie kvadruplexovej štruktúry vybraných DNA oligonukleotidov (Macaya a kol., 1993). Preto jednou z dôležitých úloh tejto práce bola analýza štruktúry DNA-oligonukleotidov viazaných na povrch proteínu C16 v rôznych experimentálnych podmienkach a následná optimalizácia pomeru koncentrácií daných iónov, pri ktorej vzniká stabilná a správna štruktúra DNA, ktorá je podmienkou pre následné viazanie cieľovej biomakromolekuly. V takýchto podmienkach je umožnená väzba funkčných ligandov na biokonjugáty, čím sa otvára možnosť tvorby bionanomateriálov s využitím v biomedicíne či technologickom priemysle.

MATERIÁL A METODIKA

Proteín C16 (dodaný z Katedry biomateriálov, University of Bayreuth v Bayreuthe, Nemecko) bol rozpustený v 6 M roztoku guanozíntiokyanátu (GuaSCN) v koncentrácii 5 mg/ml a následne dialyzovaný proti 10 mM HEPES s pH = 7,1. Chemická modifikácia, pripojenie azidovej skupiny N₃ na N-koniec proteínu bolo uskutočnené použitím 25 mM azidového činidla N₃HSI rozpusteného v dimetylformamide (DMF). Reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote 2 hodiny. Úspešnosť reakcie bola overená hmotnostnou spektrometriou MALDI-TOF po naštiepení proteínu 5 M bikarbonátom amónnym (24 hod, lab. teplota). Oligonukleotidy TBA15 a TBA29 (zakúpené od firmy biomers.com; Ulm, Nemecko) rozpustené v redestilovanej vode na koncentráciu 0,5 mM boli modifikované pripojením dibenzocyklooktánu (DBCO) na 5' koniec (2 hod, lab. teplota). Úspešnosť reakcií bola overená vysokoúčinnou kvapalnou chromatografiou (HPLC). Následnou „klik“-reakciou medzi modifikovaným proteínom a oligonukleotidmi v prítomnosti 8 M močoviny a 1 M HEPES-Na (pH = 8) pri teplote 40 °C a trvaní 48 hodín boli syntetizované biokonjugáty pavúčí proteín-DNA. Reakcia prebiehala v pomere látkových množstiev 1:1,5 (proteín:oligonukleotid). Úspešnosť syntézy bola overená natívnou polyakrylamidovou (PAGE) elektroforézou. Po vysušení v exsikátore boli pripravené biokonjugáty uložené a skladované pri teplote -80 °C. Chemická modifikácia proteínu C16 ako aj oligonukleotidov TBA15 a TBA29, syntéza biokonjugátov a overenie úspešnosti týchto reakcií prebiehali na Katedre biomateriálov, Univerzita Bayreuth v Nemecku. Pripravené proteín-DNA oligonukleotidy boli následne ďalej študované na oddelení biofyziky, Ústavu experimentálnej fyziky SAV v Košiciach. Pre jednotlivé experimenty boli biokonjugáty rozpustené v 6 M GuaSCN (3 – 5 mg/ml), dialyzované proti TRIS (pH = 8) alebo HEPES (pH = 8) po dobu 24 hodín a následne použitím ultracentrifugácie (55 000 rpm, 55 min, 4 °C) boli zbavené nerozbalených molekúl. Za účelom analýzy sekundárnej štruktúry DNA oligomérov viazaných na pavúčí proteín boli pripravené vzorky biokonjugátov s rôznymi pomermi Na⁺ a K⁺ iónov. Jednotlivé spektrá cirkulárneho dichroizmu (CD) boli merané v 0.1 cm kvete v rozsahu vlnových dĺžok 190 - 330 nm pri laboratórnej teplote s rýchlosťou skenovania 100 nm/min. Kinetické merania samousporiadania pre každý biokonjugát samostatne prebiehali v roztokoch KPi so 4 koncentráciami (25, 50, 75, 100 mM) a v aptamérovom (GQ) pufrí s obsahom NaCl a KCl v 5 rôznych pomeroch. Merania absorbcie pri vlnovej dĺžke 340 nm a teplote 30 °C prebiehali v triplikátoch a boli ukončené po dosiahnutí stacionárnej fázy fibrilizácie. Kinetické merania prebiehali tiež v kombináciách KPi tlmivého roztoku s prídavkom NaCl (25 mM KPi + 150 mM NaCl, 75 mM KPi + 100 mM NaCl) za vyššie uvedených podmienok. Koncentrácia biokonjugátov vo všetkých analyzovaných podmienkach bola vždy 15 μM. Po ukončení procesu fibrilizácie boli vzorky analyzované meraniami CD spektier a vizualizácia vzniknutých agregátov bola uskutočnená pomocou atómovej silovej mikroskopie (AFM). Vzorky na AFM boli pripravené kvapnutím 10 μL vzorky na čerstvo očistený povrch sľudy (V1 kvalita, TedPella, USA) a po 5 min. absorpcii boli vzorky opláchnuté ultračistou vodou a osušené. Na vizualizáciu bol použitý AFM mikroskop Veeco Bruker pracujúci v tzv. tapping móde so skenovacím hrotom NCHV (Bruker, USA). Snímky boli následne exportované programom Nanoscope Analysis 1.2.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Štruktúra pavúčieho proteínu, ako aj jeho fyzikálne vlastnosti, sú dôvodmi pre jeho obsiahle štúdie najmä v oblasti prípravy nových nanomateriálov. Cieľom tejto štúdie bolo syntetizovať a charakterizovať biokonjugáty pavúčí proteín-DNA, uskutočniť analýzu ich samousporiadania a vizualizovať vzniknuté štruktúry. Chemická modifikácia proteínu C16 a oligonukleotidov TBA15 a TBA29 umožnila syntézu biokonjugátov využitím „klik-reakcie“ (Humenik a kol., 2020). Typ použitých oligonukleotidov je ligandovo-špecifický, v našom

prípade použité oligonukleotidy viažu trombín cez rôzne väzobné miesta. Úspešné viazanie funkčných ligandov je podmienené správne usporiadanou sekundárnou štruktúrou DNA oligonukleotidov, pre ktorú je dôležitá najmä prítomnosť K^+ iónov, ale aj Na^+ iónov, resp. ich pomeru. Na základe nami uskutočnených experimentov sme zistili, že prítomnosť jednotlivých iónov samostatne nemá významný vplyv na sekundárnu štruktúru DNA oligonukleotidov. Avšak, kombinácia Na^+/K^+ iónov výrazne ovplyvňuje TBA29, ako bolo preukázané CD meraniami. Na základe CD meraní sme následne uskutočnili experimenty samousporiadania a tvorby fibrilárnych nanoštruktúr. Zistili sme, že biokonjugáty a teda, pavúčí proteín, si zachováva schopnosť amyloidného samo-usporiadania aj po modifikácii DNA-oligonukleotidmi. Kinetické merania preukázali formovanie agregátov vo fosfátovom (KPi) pufrí a aptamérovom (GQ) pufrí s obsahom NaCl a KCl. Pre KPi je známe, že indukuje tvorbu fibril pavúčieho proteínu C16. Pre oba biokonjugáty bol v tomto pufrí pozorovaný rovnaký trend zvyšujúcej sa rýchlosti samo-usporiadania sa so zvyšujúcou sa koncentráciou KPi v roztoku. Naopak, pri použití GQ tlmivého roztoku sme síce pozorovali rovnaký priebeh kinetiky samo-usporiadania, avšak výraznejší efekt na rýchlosť tohto procesu bol viditeľný len pre eADF4(C16)-TBA15. Prítomnosť iónov Na^+ (NaCl) v kombinácii s KPi viedla k výraznému vplyvu na rýchlosť samo-usporiadania oboch biokonjugátov. Vzorky boli následne analyzované aj metódou CD, ktorá preukázala vznik β -listov v roztokoch KPi, ale aj v GQ tlmivom roztoku, pričom bola zachovaná tiež kvadruplexová sekundárna štruktúra DNA oligomérov. Formovanie fibrilárnych štruktúr preukázala tiež AFM. Dosiahnuté výsledky dávajú základ pre ďalšie štúdie, ktoré budú cieľiť na optimalizáciu podmienok pre väzbu funkčných ligandov, ako aj ich riadené uvoľňovanie.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantami VEGA 2/0034/22, SK-DAAD a SK-TW Azcai.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Heidebrecht A, Scheibel T. Recombinant production of spider silk proteins. *Adv. Appl. Microbiol.* 2013; 82: 115–153.
- Humenik M, Magdeburg M, Scheibel T. Influence of repeat numbers on self-assembly rates of repetitive recombinant spider silk proteins. *J. Struct. Biol.* 2014; 186, 431–437.
- Humenik M, et al. Functionalized DNA-spider silk nanohydrogels for controlled protein binding and release. *Mater. Today Bio.* 2020; 6:100045.
- Humenik M, Scheibel T. Nanomaterial building blocks based on spider silk-oligonucleotide conjugates. *ACS Nano.* 2014; 8:1342–1349.
- Knowles TPJ, Buehler MJ. Nanomechanics of functional and pathological amyloid materials. *Nat. Nanotechnol.* 2011; 6:469–479.
- Macaya RF, et al. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90:3745–3749.

VPLYV KAROTICKEJ ENDARTEREKTÓMIE NA INDUKCIU ISCHEMICKEJ TOLERANCIE - DETEKCIA ZMIEN GÉNOVEJ EXPRESIE

Furman M.¹, Némethová M.¹, Mačáková Ľ.¹, Sihotský V.³, Kopolovets I.², Virág M.², Mucha R.¹

¹Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Košice

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

³Lekárska 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 vrátane samotnej ischémie. Karotická endarterektómia (CEA) je chirurgické odstránenie arterosklerotického plátu z karotidy, pričom prietok krvi karotidou je počas zákroku pozastavený. Cieľom tejto práce je štúdium a detekcie zmien génov aktivovaných procesom CEA vo vzorkách ľudskej krvi a ich možné zapojenie do mechanizmov ischemickej tolerancie. Vykonali sme analýzu krvi pacientov, ktorí podstúpili CEA s asymptomatickou stenózou *a. carotis interna* (ACI), symptomatickou stenózou ACI a s poklesom oxymetrie počas CEA o viac ako 20%. Pri peroperačnom klemovaní ACI môže dôjsť k prechodnej ischémii mozgu, ktorá môže byť za určitých podmienok považovaná za formu navodenia ischemickej tolerancie. Koreláciou zmien expresie génových markerov u jednotlivých skupín je možné charakterizovať špecifické modifikácie pre danú skupinu. V tejto práci sme sa zamerali na skupinu s poklesom oxymetrie, pre ktorú sme na základe Microarray analýzy reprezentatívnej vzorky vybrali gény s najsignifikantnejšou zmenou expresie. Následnou RT-qPCR analýzou sme testovali zmeny expresie v rámci širších štatistických skupín. Naše výsledky potvrdzujú možný vplyv CEA na navodenie IT, pričom štatisticky najvýznamnejší efekt bol pozorovaný u skupiny pacientov s poklesom oxymetrie počas CEA, konkrétne u 6 génov *DPY19L4*, *SESN3*, *C5orf42*, *HMSD*, *RHBDD1*, *POLR3G*.

ÚVOD

Ischemická cievna mozgová príhoda (CMP) má za následok 5,9 milióna úmrtí ľudí ročne a u 16,9 milióna pacientov spôsobuje ťažkú a/alebo trvalú invaliditu, pričom existujú reálne predpoklady pre vzrastajúcu tendenciu jej výskytu (Strong a kol., 2007). Aktuálnym je koncept protekcie mozgu na základe navodenia neuroprotektívnych mechanizmov. Za neuroprotektívnu môžeme považovať akúkoľvek metódu aplikovanú so snahou inhibovať molekulárne a bunkové procesy, ktoré sú zodpovedné za poškodenie mozgového tkaniva, pričom táto metóda umožní prežitie neurónov a homeostatickú stabilizáciu ischemizovaného prostredia (Moretti a kol., 2015). Mozog je citlivý na nedostatočný prísun kyslíka, energie a zásob, čo je kompenzované viacerými endogénnymi mechanizmami. Z tohto pohľadu sa zdá byť sľubným konceptom navodenia ischemickej tolerancie, umožňujúci redukciami poškodenia a tak sa podieľať na ochrane neurónov. Pojem ischemická tolerancia zahŕňa mechanizmy indukované viacerými spôsobmi, ktorých výsledkom je ochranný stav. Ako taký je ischemický kondicioning definovaný, ako krátkodobá a sub-kritická ischémia vyvolaná v konkrétnom experimentálnom postupe (Dirnagl et al. 1995). 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 oksyloženou krvou. Dočasné uzatvorenie priechodnosti jednej z karotíd je nevyhnutné pre chirurgické odstránenie arterosklerotického plátu

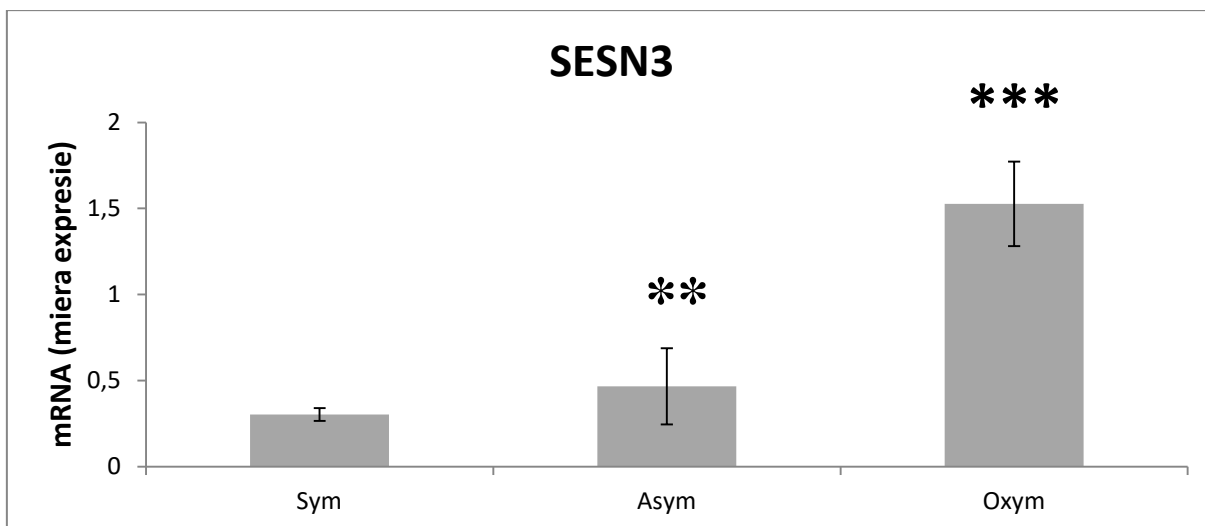
nahromadeného na vnútornej stene dotýčajnej karotidy. Mozog je tak počas zákroku zásobovaný krvou len prostredníctvom jednej z karotíd, čo má vplyv na stimuláciu neuroprotektívnych kaskád a následné navodenie ischemickej tolerancie (Howell, 2007). Počas operačného zákroku sa štandardne sleduje miera transkraniálnej oxymetrie, pričom pri jej poklese pod 20% dochádza k výskytu symptomatických prejavov CMP, ktoré samovoľne vymiznú v rozmedzí 5 až 7 dní od CEA. Nakoľko tento mechanizmus a ani mechanizmy navodzujúce IT celkovo nepatria k plne prebádaným fenoménom kvôli svojej zložitosti a komplexnosti molekulárnych mechanizmov zamerali sme našu štúdiu na detekciu zmien génov aktivovaných procesom CEA a ich možné zapojenie do mechanizmov ischemickej tolerancie.

MATERIÁL A METODIKA

V spolupráci s Východoslovenským ústavom srdcových chorôb, a.s. sme vykonali odbery krvi u pacientov, ktorí podstúpili karotickú endarterektómiu (CEA) s odberom 48 hodín po tomto zákroku. Pacienti podstupujúci CEA boli rozdelení do 3 skupín podľa výskytu symptomatického prejavu aterosklerózy a cievej mozgovej príhody pred samotnou CEA: (Sym) – Symptomatická skupina, ktorá prekonala CMP v rozmedzí 7 dní až 6 mesiacov pred CEA, (Asym) – Asymptomatická skupina, ktorá neprekonala CMP, prípadne sa tak stalo pred viac než 6 mesiacmi, (Oxym) – Pokles oxymetrie v priebehu CEA pod 20%. Ďalšou samostatnou skupinou bola negatívna kontrola (NEGAT) obsahujúca vzorky krvi zdravých ľudí, ktorí neprekonali CMP ani CEA. Odobraná krv bola ďalej procesovaná vo forme frakcionácie na krvné bunky a plazmu. Bunková frakcia periférnej krvi bola podrobená izolácii mRNA, ošetrovaná reštrikčným enzýmom DNázy za účelom dekontaminácie genomickou DNA a reverzne transkribovaná do cDNA formy. Nukleotidová sekvencia génov identifikovaných na základe našej predošlej Microarray analýzy bola následne analyzovaná v širšom spektre testovacích študijných kohort. Za pomoci špecifických primerov nadizajnovaných podľa nami identifikovaných génov *DPY19L4*, *SESN3*, *C5orf42*, *HMSD*, *RHBDD1*, *POLR3G* bola urobená kvantitatívna real time PCR (komerčne dostupný SYBR Green kit) na real-time termocykléri (Bio-Rad). Zmeny v expresii génov v závislosti od vplyvu navodenia ischemickej tolerancie sme štatisticky analyzovali s využitím štandardných vzorcov pre výpočet smerodajnej odchyľky 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 ľudoch a títo pacienti podpísali informovaný súhlas.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky Microarray analýzy reprezentatívnej vzorky Oxym skupiny nám poukázali na 6 génov (*DPY19L4*, *SESN3*, *C5orf42*, *HMSD*, *RHBDD1*, *POLR3G*), ktorých miera expzie sa voči negatívnej kontrole zmenila štatisticky signifikantne. Spomedzi týchto 6 génov sa najväčšia zmena pozorovala v géne *SESN3*, ktorý sme následne analyzovali v testovacích skupinách pozostávajúcich z 8 vzoriek/skupina podľa štandardného výpočtu štatistickej sily experimentu. Proteín SESN3 je členom stresom indukovateľnej rodiny proteínov sestrin, ktorá znižuje intracelulárne reaktívne kyslíkové druhy (ROS) a vyvoláva tak odolnosť voči oxidačnému stresu (Budanov a kol., 2004). Zvýšená miera expzie *SESN3* oproti negatívnej (NEGAT) kontrole bola pozorovaná u všetkých skupín, pričom bol pozorovaný v štatisticky najvýznamnejšej miere u Oxym skupiny, menej výrazne u Asym skupiny a štatisticky najmenší význam má posun v expresii *SESN3* u Sym skupiny.



Obr. 1. Úroveň expresie génu *SESN3* modifikovaná vplyvom karotickej endarterektómie (Porovnanie úrovne zmien expresie génu *SESN3* u Sym, Asym a Oxym skupin, u ktorých bola aplikovaná karotická endarterektómia (CEA). Všetky zmeny boli normalizované voči negatívnej kontrole, ktorá na grafe tvorí 0 hodnotu na X osi. Štatisticky významné zmeny expresie sú zvýraznené pomocou *, kde platí pre ** $P < 0,01$ a *** $P < 0,001$)

Z výsledkov je viditeľné, že u Oxymetrickej skupiny pacientov došlo k významnému zvýšeniu miery expresie *SESN3*, čím sme štatisticky potvrdili výsledky našej Microarray štúdie. *SESN3* je gén, o ktorom je známe, že pôsobí proti oxidačnému stresu. Jeho zvýšená miera expresie u Oxym skupiny poukazuje na možný vplyv poklesu oxymetrie pod 20% ako významného indukčného faktora mechanizmov navodenia IT. Myslíme si, že signifikantne zvýšená miera expresie *SESN3* u Asym skupiny je spôsobená vplyvom CEA na tkanivo mozgu doposiaľ neovplyvnené ischemickou fázou v podobe CMP, kde CEA pôsobí ako stimul navodzujúci IT. U Sym skupiny sa významná zmena expresie nepreukázala, čo zrejme súvisí s absenciou aktivácie neuroprotektívneho mechanizmu vplyvom CMP vyskytujúcej sa 7 dní – 6 mesiacov pred CEA, v ktorom je *SESN3* zapojený.

POĎAKOVANIE

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

- Budanov AV, et al. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated Sestrins, homologs of bacterial ahpD. *Science*. 2004;304:596–600.
- Dirnagl U, et al. Global cerebral ischemia in the rat: Online monitoring of oxygen free radical production using chemiluminescence in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, 1995; 15:929-940
- Howell S J. Carotid endarterectomy. *BJA: British Journal of Anaesthesia*. 2007; 99:119–131.
- Moretti A, Ferrari F, Villa RF. Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*. 2015;146:23–34.
- Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: Saving lives around the world. *The Lancet Neurology*. 2007;6:182–7.

PREVALENCIA VÝSKYTU SUBKLINICKEJ LAMINITÍDY U DOJNÍC POČAS A PO PRVEJ LAKTÁCIÍ V CHOVE

Gomulec P., Mudroň P.
Klinika prežúvavcov, UVLF

ABSTRAKT

Subklinická laminitída je multifaktoriálnym syndrómom a vyznačuje komplexom výrazných patofyziologických zmien, ktoré sú predispozíciou vzniku a výskytu iných neinfekčných ochorení paznechtov. Subklinická laminitída sa zvyčajne vyskytuje už v mladom veku hovädzieho dobytku. Cieľom tejto práce bolo zistiť prevalenciu tohto ochorenia u dojníc po prvom pôrode, to znamená u dojníc počas ich prvej laktácie, prípadne po jej ukončení. Údaje boli získané počas funkčnej úpravy paznechtov, ktorá bola vykonávaná na farme na východnom Slovensku v období novembra roku 2022, respektíve v období apríla/júna roku 2023. Subklinická laminitída bola diagnostikovaná na základe typických vonkajších zmien na paznechte, medzi ktoré patria hlavne krvácaniny na chodidlovej ploche paznechtov a zmena sfarbenia rohoviny na žlté. Údaje o dojniciach (poradie a stupeň laktácie, a vek) boli získané pomocou Plemenárskeho informačného systému. Počas funkčnej úpravy paznechtov v obdobiach jesene 2022 a na jar 2023 bolo vo fixačných klietkach vyšetrených 318 dojníc rôznych vekových a produkčných kategóriách. Výskyt subklinickej laminitídy bol zaznamenaný v 49 prípadoch, pričom 31 dojníc pochádzalo z najkritickejšej skupiny dojníc po prvom pôrode, respektíve v období ich prvej laktácie. Vek dojníc sa pohyboval v rozmedzí 2 roky a 9 mesiacov u najmladšej dojnice až po vek 7 rokov a 3 mesiace u najstaršej dojnice, u ktorej bola diagnostikovaná subklinická laminitída. Priemerný vek dojníc v prvej skupine bol 3 roky a 9 mesiacov a priemerný vek v druhej skupine dojníc bol 5 rokov a 7 mesiacov. Záverom možno konštatovať, že subklinická laminitída bola diagnostikovaná u viac ako 15 % dojníc v stáde, pričom najkritickejšou skupinou sú dojnice v období ich prvej laktácie.

ÚVOD

Subklinická laminitída je predispozičným faktorom pri rozvoji iných chodidlových lézií na paznechtov, akými sú napríklad ulcerácie chodidel alebo ochorenia bielej čiary. (Mudroň, 2020 a Green, 2002) Z biologického hľadiska je laminitída systémové ochorenie, ktoré sa primárne manifestuje na paznechtov, pričom dochádza hlavne k narušeniu integrity paznechtov. (Hoblet a Weiss, 2001) Poškodenie mikrovaskulatúry kória, ku ktorému dochádza alteráciou systémového pH, ale aj pôsobením endotoxínov a vazoaktívnych látok cirkulujúcich v krvnom obeh, spúšťa kaskádu procesov vedúcich k vzniku a rozvoju laminitídy (Cook a kol. 2004). Laminitída sa spočiatku vyvíja v subklinickej forme a k nástupu klinických prejavov dochádza neskôr (Belge a Bakir, 2005). Subklinickú laminitídu je možné diagnostikovať na základe krvácanín inkorporovaných v chodidlovej rohovine paznechtu a taktiež na základe nažltlého ofarbenia rohoviny v chodidlovej oblasti paznechtu, pričom u týchto zvierat nie je pozorované krívanie. (Thoenfer a kol. 2004) Cieľom tejto práce bolo určiť prevalenciu výskytu subklinickej laminitídy u takzvaných „prvorodičiek“ alebo „prvôstok“, t.j. u jalovic po prvom pôrode alebo u dojníc po prvej laktácii, pretože v tomto období života dochádza k výrazným zmenám v spôsobe ustajnenia, v strave, ale aj k zvýšeniu stresu, ktorý je zapríčinený práve prvým pôrodom a/alebo prvou laktáciou.

MATERIÁL A METODIKA

Selekcia dojníc sa uskutočňovala počas funkčnej úpravy paznechtov na farme dojníc na východnom Slovensku v období od 7.11.2022 do 22.11.2022, a v období od 12.4.2023 do

3.5.2023. V týchto obdobiach bola vykonaná funkčná alebo terapeutická úprava paznechtov u 318 dojníc. Dojnice boli fixované a vyšetrované v ortopedických fixačných klietkach (MIKULOV), pričom okrem úpravy paznechtov, prípadne liečenia patologických procesov na končatinách, bolo možné určiť telesnú kondíciu dojníc. Funkčná úprava paznechtov bola vykonávaná pomocou uhlovej brúsky (MAKITA) so špeciálnymi ortopedickými rašplovými brúsnyimi kotúčmi. V rámci funkčnej úpravy paznechtov sa zaznamenávali ušné čísla dojníc a aj vyskytujúce sa patologické procesy na končatinách. Údaje o dojniciach (vek, stupeň a poradie laktácie) boli spracované na základe informácií, ktoré sú prístupné v Plemenárskom informačnom systéme (www.plis.sk). Výsledky boli spracované deskriptívnou štatistikou a dvojvýberovým t-testom s nerovnosťou rozptylov (vek dojníc a poradie laktácie).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tab 1. Údaje o dojniciach so subklinickou laminitídou (n=49)

Laktácia	Prvá prebiehajúca alebo ukončená laktácia	Dve a viac ukončených laktácií (2.,3. a 4. laktácia)	t-test
Počet dojníc	31 (63,2 %)	18 (36,8 %)	p≤0,05
Vek x±s	3 roky a 9 mesiacov ± 0,74	5 rokov a 7 mesiacov ± 0,99	p≥0,05

Vermunt a Greenough (1996) vo svojej štúdií potvrdili, že dojnice zažívajú mnohé zmeny týkajúce sa obdobia pred a po otelení. Zároveň potvrdili, že najcitlivejšou skupinou dojníc, ktorú výrazne tieto zmeny ovplyvňujú, sú práve dojnice po prvom otelení. Taktiež Bergsten (2003) potvrdil výrazne vyššiu frekvenciu výskytu subklinickej laminitídy u jalovic, dva týždne pred očakávaným telením, ale taktiež zaznamenal ešte výraznejšiu incidenciu subklinickej laminitídy u „prvorodičiek“ približne 14 týždňov po otelení. V našej štúdií sa toto tvrdenie potvrdilo, pretože u dojníc po prvom telení, respektíve v prebiehajúcej prvej laktácii, sme zaznamenali výrazne vyšší výskyt zmien súvisiacich s prítomnosťou subklinickej laminitídy (31 dojníc – 63,2 %) oproti 18 starším dojniciam (36,8 %), ktoré mali za sebou dve a viac laktácií (p≤0,05). Vermunt a Greenough (1994) uvádzajú vo svojich štúdiách, že na subklinickú laminitídu sú najviac predisponované jalovice a mladé dojnice. Naše pozorovania tieto tvrdenia potvrdili, pretože priemerný vek dojníc v období prvej laktácie, respektíve po jej ukončení sa pohyboval v priemere okolo 3 rokov a 9 mesiacov. Aj keď toto číslo je v priemere vyššie aké bolo zaznamenané vo vyššie spomenutých štúdiách. Dôvodom je fakt, že niektoré dojnice zo skupiny zvierat v období prvej laktácie sa prvýkrát telili okolo štvrtého až piateho roku. Na druhej strane v skupine dojníc, ktoré mali ukončené dve a viac laktácií, sa nachádzali aj zvieratá, ktoré mali približne 4 roky, pričom priemerný vek tejto skupiny zvierat bol 5 rokov a 7 mesiacov (p≥0,05). To znamená, že u niektorých týchto zvierat z druhej skupiny mohol byť zaznamenaný výskyt subklinickej laminitídy už v období ich prvej laktácie, a to je aj dôvod prečo vek ako parameter v našej štúdií nemal výrazný štatistický význam. Výsledky našej práce poukazujú na relatívne vysokú incidenciu výskytu subklinickej laminitídy na farme dojníc (15,4 %), ktorá je predispozíciou pre vznik a výskyt iných ochorení paznechtov, a ktorá môže prechádzať do ireverzibilnej chronickej formy laminitídy, čím dochádza v významných ekonomických stratách v chovoch mliekového hovädzieho dobytku. Keďže výrazný výskyt subklinickej laminitídy bol práve u mladších dojníc (počas alebo po ukončení prvej laktácie), je dôležité sústrediť sa na minimalizáciu stresových faktorov u tejto skupiny, čo je podľa výsledkov tejto práce jeden z najvýznamnejších preventívnych aspektov ako znížiť výskyt subklinickej laminitídy.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Belge A, Bakir B. Subclinical laminitis in dairy cattle: 205 selected cases. *Turkish Journal of Veterinary Animal Science*. 2005; 29:9-15
- Bergsten C. Causes, risk factors and prevention of laminitis and related claw lesions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2003; 44
- Cook NB, Nordlund KV, Oetzel GR. Environmental influences on claw horn lesions associated with laminitis and subacute ruminal acidosis on dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:36-46
- Green LE. a kol. The impact of clinical lameness on the milk yield of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2002; 85:2250-2256
- Hoblet KH, Weiss W. Metabolic hoof horn disease. Claw horn disruption. *Veterinary Clinics of North America*. 2001; 17:111-127
- Mudroň P. Relationships between subclinical laminitis and sole ulcer in cows. *The Animal Biology*. 2020; 22:50-52
- Vermuntt JJ, Greenough PR. Predisposing factors of laminitis in cattle. *British Veterinary Journal*. 1994; 150:151-164
- Vermuntt JJ, Greenough PR. Sole haemorrhages in dairy heifers managed under different underfoot and environmental conditions. *British Veterinary Journal*. 1996; 152:57-73
- Thoenfer MB, Pollitt CC, Van Eps AW. Acute bovine laminitis: a new induction model using alimentary oligofructose overload. *Journal of Dairy Science*. 2004; 87:2932-2940

PRÍTOMNOSŤ TECHNOLOGICKY NEŽIADUCÍCH BAKTÉRIÍ A ICH VARIABILITA ZASTÚPENIA V RÔZNYCH DRUHOCH SUROVÉHO MLIIEKA

Hanzelová Z.¹, Dudriková E.¹, Lovayová V.², Výrostková J.¹, Regecová I.¹

¹Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF, Košice

²Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, LF, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Cieľom experimentu bolo štúdium baktérií v surovom mlieku rôznych druhov hospodárskych zvierat (kravské, ovčie a kozie), ktorých prítomnosť môže spôsobiť technologické problémy pri spracovaní mlieka. Vzorky boli odobraté v prevádzkach na výrobu syrov a kyslomliečnych výrobkov remeselným spôsobom v rôznych častiach celého Slovenska. Pozornosť štúdia bola zameraná na dve skupiny baktérií, a to zástupcov čeľade Enterobacteriaceae (radu Enterobacterales) a rodu *Enterococcus*. Počas experimentu bolo odobratých 13 bazénových vzoriek mlieka (kravské n=4, ovčie n=5 a kozie n=4) a pomocou metódy MALDI-TOF MS a PCR metódy boli tieto vzorky hodnotené. Boli stanovené počty baktérií v 1 ml vzorky mlieka a bola skúmaná účinnosť pasterizácie pred výrobou mliečnych výrobkov (syrov, kyslomliečnych výrobkov) v každej prevádzke. Počet baktérií zástupcov čeľade Enterobacteriaceae bol od 2,3 KTJ.ml⁻¹ log 10 do 6,24 KTJ.ml⁻¹ log 10 a počet baktérií z rodu *Enterococcus* bol v rozsahu od 2,3 KTJ.ml⁻¹ log 10 do 4,81 KTJ.ml⁻¹ log 10. Z rodu *Enterococcus* boli najviac zastúpené v 65,83 % *E. faecalis*, v 12,20% *E. hirae*, v 9,76 % *E. durans*, v 4,88% *E. malodoratus*. Z radu Enterobacterales bolo detegovaných v bazénových vzorkách mlieka 47,91% zástupcov čeľade Enterobacteriaceae, 43,75% Hafniaceae, 6,25% Yersiniaceae a 2,08% Erwiniaceae. Výsledok skúmania ukázal, že obe skupiny sledovaných baktérií sú bežnou súčasťou mikrobiocenózy surového mlieka nezávisle od jeho druhu.

ÚVOD

Mlieko je vhodné médium pre rast rôznych mikroorganizmov, pretože je bohaté na živiny, má vysoký obsah vody a neutrálne pH. Rápidny rast mikroorganizmov, konkrétne pri vysokých teplotách okolia, môže viesť k zmene zloženia mlieka ako aj k zmenám pri výrobe mliečnych výrobkov. Ako sumarizovali Chege a kol. (2016), surové mlieko by mohlo byť predmetom kontaminácie v rôznych miestach spracovania prostredníctvom procesov celého potravinového reťazca a z rôznych zdrojov.

MATERIÁL A METODIKA

Odber bazénových vzoriek surového mlieka (kravské, kozie, ovčie), ktoré bolo následne použité na výrobu syrov a kyslomliečnych výrobkov, bol realizovaný v prevádzkach v rôznych častiach Slovenska (západ, stred a východ). Zo všetkých bazénových vzoriek surového mlieka (n=13) boli pripravené desaťnásobné riedenia podľa ISO 6887-5. Následne bola vykonaná izolácia baktérií čeľade Enterobacteriaceae prostredníctvom normy na dôkaz a stanovenie ich počtu podľa STN ISO 21528 a izolácia baktérií rodu *Enterococcus* podľa Koreňová a kol. (2008). Typické kolónie v oboch skupinách baktérií z platní obsahujúcich 15 až 150 kolónií boli použité na ďalšie skúmanie a stanovenie počtu baktérií v 1 ml vzorky. Kolónie boli preočkované na povrch Columbia blood agaru (Oxoid, United Kingdom) a po inkubácii boli individuálne kolónie použité na identifikáciu pomocou metódy MALDI-TOF MS. Súčasne bola prevedená aj genotypová identifikácia na úrovni rodu *Enterococcus*. DNA bola izolovaná z enterokokových kmeňov podľa Hein a kol. (2005) a PCR metóda na identifikáciu rodu *Enterococcus* bola použitá podľa Ke a kol. (1999).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mikrobiálnym vyšetrením 13 bazénových vzoriek surového ovčieho (n=5), kravského (n=4) a kozieho mlieka n=4 bolo možné odobrať na ďalšie skúmanie 65 suspektných kolónií

enterokokov a z nich identifikáciou pomocou PCR metódy bolo potvrdených 43 izolátov patriacich do rodu *Enterococcus*. Následne bola prevedená identifikácia 41 izolátov pomocou MALDI-TOF MS metódy a bolo určených 6 druhov enterokokov. Najviac bol zastúpený v 65,83 % *E. faecalis* (27 izolátov vo všetkých druhoch mlieka), v 12,20% *E. hirae* (5 izolátov v ovčom a kozom mlieku), v 9,76 % *E. durans* (4 izoláty v ovčom mlieku), v 4,88% *E. malodoratus* (2 izoláty v kravskom a ovčom mlieku) a najmenej zastúpené boli *E. faecium* (1 izolát v ovčom mlieku), *E. casseliflavus* (1 izolát v kravskom mlieku) a *E. devriesii* (1 izolát v kravskom mlieku). Metódou MALDI-TOF MS bolo vyšetrených aj 56 suspektných kolónií enterobaktérií a z nich identifikovaných 48 izolátov patriacich radu Enterobacterales so zastúpením čeľadí Hafniaceae v 43,75% (21 izolátov v ovčom a kozom mlieku), Enterobacteriaceae v 47,91% (23 izolátov vo všetkých druhoch mlieka), Yersiniaceae v 6,25% (3 izoláty v ovčom mlieku), Erwiniaceae (1 izolát v kozom mlieku). V rámci čeľade Enterobacteriaceae bolo identifikovaných 23 izolátov patriacich do 6 druhov tejto čeľade, a to v najväčšom zastúpení 34,78% *Klebsiella oxytoca* (8 izolátov v kravskom, ovčom mlieku), rod *Enterobacter* v 26,09% (6 izolátov v kravskom a ovčom mlieku v druhovom zastúpení *E. cloacea*, *E. bugandii*, *E. cobei*), *Citrobacter gillenii* v 17,39% (4 izoláty iba v kravskom mlieku), *Lelliottia amnigena* v 13,04% (3 izoláty v kravskom a kozom mlieku) a najmenej *Raoultella ornitolytica* (1 izolát v ovčom mlieku) a *Buttiauxella gavinae* (1 izolát v ovčom mlieku). Ako je uvedené v Tabuľke 1, najväčšia rôznorodosť zástupcov radu Enterobacterales bola v dvoch bazénových vzorkách ovčieho mlieka a prítomnosť enterokokov najviac varíovala v dvoch bazénových vzorkách ovčieho mlieka a jednej bazénovej vzorke kozieho mlieka. Súčasťou štúdia prítomnosti technologicky nežiaducich baktérií z čeľade Enterobacteriaceae a rodu *Enterococcus* bolo aj stanovenie počtu týchto mikroorganizmov v 1 ml každej vyšetrovanej bazénovej vzorky, pričom zistený rozsah bol od 2,3 KTJ.ml⁻¹ log 10 do 6,24 KTJ.ml⁻¹ log 10 pri zástupcoch čeľade Enterobacteriaceae s najvyšším počtom baktérií v bazénovej vzorke kozieho mlieka. Počet baktérií z rodu *Enterococcus* bol v rozsahu od 2,3 KTJ.ml⁻¹ log 10 do 4,81 KTJ.ml⁻¹ log 10 s najvyšším počtom baktérií pri bazénovej vzorke kozieho mlieka. Taktiež boli mikrobiologicky sledované aj všetky vzorky mlieka (n=13) odobraté v prevádzkach po pasterizácii surového mlieka za účelom overenia účinnosti tepelného ošetrenia mlieka pred samotnou výrobou. Výsledok na prítomnosť sledovaných baktérií bol negatívny vo všetkých bazénových vzorkách mlieka. Cieľom tohto experimentu bolo zamerať pozornosť na dve skupiny baktérií, ktorých prítomnosť v surovom mlieku ako vstupnej surovine na výrobu mliečnych výrobkov, najmä pri jeho skladovaní pred spracovaním, môže metabolickou činnosťou týchto mikroorganizmov ovplyvniť kvalitatívne parametre surového mlieka, aj napriek tomu, že je následne tepelne ošetrené. Ďalšou dôležitou témou je prítomnosť týchto baktérií ako súčasť biofilmu v prevádzkach na spracovanie mlieka, a preto je otázka dezinfekcie povrchu zariadení, ktoré prichádzajú do kontaktu so surovým mliekom a následne so surovinou, ktorá sa ďalej spracúva (najmä malé prevádzky) tiež na mieste, to však nebolo cieľom tohto sledovania. Všeobecne sa v surovom mlieku vyskytuje vysoký počet baktérií mliečneho kvasenia. Najviac zastúpené sú druhy rodov *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*, ďalej je to niekoľko ďalších Gram-pozitívnych rodov, ako sú napríklad *Bacillus*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*. Gram-negatívne baktérie sú zastúpené rodmi *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* a *Chryseobacterium* (Tančinová a kol. 2017). V mlieku a mliečnych výrobkoch sa najčastejšie izolujú z čeľade Enterobacteriaceae nasledujúce rody: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Yersinia* a *Serratia*, z ktorých prevláda rod *Enterobacter*, a to tak v surovom mlieku ako aj v pasterizovanom mlieku. Koliformné baktérie majú v mliekarstve významné postavenie ako hygienický ukazovateľ, označujú sa ako indikátory mikrobiálneho znečistenia (Kim a kol. 2021). Yohan a kol. (2016) opísali, že prirodzená mikrobiota surového mlieka

bola vytvorená z mnohých bakteriálnych rodov, ale najdominantnejšie boli baktérie mliečného kvasenia a zástupcovia čeľade Enterobacteriaceae. Počas chladenia a skladovania mlieka pri nízkych teplotách (počas dlhšej doby) sa mení mikrobiálna populácia. Dominantné Gram-pozitívne baktérie sú nahrádzané Gram-negatívnymi baktériami a Gram-pozitívnymi psychrotrofnými baktériami (Quigly a kol. 2013). Tento experiment ukázal, že v surovom mlieku (kravské, ovčie, kozie) je možné zaznamenať aj prítomnosť enterokokových baktérií. Najčastejšie detegované druhy enterokokov v kravskom, ovčom a kozom mlieku sú *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* a/alebo *E. durans* (Lauková a kol. 2021). Vo všeobecnosti môžu mikroorganizmy kontaminovať surové mlieko dvomi cestami. Prvá cesta je endogénna kontaminácia, kde je mlieko kontaminované priamym prenosom z chorého zvierat'a. Druhá cesta, exogénna kontaminácia, kde je mlieko kontaminované počas alebo po dojení prostredníctvom féces, vonkajšími časťami vemena, ceckov, z prostredia, vybavenia, atď. Po procese výroby by malo byť všetko dobre vyčistené, pretože aj malé množstvo mlieka môže byť zdrojom živín pre baktérie čeľade Enterobacteriaceae (Freitas a kol. 2013) a ako ukázal aj tento experiment aj zástupcov rodu *Enterococcus*.

Bazénová vzorka	Zástupcovia radu Enterobacteriales	Bazénová vzorka	Zástupcovia rodu <i>Enterococcus</i>
Ovčie mlieko 1	<i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Buttiauxella gaviniae</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>	Kozie mlieko 1	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i>
Ovčie mlieko 2	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Citrobacter gillenii</i> , <i>Enterobacter cobei</i>	Ovčie mlieko 3	<i>E. faecalis</i> <i>E. hirae</i> <i>E. durans</i>
		Ovčie mlieko 4	<i>E. faecalis</i> <i>E. malodoratus</i> <i>E. durans</i>

Tab.1. Variabilita prítomnosti baktérií čeľade Enterobacteriales a rodu *Enterococcus* v bazénových vzorkách mlieka identifikované metódou MALDI-TOF SM

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Freitas R, et al. Microbiological safety of Minas Frescal Cheese (MFC) and tracking the contamination of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in MFC processing. *Foodborne Pathogens Dis.* 2013; 10: 951–955.
- Hein I, et al. Quantification of *Staphylococcus aureus* in unpasteurised bovine and caprine milk by real-time PCR. *Res. Microbiol.* 2005; 156: 554–563.
- Chege P, et al. Analysis of contamination points of milk through the whole value chain process and the quality of milk products in the dairy industry. *Food Quality Control.* 2016; Chapter 1: 3–13.
- Ke D, et al. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3497–3503.
- Kim JM, et al. Nucleic acid lateral flow assay for simultaneous detection of hygiene indicator bacteria. In *Anal Bioanal Chem.* 2021; 413: 5003–5011.
- Koreňová J, et al. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. *J. Food Nutr. Res.* 2008; 47: 100–104.
- Lauková A, et al. Slovak local ewe's milk lump cheese, a source of beneficial *Enterococcus durans* strain. *Foods.* 2021; 10: 3091.
- Quigly et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev.* 2013, 37: 664–98.
- Tančínová D, et al. *Mikrobiológia potravín.* Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2017, 239 s. ISBN 978-80-552-1642-3.
- Yohan Y, et al. Microbial benefits and risks of raw milk cheese *Food Control.* 2016; 63: 201–215.

KONDICIOVANÉ MÉDIUM Z KMEŇOVÝCH BUNIEK INDUKUJE DIFERENCIÁCIU A PRERASTANIE NEURITOV SH-SY5Y

Hudáková N.¹, Petroušková P.¹, Maloveská M.¹, Vozár, J.¹, Mudroňová D.², Čížková D.¹

¹Centrum experimentálnej a klinickej regeneračnej medicíny, UVLF v Košiciach

²Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Mezenchýmové kmeňové bunky (MSC) vylučujú veľké množstvo bioaktívnych molekúl a extracelulárnych vezikúl, označených ako kondiciované médium (MSC-CM), ktoré má významné parakrinné účinky na susedné bunky a tkanivá. V tejto štúdií sme hodnotili funkčný vplyv MSC-CM získaného z MSC z tukového tkaniva (AT-MSC-CM) a amniotickej membrány (AM-MSC-CM) na diferenciáciu a prerastanie neuritov na bunkách SH-SY5Y. Z našich dát vyplýva, že v skupinách AT-MSC-CM aj AM-MSC-CM bol zaznamenaný na SH-SY5Y signifikantne vyšší priemerný počet neuritov na bunku počas diferenciácie v porovnaní s kontrolnou DMEM skupinou, s tým, že pri skupine AT-MSC-CM bol tento počet vyšší dokonca aj ako v skupine štandardne diferencovanej pomocou kyseliny retinovej. Čo sa týka priemernej dĺžky neuritov v porovnaní s DMEM bola dĺžka neuritov v MSC-CM vyššia aj keď nie signifikantne. Naše výsledky zdôrazňujú, že aj po zohľadnení faktu, že každý zdroj MSC má svoje špecifiká súvisiace s ich terapeutickou účinnosťou, MSC-CM sa javí ako potenciálna terapeutická stratégia pre ochorenia postihujúce nervový systém.

ÚVOD

Mezenchýmové stromálne perivaskulárne bunky (MSC) sú multipotentné bunky so schopnosťou samoobnovy, ktoré sú adherentné k plastovým povrchom a majú regeneračný potenciál. Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu (ISCT) stanovila špecifické kritériá pre tieto bunky. Musia byť prilnavé k plastom, musia byť schopné diferenciácie na kosť, chrupavku a tukové tkanivo a exprimovať povrchové markery CD105, CD73 a CD90. Nesmú exprimovať CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 alfa alebo CD19 (Jovic a kol. 2022). MSC boli izolované z rôznych tkanív, v súčasnosti je kostná dreň (BM) najpoužívanejším zdrojom MSC v klinických štúdiách, po nej nasleduje pupočná šnúra (UC) a tukové tkanivo (AT) (Jovic a kol. 2022). Štúdie naznačujú, že pleiotropné účinky MSC nie sú spôsobené ich diferenciačnými schopnosťami, ale skôr sú sprostredkované uvoľňovaním rozpustných bioaktívnych molekúl (nazývaných aj kondiciované médium) (Yari a kol. 2022).

MATERIÁL A METODIKA

Príprava MSC-CM

Izolácia MSC pochádzajúcich z psieho tukového a amniotického tkaniva, ako aj kultivácia a charakterizácia MSC už boli publikované v našej predchádzajúcej práci (Humenik a kol., 2022). Kondiciované médium (CM) sme pripravili kultiváciou MSC v tretej pasáži po jednom premytí v sterilnom PBS a ich kultiváciou počas 24 hodín v DMEM High Glucose (DMEM HG, Sigma, USA) bez fetálneho bovinného séra (FBS), doplneného 2% antibioticko-antimykotickým roztokom penicilínu, streptomycínu a amfotericínu B (ATB/ATM). MSC-CM sme centrifugovali (300g, 7 min), prefiltrovali (0,22 µm) a uskladnili v mrazničke -80 °C na neskoršie použitie.

Diferenciácia SH-SY5Y na bunky podobné neurónom

Štandardná diferenciácia SH-SY5Y bola indukovaná nasledujúcim diferenciačným protokolom. Bunky SH-SY5Y (1×10^4 buniek/cm²) sme kultivovali v DMEM HG s 5 % FBS.

Po troch dňoch bolo médium vymenené za DMEM HG s 2 % FBS a 10 mM kyselinou all-trans-retinovou (RA; Sigma-Aldrich, USA, R2625) a kultúra pokračovala ďalších 5 dní. Bunky sme potom kultivovali ďalších 5 dní s použitím Neurobasal média (Gibco, USA) doplneného o neurotrofický faktor odvodený z mozgu (BDNF, 50 ng/ml, Thermo Fisher, USA).

Experimentálna neuronálna diferenciácia pomocou MSC-CM bola realizovaná na SH-SY5Y, ktoré sme kultivovali 5 dní v kondicionovanom médiu (AT-MSC-CM a AM-MSC-CM) s prídavkom 2 % FBS a 2 % ATB/ATM, nasledovala 5-dňová inkubácia v čerstvom MSC-CM s 2 % ATB/ATM. Bunky SH-SY5Y, ktoré boli indukované k diferenciácii na bunky podobné neurónom: i) štandardným diferenciačným protokolom prostredníctvom RA a BDNF a ii) MSC-CM, boli následne použité na analýzu prerastania neuritov.

Analýza prerastania neuritov

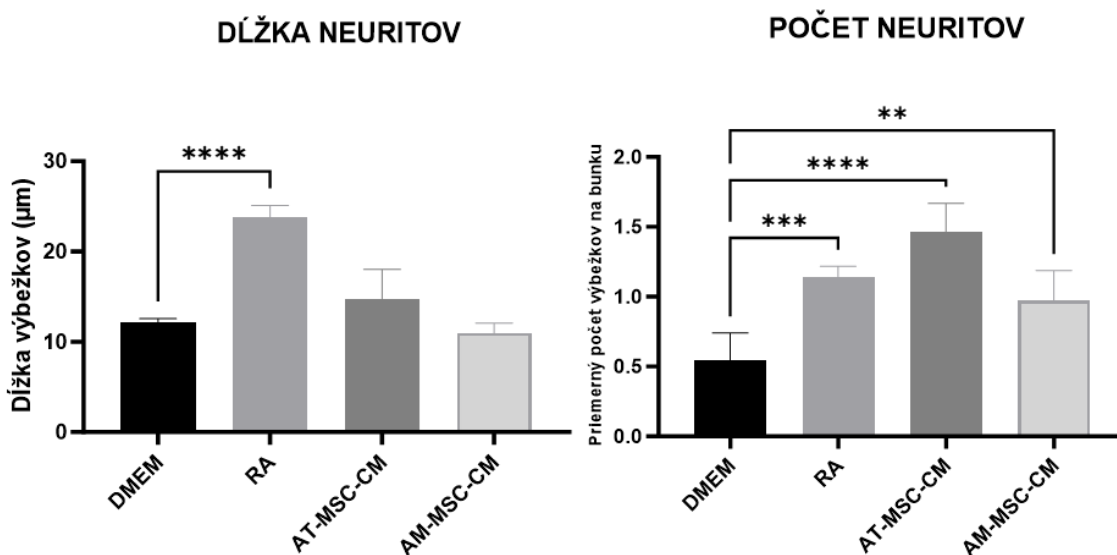
Na zachytenie obrázkov bunkových kultúr pre sledovanie charakteristík diferencovaných buniek sme použili invertovaný mikroskop Zeiss Axiovert 200 s objektívom 20X. Pod mikroskopom s fázovým kontrastom sme skúmali najmenej 50 buniek ($n = 50$) z piatich náhodne vybraných polí v každej experimentálnej skupine. Potom sme určili priemernú celkovú dĺžku neuritov a priemerný počet neuritov na bunku. Zodpovedajúcu dĺžku neuritov sme analyzovali pomocou bežného protokolu individuálneho označovania neuritov a manuálneho sledovania dĺžky výbežkov pomocou softvéru „Draw a measurement shape“ (Zen Core v3.1). Na stanovenie priemerného počtu neuritov na bunku sme najskôr manuálne spočítali počet buniek („Počet udalostí“) a označili zodpovedajúce výbežky pochádzajúce z buniek a štatisticky spracovali (ANOVA) na priemerný počet neuritov na bunku.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Motorické a senzorické funkcie sú často v dôsledku axonálneho poškodenia centrálného nervového systému narušené. V našom experimente sme skúmali, či pridanie MSC-CM do kultivácie neuroblastómovej bunkovej línie SH-SY5Y môže zlepšiť rast a diferenciáciu neuritov, keďže jednou z charakteristických vlastností SH-SY5Y je schopnosť diferenciácie na bunky s morfológiou podobnou neurónom (Gao a kol. 2010).

Aby sme preskúmali úlohu MSC-CM pri diferenciácii, porovnali sme bunky SH-SY5Y kultivované s kyselinou all-trans retinovou (RA) a BDNF, ktoré slúžia ako štandardný diferenciačný postup s experimentálnou diferenciáciou navodenou inkubáciou buniek SH-SY5Y s rôznymi MSC-CM (AT-MSC-CM, AM-MSC-CM). Kvantitatívne sme vyhodnotili účinky MSC-CM na rast neurónov stanovením priemerných dĺžok neuritov a priemerného počtu neuritov na bunku v skupinách MSC-CM, DMEM kontrolnej skupine (SH-SY5Y kultivované v DMEM) a RA diferenciačnej skupine (SH-SY5Y kultivované v DMEM s RA). Ako je znázornené na Obr. 1, čo sa týka dĺžky výbežkov, dlhšie neurity sme zaznamenali v skupine AT-MSC-CM, no bez štatistickej významnosti v porovnaní s DMEM (kontrola). Na druhej strane, pri hodnotení aktivity podporujúcej regeneráciu neuritov sme sa zamerali aj na to, či MSC-CM ovplyvňuje tvorbu nových neuritov (priemerný počet neuritov na bunku). Naše údaje ukazujú, že použitie oboch MSC-CM viedlo k výrazne vyššiemu počtu neuritov pri SH-SY5Y, pričom najviac neuritov na bunku bolo pozorovaných v skupine AT-MSC-CM (**** $p < 0,0001$), dokonca viac ako v kontrolnej RA (diferenciačná skupina, *** $p < 0,001$), po ktorej nasledovala skupina AM-MSC-CM (** $p < 0,01$) (Obr. 1). Celkovo tieto výsledky naznačujú diferenciačný potenciál MSC-CM na tvorbu buniek podobných neurónom, ako aj aktivitu podporujúcu vznik nových neuritov. Podľa autorov tieto schopnosti možno pripísať neurotrofickým faktorom (NTF), ako je napríklad neurotrofický faktor odvodený od gliových buniek (GDNF), nervový rastový faktor (NGF) a BDNF (Yari a kol. 2022). S ďalšími podrobnými analýzami sekretómov náš výskum prispieva k lepšiemu pochopeniu obsahu

MSC-CM, čo je mimoriadne dôležité pre kondicionované médiá ako potenciálne terapeutické nástroje v klinickej praxi pri liečbe mnohých chorôb.



Obr. 1. Kvantitatívne analýzy priemernej dĺžky neuritov a priemerného počtu neuritov na bunku v rôznych experimentálnych skupinách. V porovnaní s kontrolnou skupinou (SH-SY5Y v DMEM s ATB/ATM) bol vo všetkých skupinách kondicionovaných médií a v skupine, kde bola použitá kyselina retinová, štatisticky zvýšený počet neuritov na bunku. Výsledky ANOVA pomocou softvéru GraphPad Prism sú prezentované ako priemer ± štandardná odchýlka (SD) (* označuje $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, čo znamená štatisticky významný rozdiel).

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gao X, et al. Progranulin promotes neurite outgrowth and neuronal differentiation by regulating GSK-3 β . *Protein Cell.* 2010;1:552–562.
- Humenik F, et al. A Comparative Study of Canine Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Sources. *Animals.* 2022; 12:1502.
- Jovic D, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev and Rep* 2022;18:1525–1545.
- Yari H, et al. Emerging role of mesenchymal stromal cells (MSCs)-derived exosome in neurodegeneration-associated conditions: a groundbreaking cell-free approach. *Stem Cell Research & Therapy.* 2022; 13:423.

SLEDOVANIE PROCESU BIODEGRADÁCIE BIOMATERIÁLU

Korim F., Vdoviaková K.

Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Biodegradácia materiálu je jedným z kľúčových faktorov v regeneračnej medicíne defektov kostného tkaniva. V súčasnosti existuje mnoho materiálov, ktoré sa líšia svojimi biodegradačnými, osteoinduktívnymi a osteokonduktívnymi vlastnosťami. V našej pilotnej štúdií sme sledovali dynamiku degradácie kalcium fosfátového materiálu a tvorbu nového kostného tkaniva v artifiálnych defektoch *tuberositas tibiae* v 2., 4. a 10. týždni po implantácii materiálu. Na základe vyšetrenia počítačovou tomografiou a štandardným prehľadovým farbením hematoxylin – eozín môžeme konštatovať plynulú regeneráciu a tvorbu plnohodnotného kostného tkaniva do 10. týždňa po implantácii. Sledovanie dynamiky môže prispieť k novým informáciám tykajúcich sa procesu biodegradácie a regenerácie kostného tkaniva.

ÚVOD

Etiológia kostných defektov je široká, od rôznych traum, neoplázií, infekcií, degeneratívnych zmien, metabolických ochorení až kongenitálnych chorôb a malformácií. Hojenie kostného tkaniva je komplexný fyziologický proces zahrňajúci množstvo mechanizmov na tkanivovej, bunecnej a molekulárnej úrovni. Z hľadiska dynamiky je regenerácia kostného tkaniva pomalý proces, a to ho odlišuje od hojenia mäkkých tkanív (Einhorn a kol., 2015; Pawlina a Ross, 2018; Chaurasia a kol., 2019). Jedny z najčastejšie používaných materiálov v regeneračnej medicíne sú kalcium fosfáty. Kalcium fosfáty majú chemické a fyzikálne vlastnosti podobné fyziologickej kosti a majú dobrú schopnosť osteogénnej stimulácie mezenchýmových kmeňových buniek kostnej drene. (Liu a kol., 2010; Bose a Tarafder 2012; Jeong a kol., 2019). Biodegradácia je jedným z kľúčových faktorov pre výber vhodného materiálu, ktorý bude určený pre použitie v regeneračnej medicíne kostného tkaniva. V organizme prebieha biodegradácia viacerými mechanizmami ako sú rozpúšťanie, enzymatická degradácia a fagocytóza. Degradačné produkty materiálov stimulujú žiadnu alebo len miernu imunitnú reakciu organizmu, avšak v niektorých prípadoch priamo podporujú regeneráciu kosti. Degradačné produkty sú kontinuálne absorbované alebo vylučované do/z tkaniva/materiálu (najmä počas jeho vrastania do tkaniva) a regenerované kostné tkanivo úplne nahradí implantovaný materiál, pričom po regenerácii kosti nezostane v tele žiadny zvyškový materiál (Liu a kol., 2023). Cieľom našej pilotnej práce bolo sledovať dynamiku reparačných zmien po implantácii kalcium fosfátového materiálu v nami zvolených intervaloch.

MATERIÁL A METODIKA

Pilotný pokus bol vykonaný na 3 svinách domácich (2 prasnice, 1 kanec) plemena Slovenská ušľachtilá biela priemerného veku 6 mesiacov a hmotnosti 80 – 90 kg. Cirkulárny kostný defekt ($\varnothing = 10$ mm) hlboký 10 mm bol vytvorený v oblasti *tuberositas tibiae* holennej kosti. Vytvorené defekty boli vyplnené tatrakalcium fosfát/monenitovým materiálom. Po uplynutí pozorovacej periódy boli svine humánne utratené v hlbokkej anestézii pomocou embutramidu (T61) na 2., 4. a 10. týždeň po implantácii materiálu. Ihneď po eutanázii boli končatiny disartikulované a podrobené vyšetreniu počítačovou tomografiou (CT – Philips Brilliance) a histopatologickým vyšetrením. Reprezentatívne vzorky kostného tkaniva boli štandardne fixované 4% pufrovaným formalínom, dekalifikované v EDTA, zaliate do parafínu, narezané na 5 – 7 μ m rezy a ofarbené klasickým prehľadným farbením hematoxylin – eozín.

Degradáciu materiálu a novotvorbu kostného tkaniva sme sledovali pomocou svetelného mikroskopu Olympus CX 43.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe vyšetrenia CT môžeme konštatovať postupnú biodegradáciu kalcium fosfatového materiálu. Materiál bol prítomný vo všetkých týždňoch hojenia a mal denzitu približne 1 500 HU (Hounsfield Unit). Druhý týždeň po implantácii bol typický pre prítomnosť skvapalneného eozinofilne sa farbiaceho obsahu. Rovnako bolo možné v histologickom reze pozorovať prítomnosť na fibrocyty a fibroblasty bohatého väziva a výraznú aktiváciu kostnej drene reziduálnej pôvodnej kosti. Od štvrtého týždňa prebiehala slabá osteogenezá, degradácia materiálu, angiogenéza a tvorba fibrozného kalusu, ktorý je bohatý na cievy. Po okrajoch materiálu sa zobrazovalo pravdepodobne *de novo* vytvorené kostné tkanivo s minerálnou denzitou 500 – 600 HU. Po 2,5 mesiacoch od implantácie materiálu (10. týždeň) sme pozorovali takmer polovičnú degradáciu materiálu s približne 25% vytvoreným novým kostným tkanivom, ktoré je v kontakte s pôvodným kostným tkanivom, ale aj implantovaným materiálom. V histologickom obraze pozorujeme desmogénnu osifikáciu, chondrogénnu osifikáciu a minimálne množstvá kolegénového väziva. Prítomné boli oba typy kostného tkaniva – vláknité kostné tkanivo svedčiace o procese tvorby nového kostného tkaniva a lamelárne (dospelé) kostné tkanivo. Podobná štúdia bola realizovaná Bou Assaf a kol., (2019), kde skúmali efekt rôznych možností terapie kostných defektov stehennej kosti u sviň domácich. Ako jeden z materiálov použili aj kalcium fosfát (hydroxyapatit a β – trikalcium fosfát). Tento materiál podobne ako u nás v druhom týždni nestimuloval žiadnu osteogenezu a vykazoval tvorbu kalusu. Avšak, v štvrtom týždni autori podobne ako my pozorovali miernu osteogenezu. Kombinácia kalcium fosfátových materiálov preukázala zvýšenú expresiu pre osteogénne markery ako RUNX-2, ON, OCN, OPN, ALP a COL1 (Bou Assaf a kol., 2019). Monenit ako jeden zo zástupcov kalcium fosfátov má dobré degradačné vlastnosti a bol študovaný v experimente kraniofaciálnych defektov u králikov. Avšak, iba 43% objemu defektu bolo vyplnené kostným tkanivom (Torres a kol., 2015). Je zaujímavé, že v prípade komerčného apatitového cementu dochádzalo k jeho degradácii v kostných defektov ramennej a stehennej kosti u oviec, ale nedochádzalo k plnohodnotnej tvorbe kostného tkaniva. Kostné tkanivo bolo vytvorené iba po okrajoch kostného defektu a to aj po 6. mesiacoch po implantácii (Apelt a kol., 2004; von Rechenberg a kol., 2013). Je nutné podotknúť, že každý materiál má svoju charakteristickú dobu degradácie, ktorá závisí od fyzikálno-chemických reakcií a bunkových mechanizmov organizmu (Liu a kol., 2023). Pre ďalšie pochopenie procesu biodegradácie a tvorby nového kostného tkaniva v mieste implantácie je nutné vykonať ešte mnoho podobných experimentálnych štúdií s väčším počtom zvierat a materiálov.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom APVV (APPV - 20-0184).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Apelt D, et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2004; 25:1439-51.
- Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater*. 2012; 8:1401-21.
- Bou Assaf R, et al. Healing of Bone Defects in Pig's Femur Using Mesenchymal Cells Originated from the Sinus Membrane with Different Scaffolds. *Stem Cells Int*. 2019; 30:4185942.
- Chaurasia A, et al. Evaluation of haemato-biochemical parameters using different biomaterials in fracture healing of dogs. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2019; 8:2265-71.
- Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol*. 2015; 11:45-4.

- Jeong J, et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019; 14:23.
- Liu H, et al. β -Tricalcium phosphate nanoparticles adhered carbon nanofibrous membrane for human osteoblasts cell culture. *Materials Letters.* 2010; 64:725-8.
- Liu D, et al. Biodegradable Cements for Bone Regeneration. *J Funct Biomater.* 2023;14:134.
- Pawlina W, Ross MH. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology* 8th Edition. Philadelphia, LWW. 2018; 1072 s.
- von Rechenberg B, et al. Evaluation of four biodegradable, injectable bone cements in an experimental drill hole model in sheep. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013; 85:130-8.
- Torres J, et al. Monetite granules versus particulate autologous bone in bone regeneration. *Ann Anat.* 2015; 200:126-33.

ÚČINOK KOMBINOVANEJ TERAPIE PRI LIEČBE TRAUMATICKÉHO POŠKODENIA MIECHY

Magurová M., Bačová M., Gálik J.
Neurobiologický ústav, BMC SAV, v.v.i.

ABSTRAKT

Vzhľadom na nedostatočnú plasticitu a obmedzenú regeneračnú schopnosť centrálného nervového systému je obnova nervových funkcií po traumatickom poškodení miechy zriedkavá. Vedecké a lekárske tímy za posledných niekoľko desaťročí uskutočnili rozsiahly výskum regeneračných stratégií založených na patofyziológii traumy miechy pre zlepšenie neuronálnych funkcií. V našej práci uvádzame predbežné výsledky projektu, ktorého náplňou je kombinovaná terapia pozostávajúca z aplikácie exogénneho elektrického poľa cez miesto poškodenia v kombinácii s podávaním protizápalového liečiva atorvastatínu. Počas priebehu experimentu sme pozorovali proteínové zmeny, a prostredníctvom histologickej analýzy sme uviedli priemerné hodnoty zachovaného tkaniva v 4 skupinách 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 bolo 7 dní po kompresii v kombinácii s elektrickou stimuláciou podávané protizápalové liečivo atorvastatín (ATR) (OFS+SCI+ATR, nOFS+SCI+ATR). Proteínová analýza ukázala, že podávanie atorvastatínu v kombinácii s OF stimuláciou malo synergický účinok na hladinu proteínov pre astrocyty (GFAP). Hladina proteínov pre zrelé oligodendrocyty (PLP1) doposiaľ nepotvrdila synergický účinok OF stimulácie s podávaním ATR. Na základe histologickej analýzy môžeme konštatovať, že v skupinách (OFS+SCI, OFS+SCI+ATR) bolo vyššie percento zachovaného tkaniva v porovnaní so skupinami zvierat, ktoré boli po poškodení miechy bez stimulácie (nOFS+SCI, nOFS+SCI+ATR).

ÚVOD

Patofyziológia poškodenia miechy pozostáva zo vzájomne súvisiacich udalostí rozdelených do dvoch fáz. Primárne poškodenie nastáva kompresiou miechy tlakom úlomkov kostí, mäkkého tkaniva a/alebo mechanickým inzultom prostredníctvom cudzích predmetov (Wang a kol. 2021). Po iniciačnom poranení nasleduje kaskáda procesov, označená aj ako sekundárne poškodenie. Sekundárne poškodenie zahŕňa biochemické a celulárne procesy, medzi ktoré radíme abnormality elektrolytov, tvorbu voľných radikálov, zmeny vaskulatury, edém, zápalovú reakciu, apoptózu alebo geneticky programovanú bunkovú smrť a ďalšie procesy (Ambrozaitis a kol. 2006)

Vedecké a lekárske tímy za posledných niekoľko desaťročí uskutočnili rozsiahly výskum regeneračných stratégií pre zlepšenie neuronálnych funkcií. To viedlo k úsiliu zameranému na vývoj farmakologickej liečby SCI s cieľom znížiť poškodenie neurónov a napraviť ich funkcie (Hu a kol. 2016). Farmakologická terapia zahŕňa neuroprotektívne liečivá s cieľom obmedziť poškodenie neurónov po akútnej SCI, a neuroregeneračnú liečbu, ktorej snahou je podpora regenerácie neurónov (Baroncini a kol. 2021).

Medzi súčasné liečebné postupy zamerané na zlepšenie funkčného stavu po poškodení patrí aj elektrostimulačná stratégia, ktorej cieľom je obnova prenosu nervového signálu (tvorba alternatívnych nervových dráh alebo regenerácia axónov) (Schuhfried a kol. 2012). Jednosmerné elektrické pole stimuluje prerastanie axónov iba jedným smerom, a potláča rast v opačnom. Avšak pre celkovú obnovu senzorických aj motorických funkcií (ascendentné a descendentné nervové vlákna) je potrebné, aby poškodené axóny súčasne prerastali kraniálnym aj kaudálnym smerom. Na to bol navrhnutý princíp oscilujúceho elektrického poľa (OFS – oscillating field stimulation), ktorého cieľom je podporovať prerastanie axónov cez miesto lézie v mieche oboma smermi (McGinnis a Murphy 1992, McCaig 1987, Borgens a kol.1993). Vývoj regeneračných terapií na liečbu neurologického deficitu

predstavuje aktívnu a rýchlo sa rozvíjajúcu oblasť výskumu. Zlepšenie klinických výsledkov možno dosiahnuť s využitím potenciálu pokrokov v rôznych oblastiach a ich integráciou s cieľom vytvoriť inovatívne terapeutické stratégie (Ashammakhi a kol. 2019, Zhang a kol. 2020).

MATERIÁL A METODIKA

Na experiment bolo použitých celkovo 28 experimentálnych potkanov (dospelé samice, 250-300 g, kmeň Wistar). Chirurgický zákrok prebiehal v celkovej inhalačnej anestézii (isoflurane 2 - 4% v 1,5-2,0 l/min vzduchu). Počas zákroku bol zvieratám odhalený 9 hrudníkový stavec (Th 9), a následne bola vykonaná laminektómia. Okrem hlavnej laminektómie boli vykonané dve malé laminektómie pre umiestnenie elektród, dva segmenty kraniálne a kaudálne od miesta lézie. Traumatické poškodenie miechy bolo navodené pomocou kompresného zariadenia s plastovým impaktorom s hmotnosťou 40 g počas doby 15 minút. Ihneď po vyvolaní traumy bol zvieratám subkutánne implantovaný miniatúrny elektrický stimulátor (50 μ A) vyvinutý na našom pracovisku (Bačová a kol. 2019). K stimulátoru boli pripojené dve inertné elektródy (Ir/Pt), ktoré boli zavedené do epidurálneho priestoru cez laminektómie kraniálne a kaudálne od oblasti lézie. Stimulátor bol pred implantáciou zaliaty do elektroizolačného biokompatibilného silikonového materiálu (Duosil Express, SHERA). Polarita stimulátora sa menila každých 15 minút po dobu 6 týždňov. Experimentálne zvieratá boli náhodne rozdelené do 4 skupín: zvieratá s Th 9 kompresiou (SCI) s implantovaným funkčným stimulátorom (SCI+OFS, n = 7), zvieratá so SCI s implantovaným nefunkčným stimulátorom (SCI+nOFS, n = 7), a dve skupiny zvierat so SCI, ktorým okrem implantácie stimulátora bol podávaný atorvastatín (ATR, 5 mg/kg, i.p) na zmiernenie zápalovej odpovede 7 dní od kompresie (OFS+SCI+ATR, n = 7, nOFS+SCI+ATR, n = 7). Zvieratá po zákroku prežívali 6 týždňov. Počas doby prežívania bol pravidelne monitorovaný zdravotný stav a váha zvierat. Experimentálne zvieratá boli humánne usmrtené dekapitáciou a odobraté tkanivo (Th 7 – Th 11) bolo spracované a použité na Western Blot analýzu. Pre histologické spracovanie tkaniva boli zvieratá usmrtené transkardiálnym preplachom (300 ml fyziologický roztok, 300 ml 4% paraformaldehyd). Jednotlivé miechové segmenty (Th7-Th11) boli nakrájané na kryostate (Leica CM1850) na priečne rezy (25 μ m) a ofarbené pomocou Luxol Fast Blue/Cresyl Violet histologickej metodiky. Pokus bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, Č. záznamu 4148/2021 - 220, dňa 3.5.2021.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe doterajších výsledkov a pozorovaní môžeme potvrdiť, že implantácia OF stimulátora je bezpečná metóda, ktorá môže prispieť ku regenerácii a funkčnej obnove poškodeného miechového tkaniva (Bačová a kol. 2019). Samotná implantácia u zvierat nespôsobovala obmedzenia. Počas 6 týždňového prežívania sme v skupinách zvierat so SCI, ktorým bol implantovaný nefunkčný elektrický stimulátor (nOFS+SCI, nOFS+SCI+ATR) pozorovali vyššiu stratu hmotnosti a oneskorený nástup mikcie v porovnaní so skupinami, kde bol podkožne implantovaný funkčný stimulátor (OFS+SCI, OFS+SCI+ATR).

Histologická analýza ukázala, že poškodenie miechy kompresným modelom viedlo k úbytku bielej hmoty a ku tvorbe drobných kavít v oblasti bielej aj sivej hmoty. Celková plocha zachovaného tkaniva bola v rámci experimentálnych skupín OFS+SCI, OFS+SCI+ATR väčšia, predovšetkým v kaudálnych segmentoch (priemerné hodnoty OFS+SCI: Th10 - 92,56%, Th11 - 97,23%; OFS+SCI+ATR: Th10 - 94,76%, Th11 - 96,13%) v porovnaní s

experimentálnymi skupinami nOFS+SCI a nOFS+SCI+ATR (priemerné hodnoty nOFS+SCI: Th10 - 80,88%, Th11 - 93,33%; nOFS+SCI+ATR: Th10 - 84,93%, Th11 - 89,59%).

Pomocou metódy Western Blot sme analyzovali hladiny proteínov pre astrocyty (GFAP) a zrelé oligodendrocyty (PLP1). Podávanie protizápalového liečiva pôsobilo neuroprotektívne aj v kombinácii s elektrickou stimuláciou. Hladina GFAP proteínu sa znížila v skupine OFS+SCI+ATR viac, ako v ostatných skupinách, kde bol postupne zaznamenaný nárast optickej denzity vo všetkých miechových segmentoch v poradí OFS+SCI, nOFS+SCI+ATR a nakoniec nOFS+SCI.

V prípade PLP1 proteínu sme zaznamenali zvýšenú hladinu v skupine OFS+SCI, v porovnaní s ostatnými experimentálnymi skupinami, hlavne v tých, kde bol podávaný atorvastatín došlo ku poklesu jeho expresie (OFS+SCI+ATR, nOFS+SCI+ATR, nOFS+SCI). Potvrdil sa tak pozitívny účinok elektrickej stimulácie, avšak vzhľadom na to, že za fyziologických podmienok je tento proteín asociovaný s cholesterolom, je pravdepodobné, že v tomto prípade podávanie atorvastatínu potlačilo expresiu PLP1 proteínu.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0098/20 a doktgrantom 2022 – APP0405.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ambrozaitis KV, et al. Pathophysiology of acute spinal cord injury. *Medicina (Kaunas)*. 2006; 42 (3):255-261.
- Ashammakhi N, et al. Regenerative Therapies for spinal cord injury. *Tissue Eng*. 2019; 25 (6):471 – 491.
- 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.
- Baroncini A, et al. Pharmacological management of secondary spinal cord injury. *Expert Opin Pharmacotherp*. 2021; 22 (13):1793 – 1800.
- Borgens RB, et al. Effects of applied electric fields on clinical cases of complete paraplegia in dogs. *J. Restor. Neurol. Neurosci*. 1993; 5: 305 – 322.
- Hu HZ, Granger N, Jeffery ND. Pathophysiology, clinical importance, and management of neurogenic lower urinary tract dysfunction caused by suprasacral spinal cord injury. *J Vet Intern Med*. 2016; 30: 1575 – 1588.
- 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.
- Schuhfried O, et al. 2012. Non-invasive neuromuscular electrical stimulation in patients with central nervous system lesions: an educational review. *J Rehabil Med*. 2012; 44: 99 – 105.
- Wang TY, et al. Management of Acute Traumatic Spinal Cord Injury: A Review of the Literature. *Front. Surg*. 2021; 8 (698736): 1-15.
- Zhang YI, et al. Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention (Review). *Mol. Med. Rep*. 2020; 23 (417):1 – 18.

KONŠTRUKCIA KNIŽNICE CDR3 VOČI ZÁPADONÍLSKEMU VÍRUSU

Maľarik T.¹, Bhide K.¹, Kulkarni A.^{1,2}, Jozefiaková J.¹, Talpašová L.¹, James K.², Čurlík J.³, Bhide M.^{1,2}

¹Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

²Neuroimunologický ústav, SAV, v.v.i., Bratislava

³Katedra chovu a chorôb zveri, rýb a včiel, ekológie a kynológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Flavivírusy (čľaď *Flaviviridae*) sú neurotropné patogény prenášané článkonožcami. Sú to vírusy s jednovláknovou pozitívne orientovanou RNA (11kb), ktoré spôsobujú infekcie u ľuďa a zvierat. Niektoré z nich majú celosvetový výskyt a ročne infikujú viac ako 400 miliónov ľuďa (Gul a kol., 2022). Viac ako štvrtina celosvetovej populácie žije v lokalitách, kde sú tieto vírusy endemické. Medzi tieto vírusy patrí aj západonílsky vírus (West Nile virus, WNV). Neurologické komplikácie, ktoré môže spôsobiť, je ťažké liečiť z dôvodu vysoko selektívnej permeabilnej hematoencefalickej bariéry (HEB). Túto bariéru je WNV schopný prekonať pomocou domény III obalového glykoproteínu E, ktorou adheruje na špecifické receptory buniek. Pre vytvorenie protilátok voči WNV schopných prechádzať cez HEB bola vytvorená CDR3-E. coli knižnica, ktorá obsahovala sekvencie komplementárnej oblasti 3 (CDR3) nanoprotilátok získaných z krvi lamy krotkej (*Lama glama*) imunizovanej rekombinantnou DIII (rDIII) E proteínu WNV. Na zostavenie tejto knižnice bola použitá cDNA získaná prepisom mRNA izolovanej z leukocytov. Ďalej bola z tejto knižnice zostavená CDR3-fágová knižnica, ktorá slúžila na selekciu interagujúcich fágov s inaktivovaným WNV pomocou 3 kôl „biopanningu“. Diverzita 90% v rámci CDR3 sekvencií a špecifickosť získaných fágov exprimujúcich CDR3 peptidy sú predpokladom pre produkciu neutralizujúcich CDR3 peptidov voči WNV.

ÚVOD

Medzi celosvetovo rozšírené flavivírusy patrí západonílsky vírus (West Nile virus, WNV), ktorý je prenášaný komármi rodu *Culex*. Spôsobuje ochorenie podobné chrípke, ktoré môžu prejsť až do encefalitídy alebo meningitídy. Mechanizmus infekcie spočíva v priamej infekcií neurónov najmä v oblasti sivej hmoty mozgu, hlbokých jadier, mozgového kmeňa a miechy. Okrem spomínaných encefalitíd a meningitíd môže poškodenie okolitých nervov spôsobovať dokonca paralýzy (Hayesa kol., 2005). Štruktúra genómu WNV je podobná ako u ostatných flavivírusov. +ssRNA genóm pozostáva z 3 génov kódujúcich štruktúrne proteíny a 7 génov kódujúcich neštruktúrne proteíny. Celý genóm predstavuje 11 kb a prekladá sa vo forme polyproteínu, ktorý je ďalej štiepený proteázami na funkčné proteíny. K štruktúrnym proteínom patria: C- kapsidový proteín, prM- membránový proteín (jeho zrelá forma je M proteín) a E- obalový glykoproteín. Základnou vlastnosťou WNV, ako aj iných flavivírusov, je prechod cez hematoencefalickú bariéru (HEB) (Diamond a Klein, 2004). K tomuto prechodu je potrebný obalový E glykoproteín, ktorý pozostáva z 3 domén: DI, DII a DIII a z 2 transmembránových domén TM1 a TM2, ktoré sú spojené s D doménami cez kmeňovú oblasť, tzv. „stem region“ (Zhang a kol., 2017). Naviazanie sa vírusu na receptor bunky zabezpečuje DIII doména, ktorá sprostredkuje prechod cez HEB (Mertinková a kol., 2020). Nanoprotilátky, označované aj ako VHH, sú variabilné domény vyskytujúce sa u jednoreťazcových protilátok tvorených iba ťažkými reťazcami. Ide o špecifický typ protilátok produkovaných iba u niektorých zvierat, ako sú jedince čľaďe *Camelidae* (VHH) a chrupavkovité ryby triedy Chondroichtyes (VNAR). Samotné domény VHH majú unikátne vlastnosti a to najmä schopnosť zachovať si plnú väzbovú kapacitu aj v neprítomnosti ostatných domén. Štruktúra VHH pozostáva zo 4 konzervovaných rámcov (FR 1-4) a 3 variabilných, komplementaritu determinujúcich oblastí (CDR 1-3). Oblasť CDR3 má najväčšiu diverzitu aminokyselín a zároveň ide o najdlhšiu variabilnú doménu VHH,

ktorá plní dominantnú úlohu pri väzbe nanoprotilátok s antigénmi (Breine a kol., 2023). Na základe využitia techník fágového displeja je množné selektovať špecifické VHH, prípadne CDR3 voči želaným antigénom (Xu a kol., 2022). Naším cieľom bola konštrukcia CDR3 peptidov so štruktúrnym motívom Cys-CDR3-Cys za účelom blokovania DIII domény E proteínu WNV a zabráneniu prechodu cez HEB.

MATERIÁL A METODIKA

Pre získanie týchto nanoprotilátok bola lama krotká (*Lama glama*) imunizovaná s rekombinantnou DIII (rDIII) WNV (strain goshawk-Hungary/04, DQ116961) (Mertinková a kol., 2020). Po 3 „booster“ dávkach bola odobratá krv, z ktorej boli izolované B-lymfocyty. mRNA izolovaná z lymfocytov bola reverzne prepísaná do cDNA pomocou random hexamérov (Sigma-Aldrich, USA) a RevertAid H minus Reverse Transcriptase (ThermoScientific, USA). Sekvencia CDR3 (150 bp) oblasti bola amplifikovaná s použitím degenerovaných primerov s prítomnosťou špecifických reštrikčných miest (*NcoI*_C/CATGG a *NotI*_GC/GGCCG). Purifikovaný PCR produkt bol ligovaný pomocou T4 DNA Ligase (ThermoScientific, USA) do fagemidu pSEX81 (Progen, Nemecko) a elektroporovaný do *E. coli* XL1-blue za účelom vytvorenia CDR3- *E. coli* knižnice. Celkovo bolo vykonaných 15 elektroporácií. Rast *E. coli* klonov prebehol na kultivačnej platni s 2xTY kultivačným médiom obsahujúcim 1% roztok glukózy pri 37°C celú noc. Pre selekciu klonov bol pridaný karbenicilín o koncentrácii 1 µg/100 ml. Pre separáciu klonov bolo z CDR3-*E. coli* knižnice odobratých 10 µl a inokulovaných na kultivačnú platňu s 2xTY kultivačným médiom pri 37°C, 12 hodín. Zvyšok knižnice bol konzervovaný v 50% glycerole a uskladnený v -80°C. DNA z jednotlivých klonov bola izolovaná a sekvenovaná s využitím fagemidovo špecifických primerov. Následne bola CDR3-*E. coli* knižnica infikovaná hyperfágom M13 K07 ΔpIII (Progen, Nemecko), pre získanie CDR3-fágovej knižnice. Uvoľnené fágy boli precipitované pomocou PEG-NaCl. Takto získané fágy boli využité na „biopanning“ voči inaktivovanému WNV (lína 2), pre selekciu špecifických väzobných klonov. Biopanning prebiehal v 3 kolách. Po poslednom kole boli získané fágy otestované pomocou ELISA pre overenie špecifickej väzby aj s rDIII WNV. Interakcia bola meraná pri 450 nm vďaka použitiu sekundárnej protilátky značenej chrenovou peroxidázou. Negatívne kontroly zahrňali fágy v „coating“ pufri, DIII s primárnou protilátkou anti-M13 bez prítomnosti fágov a fágy s DIII bez použitia primárnej protilátky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

CDR3-*E. coli* knižnica o veľkosti $1,1 \times 10^{10}$ bola sekvenovaná a bolo vybraných 30 klonov. Sekvencie boli analyzované a upravené v programe GeneiousPro, pričom bola zostavená dištančná matrica reprezentujúca podobnosť porovnávaných sekvencií s využitím „neighbour-joining“ metódy. Z analyzovaných 30 sekvencií bolo 27 unikátnych, čo značí 90% diverzitu v rámci testovaných CDR3 sekvencií. Po vytvorení CDR3-fágovej knižnice bola jej veľkosť vypočítaná ako $1,61 \times 10^{12}$. ELISA preukázala špecifickosť väzby na DIII domény E proteínu WNV s hodnotou absorbancie 0,95. ELISA testom boli potvrdené špecifické väzbové interakcie selektovaných fágov exprimujúce CDR3 peptidy. Po overení diverzity CDR3 sekvencií a špecifickosti získaných fágov, budú tieto fágy podrobené izolácií jednovláknovej DNA denaturačným protokolom a klonovaniu do expresného vektora za účelom produkcie funkčných CDR3 peptidov. Takto funkčné peptidy by mohli slúžiť ako súčasť terapie, prípadne profylaxie ochorení CNS spôsobených WNV. Syntetizované peptidy odvodené od CDR3 oblastí sú schopné interagovať s antigénmi a neutralizovať ich, mechanizmom podobným ako štruktúrne kompletne VHH (Breine a kol., 2023). Peptidy odvodené od CDR3 sekvencií sa dokonca využívajú v diagnostike nádorov pre ich lepšiu penetračnú schopnosť do

tkanív (Hussain a kol., 1996). Zároveň dokážu neutralizovať vírusy a ich fúziu s membránami cieľových buniek, ako napr. pri HIV-1 (Rausch a kol., 1990).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená z APVV-22-0084, VEGA- 1/0381/23, VEGA - 1/0348/22 a ERA-NET EURONANOMED2021-105.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Breine A, et al. Bypassing the Need for Cell Permeabilization: Nanobody CDR3 Peptide Improves Binding on Living Bacteria. *Bioconjug Chem.* 2023; 34(7):1234-1243.
- Diamond MS, Klein RS. West Nile virus: crossing the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2004; 10(12):1294-1295.
- Gul L, Korcsmaros T, Hall N. Flaviviruses hijack the host microbiota to facilitate their transmission. *Cell.* 2022; 185(14):2395-2397.
- Hayes EB, et al. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(8):1174-1179.
- Hussain R, Courtenay-Luck NS, Siligardi G. Structure-function correlation and biostability of antibody CDR-derived peptides as tumour imaging agents. *Biomedical peptides, proteins & nucleic acids : structure, synthesis & biological activity.* 1996; 2(3):67-70.
- Mertinková P, et al. A simple and rapid pipeline for identification of receptor-binding sites on the surface proteins of pathogens. *Scientific Reports.* 2020; 10(1):1163.
- Rausch DM, et al. Peptides derived from the CDR3-homologous domain of the CD4 molecule are specific inhibitors of HIV-1 and SIV infection, virus-induced cell fusion, and postinfection viral transmission in vitro. Implications for the design of small peptide anti-HIV therapeutic agents. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1990; 616:125-148.
- Xu H, et al. Construction of a T7 phage display nanobody library for bio-panning and identification of chicken dendritic cell-specific binding nanobodies. *Scientific Reports.* 2022; 12(1):12122.
- Zhang X, et al. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses,* 2017; 9(11).

MORFOMETRICKÉ HODNOTENIE DYSPLÁZIE BEDROVÉHO KLĽBU

Marešová S., Kuricová M., Fuchs J.

Klinika malých zvierat, UVLF, Komenského 73, 04181 Kosice, Slovakia

ABSTRAKT

Dysplázia bedrového kĺbu (DBK) u psov je polygénna a multifaktoriálna vývojová porucha charakterizovaná abnormálnym vývojom, laxitou koxofemorálneho kĺbu, degeneráciou a osteoartritídou. Laxnosť bedrového kĺbu, skorá charakteristika DBK, vedie k degenerácii kĺbu v dôsledku mechanického poranenia, čo je klinický problém väčšinou u psov stredných až veľkých plemien. Medzi klinické príznaky patrí bolesť, znížená aktivita a krívanie. Definitívnu diagnózu možno dosiahnuť iba röntgenovým vyšetrením. Súčasné diagnostické techniky sú do značnej miery subjektívnymi meraniami konformácie kĺbov vykonávanými v rôznych štádiách vývoja. Cieľom našej štúdie je spresniť hodnotenia DBK pomocou kvantitatívnej metódy planimetrie, pretože Norbergov uhol (NA) je subjektívny parameter. Keďže sa zistilo, že meranie NA nie je dostatočné na meranie laxity bedra na ventrodorzálnej projekcii bedra, pretože extenzia panvových končatín naťahuje kĺbové puzdro, väzivo hlavice stehennej kosti a súvisiace svaly podporujúce kongruenciu kĺbu, rozhodli sme sa overiť ďalšie metódy zisťovania laxity a tým stupeň DBK, medzi ktoré patria meranie krytia hlavice stehennej kosti (lineárne a plošné prekrytie) a uhol kongruencie. Tie nám môžu poskytnúť relevantné informácie o tom, ako dobre zapadá hlavica stehennej kosti do acetabula a dopomôcť tak ku kvalitnejšiemu hodnoteniu DBK a lepšej identifikácii postihnutých jedincov. V našej štúdii sme zahrnuli 122 röntgenových snímok troch plemien psov oboch pohlaví a v rôznych obdobiach života.

ÚVOD

DBK je dedičné ochorenie s vplyvom aj vonkajšieho prostredia na fenotyp bedrového kĺbu. Toto ochorenie sa vyskytuje najmä u veľkých plemien psov s tendenciou rýchleho rastu (Gaspar a kol. 2016, Skurková a kol. 2010) (napr. veľké plemená ako sú bernský salašnícky pes, nemecký ovčiak, doberman, aljašský malamut a rotvajler, stredné plemená ako zlatý retriever, kokeršpaniel a poľovné psy ako bavorský farbiar či slovenský durič). Novonarodené šteniatka sa rodia s morfológicky a funkčne normálnymi bedrovými kĺbmi a formovanie bedrového kĺbu v postnatálnom období závisí od genetickej predispozície jedinca, ktorá určuje anatomické pomery v kĺbe (tvar a veľkosť kĺbu, muskulatúra, inervácia), ďalej od biomechanického zaťaženia a síl pôsobiacich v kĺbe a od tvorby chrupkových a kostných tkanív (Riser 1975, Snášil 2008). Rozvoj tohto ochorenia je teda podmienený viacerými faktormi ako veľkosť plemena, rýchlosť rastu, výživa, telesná konštitúcia, index svalovej hmoty v panvovej oblasti, hormonálna rovnováha a nervovosvalová dysfunkcia. Pre správne diagnostikovanie je potrebné vykonať dôkladné vyšetrenie bedrových kĺbov, ktoré pozostáva z ortopedického vyšetrenia a niekoľkých röntgenových snímok po 12. mesiaci života psa v celkovej anestézii (Ginja a kol. 2010). Cieľom každého skriningového programu je vylúčiť geneticky pozitívnych jedincov z chovu. Cieľom tejto štúdie je spresniť hodnotenia DBK pomocou kvantitatívnej metódy planimetrie bedrového kĺbu, pretože Norbergov uhol (NA), základné hodnotiace kritérium pre oficiálnu diagnózu, je subjektívny parameter. U psa bez DBK by malo byť NA > 105 stupňov, čo odráža hlbšie acetabulum a tesnejšie priliehajúci bedrový kĺb a teda zdravý kĺb, zatiaľ čo nižšie NA odráža rôzne stupne subluxácie (Gaspar a kol. 2016). Zdravý kĺb sa ďalej vyznačuje LFO a AFO > 50%.

MATERIÁL A METODIKA

Do našej štúdie sme zahrnuli 122 röntgenových snímok troch plemien psov: bernský salašnícky pes (BSP, $n = 32$), bavorský farbiar (BF, $n = 69$) a nemecký ovčiak (NO, $n = 21$) oboch pohlaví a v rôznych obdobiach života. Všetky snímky boli zhotovené pomocou röntgenového prístroja CONTROL-X VAREX IMAGING s priamou digitalizáciou. Hrudník psa bol uložený v polohovacom zariadení v dorzálnom ľahu s vystretými panvovými koončatinami a s dodržaním oficiálnych požiadaviek na hodnotenie DBK (Flückiger 2007). Do štúdie boli zahrnuté len kvalitné röntgenové snímky (obr. 1). Všetky psy boli röntgenované v hlbokoj sedácii s použitím štandardného protokolu butorfanolu, a propofolu. Norbergov uhol (NA) - uhol medzi čiarou vedenou medzi stredmi hlavice stehenných kostí a čiarou vedenou od stredu hlavice stehennej kosti ku kraniolaterálnej strane dorzálneho okraja acetabula (Tomlinson, Johnson 2000, Fluckiger 2007).

Lineárne prekrytie hlavice stehennej kosti (LFO) - vyznačí sa stred hlavice stehennej kosti a priemer hlavice sa nakreslí kolmo na pozdĺžnu os tela prechádzajúcu stredom hlavice stehennej kosti. Lineárny presah hlavice stehennej kosti predstavuje percento línie (priemeru), ktorá je pokrytá acetabulom (Janssens et al. 2014).

Plocha prekrytia stehennej kosti (AFO) - vyznačí sa najlepší možný kruh ohraničujúci obrisy hlavice stehennej kosti, plocha v rámci tohto kruhu sa považuje za 100%. Dorzálny acetabulárny okraj je určený ako najlaterálnejšia časť prekryvajúcej sa oblasti a táto definovaná dvojrozmerná časť kruhu predstavuje oblasť prekrytia, vyjadrenú v percentách (Janssens a kol. 2014).

Uhol kongruencie (AoC) - je definovaný dvoma čiarami vedenými od stredu hlavice stehennej kosti k miestam, ktoré ohraničujú zhodnú časť kĺbovej dutiny (Wilie a kol. 2017).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky sme porovnávali párovým T-testom, rozdiel sme považovali za štatisticky významný, keď $p > 0,05$. Pearsonov korelačný koeficient (r) sa použil na určenie asociácie medzi 4 parametrami navzájom (NA, SFO, LFO a AoC).

Hodnotenú skupinu tejto štúdie tvorilo 60 samcov a 62 samíc s priemerným vekom $5,6 \pm 1,8$ (2-8) rokov. V skupine BF bola priemerná telesná hmotnosť 22,1 kg (19,7-24,2kg). V skupine BSP bola priemerná hmotnosť 52,1 kg (40-68kg). V skupine NO bola priemerná hmotnosť 34,6 kg(30,3-39,2 kg).

Plemeno	DBK A	DBK B	DBK C	DBK D	DBK E
BF	42	19	6	2	0
BSP	18	9	3	2	0
NO	10	6	3	2	0

U BF $r > 0,8$ bol zistený medzi pravým a ľavým LFO a AOF, $r > 0,4$ bol medzi NA a LFO a AFO pre pravú a ľavú stranu, medzi pravým a ľavým NA, medzi AoC a pravými LFO a AFO. Koeficient $r > 0,8$ pre BSP bol zistený medzi pravým NA a LFO a AFO, medzi oboma pravými a ľavými prekrytiami navzájom, $r > 0,4$ bol medzi pravým a ľavým NA, medzi pravým AoC a NA, medzi AoC na oboch stranách, medzi LFO a AFO vpravo s ľavou stranou, medzi ľavým NA a ľavými prekrytiami, medzi pravým AoC a pravými LFO a AFO.

Pre NO $r > 0,4$ bolo medzi ľavým NA a ľavým AoC, medzi pravým NA a pravým a ľavým LFO a AFO a medzi nimi navzájom. Koeficient $r > 0,8$ bol medzi ľavým a pravým NA, medzi pravým NA a pravým AoC, medzi AoC navzájom, medzi oboma NA s LFO a AFO na tej istej strane, medzi AoC a LFO a AFO na tej istej strane.

Podľa výsledkov štúdie by stálo za to pridať tieto parametre a tým spresniť hodnotenie DBK. Vysoké korelačné koeficienty zistené v tejto štúdií naznačujú, že viac štúdií na väčších psích

populáciách by mohlo priniest' k ešte lepšiemu pohľadu na rôznu konformáciu bedrových kĺbov psov so snahou identifikovať predisponovaných psov.

V tejto štúdií bolo jedno obmedzenie, že FCI stupeň E nebol hodnotený kvôli nulovému počtu röntgenov a preto by bolo vhodné vykonanie ďalšej štúdie aj s týmito hodnotami.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- FLÜCKIGER, M. Scoring radiographs for canine hip dysplasia- the big three organisations in the world, *Orthopaedics*. 2007, dostupné na internete: https://www.dysplasie-schweiz.unibe.ch/unibe/portal/fak_vetmedizin/micro_dysplasie/content/e332465/e406506/e406508/Scoring_radiographs_ger.pdf
- Gaspar et al. The Norberg angle is not an accurate predictor of canine hip conformation based on the distraction index and the dorsolateral subluxation score. *Prev Vet Med*. 2016; 135:47-52.
- Ginja MMD, et al. Diagnosis, genetic control and preventive management of canine hip dysplasia: a review, *The Veterinary Journal*. 2010; 184(3):269-76.
- Janssens L. et al. Comparing Norberg angle, linear femoral overlap and surface femoral overlap in radiographic assessment of the canine hip joint. *J Small Anim Pract*. 2014; 55(3):135-8.
- Riser WH. The dog as a model for the study of hip dysplasia. Growth, form, and development of the normal and dysplastic hip joint, *Vet Pathol*. 1975; 12(4):234-334.
- Skurkova L. et al. Vzťah Norbergovho uhla a polohy stredu hlavice stehrovej kosti vzhľadom ku korzálnemu acetabulárnemu okraju pri hodnotení dysplázie bedrových kĺbov u psov. 2010.
- Snášil M. Dysplázie kyčelního kloubu u psů-etologie, patogeneze, klinické projevy a diagnostika, *Veterinární klinika*. Brno. 2008; 5:89-93
- Tomlinson JL, Johnson JC. Quantification of measurement of femoral head coverage and Norberg angle within and among four breeds of dogs, *Am J Vet Res*. 2000; 61:1492–1500
- Wylie JD, et al. Relationship between the lateral Center-Edge Angle and 3-Dimensional Acetabular Coverage, *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*. 2017, 5(4):2325967117700589.

KARYOLOGICKÁ ANALÝZA DRUHU *ACANTHOCEPHALUS ANGUILLAE*

Marková A.^{1,2}, Orosová M.¹

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

²Katedra zoológie, UNIBA, Bratislava, Slovensko

ABSTRAKT

Predkladaná práca sa zaoberá detailnou karyologickou analýzou črevného parazita rýb *Acanthocephalus anguillae* (Acanthocephala). Po prvý krát bol zostavený karyotyp študovaného druhu a na chromozómoch mapované gény pre 18S rDNA a histón H3. Analyzovaní boli jedinci troch populácií východného Slovenska, pričom jedna pochádzala zo znečistenej vodnej nádrže Zemplínska Šírava. Karyotyp všetkých troch populácií pozostáva zo šiestich autozómov a dvoch (♀), alebo jedného (♂) X chromozómu. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia odhalila tri klastre 18S rDNA génov na dvoch autozómoch a roztrúsenú distribúciu génov pre histón H3 na všetkých chromozómoch. Distribúcia heterochromatínu bola detegovaná fluorescenčným farbením CMA₃ a DAPI. Navyše, u 34% jedincov z kontaminovaného prostredia bol zaznamenaný aj výskyt nadpočetných B chromozómov. Ako možný scenár vzniku chromozómu B navrhujeme chromozómové zlomy v dôsledku mutagénneho účinku polutantov vo vodnom prostredí.

ÚVOD

Acanthocephala sú malou skupinou endoparazitov stavovcov s celosvetovým rozšírením (Perrot-Minnot a kol., 2023). Cytogenetika háčikohlavcov je pomerne málo rozvinutou vednou oblasťou. V súčasnosti sú známe dáta len u 12 z 1270 popísaných druhov, pričom väčšina štúdií je zameraná na klasickú cytogenetiku. Niektoré z týchto údajov boli získané pred viac ako 60 rokmi z histologických rezov a roztlakových preparátov, a preto je potrebné ich zrevidovať. Všeobecne, diploidný počet chromozómov u háčikohlavcov varíruje od $2n = 5$ do $2n = 16$ a determinácia pohlavia je na základe mechanizmu XX (♀) a X0 (♂). Techniky molekulárnej cytogenetiky, konkrétne fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH), boli aplikované len u dvoch druhov rodu *Pomphorhynchus*, *P. laevis* a *P. tereticollis* (Bombarová a kol., 2007). Analýza koncov chromozómov odhalila, že žiadny z doteraz známych repetitívnych motívov nie je u Acanthocephala prítomný (Bombarová a kol., 2009), čo naznačuje buď prítomnosť doteraz neznámeho telomerického motívu, alebo stratu telomerických repetícií a nahradenie iným mechanizmom obnovy telomér.

Acanthocephalus anguillae je bežný črevný parazit sladkovodných, brakických a morských rýb. Naša práca bola zameraná na stanovenie základných chromozómových charakteristík a štúdium distribúcie chromozóm špecifických cytogenetických markerov pomocou FISH (18S rDNA a génov pre histón H3). Zároveň, keďže jedna populáciu parazita pochádzala zo znečistenej vodnej nádrže Zemplínska Šírava, sme skúmali aj možnú súvislosť medzi znečistením a chromozómovými zmenami.

MATERIÁL A METODIKA

Prvé dve študované lokality, rieka Hnilec (HN) a Olšava (OL) sú relatívne bez znečistenia, zatiaľ čo vodná nádrž Zemplínska Šírava (ZŠ) patrí medzi najviac znečistené oblasti polychlórovanými bifenyli (PCB) v Európe (Šalgovičová a Zmetáková, 2006). Bolo odlovených 77 pleskáčov zo ZŠ, 34 z HN a 40 z OL. Dokopy bolo získaných 51 jedincov *A. anguillae*: 36 zo ZŠ, deväť z HN a osem z OL. Živé jedince boli inkubované v 0,025 % kolchicíne, následne v hypotonickom roztoku 0,075 KCl a fixované v zmesi kyseliny octovej a metanolu (1:3). Chromozómové preparáty boli pripravované podľa „hot plate“ techniky opísanej v práci Orosová a Špakulová (2018). Konvenčným farbením Giemsou (5 % roztok) sme stanovili základné chromozómové charakteristiky a zostavili karyotyp. Technikou FISH sme mapovali gény pre 18S rDNA a histón H3 na chromozómoch. Fluorescenčné sondy boli

pripravené PCR amplifikáciou z gDNA *A. anguillae* pomocou špecifických primerov a značené nick transláciou s biotínom-16-dUTP. Postup, opísaný v Orosová a Špakulová (2018), zahŕňal elimináciu RNA pôsobením RNázy A v soľnom roztoku 2×SSC. Následne, správne naviazanie sondy na chromozómy bolo zabezpečené denaturáciou chromozómov v 70 % formamide po dobu 3 min 30 s pri 68 °C. Hybridizačná zmes (označená sonda, kompetičná DNA, formamid a dextran sulfát) bola denaturovaná pri 90 °C a v objeme 10 µl nakvapkaná na sklíčko. Hybridizácia prebiehala vo vlhkej komôrke pri 37 °C cez noc (~20 h). Nakoniec, bola detekcia signálu zabezpečená Cy-3-konjugovaným streptavidínom, chromozómy boli zafarbené fluorescenčným farbivom DAPI v antifade ProLong médiu a okraje krycieho sklíčka boli zalepené lakom na nechty. Takto pripravené preparáty boli uskladnené v tme v chladničke do ďalšieho dňa, kedy boli pozorované fluorescenčným mikroskopom. Diferenciálne farbenia (DAPI, CMA₃), podľa práce Orosová a kol. (2021), odhalili distribúciu heterochromatínu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Diploidná sada chromozómov všetkých troch populácií *A. anguillae* pozostáva z troch párov autozómov a dvoch X chromozómov u samičky alebo jedného X chromozómu u samca. U jedincov pochádzajúcich zo ZŠ bol pozorovaný nadpočetný B chromozóm. V bunke bol prítomný vždy len jeden B chromozóm a výskyt bol nezávislý od pohlavia. Morfológia chromozómov bola vo všetkých študovaných populáciách identická; prvý pár je metacentrický (m), druhý pár je meta-submetacentrický (m-sm), tretí pár a X chromozóm sú akrocentrické (a); $2n = 7/8$; $n = 1m + 1m-sm + 1a + 1a (X)$. Rovnaký $2n$ počet a morfológia chromozómov boli pozorované aj u príbuzného druhu, *A. lucii*, z dvoch geograficky oddelených populácií, jednej z Bulharska a jednej zo Slovenska (Mutafova a kol., 1997; Špakulová a kol., 2002). Medzi jednotlivými populáciami je výraznejší iba rozdiel v morfológii tretieho chromozómového páru, ktorý bol submetacentrický u *A. lucii* zo Slovenska (Špakulová a kol., 2002), ale akrocentrický u *A. lucii* z Bulharska (Mutafova a kol., 1997) a u *A. anguillae* v našej štúdii. Pravdepodobným mechanizmom zmeny tvaru chromozómu boli malé intrachromozómové prestavby - pericentrická inverzia. Zmeny počas evolúcie karyotypu, ako sú chromozómové prestavby a polyploidia, podporujú genetickú diferenciáciu organizmov (Kellogg, 2016). FISH s 18S rDNA sondou odhalila prítomnosť troch klastrov rRNA génov, jeden na prvom a dva na druhom páre chromozómov. Signály boli lokalizované intersticiálne v blízkosti centroméry. Doteraz bola metóda FISH aplikovaná len u dvoch príbuzných a morfológicky veľmi podobných háčikohlavcov, *P. leavis* a *P. tereticollis*. Autori pozorovali odlišnú pozíciu dvoch rDNA klastrov na prvých dvoch pároch chromozómov a pozíciu centroméry druhého chromozómového páru. Hypotetickým scenárom pre chromozómovú prestavbu sú dve následné pericentrické inverzie, jedna zmenila pozíciu NOR a druhá posunula centroméru (Bombarová a kol., 2007). Rozličná lokalizácia rDNA u troch doteraz študovaných druhov by mohla naznačovať časté zmeny v NOR distribúcii a teda predstavuje dobrý indikátor pre štúdium evolučnej dynamiky genómu háčikohlavcov. Po prvý krát sme v rámci skupiny Acanthocephala študovali distribúciu génov pre histón H3. Pozorovali sme roztrúsené signály na všetkých chromozómoch, vrátane gonozómov a dokonca u populácie zo ZŠ aj na B chromozómoch. Takáto roztrúsená distribúcia histónových génov nie je bežná, no vyskytuje sa napríklad u korytnačky *Rhinoclemmys puntularia*, kde sú H3 gény nielen v klastroch, ale aj roztrúsené po genóme s časťou mobilného elementu (Cavalcante a kol., 2020). Tieto dáta naznačujú, že mobilné elementy môžu byť evolučnou silou, ktorá distribuuje gény po genóme. Typicky vysoký podiel heterechromatínových oblastí na B chromozómoch sa v našej štúdii nepotvrdil. Farbenia DAPI odhalilo len veľmi malé bloky heterochromatínu na všetkých chromozómoch. CMA₃⁺ signály boli pozorované na koncoch všetkých chromozómov, vrátane B chromozómov.

Najvýraznejší rozdiel medzi študovanými populáciami *A. anguillae* bola prítomnosť B chromozómov, nachádzajúcich sa v genóme jedincov zo ZŠ. Podobný prípad bol zaznamenaný aj u *A. lucii* z Ružina, kde až 85% jedincov obsahovalo B chromozóm a ich počet varíroval od jedného po päť (Špakulová a kol., 2002). V našej štúdií bol B chromozóm nájdený len u 34% jedincov a vždy len jeden v bunke. U oboch druhov predstavujú B chromozómy najmenšie elementy komplementu, ale líšia sa morfológiou (metacentrický u *A. lucii* a akrocentrický u *A. anguillae*). Predpokladáme, že vznik B chromozómov u *A. anguillae* zo ZŠ mohol byť podnietený chromozómovými prestavbami ako následok nepriaznivého prostredia. Podobný prípad ich vzniku, ako vedľajší produkt prestavieb chromozómov následkom znečisteného prostredia, bol popísaný u cichlidových rýb (Feldberg a kol., 2004; Perazzo a kol., 2018). Zvýšené množstvo chromozómových aberácií, avšak nie B chromozómy, bolo detegované u pásomnice *Caryophyllaeus laticeps*, pochádzajúcej taktiež z rýb ZŠ (Orosová a kol., 2022). Prezentovaná práca predstavuje druhý dôkaz o existencii B chromozómov u druhov rodu *Acanthocephalus* z vysoko znečisteného prostredia. Preto je vysoko pravdepodobné, že dlhodobý mutagénny účinok PCB látok vo vodnom prostredí indukoval zlomy chromozómov, čo viedlo k vzniku DNA fragmentov s potenciálom vytvoriť B chromozómy.

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.
- Bombarová M, et al. Telomere analysis of platyhelminths and acanthocephalans by FISH and Southern hybridization. *Genome*. 2009; 52:897- 903.
- Cavalcante MG, et al. Molecular cytogenetics characterization of *Rhinoclemmys punctularia* (Testudines, Geomydidae) and description of a Gypsy-H3 association in its genome. *Gene*. 2020; 738:144477.
- Feldberg E, et al. B chromosomes in Amazonian cichlid species. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 106:195-198.
- Kellogg EA. Has the connection between polyploidy and diversification actually been tested? *Curr Opin Plant Biol*. 2016; 30:25–32.
- Mutafova T, Nedeva I, Kanev I. Chromosomes of *Acanthocephalus lucii*. *J Helminthol*. 1997; 71:261-262.
- Orosová M, Špakulová M. Tapeworm chromosomes: their value in systematics with instructions for cytogenetic study. *Folia Parasit*. 2018; 65:001.
- Orosová M, et al. Molecular cytogenetic analysis of a triploid population of the human broad tapeworm, *Dibothriocephalus latus* (Diphyllobothriidea). *Parasitology*. 2021; 148:787-797.
- Orosová M, et al. New cytogenetic data on *Caryophyllaeus laticeps* and *Paracaryophyllaeus gotoi*, parasites of evolutionary interest. *Parasitology*. 2022; 149:1094–1105.
- Perazzo GX, et al. B chromosome polymorphism in South American cichlid. *Neotrop Biodivers*. 2018; 4:3–9.
- Perrot-Minnot MJ, et al. Hooking the scientific community on thorny-headed worms: interesting and exciting facts, knowledge gaps and perspectives for research directions on Acanthocephala. *Parasite*. 2023; 30:23.
- 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, 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.

VPLYV ENDOPARAZITÓZY NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU, METANOGENÉZU A MIKROBIOTU JAHNIAT *IN VIVO* A *IN VITRO*

Mikulová K.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť vplyv endoparazitárnej infekcie jahniat gastrointestinálnym nematódom (GIN) *Haemonchus contortus* na bachorové fermentačné parametre a mikrobiálnu populáciu *in vivo* a *in vitro*. Dvanásť jahniat bolo rozdelených do skupín: nenakazené zvieratá (Kontrola) a experimentálne nakazené zvieratá (Infekcia) larvami tretieho štádia GIN *H. contortus*. Na 48., 49. a 50. deň po infekcii boli dve jahňatá na skupinu usmrtené a obsah bachora a slezu bol použitý na analýzy. 24-hodinovú fermentačnú techniku (IVGPT) za použitia bachorovej tekutiny sme použili na *in vitro* analýzy. V skupine Infekcia boli koncentrácie metánu *in vivo* a *in vitro* signifikantne vyššie oproti skupine Kontrola ($p < 0,001$) a zvýšené boli aj populácie celkových protozoí, baktérií a metanogénnych Archaea. V skupine Infekcia boli nižšie koncentrácie kyselín n-maslovej, iso-maslovej a iso-valerovej. Výsledky ukázali že endoparazitóza GIN *H. contortus* u jahniat je pravdepodobne spojená so zvýšenou bachorovou mikrobiálnou metanogenézou a môže ovplyvniť aj koncentráciu unikavých mastných kyselín s rozvetveným reťazcom.

ÚVOD

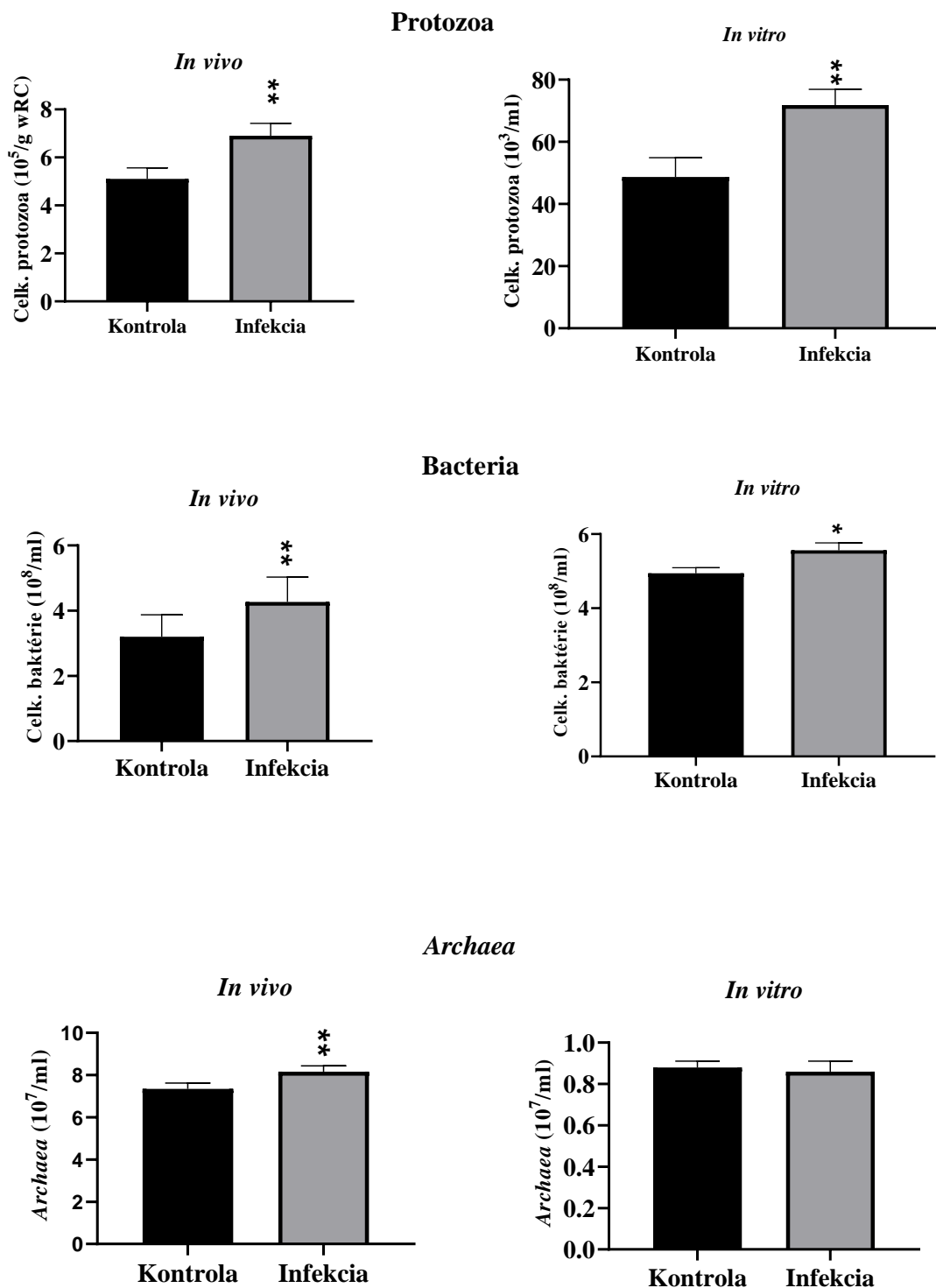
Parazitárne infekcie malých prežúvavcov spôsobené gastrointestinálnym nematódom (GIN) *Haemonchus contortus* môžu ovplyvňovať primárne faktory zodpovedné za enterické emisie metánu ako je mikrobióm bachora, príjem a zloženie krmiva. Dospelé parazity *H. contortus* žijú v sleze (abomasum) malých prežúvavcov, kde sa živia krvou a môžu spôsobiť smrť hostiteľa. V mikrobióme bachora a slezu oviec si *H. contortus* uľahčuje prežitie a reprodukciu pravdepodobne aj zvyšovaním početnosti metanogénnych mikroorganizmov (Corrêa a kol., 2021). Bohatý mikrobióm bachora zásobuje prežúvavcov dietárnymi a metabolickými potrebami, avšak za špecifických podmienok ako je infekcia GIN môže byť značne ovplyvnený. Infekcia narúša interakcie medzi hostiteľom a bachorovým mikrobiómom, pretože produkty vylučované GIN pravdepodobne môžu ovplyvniť rast a metabolizmus mikrobiálnych spoločenstiev (Li a kol., 2016). Naším cieľom bolo zistiť vplyv GIN na bachorovú fermentáciu, metanogenézu a mikrobiálnu populáciu vrátane bachorových protozoí u GIN infikovaných jahniat v podmienkach *in vivo* a *in vitro*.

MATERIÁL A METODIKA

Dvanásť jahniat (Zušľachtená valaška, vek 3-4 mesiacov, hmotnosť $17,7 \pm 2,12$ kg) bolo rozdelených do dvoch skupín: Kontrola a Infekcia - experimentálne nakazené zvieratá s 5000 ISE larvami tretieho štádia MHco1 kmeňa *H. contortus* podľa Váradyovej a kol. (2018). Každé zviera bolo kŕmené senom *ad libitum* a jadrovým krmivom (300 g sušiny/deň/zviera). Na 48., 49. a 50. deň po infekcii boli dve jahňatá na skupinu humane usmrtené podľa Nariadenia Rady Európskej komisie (1099/2009). Obsah bachora a slezu bol odobratý na analýzy a pokus *in vitro*. Z obsahu slezu nakazených jahniat sa ručne zozbierali zhľuky dospelých červov a približne 20 až 30 kusov sa umiestnilo do inkubačných fliaš v skupine Infekcia. Koncentrácie metánu *in vitro* a unikavé mastné kyseliny boli merané na plynovom chromatografe (PerkinElmer Clarus 500, Shelton, USA). Bachorové prvky sa počítali mikroskopicky. Bachorové mikrobiálne populácie sa kvantifikovali pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie. Koncentrácie metánu *in vivo* boli vypočítané stechiometricky. Štatistické analýzy sme realizovali pomocou nepárového *t*-testu (GraphPad Prism 9.2.0 (332) 2021, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vyššie koncentrácie metánu zaznamenané v skupine Infekcia oproti Kontrole ($p < 0,001$) boli pravdepodobne spojené s vyšším počtom celkových protozoí ($p < 0,001$), celkových baktérií ($p < 0,001$) a metanogénnej populácie Archaea ($p < 0,001$) in vivo ako aj celkových protozoí ($p < 0,001$) a celkových baktérií ($p < 0,01$) in vitro (Obr.1).



wRC: počet na gram vlhkého obsahu bachora, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$: rozdiely medzi skupinami

Obr. 1. Mikrobiálne populácie bachora nakazených a nenakazených jahniat

Metán bol tvorený najmä metanogénmi využívajúcimi vodík a oxidácia acetátu spojená s hydrogenotrofnou metanogéznou bola pravdepodobne dominantnou metabolickou cestou jeho tvorby (Muñoz-Tamayo a kol., 2019). Avšak zmeny v bachorovej mikrobiote, vrátane protozoí, zodpovedné za metanogézu u prežúvavcov nakazených GIN a ktoré určujú, ako sa vodík používa v bachore nie sú dostatočne preskúmané. V pokuse boli v skupine Infekcia znížené koncentrácie unikavých mastných kyselín s rozvetveným reťazcom (BCFA), ktoré sa tvoria v bachore deamináciou aminokyselín (Tab.1). Zaznamenali sme nižšie koncentrácie k. n-maslovej ($p < 0,010$), k. iso-maslovej ($p < 0,018$) a k. iso-valerovej ($p < 0,003$) u jahniat. Koncentrácie BCFA závisia od bachorovej degradácie bielkovín z potravy. Avšak relatívny podiel proteínov v sleze získaných z krmiva a mikrobiálnych bielkovín syntetizovaných v bachore závisí nie len od zloženia krmiva, ale aj od fyziologického stavu jahniat. Preto GIN infekcia môže ovplyvniť aj enzymatickú aktivitu hydroláz, najmä amylázy, ktorá je spojená s partikulárnou frakciou (Raffrenato a kol., 2021). Záverom, GIN infekcia je pravdepodobne spojená so zvýšenou bachorovou mikrobiálnou metanogéznou a môže ovplyvniť aj koncentráciu unikavých mastných kyselín s rozvetveným reťazcom.

Parameter	Kontrola	Infekcia	SD	<i>p</i>
<i>In vivo</i> (n = 6)				
Metán (mM)	0,40	0,49	0,011	< 0,001
K. n-maslová (mol%)	11,1	9,05	0,721	0,010
K. iso-maslová (mol%)	1,10	0,24	0,703	0,018
K. n-valerová (mol%)	1,40	1,30	0,504	0,757
K. iso-valerová (mol%)	0,24	0,20	0,011	0,003
<i>In vitro</i> (n = 9)				
Metán (mM)	1,70	2,67	0,071	< 0,001
K. n-maslová (mol%)	12,9	9,21	0,562	0,002
K. iso-maslová (mol%)	0,77	0,82	0,072	0,987
K. n-valerová (mol%)	1,73	1,43	0,080	0,413
K. iso-valerová (mol%)	0,57	0,50	0,041	0,114

Tab. 1. Koncentrácia metánu a unikavých mastných kyselín s rozvetveným reťazcom (BCFA)

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom APVV 18-0131 a VEGA 2/0008/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Corrêa PS, et al. The effect of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* infection on the ruminal microbiome of lambs. *Exp Parasitol.* 2021; 231:108175.
- Li RW, et al. The effect of helminth infection on the microbial composition and structure of the caprine abomasal microbiome. *Sci Rep.* 2016; 6:20606.
- Muñoz-Tamayo R, et al. Hydrogenotrophic methanogens of the mammalian gut: Functionally similar, thermodynamically different - A modelling approach. *PLoS ONE* 2019; 14:e0226243.
- Raffrenato E, et al. Rumen fluid handling affects measurements of its enzymatic activity and *in vitro* digestibility. *Anim Feed Sci Technol.* 2021; 280:115060.
- Váradyová Z, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res.* 2018; 14:78.

RIADENÉ USMERNENIE FERMENTÁCIE V KUKURIČNÝCH SILÁŽACH

Mitrik A.¹, Mitrik T.², Maskaľová I.¹

¹Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF, Košice

²FEEDLAB s.r.o., Spišská Nová Ves

ABSTRAKT

Cieľom tohto príspevku bolo sledovať fermentačnú aktivitu dvoch kombinácií homo- a hetero- fermentatívnych baktérií mliečného kvasenia (BMK) v dvoch prípravkoch (prípravok 1: *L. buchneri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*; prípravok 2: *L. buchneri*, *L. rhamnosus*, *L. diolivorans*). Produkcia propándiolu bola sledovaná v kukuričných silážach na nasledovných úrovniach: technológia rezania, hybrid, vegetačný vývoj, typ silážnej fermentácie a dĺžka doby fermentácie. Z hľadiska silážnych alternatív, prípravok 1 naplnil deklarované vlastnosti a preukázane pozitívne ovplyvnil produkciu propándiolu v kukuričných silážach z celých rastlín. Produkcia propándiolu klesala so stúpajúcim obsahom sušiny, čo má priamy súvis s postupujúcim vegetačným vývojom rastlín. Typ silážnej fermentácie a vegetačný vývoj mali štatisticky preukázateľný vplyv na úroveň produkcie propándiolu v kukuričných silážach. Štatisticky významný rozdiel na úrovni hybridov sme zistili len pri jednom hybridu. Na úrovni technológie rezania a dĺžky doby fermentácie neboli zistené štatisticky významné rozdiely. Fermentačná aktivita použitého kmeňa *Lactobacillus buchneri* závisela na jeho kombinácii s inými homofermentatívnymi a/alebo heterofermentatívnymi kmeňmi BMK. Zmeny v zložení fermentačného profilu sme sledovali na nasledovných úrovniach: 7 rôznych hybridov silážnych kukuríc, 2 technológie rezania hmoty, 4 body vegetačného vývoja v časovom intervale 34 dní, 3 dĺžky priebehu fermentačného procesu.

ÚVOD

Propán-1,2-diol (propándiol) predstavuje významnú glukoplastickú látku vo výžive vysoko produkčných kráv a jeho prírodná syntéza v priebehu silážnej fermentácie má veľký význam jednak z hľadiska zdravotného stavu zvierat, ale aj z hľadiska chutnosti krmiva s cieľom zvýšiť príjem krmiva u zvierat. Cielene riadená a usmernená fermentácia je nesmierne dôležitá k dosiahnutiu kvalitného a chutného krmiva a s tým súvisiacou zvýšenou úžitkovosťou a zvýšenou efektívnosťou krmív. Propándiol má sladkú chuť a priaznivo vplyva na atraktivnosť krmiva a používa sa ako profylaktická látka v popôrobnom období v množstve cca 500g/kus.

MATERIÁL A METODIKA

Bolo vysiatych 7 rôznych hybridov silážnych kukuríc (FAO 200 – 530) od spoločnosti KWS SEMENA s.r.o. Odber vzoriek bol vykonávaný v intervale 34 dní v štyroch termínoch (12.8.2021 – 224. kalendárny deň; 19.8.2021 – 231. kalendárny deň; 2.9.2021 – 244. kalendárny deň; 13.9.2021 – 258. kalendárny deň). Po otvorení vzoriek bola siláž dôkladne premiešaná. Príprava vodného výluhu: 100 g siláže v 2 000 ml destilovanej vody mixovaním (30 000 otáčok/1min.) počas 1 minúty a prefiltrované cez papierový filter. Hodnota pH bola ihneď meraná na prístroji Seven Compact S220 (Mettler Toledo). Vzorky výluhu boli pred meraním na UHPLC pripravované štandardným vyčistením (čistenie, riedenie, odstredovanie a ultrafiltrácia). Fermentačné charakteristiky boli merané na UHPLC Dionex UltiMate 3000 Series s kolónou AGILENT Hi-Plex H 300 x 7,7 mm.

Tab. 1 SILÁŽNA ALTERNATÍVA a
charakteristiky prípravkov

PRÍPRAVOK	0	1	2
<i>L.buchneri</i> 1k2075		+	+
<i>L.diolivorans</i> 1k20752			+
<i>L.plantarum</i> 1k2079		+	
<i>L.rhamnosus</i> 1k20711		+	+
KTJ/1g		min. 3,0x10 ¹¹	min. 2,5x10 ¹¹
dávkovanie		1g/1t	1g/1t

* g.kg⁻¹; sivé pozadie: zhodné kmene baktérií mliečného kvasenia

Mobilná fáza 0,01M H₂SO₄ s prietokom 0,7 ml/min. a s nástrekom vzorky 20 µl. Kyselina mliečna a prchavé mastné kyseliny boli merané na detektore UV-VIS 210 nm pri teplote 40°C a alkoholy, propán-1,2-diol (propándiol) a monosacharidy na RI detektore pri teplote 55°C. Navážky 500 – 750 g boli sušené v sušiarňach MEMMERT UFE 500 a UFE 700 pri teplote 60°C 16 - 24 hodín. Vysušené vzorky boli rozomleté na mlynoch SM-100 (RETCHE), 2 mm sito a následne premlené na TWISTER (RETCHE), 1 mm sito. Obsah sušiny a vybraných živín v laboratórnych vysušených vzorkách bol stanovený na analyzátore NIRS Antaris II FT-NIR Analyzer (Thermo Fisher Scientific) použitím vlastných validovaných kalibračných modelov (Tab. 1). Celkový obsah sušiny bol vyhodnotený na základe laboratórnej sušiny a na základe obsahu sušiny meraného metódou NIRS vo vysušených vzorkách. Obsah sušiny pri silážach bol korigovaný na základe obsahu jednotlivých fermentačných produktov (Kacerovský a kol., 1990). Vodorozpustné cukry (WSC) sme vyjadřili ako sumu glukózy, fruktózy a maltózy, ktoré boli merané na UHPLC. Štatistické vyhodnotenia sme vykonali programom NCSS 12 (64 bit) - verzia 12.0.18 - NCSS LLC s použitím metód: ANOVA, lineárna korelácia (Pearson), lineárna regresia, nelineárna kvadratická a polynomická regresia.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V produkcii propándiolu sme zistili štatisticky významné rozdiely medzi dvojicou hybridov (1 a 2) v porovnaní s hybridom 6. Najvyššiu priemernú produkciu propándiolu 7,5 g.kg⁻¹ dosiahol hybrid 6 (FAO 480; obsah sušiny 300 g.kg⁻¹ dosiahnutý na 243. kalendárny deň) a najnižšiu 2,8 g.kg⁻¹ hybrid 2 (FAO 240; obsah sušiny 300 g.kg⁻¹ dosiahnutý na 212. kalendárny deň). Na úrovni všetkých hybridov a pri použití silážnej alternatívy s prípravkom 1 sme zistili aj štatisticky významné (P<0,01)

korelačné vzťahy medzi obsahom sušiny a nasledovnými fermentačnými produktami: propándiol (r -0,590), kyselinou mliečnou (r 0,629), kyselinou octovou (r -0,627). Zmeny živinového zloženia v priebehu vegetačného vývoja dokumentujú priemerné obsahy živín, ktoré sa v jednotlivých fázach vývoja, štatisticky významne odlišovali (Tab. 2). Obsahy propándiolu sa podobne ako obsahy sušiny a živín v priebehu vegetačného vývoja štatisticky významne odlišovali. Pri sušine do 300 g.kg⁻¹ dosahovala produkcia propándiolu úroveň okolo 7 g.kg⁻¹. V rozsahu sušiny od 300 g.kg⁻¹ do 400 g.kg⁻¹ produkcia propándiolu klesla na približne polovicu a následne pri sušine nad 400 g.kg⁻¹ klesla na 0,9g.kg⁻¹, pričom obsah kyseliny mliečnej bol najvyšší. Toto naznačuje, že pri vyššom až vysokom

Tab. 2 VEGETAČNÝ VÝVOJ - živinové zloženie a fermentačné parametre**

PRÍPRAVOK 1	ODBER (KALENDÁRNY DEŇ)			
	1 (224)	2 (231)	3 (244)	4 (258)
n	126	126	126	126
SUŠINA (g.kg ⁻¹)	270,9 ±47,3 ²³⁴	301,1 ±50,3 ¹³⁴	347,7 ±62,2 ¹²⁴	436,4 ±47,2 ¹²³
prírastok***		4,3	3,6	6,3
WSC* (g.kg ⁻¹ DM)	86,0 ±23,9 ²³⁴	64,8 ±13,7 ¹³⁴	44,2 ±12,3 ¹²⁴	56,0 ±6,9 ¹²³
NDF (g.kg ⁻¹ DM)	441,2 ±43,5 ²³⁴	397,9 ±24,9 ¹⁴	392,9 ±15,4 ¹⁴	373,5 ±31,0 ¹²³
ADF (g.kg ⁻¹ DM)	231,7 ±25,4 ²³⁴	208,1 ±11,8 ¹³⁴	200,9 ±8,6 ¹²	198,6 ±20,2 ¹²
STARCH (g.kg ⁻¹ DM)	202,1 ±66,0 ²³⁴	252,8 ±49,7 ¹³⁴	286,0 ±22,4 ¹²⁴	307,7 ±39,1 ¹²³
EE (g.kg ⁻¹ DM)	19,1 ±3,2 ²³⁴	22,9 ±1,8 ¹³⁴	26,5 ±2,7 ¹²⁴	24,6 ±1,2 ¹²³
ASH (g.kg ⁻¹ DM)	45,1 ±1,1 ²³⁴	46,5 ±2,1 ¹³⁴	43,2 ±4,2 ¹²	43,6 ±4,1 ¹²
n	84	84	84	84
SUŠINA*	265,6 ±48,6 ²³⁴	294,7 ±50,6 ¹³⁴	345,2 ±62,8 ¹²⁴	434,3 ±47,1 ¹²³
pH	3,90 ±0,10 ²	3,96 ±0,10 ¹	3,93 ±0,09	3,93 ±0,12
KYS. MLIEČNA*	13,5 ±7,6 ³⁴	12,3 ±3,2 ³⁴	16,5 ±4,5 ¹²⁴	20,0 ±4,5 ¹²³
KYS. OCTOVÁ*	18,3 ±8,1 ³⁴	20,3 ±8,7 ³⁴	12,6 ±6,6 ¹²⁴	7,5 ±3,7 ¹²³
KYS. MASLOVÁ*	0,0 ±0,1	0,0 ±0,2	0,0 ±0,2	0,0 ±0,0
KYS. PROPIÓNOVÁ*	0,1 ±0,4	0,2 ±0,5 ³⁴	0,0 ±0,2 ²	0,0 ±0,1 ²
KYS. MRAVČIA*	0,5 ±0,3	0,5 ±0,2	0,5 ±0,2	0,5 ±0,2
ETANOL*	3,4 ±2,6 ²⁴	1,9 ±1,2 ¹⁴	2,5 ±1,5 ⁴	4,9 ±3,7 ¹²³
PROPAN-1,2-DIOL*	7,4 ±4,8³⁴	7,3 ±3,9³⁴	4,1 ±3,3¹²⁴	0,9 ±1,0¹²³
1-PROPANOL*	0,7 ±1,2 ²	1,8 ±2,4 ¹³⁴	0,7 ±1,6 ²	0,0 ±0,1 ²
1-BUTANOL*	0,0 ±0,1	0,1 ±0,5	0,0 ±0,0	0,1 ±0,8

* g.kg⁻¹; WSC* (GLUKÓZA + FRUKTÓZA + MANÓZA); ** priemer 90, 150 a 240 dní fermentácie; *** prírastok sušiny (g.kg⁻¹).deň⁻¹; indexy: štatisticky významné rozdiely v riadku (P<0,01)

obsahu sušiny (nad 350 g.kg⁻¹) nie sú vhodné podmienky pre sekundárnu konverziu kyseliny mliečnej na kyselinu octovú a tieto zistenia sú aj v súlade s výsledkami iných autorov (da Silva a kol., 2022). Dĺžka doby fermentácie nemala štatisticky preukazný vplyv na produkciu propándiolu. Avšak je zreteľný mierny pokles v obsahu propándiolu s predlžujúcou sa dobou fermentácie (Tab. 3). Nižšia hladina propándiolu a súčasne štatisticky preukázateľné zvýšenie obsahu kyseliny propiónovej a 1-propanolu na 240. deň fermentácie naznačujú, že v tejto fáze fermentácie mohlo dôjsť aj k uplatneniu epifytických kmeňov *L. diolivorans* (Krooneman a kol., 2002). Ten istý kmeň *L. buchneri* dokázal násobne zvýšiť produkciu propándiolu v rovnakých podmienkach, ak bol inokulovaný v kombinácii s dvomi homofermentatívnymi kmeňmi BMK. Kombinácia dvoch heterofermentatívnych kmeňov BMK (*L. buchneri* a *L. diolivorans*) s jedným homofermentatívnym kmeňom (*L. rhamnosus*) neprodukovala zvýšené množstvá kyseliny octovej. Dosiagnuté výsledky a rozdiely medzi prípravkami naznačujú, že výkonnosť toho istého kmeňa *L. buchneri* v produkcii propándiolu závisí s veľkou pravdepodobnosťou aj od jeho pôsobenia v kombinácii s inými druhmi *Lactobacillus*.

Prípravok 1 preukazne pozitívne ovplyvnil produkciu propándiolu v kukuričných silážach, naplnil deklarované vlastnosti a má silné predpoklady pozitívne ovplyvňovať zdravie vysoko produkčných kráv.

Produkcija propándiolu kulminovala na 150. deň fermentácie. V priebehu postupujúceho vegetačného vývoja (stúpajúci obsah sušiny) produkcia propándiolu klesala. Obsah propándiolu na úrovni 7,3 g/kg pôvodnej hmoty, pri sušine 301,1 g/kg a príjme 30 kg siláže predstavuje pre dojniciu až 219 g propándiolu/deň.

Profylakticky je dojniciam podávaný propándiol

v dávke cca 500g/kus/deň čo pri dennom príjme 219g v siláži predstavuje takmer polovičnú dávku dennej potreby priamo cez krmivo. Do úvahy taktiež pripadá aj priaznivý ekonomický účinok propándiolu, ktorý je takto možné ušetriť a vytvoriť ho priamo v krmive riadenou a usmernenou fermentáciou.

Tab. 3 DĹŽKA DOBY FERMENTÁCIE – fermentačné parametre**			
PRÍPRAVOK 1	POČET DNÍ		
	1 /90/	2 /150/	3 /240/
n	56	56	56
SUŠINA*	339,3 ± 81,7	334,4 ± 83,1	331,1 ± 84,2
pH	3,86 ± 0,08 ²³	3,94 ± 0,1 ¹	3,97 ± 0,10 ¹
KYS. MLIEČNA*	17,8 ± 5,4 ²³	14,8 ± 5,6 ¹	14,2 ± 6,3 ¹
KYS. OCTOVÁ*	11,2 ± 7,0 ³	12,9 ± 6,7 ³	19,8 ± 9,4 ¹²
KYS. MASLOVÁ*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,2
KYS. PROPIÓNOVÁ*	0,0 ± 0,0 ³	0,0 ± 0,2 ³	0,2 ± 0,5 ¹²
KYS. MRAVČIA*	0,6 ± 0,3 ²³	0,4 ± 0,2 ¹	0,5 ± 0,2 ¹
ETANOL*	2,9 ± 2,7	3,4 ± 2,8	3,3 ± 2,6
PROPAN-1,2-DIOL*	5,2 ± 5,1	5,6 ± 4,5	4,0 ± 3,3
1-PROPANOL*	0,0 ± 0,1 ³	0,3 ± 0,8 ³	2,1 ± 2,4 ¹²
1-BUTANOL*	0,1 ± 0,4	0,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0

* g.kg⁻¹; ** priemer 90, 150 a 240 dní fermentácie; indexy: štatisticky významné rozdiely v riadku (P<0,01)

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Arriola K.G, et al . Meta- analysis of effects of inoculation with *Lactobacillus buchneri*, with or without other bacteria, on silage fermentation, aerobic stability, and performance of dairy cows. J. Dairy Sci.. 2021; 104: 7653– 7670.
- da Silva EB, et al. Effect of dry matter content on the microbial community and on the effectiveness of a microbial inoculant to improve the aerobic stability of corn silage; J. Dairy Sci. 2022; 105:5024–5043.
- Kacerovský O, et al. Testing and judging feeds (Zkoušení a posuzování krmiv). Státní zemědělské nakladatelství Praha. 1990
- Krooneman J, et al. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov. a 1,2-propanediol- degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002; 52: 639–46.
- Mitřík, T. Ensilage – illustrated manual for expert a begginer alike. Wageningen Academic Publishers. 2021
- Mitřík T, Kořínek D, Mitřík A. Heterofermentative LAB and 1,2-propanediol production in maize silages with lower dry matter content. 18th international symposium forage conservation, Brno. 2019
- Nishino N, Touno E. Ensilage characteristics and aerobic stability of direct-cut and wilted grass silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. J Sci Food Agric. 2005; 85:1882–1888.

MORFOLOGICKÉ A FUNKČNÉ ZMENY GASTROINTESTINÁLNEHO TRAKTU ASOCIOVANÉ S PORUCHAMI AUTISTICKÉHO SPEKTRA U PSEUDO GERM-FREE (PGF) ANIMÁLNEHO MODELU

Németová D.¹, Gancarčíková S.¹, Lauko S.¹, Hrková G.², Hajdučková V.¹, Pačuta I.¹, Sashova Tomova A.³, Rašková B.³, Ostatníková D.³

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach, 04181 Košice, SR

²Parazitologický ústav SAV v.v.i., Hlinkova 3, 04001 Košice, SR

³Fyziologický ústav Lekárskej fakulty, UK, Sasinkova 2, 81372 Bratislava, SR

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo sledovanie vplyvu transplantátu fekálnej mikrobioty (FMT) od detí s poruchami autistického spektra (PAS) na klinicko-patologickú odpoveď a histopatológiu črevnej steny v patogenéze gastrointestinálnych symptómov sprevádzajúcich PAS, využitím pseudo germ free (PGF) animálneho modelu. Po získaní PGF modelu s redukovanou črevnou mikrobiotou boli myši rozdelené do 3 skupín: skupiny (K) bez inokulácie fekálnej dysbiotckej mikrobioty, skupiny zvierat (FMT-PAS) s aplikáciou mikrobioty od detí s PAS a poslednej skupiny (FMT-NT) s aplikáciou fekálneho transplantátu od zdravých detí v dávke 0,2 ml/myš/deň po dobu 3 dní. Po aplikácii dysbiotckej a zdravej fekálnej mikrobioty od detských donorov boli klinické parametre zvierat individuálne bodovo hodnotené podľa Indexu aktivity ochorenia DAI (Disease activity index). Exaktné kvalitatívne posúdenie poškodenia tkaniva hrubého čreva bolo dosiahnuté morfometrickou analýzou histologických rezov a hodnotením Indexu histologickej aktivity ochorenia – HAI. Histologický nález potvrdil negatívny vplyv dysbiotckej fekálnej mikrobioty na rozvoj črevnej zápalovej reakcie a mechanického poškodenia sliznice hrubého čreva na animálnom PGF modeli s dysbiotickou mikrobiotou od detí s PAS.

ÚVOD

Porucha autistického spektra je heterogénna neurovývojová porucha, ktorá postihuje viaceré sféry normálneho psychického vývinu. PAS je charakterizovaná poruchami reči a jazyka, intelektu, učenia, motoriky a opakujúcimi sa rituálnymi, obmedzujúcimi a stereotypnými vzormi aktivít, záujmov a správania. U jedincov s PAS bola pozorovaná imunitná dysfunkcia a gastrointestinálny (GIT) zápal, ktoré prispievajú k závažnosti správania pozorovaného pri poruche (Mead a kol., 2015). Prevalencia GIT symptómov v populácii detí s PAS sa môže pohybovať od 23 do 70 % (Chaidez a kol., 2014). Uvádza sa, že u detí s PAS závažnosť hnačky, syndrómu dráždivého čreva a chronickej zápchy koreluje so stupňom GIT mikrobiálnej dysbiózy (Sanctuary a kol., 2019). Technika transplantácie fekálnej mikrobioty, ktorá je veľmi odlišná od iných techník zameraných na zmenu črevnej mikrobioty, prenáša celú, kompletnú, stabilnú fekálnu mikrobiálnu komunitu črevných mikroorganizmov obsiahnutú vo výkaloch od zdravých darcov na ľudí s postihnutím, konkrétne s ochorením, ktoré je spojené so zmenenou mikrobiotou, s konečným cieľom obnoviť dysbiózu a riešiť symptómy ochorenia.

MATERIÁL A METODIKA

Predložený postup na zvieratách č. 4356/2022-220 bol schválený ŠVPS SR a odber biologického materiálu od zdravých detí a detí s PAS bol v rámci výskumného projektu č. 14/2018/OVaV schválený Etickou komisiou LF, UK a Univerzitnej nemocnice. Na štúdium morfológických a funkčných zmien GIT u animálneho modelu s poruchami autistického spektra boli použité PGF zvieratá, ktoré boli získané z SPF (Specific pathogen-free) myši línie BALB/c samičieho pohlavia z akreditovaného chovu Velaz s.r.o. (Praha, ČR), v počte 46 kusov. Preprava SPF myši do akreditovaného zariadenia Laboratória gnotobiológie, Katedry mikrobiológie a imunológie UVLF v Košiciach (SK U 16016) bola zabezpečená letecky

v špeciálnych prepravných jednotkách. Následne boli zvieratá umiestnené do odchovňového gnotobiotického zariadenia typu EHRET THF 3271/E 101/ (EHRET Labor-und Pharmatechnik GmbH Co.& KG, Emmendingen, Nemecko) a dvojrukávcového izolátora typu CBC (CBC, Ltd, Madison, Wisconsin, USA). Zvieratá mali stály prístup k autoklávovej vode v sklenených fľašiach a boli kŕmené *ad libitum* radiačne žiarenou kompletnou kŕmnu zmesou ST-1 (Velaz s.r.o., Praha, ČR). Následne boli SPF myši podľa aplikačnej schémy (Tab. 1) rozdelené do nasledovných skupín:

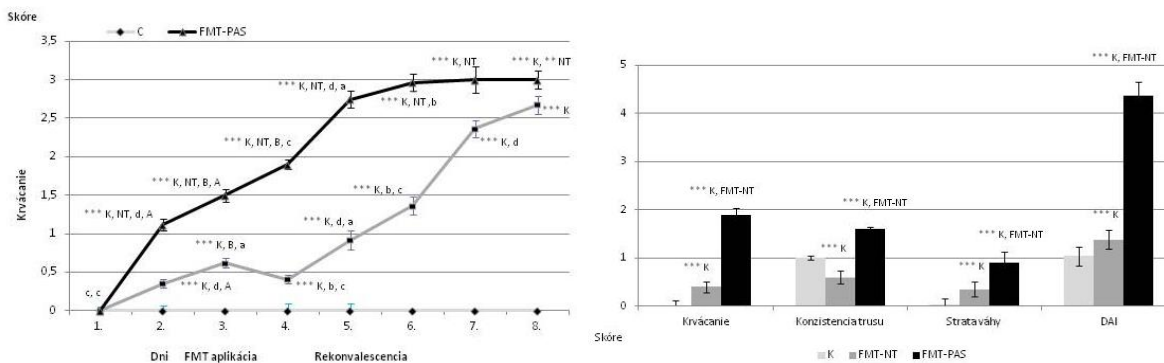
Skupina	I. fáza postupu ZÍSKANIE PGF ANIMÁLNEHO MODELU		II. fáza postupu
	Aplikácia ATB	Rekonvalescencia	Aplikácia FMT
K (n=15)	Amoxicilín potencovaný klavulanátom draselným v dávke 0,2 ml <i>per os</i> (s koncentráciou účinnej látky 387,11 mg/kg/myš) + Ciprofloxacín v dávke 0,1 ml <i>s.c</i> (s koncentráciou účinnej látky 19,60 mg/kg/myš) každých 12 hodín po dobu 5 dní	10 dní v mikrobiologicky kontrolovanom prostredí gnotobiotického izolátora	Bez aplikácie FMT
FMT-NT (n=15)			Aplikácia FMT od zdravých detí 0,2 ml <i>per os</i> /myš/deň po dobu 3 dní
FMT-PAS (n=16)			Aplikácia dysbiotickéj FMT od detí s PAS 0,2 ml <i>per os</i> /myš/deň po dobu 3 dní

Tab.1. Aplikačná schéma

Hodnotenie klinického skóre u myši zahŕňalo denné sledovanie a zaznamenávanie klinického skóre DAI, určeného podľa postupu uvedenom autormi Gancarčíková a kol. (2020). Súčasťou DAI bolo sledovanie konzistencie trusu, krvácania z rekta a denného úbytku hmotnosti pri aplikácii FMT. Na konci postupu boli myši z jednotlivých študijných skupín po 3-dňovej aplikácii transplantátov v počte 15-16ks/skupinu usmrtené humánnym spôsobom prípravkom na eutanáziu sodium pentobarbital v dávke (86 mg/kg živej hmotnosti), s následnou cervikálnou dislokáciou. Na hodnotenie morfometrických ukazovateľov a HAI boli histologické rezy zafarbené Harrisovým hematoxylínom - eozínom (H&E) a na farbenie Gobletových buniek sa použila alcianová modrá, safranín + Gillsonov hematoxylín. Medzi hodnotené parametre histologického skóre patrili: prítomnosť/nepítomnosť zápalového infiltrátu, deformačné poškodenie črevných krýpt, redukcia mucínu (Gobletových buniek) a erózie epiteliálnej výstelky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skóre rektálneho krvácania sa u skupiny FMT-PAS od prvého do 3. dňa aplikácie FMT od detí s PAS štatisticky významne zvyšovalo (Obr. 1, $p < 0.01$), a najvyššia intenzita rektálneho krvácania na úrovni skóre 3 bola u všetkých zvierat tejto skupiny zaznamenaná v období od 3-5. dňa po ukončení aplikácie FMT. Rovnako bola v tejto skupine potvrdená najvyššia strata na váhe, ktorá so skóre 1 predstavovala 5-10 % straty celkovej hmotnosti zvierat. Naproti tomu v kontrolnej skupine K sme nezaznamenali žiadne straty na hmotnosti. Nakoľko sa PGF zvieratá vyznačujú významnou redukciou črevnej mikrobioty a majú charakteristické črty germ-free zvierat, inokulácia komplexnou fekálnou zdravou mikrobiotou mala za následok objavenie sa sprievodného rektálneho krvácania. Dynamika rektálneho krvácania však bola v skupine FMT-NT v porovnaní so zvieratami FMT-PAS miernejšia, s významnejším vzostupom skóre krvácania na 4. deň po ukončení aplikácie FMT ($p < 0.001$). U skupiny FMT-PAS bol po 3-dňovej aplikácii FMT s PAS, v porovnaní so skupinou K, ako aj skupinou FMT-NT (Obr. 2), potvrdený významný klinický index ochorenia (DAI, $p < 0.001$).



Obr. 1. Dynamika vývoja rektálneho krvácania po aplikácii FMT.

Obr. 2. DAI po 3-dňovej aplikácii FMT od neurotypických detí a detí s PAS.

K (kontrolná skupina bez aplikácie FMT), FMT-NT (skupina po 3-dňovej aplikácii FMT od neurotypických detí), FMT-PAS (skupina po 3-dňovej aplikácii FMT od detí s PAS). Výsledky sú uvedené ako priemer \pm SD.

Významnosť pri * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (štatistické rozdiely medzi skupinami),

a, b $p < 0,05$; AB $p < 0,01$; cd $p < 0,001$ (štatistické rozdiely medzi dňami v rámci skupiny).

V dôsledku hepatotoxického a nefrotoxického pôsobenia dysbiotického mikrobioty bolo u skupiny FMT-PAS zaznamenané u všetkých zvierat (100 %) zväčšenie obličiek a zmena konzistencie pečene na veľmi mäkkú, sprevádzané aj významne vyššou relatívnou hmotnosťou pečene týchto zvierat ($p < 0,01$). Ďalším nálezom po aplikácii FMT s PAS bol 80% výskyt enteritíd, s 8 % zastúpením jej hemoragickej formy. Predkladané výsledky potvrdili u PGF modelu myši negatívny vplyv 3-dňovej aplikácie FMT od detí s PAS na klinicko-patologickú odpoveď v patogenéze GIT symptómov sprevádzajúcich PAS. Histopatologická analýza odhalila fyziologickú histologickú štruktúru a neporušenú povrchovú štruktúru tkaniva hrubého čreva v kontrolnej skupine K. Histologické rezy hrubého čreva zo skupiny FMT-PAS ukázali aktívny zápal, zdokumentovaný prítomnosťou lokálnych ložísk zápalových infiltrátov lokalizovaných v *tunica mucosa* a *tela submucosa*. Zápalové infiltráty boli sprevádzané závažnými deštruktívnymi zmenami v povrchových vrstvách epitelovej výstelky hrubého čreva. Poškodená celistvosť *tunica mucosa* mala za následok deformačné zmeny v črevných kryptách (kryptitída, nepravidelné krypty) a stratu pohárikovitých buniek. Histologický nález potvrdil negatívny vplyv dysbiotického fekálnej mikrobioty na rozvoj črevnej zápalovej reakcie a mechanického poškodenia sliznice hrubého čreva na animálnom PGF modeli s dysbiotickou mikrobiotou od detí s PAS.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola uskutočnená vďaka podpore projektu APVV-20-0114.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gancarcikova S, et al. Innovative Animal Model of DSS-Induced Ulcerative Colitis in Pseudo Germ-Free Mice. *Cells*. 2020; 9:2571.
- Chaidez V, Hansen RL, Hertz-Picciotto I. Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord*. 2014; 44:1117-1127.
- Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett*. 2015; 163:49-55.
- Sanctuary MR, et al. Pilot study of probiotic/colostrum supplementation on gut function in children with autism and gastrointestinal symptoms. *PLoS One*. 2019; 14:e0210064.

PORUŠENIE PRINCÍPU PROPORCIONALITY PRI USTANOVENIACH ZÁKONA Č. 39/2007 O UDEĽOVANÍ POKÚT VETERINÁRNYM LEKÁROM

Pajtašová J.

Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat , UVLF Košice

ABSTRAKT

V práci sa venujeme možnému porušeniu princípu proporcionality pri konkrétnych ustanoveniach zákona č. 39/2007 Z.z. v znení neskorších právnych predpisov (ďalej len ako „ZoVS“) v súvislosti s udeľovaním pokút majiteľom psov za porušenie ich zákonnej povinnosti označiť svojho psa elektronickým transpondérom a veterinárnym lekárom, ktorí takto neoznačeného psa ošetrí.

Cieľom práce je právna analýza platnej právnej úpravy, ktorá je podľa nášho názoru nespravodlivá k veterinárnym lekárom vzhľadom k niekoľkonásobne vyššej pokute im udeľovanej pri ošetrovaní povinne neoznačeného psa v porovnaní s pokutou udelenou majiteľovi psa, ktorému túto povinnosť ukladá zákon. Pojem nespravodlivosť sme použili zámerne, pretože tento pojem často vo svojich rozhodnutiach používa Ústavný súd Slovenskej republiky (ďalej len ako „ÚS SR“) v súvislosti s pojmom ústavne neudržateľný. Jednoznačne je táto právna úprava hodná podrobeniu prieskumu z ústavnoprávneho hľadiska, ako aj možné obmedzenie vlastníckych práv na jej základe, pričom už len neprimerané obmedzenie práva pokojne užívať svoj majetok podľa Doc. Drgonca stačí na rozhodnutie o protiústavnosti sporných ustanovení ZoVS.

ÚVOD

ZoVS v ust. § 19 ods. 9 ukladá povinnosť vlastníčkovi psa chovaného na území SR zabezpečiť jeho trvalé označenie transpondérom, ktorý spĺňa technické požiadavky podľa osobitného predpisu pred prvou zmenou vlastníka psa, najneskôr však do 12 týždňa veku psa a uviesť identifikačné údaje psa a údaje o vlastníčkovi psa v centrálnom registri spoločenských zvierat. Orgán veterinárnej správy uloží fyzickej osobe – majiteľovi psa pokutu 50 eur, ak nezabezpečí na svoje náklady trvalé označenie psa čipom podľa § 19 ods. 9 ZoVS.

Podľa ust. § 19, ods. 10 ZoVS, ak bola vlastníčkovi psa uložená pokuta podľa § 48 ods. 1, uhradením pokuty prechádza povinnosť zabezpečiť trvalé označenie psa podľa odseku 9 na obec. Takto uložená sankcia je príjmom rozpočtu obce, v ktorej má vlastník psa, ktorý pokutu uhradil trvalý pobyt. Pokuty sú príjmom štátneho rozpočtu okrem pokuty, ktorá je príjmom rozpočtu obce, v ktorej má vlastník psa, ktorý pokutu uhradil, trvalý pobyt (ust. § 48, ods. 1 ZoVS).

Podľa ust. § 13, písm. g) ZoVS je veterinárny lekár povinný oznámiť príslušnému orgánu veterinárnej správy každé podozrenie z porušenia tohto zákona.

Z ust. § 50, ods. 2 ZoVS vyplýva, že orgán veterinárnej správy uloží fyzickej osobe – podnikateľovi – súkromnému veterinárnemu lekárovi alebo právnickej osobe pokutu od 1.750 eur do 20.000 eur, ak si podľa písm. m) ZoVS ako súkromný veterinárny lekár neplní povinnosti v súlade s ust. § 13 ZoVS. Súčasne pod hrozbou tejto pokuty veterinárny lekár nesmie vykonať veterinárne úkony na psovi, ktorý nie je identifikovaný podľa § 19 ods. 9 (nie je označený elektronickým transpondérom), okrem nevyhnutých prípadov v záujme ochrany zdravia psa alebo človeka.

BREMENO ZODPOVENOSTI ZA PORUŠENIE ZÁKONNEJ POVINNOSTI OZNAČIŤ PSA

Sme toho názoru, že zákonodarca preniesol bremeno zodpovednosti za porušenie zákonnej povinnosti majiteľa psa označiť ho trvale transpondérom na veterinárnym lekárom. To sa odrazilo práve v hrubom nepomere medzi výškou sankcie, ktoré veterinárnym lekárom hrozia

za neoznámenie porušenia zákonnej povinnosti majiteľa psa označiť príslušným orgánom a za vykonanie veterinárnych úkonov na neoznačenom psovi (okrem nevyhnutných).

PRINCÍP PROPORCIONALITY

V práve je proporcionalita spájaná so spravodlivosťou. Ústavný súd SR použil v jednom z prípadov test proporcionality vo veci sp. zn. PL. ÚS 3/00 zo dňa 24. 04. 2001:

„zákonodarca musí aj pri zmene chráneného právneho postavenia – aby zásah bol ústavnoprávne prípustný - vychádzať z princípu proporcionality, ktorý je vlastný právnemu štátu. Tento princíp predovšetkým znamená primeraný vzťah medzi cieľom (účelom) sledovaným štátom a použitými prostriedkami. V týchto súvislostiach cieľ (účel) sledovaný štátom smie byť sledovaný; prostriedky ktoré štát použije, smú byť použité; použitie prostriedkov na dosiahnutie účelu je vhodné; použitie prostriedkov na dosiahnutie účelu je potrebné a nevyhnutné.“

Právnik, Doc. JUDr. Ján Drgonec, DrSc., konštatuje, že zákonodarca pri prijímaní vyššie citovaných ustanovení ZoVS nedodrжал princíp proporcionality preto, lebo veterinárovi možno podľa tohto zákona uložiť pokutu s dolnou hranicou minimálne 1.750 eur – 20.000 eur za rovnaké správanie, za aké majiteľovi psa maximálne 50 eur.

Ide o hrubý nepomer pri udeľovaní pokút pri identickom správaní – porušení ustanovení ZoVS, keď veterinár má znášať pokutu niekoľkonásobne vyššiu ako samotný majiteľ psa, pričom je to práve majiteľ psa, ktorý primárne zákon poruší (predpoklad pre udelenie pokuty). Zákonodarca tento hrubý nepomer žiadnym spôsobom neodôvodnil a nevysvetlil prečo má vôbec veterinárny lekár pokutu v takej výške znášať.

PORUŠENIE PRÁVNEHO ŠTÁTU

Právny štát by mal garantovať svojim občanom rovnosť pred zákonom, včasnú vymožiteľnosť ich práv, prístup k základným právam a slobodám (v tomto prípade vid'. nižšie na možné porušenie práva na slobodné podnikanie garantované Ústavou SR, čl. 35). Národná rada Slovenskej republiky (ďalej len ako „NR SR“) ako jediný zákonodarca prijímajúci zákony má ústavné povinnosti, ktoré spočívajú predovšetkým v rešpektovaní základných práv a slobôd. Tento postoj by mali zohľadniť aj poslanci práve pri tvorbe legislatívneho procesu tak, aby bol súladný s Ústavou.

PORUŠENIE PRÁVA NA SLOBODNÉ PODNIKANIE

V kontexte s vyššie uvedeným poukazujem na možné porušenie čl. 35 ods. 1 Ústavy SR:

„Každý má právo na slobodnú voľbu povolania a prípravu naň, ako aj právo podnikat' a uskutočňovať inú zárobkovú činnosť.“

OBMEDUJÚCI ZÁSAH DO ZÁKLADNÉHO PRÁVA VLASTNÍŤ MAJETOK

Z čl. 20 ods. 3 Ústavy SR:

„Vlastníctvo zaväzuje. Nemožno ho zneužiť na ujmu práv iných alebo v rozpore so všeobecnými záujmami chránenými zákonom. Výkon vlastníckeho práva nesmie poškodzovať ľudské zdravie, prírodu, kultúrne pamiatky a životné prostredie nad mieru ustanovenú zákonom.“

Z čl. 20 ods. 4 Ústavy SR:

„Vyvlastnenie alebo nútené obmedzenie vlastníckeho práva je možné iba v nevyhnutnej miere a vo verejnom záujme, a to na základe zákona a za primeranú náhradu.“

Z čl. 20 ods. 5 Ústavy SR:

„Iné zásahy do vlastníckeho práva možno dovoliť iba vtedy, ak ide o majetok nadobudnutý nezákonným spôsobom alebo z nelegálnych príjmov a ide o opatrenie nevyhnutné v

demokratickej spoločnosti pre bezpečnosť štátu, ochranu verejného poriadku, mravnosti alebo práv a slobôd iných. Podmienky ustanoví zákon.“

Podľa Doc. Drgonca zákonná povinnosť trvalo označiť zasahuje do práva pokojne užívať svoj majetok garantovaného článkom 1 Protokolu č. 1 k Európskemu dohovoru o ochrane ľudských práv a základných slobôd. Sankcia udelená v prípade, že pes nie je trvale označený predstavuje podľa Doc. Drgonca nútené obmedzenie vlastníctva vykonané ako sankčné opatrenie.

Z nálezu Ústavného súdu Slovenskej republiky sp. zn.: PL. ÚS 38/95 z 03. 04.1996, zverejnený v Zbierke zákonov Slovenskej republiky, čiastka 49, pod číslom 135/1996, v zbierke nálezov uverejnený pod č.4/96, právna veta č. 3:

„Ústava Slovenskej republiky neumožňuje, aby k vyvlastneniu alebo nútenému obmedzeniu vlastníckeho práva došlo priamo zákonom.“

Z nálezu Ústavného súdu Slovenskej republiky sp. zn. PL. ÚS 19/09 z 26. 01. 2011:

„Ústavnoprávna ochrana slobody vlastníctva nie je len ochranou zužujúcou sa na „púhe“ vlastníctvo, resp. majetok. Právo na ochranu vlastníctva, resp. právo na pokojné užívanie majetku je základným právom, ktoré musí byť vnímané v úzkej súvislosti s ochranou slobodnej sféry a súkromia vlastníka. Vlastnícke právo je súčasťou jadra personálnej autonómie jednotlivca vo vzťahu k verejnej moci. Obmedzenia práva na ochranu vlastníctva a práva na pokojné užívanie majetku musia rešpektovať aj ústavnú hodnotu personálnej autonómie.“

Citovaný nález sa síce týka vyvlastnenia pozemkov, no analogicky ho je možné použiť na túto právnu vec. Z uvedeného vyplýva, že NR SR ako zákonodarný orgán nie je v zmysle Ústavy SR oprávnená zákonom nútené obmedziť vlastnícke právo. Orgán oprávnený realizovať obmedzenie vlastníckeho práva zákonodarca síce v súlade s čl. 20 ods. 4 Ústavy SR určil, no je sporné, či trvale označenie psa je vo verejnom záujme, teda či je možné takto nútené obmedziť vlastníckeho práva. Pri výkone vlastníckych práv je vlastník v niektorých prípadoch povinný strpieť aj tzv. zákonné obmedzenia. Napríklad vlastník nehnuteľnosti je povinný strpieť vyrubovanie daní a poplatkov tiež pod hrozbou sankcie. No v tomto prípade nie je verejný záujem sporný.

ZÁVER

Pri výkone povolania veterinárnych lekárov je ochrana im zaručená nezákonne obmedzená hrozbou sankcie, jej hrubým nepomerom v porovnaní so sankcionovaním majiteľov psa porušujúcich zákon. Právna úprava zavádzajúca sankcie podnikateľom za porušenie právnej povinnosti ich klientov je diskriminačná voči veterinárnym lekárom oproti ostatným podnikateľským subjektom.

Ďalšou otázkou je, či trvalé označenie psov je vo verejnom záujme a či sa nejedná o nedovolený zásah do vlastníckych práv.

ZoVS by mal byť podrobený prieskumu. Vyžaduje si novelizáciu tak, aby bol súladný a neodporoval Ústave SR (čl. 20 - právo vlastníť majetok, čl. 35 - právo slobodne podnikat').

POUŽITÁ LITERATÚRA

Zákon č. 39/2007 Z. z. o veterinárnej starostlivosti v znení neskorších právnych predpisov

Zákon č. 460/1992 Zb., Ústava SR

Európsky dohovor o ochrane ľudských práv a základných slobôd

Uznesenie Ústavného súdu SR, sp. zn.: PL. ÚS 3/00 zo dňa 24. 04. 2001

Uznesenie Ústavného súdu SR, sp. zn.: PL. ÚS 19/09 z 26. 01. 2011

Uznesenie Ústavného súdu SR, sp. zn.: PL. ÚS 38/95 z 03. 04.1996

MAGNETICKÁ SEPARÁCIA NUKLEOVÝCH KYSELÍN MODIFIKOVANÝMI MAGNETICKÝMI NANOPARTIKULAMI

Pavlová A.¹, Kočíková B.¹, Urda Dolinská M.¹, Beňová E.², Zelenák V.², Zelenáková A.³, Vilček Š.¹,
Jacková A.¹

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

² Katedra anorganickej chémie, UPJŠ, Košice

³ Katedra fyziky kondenzovaných látok, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Experimentálne magnetické nanopartikuly boli porovnané pri magnetickej separácii tromi rôznymi komerčnými magnetickými kitmi na modelovej vzorke pozitívnej na RNA vírusu hepatitídy E. Testovaných bolo 12 nanopartikul s rôznymi povrchovými modifikáciami, po izolácii boli porovnávané hodnoty koncentrácie a čistoty, ako aj prahového cyklu (Ct) použitím metódy RT-qPCR. Všetky experimentálne magnetické nanopartikuly boli schopné izolovať RNA vírusu. Kvalita RNA izolovanej rôznymi nanopartikulami sa v rámci jednotlivých kitov líšila, niektoré experimentálne magnetické nanopartikuly boli porovnateľné s komerčnými magnetickými partikulami.

ÚVOD

Izolácia nukleových kyselín je jednou zo základných metód využívaných v molekulárnej biológii. V súčasnej dobe sa na izoláciu nukleových kyselín čoraz častejšie využívajú metódy magnetickej separácie. Magnetické nanopartikuly zložené z Fe₃O₄ a pokryté vrstvou siliky, dosahujú rozmery niekoľkých nanometrov a reagujú na vonkajšie magnetické pole (Kim a kol., 2019). Povrch týchto partikul je možné modifikovať rôznymi funkčnými skupinami, a tak ovplyvňovať ich vlastnosti. Magnetické nanopartikuly s naviazanými nukleovými kyselinami sú v prítomnosti magnetického poľa fixované, čo umožňuje ich premývanie extrakčnými roztokmi a minimalizuje to straty RNA v priebehu izolácie (Cui a kol., 2023). Cieľom práce bolo zistiť a porovnať schopnosť experimentálne pripravených magnetických nanopartikul izolovať vírusovú RNA v klinickej vzorke rôzneho charakteru.

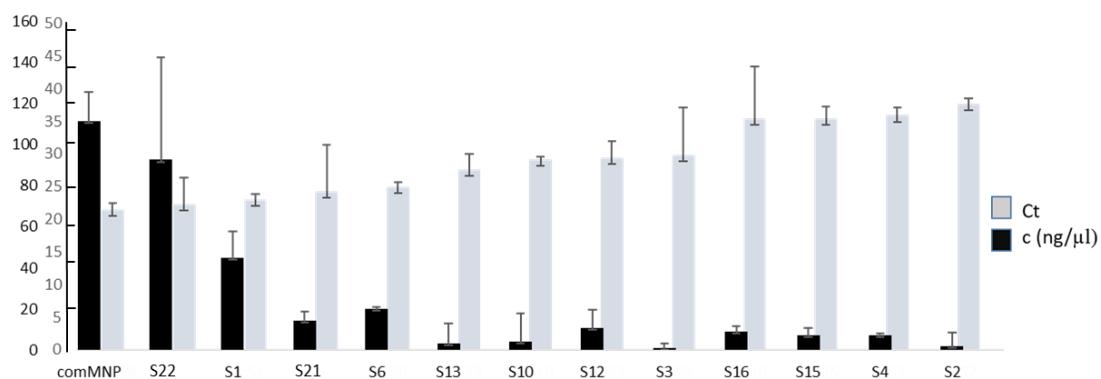
MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonávané s 12 druhmi experimentálnych magnetických nanopartikul (eMNP) na báze oxidu železa s koncentráciou 130 mg/ml. Testované boli nanopartikuly S1 s vrstvou siliky a bez ligandov, S2 až S16 s ligandami modifikovaným povrchom, S21 a S22 obalené poréznu vrstvou siliky. Na izoláciu RNA boli použité komerčné kity: MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit (Kit 1), MagMAX™ – 96 Total RNA Isolation Kit (Kit 2) a MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Kit 3) (Applied Biosystems, Vilnius, Lituania). Komerčné magnetické nanopartikuly (comMNP) z kitu boli nahradené eMNP. RNA vírusu hepatitídy E (HEV) bola izolovaná z pozitívnej klinickej vzorky pečene diviaka. Kit 1 a Kit 3 sú určené na izoláciu nukleových kyselín z tekutých vzoriek, použitý bol preto 5 % (w/v) homogenát pečene diviaka. Pri experimentoch s Kitom 2, určeným na izoláciu zo živočíšnych tkanív, bolo použitých 5 mg tkaniva pečene diviaka.

Kvalita izolovanej nukleovej kyseliny bola zisťovaná na základe nameranej koncentrácie (A260) a čistoty (A260/280). Na detekciu RNA HEV bola využívaná metóda RT-qPCR s iTaq Universal Probes One-Step Kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) použitím prístroja Bio-Rad CFX Opus 96 Real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) (Jothikumar a kol., 2006). Výsledkom RT-qPCR bola hodnota Ct. Experimenty s každým kitom boli zopakované štyrikrát, čo umožnilo vypočítať priemerné hodnoty koncentrácií a Ct pre každú nanopartikulu.

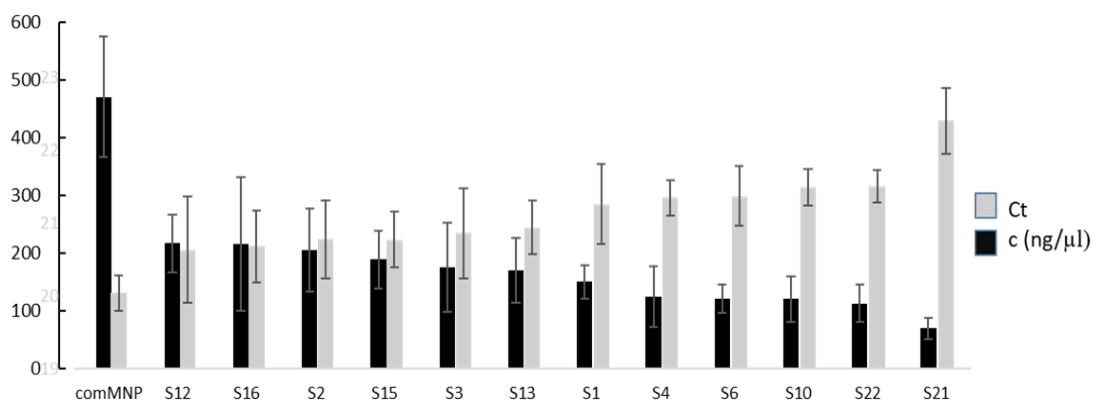
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Čistota RNA izolovanej Kitom 1 sa pohybovala v rozpätí od 1,250 do 2,500. Najvyššiu koncentráciu dosiahli comMNP z kitu (127,6 ng/μl). Najvyššiu koncentráciu z eMNP dosiahla vzorka S22 (92,67 ng/μl) a najnižšiu koncentráciu vzorka S3 (1 ng/μl). Hodnoty Ct získané z RT-qPCR dosiahli najnižšiu úroveň u comMNP (Ct = 21,45). Najlepšiu (najnižšiu) hodnotu Ct dosiahli testované nanopartikuly S22 (Ct = 22,31) a nanopartikuly S1 (Ct = 23,01). Najvyššie hodnoty Ct dosiahli nanopartikuly S2 (Ct = 37,7) (Obr.1.).



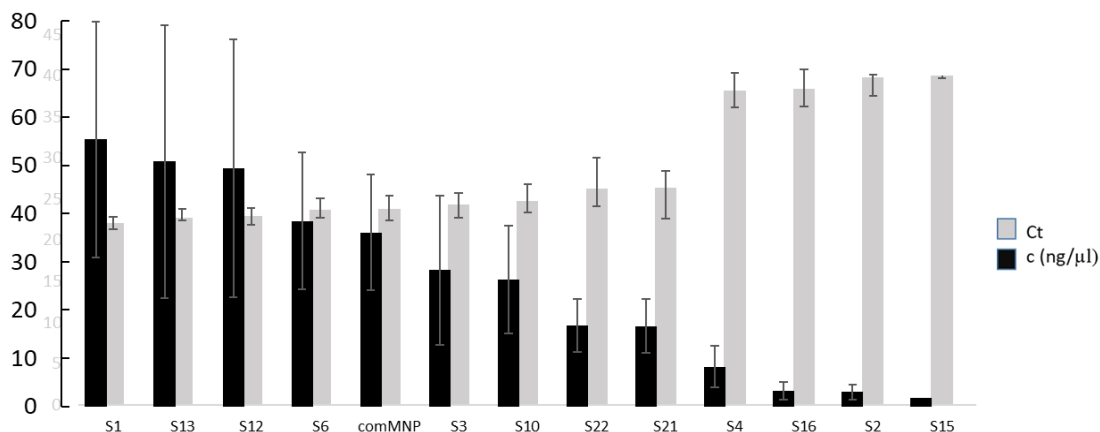
Obr. 1. Výsledky izolácie RNA s MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit

Čistota RNA izolovanej Kitom 2 bola vysoká, pohybovala sa v rozmedzí od 1,970 do 2,080. Koncentrácia RNA bola najvyššia pri comMNP (470,3 ng/μl). Najvyššiu koncentráciu RNA izolovanej eMNP dosiahla vzorka S12 (217 ng/μl), najnižšiu vzorka S21 (69 ng/μl). Hodnoty Ct dosiahli najnižšiu úroveň taktiež u comMNP (Ct = 20,0). Najnižšie hodnoty Ct dosiahli eMNP S12 a S16 (Ct = 20,64 a 20,69). Naopak, nanočastice S22 a S21, dosahovali vyššie Ct (22,41 a 21,51) (Obr. 2.).



Obr. 2. Výsledky izolácie RNA s MagMAX™ – 96 Total RNA Isolation Kit

Čistota RNA izolovanej Kitom 3 sa pohybovala v rozmedzí od 1,500 do 2,001. Koncentrácia RNA dosiahla najvyššiu úroveň pri eMNP S1 (55,4 ng/μl), najnižšiu pri S15 (1,73 ng/μl). Koncentrácia RNA izolovanej comMNP bola pri tomto kite iba 36,5 ng/μl. Najnižšiu hodnotu Ct dosiahli eMNP S1 a S13 (Ct = 22,03 a 22,72), najvyššiu hodnotu S15 (Ct = 40). Hodnota Ct comMNP bola 23,84 (Obr. 3.).



Obr. 3. Výsledky izolácie RNA s MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit

Experimenty vykonané všetkými kitmi preukázali schopnosť eMNP s rôznymi povrchovými modifikáciami izolovať RNA vírusu v tekutých klinických vzorkách a vzorkách tkanív. Vo väčšine prípadov platila závislosť, pri ktorej so vzrastajúcou koncentráciou klesali hodnoty Ct. Účinnosť jednotlivých partikul značne varírovala v závislosti od použitého komerčného kitu. Najvyššiu čistotu a koncentráciu izolovanej RNA, ako aj najnižšie hodnoty Ct sme dosiahli pri magnetickej separácii Kitom 2. Tento kit je určený na izoláciu nukleovej kyseliny zo živočíšnych tkanív, využíva optimalizované kroky na úplnú lýzu buniek a prečistenie vzorky, z čoho vyplývajú aj nami dosiahnuté priaznivé výsledky. Najlepšie hodnoty Ct a koncentrácie RNA dosiahli pri izolácii Kitom 1 častice comMNP, S22 a S1. Pri izolácii Kitom 2 častice comMNP, S12, S16 a pri izolácii Kitom 3 častice S1, S13 a S12. Rozdiely vo výsledkoch môžu byť zapríčinené rôznymi faktormi. Účinnosť jednotlivých častíc môže byť ovplyvnená ich veľkosťou a samotnými funkčnými modifikáciami povrchu, koncentráciou a pH extrakčných roztokov. Výsledky izolácie ukázali, že účinnosť niektorých častíc bola porovnateľná s comMNP. Pri vhodne zvolených extrakčných roztokoch a optimalizovaných reakčných podmienkach môžu byť tieto nanopartikuly účinne využívané v rôznych sférach diagnostiky a výskumu.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom z Operačného programu Rozvoj a Integrovaná infraštruktúra: „Nanočastice na riešenie diagnosticko-terapeutických problémov s COVID-19 (NANOVIR)“, ITMS 2014 +:313011AUW7.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cui H, et al. A simplified viral RNA extraction method based on magnetic nanoparticles for fast and high-throughput detection of SARS-CoV-2. *Talanta*. 2023, 258:124479.
- Jothikumar N, et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods*. 2006, 131(1):65-71.
- Kim SE, et al. Magnetic Particles: Their Applications from Sample Preparations to Biosensing Platforms. *Micromachines (Basel)*. 2020, 13;11(3):302.

MMP9 AKO POTENCIONÁLNY BIOMARKER KARCINÓMU PANKREASU

Roškovičová V.¹, Kaľuchová J.¹, Veľurkovská I.², Maľlanková J.², Mareková M.², Radoňák J.¹

¹ I. chirurgická klinika, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach a UNLP v Košiciach

² Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach

ABSTRAKT

Karcinóm pankreasu patrí medzi závažné onkologické ochorenia gastrointestinálneho traktu. V čase stanovenia diagnózy až 28 % pacientov má metastatické poškodenie pečene a len 5 % pacientov prežije 5 rokov. Neinvazívne markery, ktoré by mohli pomôcť skríningu ochorenia a rýchlejšie odhaliť pacientov sú stredom vedeckého výskumu. Medzi potencionálne biomarkery patria aj matrixové metaloproteinázy, ktoré zohrávajú úlohu pri onkogenéze. Prospektívne sme sledovali v období od septembra 2022 do marca 2023 46 pacientov s karcinómom pankreasu a benígnymi ochoreniami pankreasu. Stanovovali sme hladinu MMP9 v sére a v tkanive bioptovanom počas chirurgického výkonu. Výsledkom bola elevácia hladín MMP9 od štádia T2. V nižších štádiách sa nepotvrdila korelácia medzi štádiom ochorenia a hladinou MMP9, dôvodom môže byť malá skupina pacientov.

ÚVOD

Medzi závažné onkologické ochorenie tráviaceho traktu patrí karcinóm pankreasu. Napriek tomu, že sa tomuto ochoreniu venuje pozornosť, diagnostika karcinómu pankreasu je stále neskorá. Približne 5 % pacientov s rakovinou pankreasu prežije päť rokov (Klein a kol., 2021). Pacienti s neresekovateľným karcinómom pankreasu alebo metastatickým poškodením hepatobiliárneho systému prežijú menej ako jeden rok (Siegel a kol., 2022). Diagnostika sa momentálne opiera o nešpecifické klinické príznaky, základné biochemické vyšetrenie doplnené o onkomarkery Ca19-9 a CEA a zobrazovacie vyšetrenia. Základom liečby je resekčný chirurgický výkon podľa anatomickej lokalizácie nádoru a následne je pacient manažovaný onkológom. Štandardizovaným neinvazívnym markerom karcinómu pankreasu sú momentálne nádorové markery Ca19-9 a CEA. Majú však limitáciu v klinickej aplikácii z dôvodu vykazovania falošnej pozitivity pri ochoreniach pankreatobiliárneho systému (Su a kol., 2022). Do popredia výskumu sa preto dostávajú nové markery, ktoré by mohli byť senzitivnejšie a špecifickejšie pre karcinóm pankreasu. Jednými z nich sú aj matrixové metaloproteinázy (MMP). MMP sú hlavnými enzýmami, endopeptidázami, zodpovednými za degradáciu a remodeláciu extracelulárnej matrix, čo je základom patologického mechanizmu onkogenézy (Weningen a kol., 2018). Momentálne poznáme 28 podtypov MMP, ktoré sú rozdelené do tried na základe substrátovej špecificity (Huang a kol., 2018). MMP9, tiež známa ako gelatináza B alebo kolagenáza IV. typu, katalyzuje degradáciu veľkých zložiek extracelulárnej matrix ako sú elastín a kolagén. Podieľa sa na uvoľňovaní a aktivácii extracelulárnych signálnych molekúl (Augoff a kol., 2022). Na základe týchto vlastností sa predpokladá vzťah MMP9 so štádiom ochorenia karcinómu pankreasu.

MATERIÁL A METODIKA

Výskumnú vzorku tvorilo 46 pacientov, ktorí boli hospitalizovaní na I. chirurgickej klinike UNLP v Košiciach z dôvodu realizácie chirurgického výkonu resekcie alebo biopsie pankreasu. Všetci pacienti pred odberom podpísali poučenie a informovaný súhlas účastníka biomedicínskeho výskumu podľa § 27 zákona č. 576/2004 Z. z.. Vzorku tvorilo 21 žien (45 %) a 25 mužov (55 %) s vekovým priemerom 62,67 (26-81) rokov. Pacienti boli histologicky rozčlenení do dvoch skupín. Do prvej skupiny boli zaradení pacienti s benígnym nálezom, ktorú tvorili pacienti s chronickou pankreatitídou a benígnymi nádormi pankreasu (11 pacientov, 24 %); táto skupina pacientov bola použitá ako kontrolná skupina. Druhú skupinu, tvorili pacienti s malígnymi nádormi pankreasu (35 pacientov, 76 %). Túto skupinu pacientov tvorili pacienti s adenokarcinómom pankreasu, ktorá bola ďalej rozdelená do jednotlivých

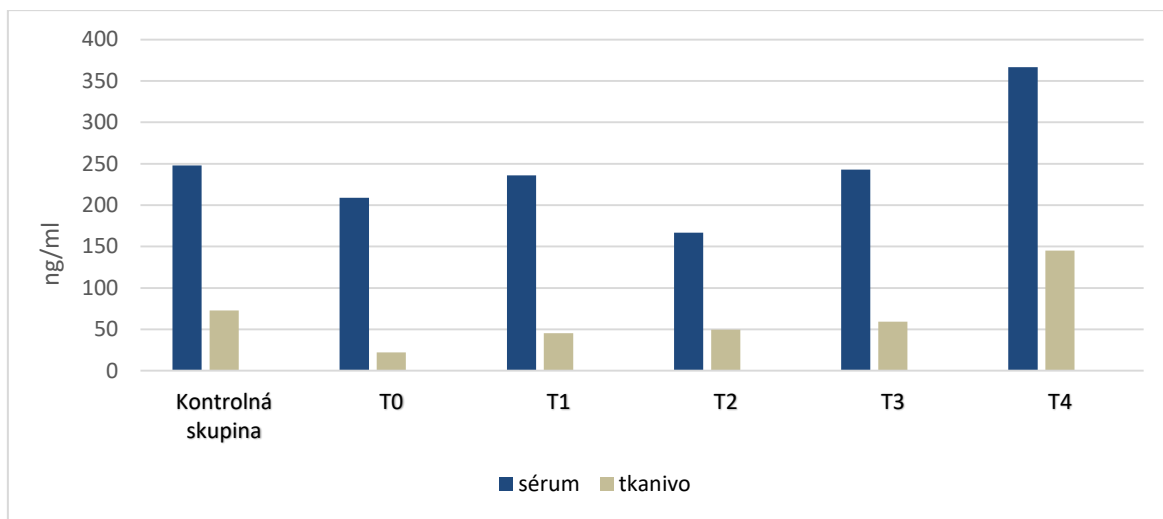
štádií karcinómu pankreasu (Tab.1) . Kategorizácia do jednotlivých štádií sa riadila pravidlami štandardne používanej TNM klasifikácie a prebiehala na Ústave patológie LF UPJŠ a UNLP. Od všetkých pacientov boli odoberané vzorky krvného séra ráno pred operačným výkonom do skúmaviek BD Vacutainer, ktoré sú určené na venózný odber a z dôvodu urýchlenia koagulácie majú vnútornú stenu pokrytú vrstvou aktivátora zrážania, ktorým bol v tomto prípade oxid kremičitý. Vzorky tkaniva boli od pacientov odoberané počas operačného zákroku do fyziologického roztoku na ľade. Následne boli vzorky odoslané na Ústav lekárskej a klinickej biochémie, kde prebehla ich analýza pomocou ELISA metódy.

Stage	T kategória	N kategória	M kategória	Počet pacientov
0	Tis	N0	M0	1 (2,8 %)
I	T1/T2	N0	M0	2 (5,7%)
II	T2	N1	M0	5 (8,6%)
III	T2	N2	M0	4 (14,3%)
IV	Akákoľvek T	Akákoľvek N	M1	23 (68,6 %)

Tab.1 8. vydanie TNM klasifikácie karcinómu pankreasu AJCC and UICC s vybranými štádiami, ktoré sa vyskytovali v našom súbore pacientov (Kang a kol., 2022)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerná koncentrácia MMP9 u pacientov v kontrolnej skupine, ktorú tvorili pacienti s benígnymi nádormi pankreasu a chronickej pankreatitídy bola v sére 247,79 ng/ml a v tkanive 72,61 ng/ml. Skupinu pacientov s malígnym ochorením sme si rozdelili na základe štádií klasifikácie TNM do jednotlivých skupín. V štádiu T0 sa vyskytol 1 pacient s koncentráciou MMP9 v sére 208,71 ng/ml a v tkanive 22,19 ng/ml. V štádiu T1 sme mali 2 pacientov s priemernou koncentráciou MMP9 v sére 235,85 ng/ml a s koncentráciou 45,21 ng/ml v tkanive pacientov. V štádiu T2 sme zaznamenali 5 pacientov s koncentráciou MMP9 v sére 166,60 ng/ml a v tkanive 177,34 ng/ml. V štádiu T3 sa vyskytli štyria pacienti s koncentráciou MMP9 v sére 242,82 ng/ml a v tkanive 59,17 ng/ml. V štádiu T4 sme mali najväčšiu skupinu pacientov, ktorú tvorilo 23 pacientov. Priemerná koncentrácia MMP9 v sére bola 366,69 ng/ml a v tkanive 145 ng/ml. Pri porovnaní štádií na grafe č.1 si môžeme všimnúť významnú eleváciu koncentrácie MMP9 v tkanivách pacientov T0 až T4. Pozorovateľná elevácia hladiny MMP9 v sére je od štádia T2. V nižších štádiách sa nepotvrdila korelácia medzi štádiom ochorenia a hladinou MMP9 v tkanive, dôvodom môže byť malá skupina pacientov. Kontrolnú skupinu netvorili zdraví jedinci, ale pacienti s benígnymi nádormi pankreasu a chronickou pankreatitídou. Keďže hlavnou funkciou MMP9 je degradácia extracelulárnej matrix a prestavba tkaniva, ktorá je prítomná aj pri chronickej pankreatitíde, hladina MMP9 môže byť aj pri chronickej pankreatitíde elevovaná (Zeng a kol., 2021). V mnohých vedeckých štúdiách bola potvrdená korelácia hladín MMP9 v sére aj v tkanive pankreasu od pacientov s adenokarcinómom pankreasu (Ueda a kol., 1996, Huang a kol., 2018). Do popredia sa dostáva aj výskum inhibítorov MMP9 ako vhodnej cielej liečby mnohých onkologických ochorení (Augoff a kol., 2022). Ako je možné vidieť aj v zastúpení pacientov v jednotlivých štádiách, diagnostika karcinómu pankreasu je stále neskorá. Samotný chirurgický výkon je základom kuratívnej liečby karcinómu pankreasu. Včasná detekcia menej pokročilých štádií je však zásadným predpokladom na dosiahnutie lepšieho výsledku pre pacienta. Napriek sľubným výsledkom nachádzame obmedzenia tejto štúdie. Na dosiahnutie vyššej štatistickej významnosti bude potrebné v budúcnosti zväčšiť kohortu pacientov a pokúsiť sa do kontrolnej skupiny zahrnúť zdravých pacientov.



Graf č.1 Koncentrácie MMP9 u pacientov v sére a v tkanive rozdelené na základe TNM klasifikácie

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla vďaka grantovej podpore v rámci Vnútorného vedeckého grantového systému Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach (VVGS-2022-2198). Výskum bol schválený Etickou komisiou UPJŠ a Etickou komisiou UNLP.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Augoff K, et al. MMP9: A Tough Target for Targeted Therapy for Cancer. *Cancers*. 2022; 14(7): 1847
- Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018; 18(10): 3249
- Kang H, Kim S-s, Sung MJ a kol. Evaluation of the 8th Edition AJCC Staging System for the Clinical Staging of Pancreatic Cancer. *Cancers*. 2022; 14: 4672.
- Klein AP, Pancreatic cancer epidemiology: understanding the role of lifestyle and inherited risk factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2021; 18(7): 493-502
- Siegel LR, et al. Cancer statistics 2021, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2022; 71(1):7-33
- Su J, Wang Y, Shao H. Value of multi-detector computed tomography combined with serum tumor markers in diagnosis, preoperative, and prognostic evaluation of pancreatic cancer. *World J Surg Onc*. 2022; 20(323)
- Ueda Y, et al. Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) is expressed in multinucleated giant cells of human giant cell tumor of bone and is associated with vascular invasion. *The American Journal of Pathology*. 1996; 148(2): 611-622
- Weniger M, Honselmann KC, Liss AS. The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship. *Cancers*. 2018; 10(9):316
- Zeng Y, et al. Prognostic and Immunological Roles of MMP9 in Pan-Cancer, *Biomed Research International*. 2022; 32

EXPRESIA RECEPTORA GABA_B V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH

Rušinová L.^{1,2}, Kovaříková, V.¹, Špirková, A.¹, Šefčíková, Z.¹, Pisko, J.¹, Koppel, J.¹, Fabian, D.¹, Čikoš, Š.¹

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

²Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied, UPJŠ v Košiciach

ABSTRAKT

Údaje z literatúry naznačujú, že kyselina γ -aminomaslová (GABA) ako hlavný inhibičný neurotransmitter, môže hrať dôležitú fyziologickú úlohu aj v neneurálnych tkanivách. V našej práci sme zisťovali či GABA môže ovplyvniť vývin preimplantačného embrya pôsobením na GABA receptory. Zamerali sme sa na skúmanie expresie receptora GABA_B a jeho izoformiem GABA_{B1a} GABA_{B1b}, v myšacích oocytoch a preimplantačných embryách. Expresiu týchto receptorov sme analyzovali v ovulovaných oocytoch a preimplantačných embryách v štádiu blastocysty. Pomocou RT-PCR sme detegovali prítomnosť oboch metabotropných podjednotiek- GABA_{B1} a GABA_{B2} receptora. Podrobnejšia analýza GABA_{B1} transkriptu ukázala, že v oocytoch a blastocystách je prítomná izoforma GABA_{B1b} v blastocystách, ale nie izoforma GABA_{B1a}. Tieto výsledky ukazujú, že GABA prítomná v prostredí preimplantačného embrya by mohla mať priamy vplyv na jeho vývin.

ÚVOD

Kyselina γ -aminomaslová (GABA) je primárny inhibičný aminokyselinový neurotransmitter v centrálnom nervovom systéme (CNS) cicavcov, ktorý hrá kľúčovú úlohu pri koordinácii neuronálnej aktivity a pôsobí aj vo vývoji neurónov počas ontogenézy (Young a Bordey 2009). Svoje účinky sprostredkováva GABA prostredníctvom dvoch rozličných receptorových systémov, a to konkrétne pomocou ionotropných GABA_A receptorov a metabotropných GABA_B receptorov. GABA_A receptory sú ligandom riadené chloridové kanály, ktoré tvoria pentamérne komplexy, ktoré sú zložené z rôznych podjednotiek (monomérov). U ľudí bolo identifikovaných celkovo 19 samostatných génov kódujúcich podjednotky GABA_A receptora, ide o šesť α , tri β , tri γ , tri ρ podjednotky a jednu δ , ε , π , θ podjednotku (Ghit a kol., 2021). Receptory GABA_B sú členmi rodiny receptorov spojených s G-proteínmi (GPCR). Ide o heterodimér zložený z dvoch podjednotiek GABA_{B1} a GABA_{B2}, pričom každá z podjednotiek pozostáva z extracelulárnej domény pripojenej k heptahelickej transmembránovej domény ukončenej karboxylovým koncom proteínu. Niektoré podjednotky GABA receptora môžu byť alternatívne zostrihnuté alebo transkribované z alternatívnych promótorov, pričom z týchto transkriptov môžu byť produkované rôzne proteínové izoformy. Medzi dve najlepšie opísané proteínové izoformy patria GABA_{B1a} a GABA_{B1b}, podjednotky GABA_B receptora (Evenseth a kol., 2020).

GABA receptory sú jedným z najvýznamnejších cieľov pri vývine liečiv neurologických a psychiatrických porúch (Bettler a kol., 2004), pričom novšie údaje ukazujú, že GABA sprostredkováva aj rôzne reakcie v neneurálnych tkanivách, kde ovplyvňuje základné bunkové aktivity (Young a Bordey, 2009). Keďže tehotné ženy a ženy, ktoré plánujú tehotenstvo môžu užívať vyššie uvedené terapeutiká a navyše sa GABA stala dostupná aj ako „doplnok stravy“, ktorú môžu užívať aj tehotné ženy (Boonstra a kol., 2015), cieľom našej práce bolo zistiť či GABA môže ovplyvniť aj vývin preimplantačného embrya.

MATERIÁL A METODIKA

IZOLÁCIA IN VIVO VYVINUTÝCH OOCYTOV A BLASTOCÝST Dospelé samice myši boli hormonálne stimulované a približne 12 hodín po podaní hCG (ľudský choriový gonadotropín) boli z vajcovodu izolované oocyty. Na získanie preimplantačných embryí v štádiu blastocysty sa hormonálne stimulované samice spárili so samcami a 96 hodín po podaní hCG boli z vajcovodu/ maternice izolované blastocysty.

IZOLÁCIA RNA a SYNTÉZA cDNA Celkovú RNA sme izolovali z tkaniva pomocou reagensie TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Nemecko) podľa postupu odporúčaného výrobcem. Po eliminácii genomickej DNA, sme cDNA syntetizovali prostredníctvom RT² First Strand Kit.

VÝBER PRIMÉROV Na detekciu GABA_{B1} a GABA_{B2} sme použili komerčné priméry (primers assay PPM27949B, PPM30556A, Qiagen). Na rozlíšenie medzi variantami GABA_{B1a} a GABA_{B1b} transkriptu myšacieho receptora GABA_{B1} sme navrhli vlastné priméry umiestnené v špecifických sekvenciách pre daný transkripčný variant. Pre výber primérov bol použitý program Primer 3 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

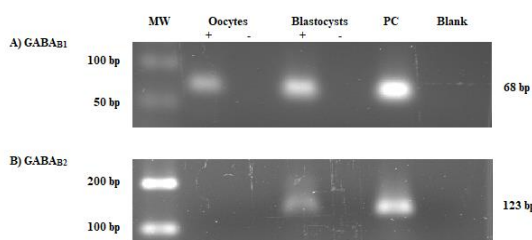
PCR ANALÝZA PCR reakcie boli uskutočnené pomocou platínovej Taq DNA polymerázy s príslušným reakčným roztokom. Po prvom kroku pri teplote 95 °C a čase 10 minút nasledovalo ďalších 45 cyklov pri 95 °C počas 20 s, 65 °C počas 30 s a 72 °C počas 20 s. Získané PCR produkty sme následne analyzovali pomocou 3 % agarózovej elektroforézy a vizualizovali pomocou zobrazovacieho systému Fusion FX7. Produkty, ktoré boli amplifikované primérmí pre GABA_{B1b} boli sekvenované (SEQme, ČR) a výsledky porovnané so známymi sekvenciami receptora GABA_{B1}.

BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA Sekvenciu získaného transkriptu GABA_{B1b}, nukleotidovú sekvenciu predpokladaného myšacieho transkriptu GABA_{B1b} (Lamp 2001 AF120255.1) a genomickú sekvenciu myšacieho GABA_{B1b} (NC_000083.7) sme porovnávali pomocou algoritmov / softvérov Clustal W a Blast 2.

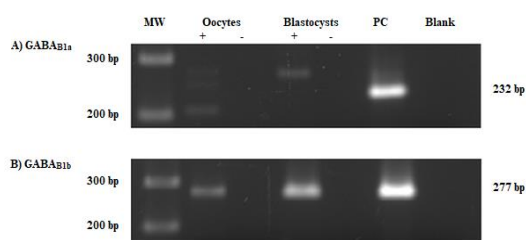
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V predchádzajúcej práci bola na našom pracovisku preukázaná expresia GABA_A receptorov v myšacích oocytoch a preimplantačných embryách (Kovaříková a kol., 2023), preto sme sa v našej aktuálnej štúdii zamerali na skúmanie expresie GABA_B receptorov u preimplantačných embryí.

Naše výsledky ukázali, že v myšacích blastocystách aj v ovulovaných oocytoch sú prítomné transkripty oboch metabotropných podjednotiek GABA receptora (GABA_{B1} a GABA_{B2}) (Obr. 1), čo naznačuje prítomnosť funkčného diméru GABA_B receptora už v bunkách skorého embrya. Pomocou nami dizajnovaných primérov a RT-PCR analýzy sme ďalej zistili, že v ovulovaných blastocystách a oocytoch je produkovaný transkript GABA_{B1b}, zatiaľ čo transkripčný variant GABA_{B1a} sme vôbec nedetegovali (Obr. 2).



Obr. 1. RT-PCR analýza GABA_{B1} a GABA_{B2} v oocytoch a blastocystách.



Obr. 2. RT-PCR analýza GABA_{B1a} a GABA_{B2} v oocytoch a blastocystách.

Aby sme potvrdili identitu nami získaného PCR produktu, bol PCR produkt sekvenovaný a následne bioinformatickou analýzou porovnávaný s publikovanou nukleotidovou sekvenciou myšacieho transkriptu GABA_{B1b} a s genomickou sekvenciou myšacieho génu GABA_{B1}. Naše porovnanie preukázalo 100 % -tnú identitu medzi nukleotidovou sekvenciou nami získaného produktu a publikovanou sekvenciou GABA_{B1b} mRNA (Lamp a kol., 2001, AF120255.1). Porovnanie sekvencie PCR produktu s genomickou sekvenciou myšacieho génu GABA_{B1} (NC_000083.7) ukázalo, že začiatok PCR produktu je kódovaný na pôvodnej sekvencii intrónu 5 a pokračuje sekvenciou exónu 6.

Výsledky novších experimentov preukázali, že GABA_B receptory môžu v neneurálnych tkanivách zohrávať rôzne úlohy. Aktivácia GABA receptorov môže ovplyvniť proliferáciu kmeňových buniek v rôznych typoch rakoviny (Young a Bordey, 2009). Napríklad aktivácia GABA_B receptorov inhibovala proliferáciu kolorektálnych buniek HT29 (Shu a kol., 2016) alebo naopak stimulovala proliferáciu sarkómových buniek OUMS-27 (Kanbara a kol., 2018). Aktivácia GABA_B receptora výrazne zvyšovala proliferáciu myšacích embryonálnych kmeňových buniek, naproti tomu aktivácia GABA_A receptorov mierne inhibovala proliferáciu týchto buniek (Schwirtlich a kol., 2010). Stimulácia proliferácie po aktivácii GABA_B, ale aj GABA_A, bola zaznamenaná aj u ľudských pankreatických β-buniek (Tian a kol., 2013). Aktivácia GABA_B receptorov môže ovplyvniť aj procesy bunkovej diferenciácie, ako to bolo demonštrované v prípade myšacích chondrocytov rastovej platničky (Cheng a kol., 2007).

Izoformy GABA_{B1a} a GABA_{B1b} patria medzi najrozšírenejšie formy GABA_B receptora a ako jediné sa pokladajú za vysoko konzervované medzi rôznymi druhmi. Rozdielnosť medzi týmito dvomi izoformami je predovšetkým v prítomnosti alternatívneho miesta v GABA_{B1b} pred exónom 6, čím sa exón 6 predlžuje na jeho 5' konci. Mnohé štúdie naznačujú aj značné rozdiely v expresii medzi GABA_{B1a} a GABA_{B1b} z časového a priestorového hľadiska (Bettler a kol., 2004), čo zároveň naznačuje aj ich odlišné úlohy.

Naše výsledky ukázali, že v myšacích preimplantačných embryách je produkovaný transkript GABA_{B1b}, ale nie GABA_{B1a}, avšak možný fyziologický význam takejto expresie je potrebné ešte objasniť. Uvedené výsledky tiež naznačujú, že nadmerná konzumácia látok pôsobiacich na GABA receptory (ako sú špecifické terapeutiká, alkohol alebo potravinové aditíva obsahujúce GABA) by mohla negatívne ovplyvniť preimplantačné embryá a predstavovať tak riziko pre úspešné začatie tehotenstva.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná z projektov APVV-18-0389 a VEGA 2/0092/19.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bettler B. et. al. Molecular Structure and Physiological Functions of GABA_B Receptors. *Physiological Reviews*. 2004; 84(3): 835–867.
- Bonstra E. et. al. Neurotransmitters as food supplements: the effects of GABA on brain and behavior. *Frontiers in Psychology*. 2015; 6:1520.
- Evenseth LSM. et. al. The GABA_B Receptor—Structure, Ligand Binding and Drug Development. *Molecules*. 2020; 25(13): 3093.
- Ghit A, et. al.. GABA_A receptors: structure, function, pharmacology, and related disorders. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2021; 19(1): 123.
- Cheng Z, et. al. Type B γ -Aminobutyric Acid Receptors Modulate the Function of the Extracellular Ca²⁺-Sensing Receptor and Cell Differentiation in Murine Growth Plate Chondrocytes. *Endocrinology*. 2007; 148(10): 4984–4992.
- Kanbara K, et. al. GABA_B receptor regulates proliferation in the high-grade chondrosarcoma cell line OUMS-27 via apoptotic pathways. *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 263.
- Kovaríková V, et. al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) can affect physiological processes in preimplantation embryos via GABA_A and GABA_B receptors. *Reproductive medicine and biology*. 2023. 22(1):e12528.
- Lamp K, et. al. The murine GABA_B receptor 1: cDNA cloning, tissue distribution, structure of the Gabbr1 gene, and mapping to chromosome 17. *Cytogenetic and Genome Research*. 2001; 92(1-2): 116–121.
- Shu Q, et. al. GABA_B/GSK-3 β /NF- κ B signaling pathway regulates the proliferation of colorectal cancer cells. *Cancer Medicine*. 2016; 5(6): 1259–1267.
- Schwirtlich M, et. al. GABA_A and GABA_B receptors of distinct properties affect oppositely the proliferation of mouse embryonic stem cells through synergistic elevation of intracellular Ca²⁺. *FASEB Journal*. 2010; 24(4): 1218–1228.
- Tian J, et. al. (2013). γ -Aminobutyric Acid Regulates Both the Survival and Replication of Human β -Cells. *Diabetes*. 2013; 62(11): 3760–3765.
- Young SZ, Bordey A. GABA's Control of Stem and Cancer Cell Proliferation in Adult Neural and Peripheral Niches. *Physiology*. 2009; 24(3): 171–185.

VYUŽITIE SYNBIOTÍK NA ZMIERNENIE ČREVNEJ DYSBIÓZY A GASTROINTESTINÁLNYCH PRÍZNAKOV PORÚCH AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Ryniková M.¹, Adamková P.¹, Gancarčíková S.², Lauko S.², Hajdučková V.², Raskova B.³, Sashova Tomova A.³, Demečková V.¹

¹Katedra fyziológie živočíchov, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

²Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

³Fyziologický ústav, Lekárska fakulta, UK v Bratislave, Bratislava

ABSTRAKT

Poruchy autistického spektra (PAS) predstavujú skupinu neurovývinových ochorení, ktoré sa okrem sociálnych a behaviorálnych porúch vyznačujú aj gastrointestinálnymi ťažkosťami. Súčasné štúdie poukazujú na významný vplyv mikrobiómu na rozvoj symptómov u detí s PAS. Cieľom tejto štúdie bolo predovšetkým preskúmať využitie mikrobiálnej terapie v podobe synbiotika na zmiernenie gastrointestinálnych symptómov a obnovenie normobiózy na predklinickom modeli. Naša štúdia preukázala vplyv dysbiotického mikrobiómu od autistických pacientov na výskyt rektálneho krvácania. Zároveň naše výsledky naznačujú, že podávanie synbiotika má priaznivý účinok na zmiernenie tohto symptómu a obnovu normobiózy prostredníctvom zvýšenia alfa diverzity mikrobiómu a úprave zastúpenia vybraných čľadí. Keďže sledovaný pokles skóre rektálneho krvácania bol relatívne malý, odporúčame predĺžiť dobu liečby na dosiahnutie lepšieho terapeutického efektu.

ÚVOD

Poruchy autistického spektra (PAS) sú komplexnou skupinou neurovývinových porúch, ktoré charakterizujú predovšetkým ťažkosti v komunikácii, sociálnych interakciách a repetitívne správanie. Najčastejšou klinickou formou PAS je autizmus. Etiológia PAS zatiaľ nie je spoľahlivo objasnená, avšak štúdie poukazujú na vplyv genetických faktorov, imunity a faktorov prostredia (Fattorusso a kol. 2019). Častým symptómom u detí s PAS sú gastrointestinálne ťažkosti (napr. bolesť brucha, zápcha, krv v stolici), ktoré sa vyskytujú štyrikrát častejšie ako v normálnej populácii. Najnovšie výskumy tiež poukazujú na porušenie rovnovážneho stavu mikrobiómu u autistických pacientov. Tento stav sa označuje ako dysbióza a jej miera bola korelovaná so závažnosťou gastrointestinálnych symptómov u detí s PAS (Skrikantha a Hasan Mohajeri 2019). Výsledky niektorých štúdií tiež naznačujú, že zloženie mikrobiómu môže ovplyvňovať aj samotné správanie a sociálne interakcie autistických pacientov prostredníctvom tzv. *gut-brain axis* (os črevo-mozog) (Alharthi a kol. 2022). Úprava črevnej dysbiózy by teda mohla zmierniť nielen gastrointestinálne ťažkosti, ale aj typické poruchy správania typické u detí s PAS. Jedným zo spôsobov úpravy črevného mikrobiómu je administrácia synbiotík, ktoré predstavujú kompletný preparát obsahujúci probiotiká a prebiotiká (Mitchell a Davies 2022). Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať vplyv črevného mikrobiómu na gastrointestinálne symptómy PAS a možnosť využitia synbiotík na ich zmiernenie a nastolenie normobiózy.

MATERIÁL A METODIKA

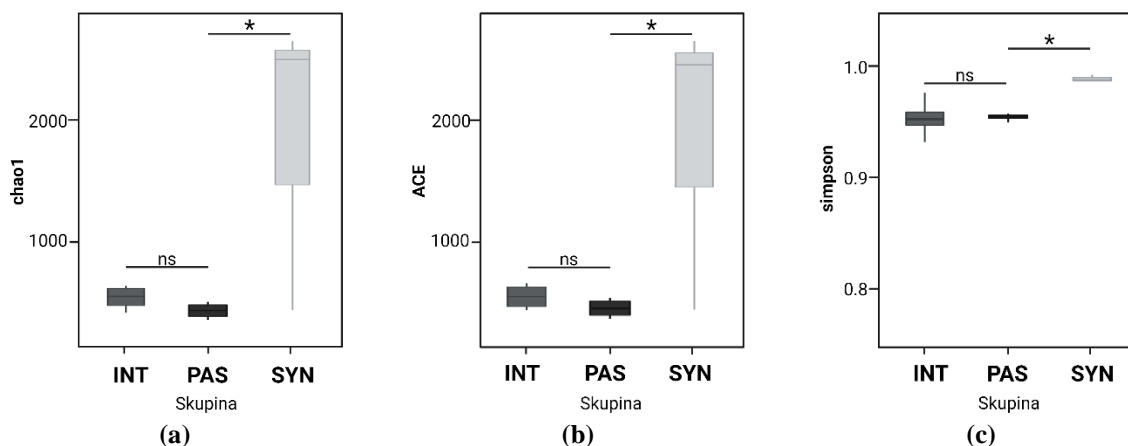
Samice myší BALB/c (n=41; Velaz, Praha, Česká republika) boli chované v gnotobiotických izolátoroch pre hlodavce THF 3315 (EHRET Labor-und Pharmatechnik GmbH Co.&KG, Emmendingen, Nemecko) a Single-tier CBC (CBC, Ltd., Madison, WI, USA). Na navodenie pseudo germ-free (PGF) statusu podstúpili všetky zvieratá antibiotickú liečbu (*p.o.* amoxicilín/kyselina klavulánová a *s.c.* ciprofloxacín; 5 dní), po ktorej nasledovalo obdobie rekonvalescencie (10 dní). PGF myši boli rozdelené do troch skupín: intaktné zvieratá (INT; n=23), skupina PAS (n=23) a zvieratá, u ktorých boli príznaky PAS liečené pomocou synbiotika (SYN; n=15). Gastrointestinálne príznaky PAS boli u zvierat navodené orálnym podávaním fekálneho mikrobiálneho transplantátu (FMT) od detí s PAS každých 12 h po

dobu 3 dní. Po 5-dňovej rekonvalescencii boli zvieratá liečené orálnym podávaním synbiotika (*Lactobacillus plantarum* CCM 7512, *Lactobacillus reuteri* CCM 8617 v MRS bujóne + šrotované ľanové semeno) po dobu 5 dní. V priebehu celého experimentu bolo zaznamenávané krvácanie z rekta, ktorému bolo pridelené skóre (0 – 6). Z fekálnych vzoriek sme pomocou kitu (Zymo Research, CA, USA) vyzolovali bakteriálnu DNA, ktorá bola zaslaná na metagenomickú analýzu (Novogene Europe, Cambridge, Veľká Británia).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V priebehu experimentu sme zaznamenávali skóre krvácania z rekta, čo je jedným z gastrointestinálnych ťažkostí, ktoré boli pozorované u detí s PAS (Srikantha a Hasan Mohajeri 2019). V skupine PAS sme pozorovali signifikantné zvýšenie klinického skóre (z 0 na 6; $p < 0,0001$). Rektálne krvácanie poukazuje na poškodenie sliznice čreva, čo spúšťa zápalovú imunitnú odpoveď a umožňuje lepší prechod bakteriálnych metabolitov do systémovej cirkulácie. Týmto spôsobom môžu následne pôsobiť aj na vzdialené orgány, napr. mozog (Srikantha a Hasan Mohajeri 2019). Po liečbe synbiotikom sa klinické skóre signifikantne znížilo ($p < 0,01$) aj keď jeho pokles bol pomerne malý (zo 6 na 5).

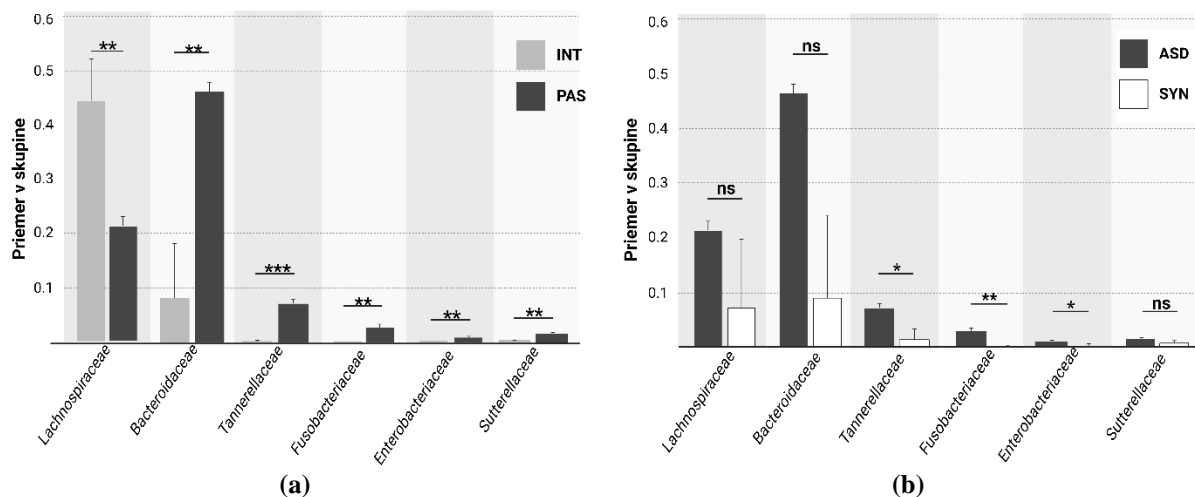
Indexy druhovej bohatosti (chao1, ACE) a druhovej diverzity (simpson) sú zatiaľ považované za jediné spoľahlivé ukazovatele normobiózy (Gomaa 2020). Po podávaní FMT od detí s PAS sme nezaznamenali signifikantný rozdiel druhovej bohatosti (Obr. 1a) a druhovej diverzity (Obr. 1b) voči intaktnej skupine. Dôvodom je pravdepodobne zníženie týchto indexov aj v INT skupine podávaním antibiotík na navodenie PGF statusu (Huang a kol. 2022). Na druhej strane, podávaním synbiotík sa sledované ukazovatele alfa diverzity signifikantne zvýšili ($p < 0,05$), čo naznačuje, že došlo k obnove mikrobiómu smerom k normobióze.



Obr. 1 Indexy alfa diverzity

Štatistické porovnanie indexov alfa diverzity medzi jednotlivými skupinami. Indexy druhovej bohatosti: (a) chao1; (b) ACE. Index druhovej diverzity: (c) simpson. Štatistická signifikancia na základe Man-Whitney U testu. ns – nesignifikantný; * $p < 0,05$. INT – kontrolná skupina; PAS – skupina s gastrointestinálnymi symptómami PAS; SYN – skupina liečená podávaním synbiotík.

Na úrovni beta diverzity sme pozorovali signifikantné zmeny v zastúpení niektorých čeľadí (Obr. 2a) medzi experimentálnymi skupinami. V skupine PAS bolo signifikantne nižšie ($p < 0,01$) zastúpenie čeľade *Lachnospiraceae*, čo bolo dokázané aj v štúdií na pediatrických pacientoch s PAS (David a kol. 2021). Na druhej strane sa signifikantne zvýšilo zastúpenie členov čeľadí *Bacteroidaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae* a *Sutterellaceae* ($p < 0,01$). Zvýšenie zastúpenia týchto čeľadí bolo pozorované u pacientov s PAS (Chen a kol. 2022; David a kol. 2021; Liu a kol. 2019; Ding, Taur a Walkup 2017). Niektoré z týchto zmien boli normalizované po liečbe (Obr. 2b). Podávanie synbiotika pravdepodobne upravilo pomery v hrubom čreve, čo viedlo k zníženiu abundancie zástupcov čeľadí *Fusobacteriaceae* ($p < 0,01$), *Tannerellaceae*, a *Enterobacteriaceae* ($p < 0,05$).



Obr. 2 Beta diverzita na úrovni čeľade

Beta diverzita na úrovni čeľade. Dáta sú zobrazené ako priemer +SD. (a) porovnanie skupín INT a PAS; (b) porovnanie skupín PAS a SYN. Štatistická signifikancia na základe t-testu. ns – nesignifikantný; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. INT – kontrolná skupina; PAS – skupina s gastrointestinálnymi symptómami PAS; SYN – skupina liečená podávaním synbiotík.

Výsledky predloženej štúdie prinášajú zaujímavé poznatky ohľadom vplyvu mikrobiómu na výskyt gastrointestinálnych symptómov u detí s PAS a možnosti úpravy zloženia mikrobiómu na zmiernenie týchto problémov. Mikrobiálny transplantát od detí s PAS spôsobil zmeny v zastúpení vybraných čeľadí oproti kontrolnej skupine a navodil výrazné rektálne krvácanie. Podávanie synbiotika malo priaznivý účinok na obnovenie normobiózy a na zmiernenie gastrointestinálnych symptómov, čo sa odrazilo aj na signifikantnom poklese skóre rektálneho krvácania.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola financovaná z grantového projektu APVV-20-0114.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alharthi A, et al. The Human Gut Microbiome as a Potential Factor in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(3): 1363.
- Chen YC, et al. Altered gut microbiota correlates with behavioral problems but not gastrointestinal symptoms in individuals with autism. *Brain Behav Immun.* 2022; 106: 161-178.
- David MM, et al. Children with Autism and Their Typically Developing Siblings Differ in Amplicon Sequence Variants and Predicted Functions of Stool-Associated Microbes. *mSystems.* 2021; 6(2): e00193-20.
- Ding HT, Taur Y a Walkup JT. Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings. *Autism Dev Disord.* 2017; 47: 480-489
- Fattorusso A, et al. Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota. *Nutrients.* 2019; 11(3): 521.
- Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2020; 113(2): 2019-2040.
- Huang C, et al. Effects of Four Antibiotics on the Diversity of the Intestinal Microbiota. *Microbiol Spectr.* 2022; 10(2): e0190421.
- Liu S, et al. Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci Rep.* 2019; 9: 287.
- Mitchell LK, Davies PSW. Pre- and probiotics in the management of children with autism and gut issues: a review of the current evidence. *Eur J Clin Nutr.* 2022; 76(7): 913-921.
- Skrikantha P, Hasan Mohajeri M. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(9): 2115.

TERAPEUTICKÝ POTENCIÁL ATRANORÍNU: SKÚMANIE JEHO ÚČINKOV NA NÁDORY MOZGU

Šimko P., Urbanská N., Mattová S., Kisková T.
Katedra fyziológie živočíchov, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Atranorín (ATR) patrí k sekundárnym metabolitom lišajníkov. V tomto experimente sme skúmali jeho účinok na laboratórne potkany s indukovanými nádormi na mozgu. Pracovali sme s laboratórnymi potkanmi kmeňa Sprague-Dawley (n=19), ktoré sme si rozdelili do troch skupín. Prvú kontrolnú skupinu tvorili zdraví jedinci (n=6), druhú skupinu tvorili jedinci s indukovaným nádorom na mozgu (n=6) a tretiu skupinu jedinci s indukovaným nádorom na mozgu, ktorým sa denne podával ATR v dávke 10 mg/kg hmotnosti v roztoku 10% etanolu *per os* počas jedného mesiaca. Zvieratám sme následne stanovovali hladiny reaktívnych foriem kyslíka v leukocytoch a vykonali sme aj analýzu hematologických parametrov. Z našich výsledkov vyplýva, že ATR má vplyv na vychytávanie voľných radikálov v krvi a prejavil sa ako antioxidant a taktiež na celkový počet krvných elementov, ktorých hladiny boli stanovené po hematologickej analýze.

ÚVOD

Lišajníky, ktorých telo je tvorené zelenou riasou, či sinicou a hubovým partnerom, sú symbiotické organizmy využívané ľudstvom už po stáročia. Svoje uplatnenie nachádzali v širokej škále odvetví a predstavovali významnú zložku potravy naprieč kultúrami (Crawford 2019). V štruktúrach svojej stielky produkujú sekundárne metabolity, ktoré im poskytujú výhodné vlastnosti. Jedným z takýchto sekundárnych metabolitov je atranorín (ATR). ATR je aromatický depsid, známy svojou pozitívnou biologickou aktivitou, medzi ktorú zaradzujeme antibakteriálny, antifungálny, antiinflamačný, cytotoxický, antivirálny, či imunomodulačný účinok (Studzinska-Sroka, Galanty a kol. 2017). Štúdie, zaoberajúce sa jeho vlastnosťami, sa zameriavajú najmä na jeho účinky v prostredí *in vitro*. V štúdií Majchrzak-Celińskiej a kol. (2022) skúmali autori možnosť využiť ATR ako suplement pri liečbe glioblastómu. V tejto štúdií preukázali jeho pozitívny efekt v dávke 25 μM na viabilitu A-172 buniek, v dávke 50 μM na viabilitu T98G a v dávke 25 μM na viabilitu U-138 MG nádorových bunkových línií mozgu (Majchrzak-Celińska, Kleszcz a kol. 2022). Účinky ATR na zdravý živý organizmus sme popísali v štúdií (Simko, Leskanicova a kol. 2022). Jedná sa o prvú takúto komplexnú štúdiu zaoberajúcu sa účinkami ATR na zdravý živý organizmus *in vivo*.

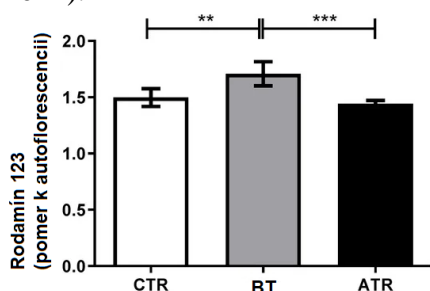
MATERIÁL A METODIKA

ATR sme získali extrakciou z lišajníka *Pseudovernia furfuracea*. Experimentálnu skupinu tvorilo 19 laboratórných potkanov kmeňa Sprague-Dawley rozdelených do troch skupín. Prvú skupinu tvorili jedinci kontrolnej neovplyvnenej skupiny (CTR). Druhú skupinu tvorili neliečení jedinci s indukovaným nádorom na mozgu (BT) a tretiu skupinu jedinci s indukovaným nádorom na mozgu, liečení s ATR (ATR). V experimente sme sa rozhodli stanoviť reaktívne formy kyslíka (ROS) v leukocytoch vo vzorkách krvi odobratej potkanom o objeme 100 μL podľa predchádzajúcej práce (Pipová a kol. 2020). Vzorky boli merané pomocou prietokovej cytometrie. Hladina ROS v leukocytoch bola vyjadrená ako pomer mediánu fluorescencie k autofluorescencii nezafarbených vzoriek. Rozhodli sme sa taktiež skúmať vplyv ATR na hematologické parametre. Krv bola zvieratám odobraná vo veku 60 a 90 dní z *vena caudalis*, následne bola analyzovaná za použitia veterinárneho hematologického analyzátoru EXIGO H400. Zmerané hodnoty boli vyhodnotené v programe GRAPHPAD Prism 8.0. Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm smerodajná odchýlka.

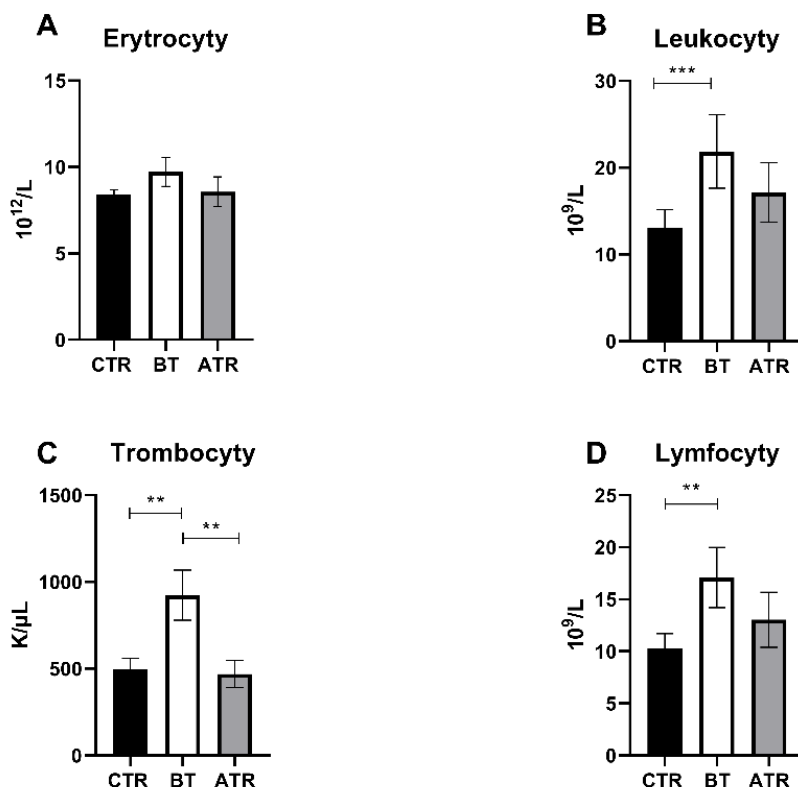
VÝSLEDKY A DISKUSIA

REAKTÍVNE FORMY KYSLÍKA

Pri skupinách zvierat s indukovaným nádorom na mozgu došlo k uvoľneniu voľných radikálov ($p < 0.01$) v porovnaní s CTR skupinou. ATR bol schopný znížiť hodnoty ROS na úroveň CTR zvierat ($p < 0.001$). V tejto štúdii sme preukázali antioxidačný účinok ATR, čo koreluje aj s výsledkami, ktoré získali Siqueira a kol. (2010), ktorí preukázali schopnosť ATR v konc. 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ vychytávať voľné radikály. V inej štúdii sa preukázalo, že antioxidačný potenciál ATR bol závislý od voľných radikálov (hydroxylové radikály, superoxidové radikály, peroxid vodíka a oxid dusnatý) v konc. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ v prostredí *in vitro* (Melo, a kol. 2011).



Obr. 1. Hladina ROS v krvných leukocytoch u kontrolnej skupiny zvierat (CTR), zvierat s indukovaným nádorom mozgu (BT) a zvierat s indukovaným nádorom mozgu, liečených s ATR (ATR). Hodnoty sú vyjadrené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia je zohľadnená ako ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$.



Obr. 2. Množstvo erytrocytov (A), leukocytov (B), trombocytov (C) a lymfocytov (D) po liečbe. Dáta sú uvedené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia je zohľadnená ako ** $p < 0.01$ a *** $p < 0.001$

HEMATOLOGICKÁ ANALÝZA

V počte erytrocytov nedošlo k signifikantnému rozdielu medzi skupinami, zatiaľ čo pri leukocytoch došlo k zvýšeniu ich počtu pri BT skupine v porovnaní s CTR skupinou ($p < 0.001$). Zvýšené hodnoty leukocytov môžu predstavovať fyziologickú odpoveď na akútnu

stresovú situáciu (Dhabhar a kol., 2012). Počet trombocytov sa pri BT skupine výrazne zvýšil pri porovnaní s CTR skupinou ($p < 0.01$). V ATR skupine, bol ATR schopný znížiť počet trombocytov na úroveň CTR skupiny, v porovnaní s BT skupinou ($p < 0.01$). K zmenám v počte lymfocytov došlo pri BT skupine v porovnaní s CTR skupinou ($p < 0.01$).

POĎAKOVANIE

Táto štúdia vznikla vďaka grantovej schéme VEGA (VEGA-1/0658/20) a schémam VVGS (VVGS-PF-2022-2136 a VVGS-2023-2561).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Crawford SD. Lichens used in traditional medicine. Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential. 2019; 31-97.
- Dhabhar FS, et al. Stress-induced redistribution of immune cells—From barracks to boulevards to battlefields: A tale of three hormones—Curt Richter Award Winner. *Psychoneuroendocrinology*. 2012; 37(9): 1345-1368.
- Majchrzak-Celińska 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): 1084.
- Melo MGD, et al. Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladonia kalbii* Ahti in rodents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011; 47: 861-872.
- Pipová Kokošová N, et al. Melatonin mitigates hippocampal and cognitive impairments caused by prenatal irradiation. *European Journal of Neuroscience*. 2020; 52(6): 3575-3594.
- Simko P, et al. Biochemical Properties of Atranorin-Induced Behavioral and Systematic Changes of Laboratory Rats. *Life*. 2022; 12(7): 1090.
- Siqueira RS, et al. Antinociceptive activity of atranorin in mice orofacial nociception tests." *Zeitschrift für Naturforschung C*. 2010; 65(9-10): 551-561.
- Studzinska-Sroka E, Galanty A, Bylka W. Atranorin-an interesting lichen secondary metabolite. Mini reviews in medicinal chemistry. 2017; 17(17): 1633-1645.

SYNTÉZA CDR3 PEPTIDOV VOČI SARS-COV-2

Talpašová L.¹, Kulkarni A.^{1,2}, Víglašský J.¹, Jozefiaková J.¹, Maľarik T.¹, Bhide K.¹, Čurlík J.³, Bhide M.^{1,2}.

¹Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach, Košice

²Neuroimunologický ústav, SAV, v.v.i., Bratislava

³Katedra chovu a chorôb zveri, rýb a včiel, ekológie a kynológie, UVLF v Košiciach, Košice

ABSTRAKT

Koronavírus 2 spôsobujúci ťažký akútny respiračný syndróm (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) bol koncom roka 2019 príčinou globálnej pandémie s prvým ohniskom hláseným v provincii Hubei, Wuhan v Číne. Vírus spôsobuje ochorenie COVID-19 a jeho klinickou manifestáciou sú prevažne ochorenia dýchacieho systému. Avšak nedávne štúdie naznačujú, že patológia vírusu môže mať ďalekosiahlejšie dôsledky, a to i pre centrálnu nervovú sústavu. Vývin terapeutík inhibujúcich infekcie v mozgu je však pre vedcov mnohoročnou výzvou hlavne z dôvodu selektívnej permeability hematoencefalickej bariéry (HEB). Práve nanoprotilátky, vyskytujúce sa u jedincov čeľade *Camelidae* a chrupavkovitých rýb triedy Chondrichthyes, predstavujú sľubnú alternatívu v liečbe neuroinvasívnych ochorení. Predovšetkým ich CDR3 (complementarity-determining region 3) oblasť, ktorá plní dominantnú úlohu pri väzbe nanoprotilátok s antigénmi. Navyše prítomnosť Fc oblasti IgG zvyšuje aviditu a stabilitu nanoprotilátok a zabezpečuje protilátkovú recykláciu. V tejto štúdii boli izolované B-lymfocyty z krvi lamy krotkej (*Lama glama*), imunizovanej rekombinantným spike proteínom SARS-CoV-2 za účelom tvorby týchto špecifických nanoprotilátok. Leukocyty boli použité na izoláciu mRNA, ktorá bola reverzne prepísaná do cDNA. Fragment kódujúci CDR3 bol amplifikovaný a ligovaný do fagemidu pSEX81 obsahujúci Fc oblasť IgG1 ľudskej protilátky. Následnou elektroporáciou bola skonštruovaná CDR3 – *E. coli* knižnica, ktorá bola použitá na tvorbu CDR3-fágovej knižnice. Metódou fágového displeja počas 3 kôl „biopanningu“ došlo k selekcii fágov najlepšie interagujúcich s inaktivovaným SARS-CoV-2. Interakcia bola potvrdená prostredníctvom ELISA. Fágy po finálnom treťom kole biopanningu vykazovali interakciu 3,390 a budú ďalej použité pri produkcii nanoprotilátky proti SARS-CoV-2.

ÚVOD

SARS-CoV-2 (rod *Betacoronavirus*) je zoonotický, obalený vírus s + ssRNA o veľkosti ~ 30 kb, ktorý spôsobuje ochorenie COVID-19 u ľudí. Ako receptor pre vstup do bunky využíva enzým konvertujúci angiotenzín 2 (ACE2) (Lu a kol., 2020). Hlavný antigén vírusu spike proteín (S) je nevyhnutný pre vstup vírusu do bunky. Na ACE2 sa viaže pomocou receptor-binding domain (RBD) (Lan a kol., 2020), ktorá je preukázateľne hlavným cieľom neutralizačných protilátok. Uvádza sa, že ACE2 sa hojne exprimuje vo venózných endotelových bunkách mozgu, ako aj v epitelových bunkách tkanív pľúc a tenkého čreva (Cao a kol., 2020). To naznačuje, že invázia SARS-CoV-2 do CNS je pravdepodobná a takisto možno pozorovať rastúci počet neurologických porúch spojených s ochorením COVID-19 (Fotuhi a kol., 2020), avšak liečba infekcií mozgu je náročná kvôli prakticky nepriepustnej hematoencefalickej bariére.

Difúzia konvenčných protilátok v tkanivách je limitovaná ich veľkosťou (150 kDa). Nanoprotilátky, vytvorené ako alternatíva ku konvenčným protilátkam, vykazujú veľký potenciál v medicínskej i biotechnologickej oblasti. Tieto molekuly sú tvorené výlučne ťažkými reťazcami a prirodzene sa vyskytujú u jedincov čeľade *Camelidae* a u chrupavkovitých rýb triedy Chondrichthyes. Výhodou je ich malá molekulová hmotnosť (15 kDa), vďaka ktorej difundujú do tkanív a nádorov takmer štyrikrát lepšie ako klasické protilátky. Typická nanoprotilátka pozostáva zo štyroch rámcových oblastí (FR1–4) a troch hypervariabilných oblastí (CDR 1–3). Oblasť CDR3 (5-8 kDa) predstavuje najdlhšiu oblasť a

hrá kľúčovú úlohu v interakcii s epitopmi (Bhide, 2022). Navyše konjugácia CDR3 s Fc oblasťou IgG protilátok zároveň poskytuje široké využitie pri kontrole chorôb a ochrane pred infekčnými chorobami (Richardson a Moore, 2021). Fc oblasť sprostredkuje dve hlavné efektorové funkcie: bunkovú cytotoxicitu závislú od protilátky (ADCC) a cytotoxicitu závislú od komplementu (CDC). U ľudí existujú štyri typy Fc oblastí (IgG1-IgG4). Ľudský IgG1 ponúka vysokú ADCC a CDC a je najvhodnejší na terapeutické použitie proti patogénom. Prítomnosť Fc oblasti tiež zabezpečuje recykláciu protilátok, ich uvoľnenie a opätovné použitie do extracelulárnej tekutiny (Challa a kol., 2014). Fúzny konštrukt CDR3-Fc môže byť transportovaný cez HEB do mozgu, kde môže potenciálne liečiť infekcie spôsobené rôznymi neuropatogénmi, vrátane SARS-CoV-2.

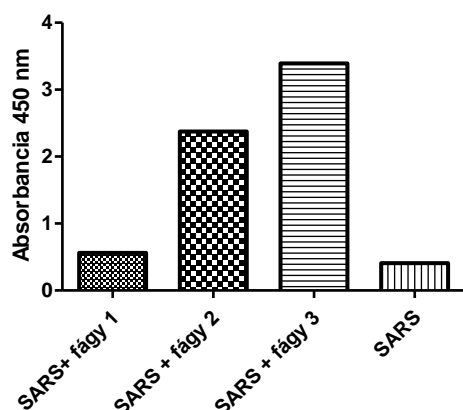
MATERIÁL A METODIKA

S cieľom produkcie nanoprotilátok voči SARS-CoV-2 bola lama (*Lama glama*) imunizovaná 3 dávkami rekombinantného spike (rS) proteínu SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1, MN908947). Štyri týždne po prvej imunizácii bola odobraná krv, z ktorej sa izolovali polymorfonukleocyty pre izoláciu mRNA. RNA bola prepísaná do cDNA použitím RevertAid H minus Reverse Transcriptase (ThermoScientific, USA) a random hexamérov (Sigma-Aldrich, USA). Sekvencia CDR3 oblasti nanoprotilátky bola amplifikovaná použitím degenerovaných primerov Nco F (CCATGG) a Not R (GCGGCCGC). Amplifikovaný produkt bol digestovaný reštrikčnými endonukleázami *NcoI* (5'C↓CATGG 3') a *NotI* (5'GC↓GGCCGC 3') a ligovaný pomocou T4 DNA ligázy (ThermoScientific, USA) s fagomidom pSEX81 (Progen, Nemecko) obsahujúcim sekvenciu Fc fragmentu IgG1 ľudskej protilátky. Ligačný mix bol elektroporovaný do elektrokompetentných *E. coli* XL1-blue za vzniku CDR3- *E. coli* knižnice. Na získanie tejto knižnice sa uskutočnilo 8 elektroporácií. Kultivácia elektrokompetentných *E. coli* prebehla na kultivačných platniach s LB médiom s 1% glukózou a tetracyklínom, pri 37°C, 16 hod. Po kultivácii bola CDR3- *E. coli* knižnica superinfikovaná hyperfágom M13K07ΔpIII (Progen, Nemecko). Selektia bakteriofágov s génom nášho záujmu prebehla počas 3 kôl „biopanningu“ voči inaktivovanému SARS-CoV-2 (variant Omicron B.1.1.529). Na kvantifikáciu fágov po jednotlivých kolách bola prevedená titrácia na kultivačných platniach s LB médiom s 1x tetracyklínom a 1x karbenicilínom. Interakcia fágov s inaktivovaným SARS-CoV-2 bola potvrdená aj pomocou ELISA. DNA z fágov bola izolovaná (98°C/15 minút) a vybrané klony boli sekvenované a analyzované pomocou programu GeneiousPro.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amplifikovaný produkt bol o veľkosti 120 bp, čo zodpovedá veľkosti CDR3. Tento produkt bol použitý na tvorbu CDR3 - *E. coli* knižnice. Veľkosť CDR3- *E. coli* knižnice bola 1,2 x 10¹⁰ a 1,3 ml knižnice bolo použitých pri príprave CDR3-fágovej knižnice. V jednotlivých kolách biopanningu sme použili 1x10⁷ fágov. Vzorky fágov po prvom kole biopanningu boli sekvenované a analyzované v programe GeneiousPro. Po 3. kole biopanningu bola testovaná interakcia fágov s cieľovým antigénom pomocou ELISA (Obr. 1).

Fágová ELISA po 3 kolách biopanningu



Obr. 1 Fágová ELISA po 3 kolách biopanningu.

Interakcia meraná ako absorbancia pri 450 nm naprieč jednotlivými kolami stúpala z 0,560 v prípade fágov po prvom biopanningu až po 3,390 (fágy po treťom kole biopanningu). Ako negatívna kontrola slúžila detekcia interakcie bez prítomnosti fágov. DNA z fágov po finálnom treťom biopanningu bola izolovaná a bude použitá na produkciu proteínu v eukaryotickom expresnom systéme *Pichia pastoris*.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená z APVV projektu APVV-22-0084, VEGA- 1/0381/23 and VEGA - 1/0348/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bhide M. Crossing of the pathogens and drugs across the blood brain barrier. University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Košice. 2022
- Cao W, et al. The psychological impact of the COVID-19 epidemic on college students in China. *Psychiatry Res.* 2020; 287:112934.
- Fotuhi M, et al. Neurobiology of COVID-19. *J Alzheimers Dis* 2020; 76(1): 3-19.
- Challa DK, et al. FcRn: From Molecular Interactions to Regulation of IgG Pharmacokinetics and Functions. In M. Daeron & F. Nimmerjahn (Eds.), *Fc Receptors*. 2014; pp 249-272.
- Lan J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020; 581(7807):215-220
- Lu R, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224):565-574.
- Richardson SI, Moore PL. Targeting Fc effector function in vaccine design. *Expert Opin Ther Targets*. 2021; 25(6):467-477.

ANTIDEPRESÍVNY POTENCIÁL SEKUNDÁRNEHO METABOLITU LIŠAJNÍKOV - ATRANORÍNU

Urbanská N., Šimko P., Kisková T.

Katedra fyziológie živočíchov, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Atranorín (ATR) patrí medzi sekundárne metabolity lišajníkov. V súčasnosti boli jeho účinky skúmané predovšetkým v podmienkach *in vitro* a sporadicky *in vivo*. Cieľom našej štúdie bolo analyzovať vplyv ATR na depresiu podobné stavy samcov potkanov kmeňa Wistar. Ako model na vyvolanie depresie sme využili prenatalný a opakovaný postnatalný imobilizačný stres (v poslednom týždni gravidity boli stresované gravidné samice trikrát denne po dobu 45 min počas troch nasledujúcich dní; vo veku 60 dní bolo potomstvo samcov po narodení opakovane stresované). Samce boli rozdelené do troch skupín: skupina DEP - potomstvo matiek stresované v imobilizačných boxoch (n = 10), skupina CTR - zdravá kontrola (n = 10) a skupina ATR (n = 10), ktorej bol podávaný extrakt ATR (10 mg/kg) počas jedného mesiaca *per os*. Zvieratá boli testované v behaviorálnych aparátúrach. Z výsledkov vyplýva, že po navodení depresie zvieratá trávili štatisticky významne menej času v otvorených ramenách vyvýšeného krížového labyrintu a ich „chaotické“ správanie sa prejavilo zvýšením rýchlosti pohybu a trajektóriou prejdehou na periférii v teste otvoreného poľa. ATR upravil sledované parametre na úroveň zdravých jedincov. Výsledky našej štúdie naznačujú potenciálny antidepresívny/anxiolytický účinok ATR.

ÚVOD

Depresia je spomedzi svetových chorôb na štvrtom mieste incidencie po chorobách dýchacích ciest, prenatalných poruchách a AIDS. Symptómy depresie, ako je zvýšená úzkosť, fyzická bolesť, samovražedné sklony, strata koncentrácie a záujmu majú vplyv na správanie a náladu, ale aj na celkový zdravotný stav človeka, čoho následkom je vysoká ekonomická záťaž (Vaváková, Ďuračková a kol. 2015). Duševné choroby sú rizikovým faktorom iných ochorení ako je ischemická choroba srdca a rakovina (Barth, Schumacher a kol. 2004). Nedostatočná účinnosť, tolerancia, mnoho vedľajších účinkov, časté relapsy charakterizujú súčasnú antidepresívnu liečbu (Lund, Brooke-Sumner a kol. 2018). Avšak rôzne prírodné rastliny, byliny a ich látky majú menej nežiaducich účinkov ako konvenčné lieky (Yeung, Hernandez a kol. 2018).

ATR je druhým najviac študovaným sekundárnym metabolitom po kyseline usnovej (Ingolfssdottir 2002, Araújo, De Melo a kol. 2015). ATR preukázal rôznu biologickú aktivitu ako napr. protinádorovú, cytotoxickú, imunomodulačnú, antioxidačnú. Súčasné štúdie boli väčšinou vykonané *in vitro* a len sporadicky *in vivo*. Naša predchádzajúca štúdia sa zamerala na účinky ATR na behaviorálne a neuronálne zmeny po perorálnom podaní u samíc a samcov potkanov kmeňa Sprague-Dawley (Simko, Leskaničová a kol. 2022). Na základe našich predchádzajúcich výsledkov môže mať ATR anxiolytické/antidepresívne účinky.

MATERIÁL A METODIKA

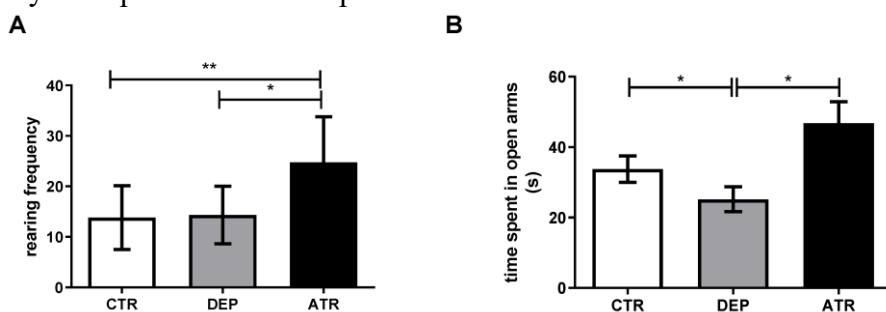
Gravidné samice boli rozdelené do dvoch experimentálnych skupín: kontrolnej a "depresívnej". Skupina "depresívnych" samíc bola stresovaná pomocou imobilizačných boxov v poslednom týždni gravidity: trikrát denne po dobu 45 min, počas troch nasledujúcich dní (Van den Hove, Leibold a kol. 2014). Po pôrode bolo potomstvo samcov ponechané s matkami 30 dní. Potomstvo tvorilo tri skupiny: skupina CTR ako potomstvo kontrolných matiek (n = 10), skupina DEP (n = 10) a skupina ATR (n = 10). ATR bol podávaný denne *per os* v dávke 10 mg/kg. Bol rozpustený v 10 % etanole a podávaný počas jedného mesiaca. Zvieratá sme v poslednom experimentálnom týždni podrobili behaviorálnemu testovaniu. Na tento účel sme si zvolili vyvýšený krížový labyrint (EPM) a test otvoreného poľa (OFT).

Údaje sme vyhodnocovali v štatistickom programe GraphPad Prism 8.0.1. Hodnoty sú prezentované ako priemer \pm štandardná odchýlka (SD).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

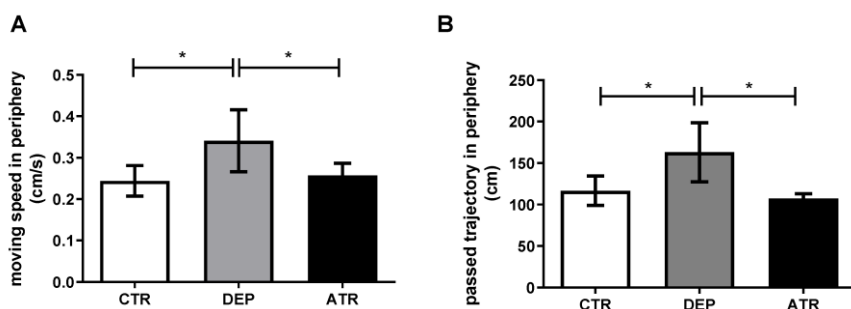
V posledných rokoch sa zvýšil záujem o biologické vlastnosti ATR. Naša štúdia sa zamerala na potenciál ATR v liečbe depresie.

Po aplikácii ATR sa v porovnaní so skupinou s DEP výrazne zvýšila frekvencia vztyčovania a čas strávený v otvorených ramenách (Obr. 1). Naopak, frekvencia vztyčovania sa výrazne zvýšila v porovnaní so skupinou CTR.



Obr. 1. Vztyčovanie (A) a čas strávený v otvorených ramenách (B) v EPM v jednotlivých skupinách zvierat: kontrolná skupina (CTR), skupina v stave podobnom depresii (DEP) a skupina s podávaným extraktom atranorínu (ATR). Hodnoty sú uvedené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia je označená ako * $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

Na základe štúdie Šimka a kol. (2022) sa pri podávaní ATR zdravým zvieratám v dávke 10 mg/kg telesnej hmotnosti sa zvýšil čas strávený v otvorených ramenách v teste EPM v porovnaní so zdravými samcami aj samicami potkanov Sprague-Dawley. Okrem toho sa u zdravých zvierat, ktorým bol podávaný ATR, zvýšila frekvencia vztyčovania v OFT (Šimko, Leskaničová a kol. 2022). Výsledky našej štúdie naznačujú, že po aplikácii ATR dochádza k zníženiu úzkosti. Vo všeobecnosti zvýšenie frekvencie vztyčovania a času v otvorených ramenách naznačuje zníženie úzkosti u zvierat s DEP (Carola, D'Olimpio et al. 2002, Belovicová, Bogi a kol. 2017). Zníženie exploračného správania u zvierat v teste EPM naznačuje, že ATR môže pôsobiť na ich úzkostné a depresívne stavy. Pokles exploračného správania bolo pozorované aj v klinických štúdiách pri pacientov s depresiou (Smith, Taylor a kol. 2022).



Obr. 2. Rýchlosť pohybu (A) a trajektória prejdenej na periférii (B) v OFT v jednotlivých skupinách zvierat: kontrolná skupina (CTR), skupina v stave podobnom depresii (DEP) a skupina s podávaným extraktom atranorínu (ATR). Hodnoty sú uvedené ako aritmetický priemer \pm SD. Signifikancia je označená ako * $p < 0,05$.

Počas testovania v OFT dochádzalo k zvýšeniu rýchlosti pohybu a trajektórie zvierat v stave podobnom depresii v periférii v porovnaní so skupinou CTR (Obr. 2). Toto "chaotické" správanie je možné opísať ako úzkostné a môže zodpovedať depresii podobnému stavu zvierat DEP. Hladina v skupine ATR bola porovnateľná s hladinou v skupine CTR. Ako ATR

pôsobí v mozgu, zostáva nejasné. Zmeny v mozgoch potkanov zistené v tejto štúdií alebo v našich skôr publikovaných údajoch (Simko, Leskanicova a kol. 2022) naznačujú molekulárny mechanizmus ATR.

Výsledky našej štúdie poskytujú prvý dôkaz o účinku ATR v liečbe depresie. Na základe našich pozorovaní je ATR potenciálnym sekundárnym metabolitom lišajníka na liečbu depresie a mal by byť zahrnutý v budúcich štúdiách.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied (VEGA-1/0658/20) a interným grantom VŠ schéma VVGS-2023-2561, VVGS-PF-2022-2136.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Araújo AM. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural product research*. 2015; 29(23): 2167-2180.
- Barth J, et al. Depression as a risk factor for mortality in patients with coronary heart disease: a meta-analysis. *Psychosomatic medicine*. 2004; 66(6): 802-813.
- Belovicova K, et al. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdisciplinary Toxicology*. 2017; 10(1): 40-43.
- Carola V, et al. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*. 2002; 134(1): 49-57.
- Ingolfssdottir K. Usnic acid. *Phytochemistry*. 2002; 61(7): 729-736.
- Lund CC et al. Social determinants of mental disorders and the Sustainable Development Goals: a systematic review of reviews. *The Lancet Psychiatry*. 2018; 5(4): 357-369.
- Simko P, et al. Biochemical Properties of Atranorin-Induced Behavioral and Systematic Changes of Laboratory Rats. *Life*. 2022; 12(7): 1090.
- Smith RS, et al. Lower levels of directed exploration and reflective thinking are associated with greater anxiety and depression. *Frontiers in Psychiatry*. 2022; 12: 782136.
- Van den Hove D, et al. Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress in rats; interdependent effects on emotional behavior and the serotonergic system. *European Neuropsychopharmacology*. 2014; 24(4): 595-607.
- Vaváková M, Ďuračková Z, Trebatická J. Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2015.
- Yeung KS, et al. Herbal medicine for depression and anxiety: A systematic review with assessment of potential psycho-oncologic relevance. *Phytotherapy Research*. 2018; 32(5): 865-891.

VPLYV POLYMORFIZMOV CYP1A2 NA VZNIK KARCINÓMU PROSTATY

Vilčková M.^{1,2}, Jurečeková J.¹, Kliment J.³, Škereňová M.⁴, Dušenka R.³, Knoško Brožová M.¹,
Kmeťová Sivoňová M.¹

¹ Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

² Veliteľstvo vojenského zdravotníctva, Ružomberok

³ Urologická klinika, Jesseniova lekárska fakulta a UNM, Martin

⁴ Martinské centrum pre medicínu Biomed, Jesseniova lekárska fakulta UK, Martin

ABSTRAKT

Úloha polymorfizmov cytochrómu P450 1A2 (CYP1A2) rs2472299, rs2470890 a rs11072508 v riziku karcinómu prostaty, progresii ochorenia a vývoji nádoru zostáva nejasná. Preto sme skúmali potenciálne asociácie týchto troch polymorfizmov a haplotypov CYP1A2 s citlivosťou na karcinóm prostaty a jeho klinicko-patologické charakteristiky. Naša prípadová-kontrolná štúdia pozostávala z 522 pacientov s karcinómom prostaty a 554 zdravých kontrol. Na stanovenie polymorfizmu CYP1A2 sa použila analýza topenia s vysokým rozlíšením. Pre CYP1A2 rs2472299 a rs11072508 sa nepozorovala žiadna významná súvislosť s rizikom karcinómu prostaty. Avšak signifikantne znížené riziko karcinómu prostaty sa zistilo pre CYP1A2 rs2470890 (OR, 0,67, p = 0,02). Po analýze asociácií klinického stavu a týchto troch polymorfizmov CYP1A2, polymorfizmy rs2470890 a rs11072508 vykazovali pozitívnu súvislosť s vyšším Gleasonovým skóre. Všetky tri polymorfizmy vykazovali signifikantne pozitívnu asociáciu s patologickým T štádiom v aditívnych, alelických a dominantných genetických modeloch (p<0,05). Haplotypová analýza odhalila, že najbežnejšie haplotypy „GTT“ a „ACC“ boli významne spojené so zníženým a zvýšeným rizikom karcinómu prostaty u pacientov s patologickým T štádiom 3 a 4. Zistilo sa významné spojenie medzi haplotypom „GTT“ a Gleasonovým skóre (OR, 0,71, p=0,03), čo naznačuje ochranný účinok hlavného haplotypu „GTT“ v patológii karcinómu prostaty. Záverom možno povedať, že tieto polymorfizmy a haplotypy CYP1A2 majú potenciál predpovedať progresiu ochorenia karcinómu prostaty.

ÚVOD

Enzýmy ľudského cytochrómu hrajú kľúčovú úlohu v rôznych biologických procesoch a ľudských chorobách. Členovia rodiny CYP1, vrátane CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 sú indukovaní arylovými uhl'ovodíkovými receptormi (AhR), ktoré sa podieľajú na metabolizme rôznych endogénnych a exogénnych substrátov. Uvádza sa, že ligandy, ktoré indukujú expresiu CYP1 sú karcinogénne xenobiotiká. Enzýmy CYP1 teda korelujú s patogenézou karcinómov.

Najmä CYP1A2 metabolizuje enviromentálne xenobiotiká, ako sú aromatické a heterocyklické amíny (HA) a polycyklické aromatické uhl'ovodíky (PAH), ktoré vznikajú počas pečenia a grilovania mäsa a vykazujú mutagénne a karcinogénne vlastnosti. Ich expresia bola zistená aj v tkanive prostaty (Kwon a kol., 2021). Nedávno bola u pacientov s pľúcnym adenokarcinómom a hepatocelulárnym karcinómom identifikovaná tumor supresívna funkcia CYP1A2 (Yu a kol., 2021). Preto je CYP1A2 jedným s rizikových faktorov karcinómu, pretože metabolizuje a aktivuje prokarcinogény. Polymorfizmus CYP1A2 je teda široko študovaný pri rôznych typoch karcinogénov (Koonrunsesomboon a kol., 2018). Polycyklické aromatické uhl'ovodíky (PAH) sú široko rozšírené enviromentálne prokarcinogény. Tieto zlúčeniny reagujú s DNA a vytvárajú adukty, ktoré vedú k mutáciám a iniciáciám karcinogény (Elfaki a kol., 2018).

MATERIÁL A METODIKA

Študijná populácia pozostávala z 1076 subjektov, z toho bolo 522 pacientov s karcinómom prostaty a 554 zdravých jedincov nad 50 rokov, ktorí boli liečení na Urologickej klinike JLF

a MFN v Martine. U všetkých pacientov s diagnózou karcinómu prostaty sa vykonalo histologické vyšetrenie vzoriek získaných biopsiou prostaty alebo transuretrálnou resekciou prostaty. Zdravé kontroly nemali žiadne aktuálne alebo predchádzajúce karcinómy.

Genómová DNA bola izolovaná zo vzoriek periférnej krvi pomocou Wizard Genomic DNA Purification Kit a zrážanie etanolom podľa výrobcu. Na analýzu vybraných SNP sa uskutočnila analýza topenia s vysokým rozlíšením (HRMA) na LightCycler 480. Genetická analýza určených genotypov a analýza asociácie medzi každým SNP a definované skupiny účastníkov štúdie sa uskutočnili pomocou softvéru PLINK 1.07. Všetky asociácie genetického modelu boli testované pomocou Fisherov test, s výnimkou aditívneho modelu, ktorý testoval Cochran- Armitage trend test. Asociácia haplotypov bola testovaná Pearsonovým χ^2 -testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerný vek pacientov zaradených do štúdie bol 65,8 (\pm 9,5) rokov a sérová koncentrácia PSA 44,3 (\pm 4,5) ng/ml. Zo 421 pacientov 275 (65,3%) malo Gleasonovo skóre \leq 7 a 146 (34,7%) jedincov malo Gleasonovo skóre $>$ 7. V 101 prípadoch nebol konečný patologický stupeň zahrnutý do analýzy, pretože klasifikácia bola vykonávaná pomocou iných systémov klasifikácie. 50% pacientov malo nádor štádia pT1/pT2 a rovnaký počet (%) pT3/pT4. 554 zdravých kontrol malo priemerný vek 64,7 (\pm 10,3) rokov a výrazne nižšiu koncentráciu PSA v sére 3,2 (\pm 0,5; $p < 0,05$) ng/ ml v porovnaní s pacientmi. Genotypová distribúcia pre všetky SNP u kontrol a pacientov s karcinómom prostaty bola konzistentná s Hardy-Weinbergovou rovnováhou. Pre polymorfizmy rs2472299 a rs11072508 sme nenašli žiadnu významnú súvislosť s náchylnosťou na karcinóm prostaty v ktoromkoľvek z genetických modelov. Genotypové frekvencie sa výrazne líšili medzi pacientmi s karcinómom prostaty a kontrolnými skupinami z hľadiska polymorfizmu CYP1A2 rs2470890 ($p = 0,03$). Recesívna alela rs2470890 (CC) výrazne znížila riziko karcinómu prostaty v porovnaní s CT+TT v recesívnom genetickom modeli (OR, 0,67; 95%CI, 0,48 – 0,93; $p = 0,02$). Ako je uvedené v Tab. 1 analýza polymorfizmov CYP1A2 rs2472299 a rs2470890 neodhalila žiadne významné spojenie s hladinami PSA. Avšak, v prípade polymorfizmu CYP1A2 rs11072508 v dominantnom modeli sme pozorovali významné 1,51- násobné zvýšenie rizika karcinómu prostaty spojeného s hladinami PSA \geq 10 ng/ml. aditívny genetický model ukázal významný rozdiel v riziku karcinómu prostaty u pacientov s Gleasonovým skóre \geq 7 z hľadiska polymorfizmov CYP1A2 rs2470890 a rs11072508. ďalej boli stanovené zvýšené rizika karcinómu prostaty o 1,37 a 1,59 polymorfizmu rs11072508 u pacientov s Gleasonovým skóre \geq 7. V súvislosti s polymorfizmami CYP1A2 a patologickým T štádiom všetky 3 polymorfizmy vykazovali pozitívnu asociáciu v aditívnom, alelickom a dominantnom genetickom modeli. Analýza génu CYP1A2 odhalila päť haplotypových skupín, medzi ktorými sú „GTT“ a „ACC“ sa vyskytovali najčastejšie. Toto je prvá štúdia, ktorá ukazuje významnú súvislosť medzi CYP1A2 polymorfizmom, odhadovanými haplotypmi v súvislosti s rozvojom karcinómu prostaty a progresiou nádoru. Naša analýza naznačuje, že najčastejší haplotyp GTT moduluje prognózu karcinómu prostaty u pacientov s Gleasonovým skóre $>$ 7 a pT3/pT4. Na druhej strane druhý najviac bežný haplotyp „ACC“ je spojený s výrazne zvýšeným rizikom u pacientov s pT3/pT4. Predpokladáme, že tieto polymorfizmy a haplotypy CYP1A2 hrajú rozhodujúcu úlohu pri progresii nádoru ako pri karcinogéze a náchylnosti na karcinóm prostaty.

Tab. 1: Riziko karcinómu prostaty spojené s polymorfizmami a frekvencie haplotypov

CYP1A2	A1	A2	Model	PSA				Gleason score				Pathological T stage			
				< 10 ng/ml	≥ 10 ng/ml	OR (95%CI)	P	≤ 7	> 7	OR (95%CI)	P	pT1/pT2	pT3/pT4	OR (95%CI)	P
rs2472299	A	G	GENO	26/93/90	24/105/85	–	0.64	28/122/125	19/70/57	–	0.39	11/48/58	18/53/39	–	0.07
	A	G	ADD	145/273	153/275	–	0.74	178/372	108/184	–	0.17	70/164	89/131	–	0.02
	A	G	ALLELIC	145/273	153/275	1.05 (0.79-1.39)	0.77	178/372	108/184	1.23 (0.91-1.65)	0.19	70/164	89/131	1.59 (1.08-2.35)	0.02
	A	G	DOM	119/90	129/85	1.15 (0.78-1.69)	0.49	150/125	89/57	1.30 (0.87-1.96)	0.22	59/58	71/39	1.79 (1.05-3.05)	0.03
	A	G	REC	26/183	24/190	0.89 (0.49-1.61)	0.76	28/247	19/127	1.32 (0.71-2.46)	0.42	11/106	18/92	1.89 (0.85-4.19)	0.16
rs2470890	C	T	GENO	26/103/80	31/115/68	–	0.38	30/135/110	24/77/45	–	0.09	14/50/53	19/62/29	–	0.01
	C	T	ADD	155/263	177/251	–	0.18	195/355	125/167	–	0.03	78/156	100/120	–	0.007
	C	T	ALLELIC	155/263	177/251	1.19 (0.91-1.57)	0.21	195/355	125/167	1.36 (1.02-1.82)	0.04	78/156	100/120	1.67 (1.14-2.44)	0.009
	C	T	DOM	129/80	146/68	1.33 (0.89-1.99)	0.18	165/110	101/45	1.49 (0.97-2.91)	0.07	64/53	81/29	2.31 (1.32-4.05)	0.004
	C	T	REC	26/183	31/183	1.19 (0.68-2.09)	0.57	30/245	24/122	1.61 (0.90-2.87)	0.13	14/103	19/291	1.54 (0.73-3.24)	0.27
rs11072508	C	T	GENO	26/100/83	30/119/65	–	0.13	31/134/110	23/80/43	–	0.07	15/54/48	19/62/29	–	0.07
	C	T	ADD	152/266	179/249	–	0.09	196/354	126/166	–	0.03	84/150	100/120	–	0.03
	C	T	ALLELIC	152/266	179/249	1.26 (0.95-1.66)	0.11	196/354	126/166	1.37 (1.03-1.83)	0.04	84/150	100/120	1.49 (1.02-2.17)	0.05
	C	T	DOM	126/83	149/65	1.51 (1.01-2.26)	0.05	165/110	103/43	1.60 (1.04-2.45)	0.03	69/48	81/29	1.94 (1.11-3.41)	0.03
	C	T	REC	26/183	30/184	1.15 (0.65-2.02)	0.67	31/244	23/123	1.47 (0.82-2.63)	0.22	15/102	19/91	1.42 (0.68-2.96)	0.36

Haplotype	PSA				Gleason score				Pathological T stage			
	< 10 ng/ml	≥ 10 ng/ml	OR (95% CI)	P	≤ 7	> 7	OR (95% CI)	P	pT1/pT2	pT3/pT4	OR (95% CI)	P
GTT	0.626	0.562	0.76 (0.57-1.00)	0.06	0.632	0.552	0.71 (0.54-0.95)	0.03	0.643	0.532	0.62 (0.43-0.91)	0.02
ACC	0.325	0.334	1.05 (0.78-1.41)	0.78	0.303	0.347	1.23 (0.91-1.67)	0.19	0.287	0.385	1.54 (1.04-2.26)	0.03
GCC	0.037	0.062	1.74 (0.91-3.34)	0.09	0.041	0.066	1.67 (0.88-3.15)	0.11	0.052	0.060	1.16 (0.52-2.57)	0.73
GTC	0.000	0.024	NA		0.011	0.017	1.48 (0.49-4.47)	0.47	0.018	0.009	0.61 (0.14-2.79)	0.45
ACT	0.013	0.019	1.58 (0.51-4.93)	0.45	0.013	0.018	1.36 (0.42-4.35)	0.61	0.000	0.014	NA	0.07

POĎAKOVANIE

Túto prácu podporila agentúra MŠVVaŠ SR v rámci grantov č. 1/0014/22 a APVV-15-0181.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Elfaki I, Mir R, Almutairi FM, Duhier FMA. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. Asian Pac J Cancer Prev. 2018 Aug 24;
- Koonrungsesomboon N, et al. The impact of genetic polymorphisms on CYP1A2 activity in humans: a systematic review and meta-analysis. Pharmacogenomics J. 2018 Dec;18(6):760-768.
- Kwon YJ, Shin S, Chun YJ. Biological roles of cytochrome P450 1A1, 1A2, and 1B1 enzymes. Arch Pharm Res. 2021 Jan;44(1):63-83
- Yu J, et al. Cytochrome P450 1A2 overcomes nuclear factor kappa B-mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. Oncogene. 2021 Jan;40(3):492-507.

VÝSKYT SUPEROXIDDISMUTÁZY 1 V NÁDOROCH PANKREASU

Vrzgula M.¹, Mihalik J.¹, Benický M.², Gaško R.³, Krehel'ová A.¹, Hodorová I.¹

¹Ústav anatómie, Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice

²Oddelenie patológie, Lekárska fakulta, UPJŠ, Košice

³Klinická epidemiológia a bioštatistika, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zmapovať výskyt superoxididismutázy (SOD) 1 v nádorových bunkách rôzne diferencovaného duktálneho adenokarcinómu pankreasu (PDAC) a zhodnotiť možnosť používania SOD1 ako prognostického markera u pacientov s PDAC. Detekciu enzýmu v nádorových bunkách sme realizovali nepriamou imunohistochemickou metódou, pričom z celého súboru (n=60) bolo 55 vzoriek SOD1 pozitívnych (91,67%). Výsledky imunohistochemickej analýzy sme korelovali so stupňom diferenciácie tumoru (G1, G3). V skupine dobre diferencovaných tumorov bolo pozitívnych 36 vzoriek z celkového počtu 40, v skupine zle diferencovaných tumorov bolo pozitívnych 19 vzoriek z celkového počtu 20. Na posúdenie presných štatistických vzťahov medzi výskytom proteínu a stupňom diferenciácie tumoru sme použili Fisherov exaktný test a chí-kvadrátový test. Keďže prítomnosť proteínu v nádorových bunkách v našom súbore nekorelovala štatisticky významne so stupňom diferenciácie tumoru, a tým aj prognózou ochorenia, predpokladáme, že miera expresie SOD1 v nádorových bunkách pankreasu nie je vhodným prognostickým markerom PDAC.

ÚVOD

Rakovina pankreasu patrí medzi najobávanejšie onkologické ochorenia. Toto konštatovanie platí aj napriek neustále sa zlepšujúcim diagnostickým možnostiam a veľkému pokroku v poznaní molekulárnogenetických procesov jej patogenézy. Najčastejším malígnym nádorom pankreasu je PDAC, má pôvod v epitelových bunkách pankreatických vývodov (Lüllmann-Rauch, 2012; Neuwirth a kol., 2018). Pri vzniku a rozvoji PDAC sa uplatňuje o. i. oxidačný stres, reaktívne formy kyslíka vznikajú ako vedľajšie produkty bunkového aeróbného metabolizmu. Antioxidačné enzýmy patria medzi protektívne celulárne faktory, chránia bunku pred účinkom voľných radikálov, plnia však dôležitú úlohu aj v regulácii bunkových signálnych dráh (Li a kol., 2015). Dôležitú úlohu v rámci enzýmového antioxidačného systému zohráva superoxididismutáza (SOD), ktorá katalyzuje premenu superoxidu ($\bullet\text{O}_2^-$) na peroxid vodíka (H_2O_2). U ľudí sa vyvinuli tri rôzne izoformy SOD, ktoré majú v katalytickom centre variabilné kovové ióny. Okrem požiadaviek na rozdielne kofaktory kovových iónov sú tieto enzýmy aj odlišne lokalizované v jednotlivých celulárnych kompartmentoch (Miller, 2012). SOD1 (CuZn-SOD) je homodimérny bimetaloenzým, ktorý využíva meď na katalýzu a zinok na zvýšenie katalytickej účinnosti a stabilizáciu samotného enzýmu. SOD1 dosahuje molekulovú hmotnosť 32 kDa a je hlavnou cytosolickou formou superoxididismutáz (Fukai a Ushio-Fukai, 2011). SOD1 je primárne distribuovaná v cytosole, nachádza sa však aj v bunkových organelách ako sú jadro, lyzozómy a peroxizómy, bola detegovaná aj v intermembránovom priestore mitochondrií (Tsang a kol., 2014). Význam SOD1 v patogenéze onkologických ochorení nie je dostatočne definovaný (Wilkes a kol., 2017). V hemolyzovaných červených krvinkách pacientov s PDAC bola detegovaná zvýšená SOD1 aktivita. Klinická implikácia tohto objavu je nejasná aj v dôsledku toho, že celková SOD aktivita nebola u pacientov podstatnejšie zmenená (Lin a kol., 2009, Kodydková a kol., 2013).

MATERIÁL A METODIKA

Zmapovanie výskytu SOD 1 v nádorových bunkách sme realizovali na 60 vzorkách PDAC. Materiál vo forme parafinových bločkov bol pre účely tejto štúdie zapožičaný po schválení Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura (UNLP) v Košiciach z Oddelenia patológie UNLP. Tumory zaradené do štúdie (60) boli patológom rozdelené na dobre

diferencované - G1 (40) a zle diferencované - G2 (20). Cieľom našej práce bolo imunohistochemicky stanoviť výskyt SOD1 v nádorových bunkách PDAC a korelovať výsledky s rozličným stupňom diferenciácie tumorov. Na zmapovanie prítomnosti SOD1 boli použité primárne králičie polyklonálne protilátky anti-SOD1 v riedení 1:200. Inkubácia primárnych protilátok trvala 60 minút a prebehla pri laboratórnej teplote. K spracovávaným vzorkám bol pridaný Biotynilovaný Link, Streptavidín-HRP a na vizualizáciu SOD1 diaminobenzidín. Po každom uvedenom kroku bol vykonaný oplach v oplachovacom roztoku. Na záver boli vzorky tkanív zafarbené hematoxylínom. Následne bol celý postup zopakovaný ešte raz bez pridania primárnej protilátky pre potrebu negatívnej kontroly. Prítomnosť proteínu SOD1 v nádorových bunkách sme hodnotili kvalitatívne aj kvantitatívne metódou podľa Pastornická a kol. Kvalitatívne sme vzorky vyhodnocovali posúdením intenzity sfarbenia, na kvantitatívne hodnotenie sme použili semikvantitatívnu metódu, pričom sme posudzovali percento pozitívnych nádorových buniek v každom tkanivovom reze pri zaokrúhlení na celé percentá. Použili sme škálu uvedenú v Tab. 1. Za pozitívne sme považovali vzorky tumorov, ktoré sme označili znamienkom 2+ a 3+, ostatné vzorky sme považovali za negatívne. Tkanivové rezy boli za pomoci svetelného mikroskopu vyhodnotené dvoma posudzovateľmi prienikom výsledkov ich nezávislých pozorovaní. Štatistické hodnotenie výsledkov sme vykonali vo verzii (pozitívne a negatívne vzorky) aj vo verzii vzoriek (-, 1+, 2+, 3+). Na štatistickú analýzu sme použili Fisherov exaktný test a chí-kvadrátový test (χ^2 test).

<i>Zastúpenie SOD1 pozitívnych buniek</i>	<i>Označenie vzoriek</i>
0 %	-
1-10 %	1+
11-90 %	2+
91-100 %	3+

Tab. 1. Škála hodnotenia SOD1 imunoreaktívnych vzoriek

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom hodnotenia stupňa diferenciácie tumoru je predpovedať biologické a klinické správanie malígnych neoplázií. Väčšina klasifikácií na určovanie stupňa diferenciácie delí nádory do troch alebo štyroch stupňov, ktoré vystihujú stúpajúci charakter malignity a tým nepriamo aj prognózu ochorenia. Výsledky veľkých retrospektívnych štúdií pri malígnych nádoroch prsníka potvrdili, že histologický grade je dôležitý prognostický faktor, a to bez ohľadu na veľkosť tumoru alebo počet metastaticky postihnutých lymfatických uzlín. Určovanie stupňa diferenciácie má však všeobecne známe nedostatky, ktoré súvisia so subjektívnym hodnotením a s rozdielnymi stupňami diferenciácie na rôznych miestach tumoru (Kajo a Galbavý, 2017). K presnejšiemu hodnoteniu prognózy ochorenia preto môže dopomôcť stanovenie výskytu rôznych proteínov alebo iných substancií v nádorových bunkách. V našom súbore sme sledovali v nádorových bunkách PDAC výskyt SOD1. V skupine dobre diferencovaných (G1) PDAC (n=40) bolo pozitívnych 36 tkanivových rezov (90%), v skupine zle diferencovaných (G3) PDAC (n=20) bolo pozitívnych 19 vzoriek (95%). Na vyhodnotenie vzťahu imunoreaktivity SOD1 (vo verzii pozitívne a negatívne vzorky) so stupňom diferenciácie tumoru bol použitý Fisherov exaktný test (Tab. 2.).

Proteín	G1	G3	Fisherov exaktný test
SOD1 -	4	1	p=0,656
SOD1 +	36	19	

Tab. 2. Distribúcia SOD1 (vo verzii pozitívne a negatívne vzorky) vzhľadom na stupeň diferenciácie nádoru.

Na vyhodnotenie vzťahu imunoreaktivity SOD1 (vo verzii vzoriek 0,1+,2+,3+) so stupňom diferenciácie tumoru bol použitý chí kvadrátový test (Tab. 3.).

Proteín	G1	G3	χ^2 test
SOD1 -	0	0	p=0,803
SOD1 +	4	1	
SOD1 ++	34	18	
SOD1 +++	2	1	

Tab. 3. Distribúcia SOD1 (vo verzii vzoriek -, 1+, 2+, 3+) vzhľadom na stupeň diferenciácie nádoru.

V oboch prípadoch sme zistili, že rozdiel v distribúcii SOD1 medzi G1 a G3 nie je štatisticky významný (p=0,656; p=0,803), čiže štatisticky významná korelácia medzi prítomnosťou SOD1 a stupňom diferenciácie tumoru nebola dokázaná. Vzhľadom na uvedené výsledky štatistickej analýzy je možné predpokladať, že miera expresie SOD1 v nádorových bunkách pankreasu nie je vhodným prognostickým markerom u pacientov s PDAC. V našom výskume plánujeme pokračovať s ostatnými izoformami superoxididismutázy.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA č.1/1073/19

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011; 15/6:1583-606.
- Kajo K, Galbavý Š. Úvod do onkologickej patológie in *Všeobecná onkológia.* 2017; 576 s.
- Kodydkova et al. Antioxidant status and oxidative stress markers in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas.* 2013; 42/4:614-21.
- Li W et al. Superoxide dismutase promotes the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via activation of the H2O2/ERK/NF- κ B axis. *Int J Oncol.* 2015; 46/6:2613-20.
- Lin Y et al. Serum soluble fas levels and superoxide dismutase activity and the risk of death from pancreatic cancer: A nested case-control study within the Japanese Collaborative Cohort Study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2009; Suppl:81-5.
- Lüllmann-Rauch R. Žlázy trávicí trubice in *Histologie.* 2012; 527 s.
- Miller AF. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters.* 2012; 586/5:585-95.
- Neuwirth J et al. Zhoubný nádor pankreatu in *Kompendium onkologického zobrazování.* 2018; 468 s.
- Pastornická A et al. Influence of Paclitaxel and Doxorubicin Therapy of β III-Tubulin, Carbonic Anhydrase IX, and Survivin in Chemically Induced Breast Cancer in Female Rat. *Int J Mol Sci.* 2021; 22/12:6363.
- Tsang CK et al. Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. *Nat Commun.* 2014; 5:3446.
- Wilkes JG et al. Superoxide Dismutases in Pancreatic Cancer. *Antioxidants (Basel).* 2017;6/3:66.

ENTEROCÍNY A ICH INHIBIČNÝ ÚČINOK NA METICILÍN-REZISTENTNÉ STAFYLOKOKY

Zábolyová N., Lauková A., Pogány Simonová M.
Centrum biovied SAV v.v.i., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Košice

ABSTRAKT

Multirezistentné a najmä meticilín-rezistentné stafylokoky (MRS) sa vyskytujú nielen v humánnej medicíne, ale čoraz viac sa s nimi stretávame aj u hospodárskych zvierat, čo ohrozuje kvalitu živočíšnych produktov a následne aj zdravie konzumenta. Vzniku/prenosu rezistencií na antibiotiká by mohlo zabrániť používanie naturálnych substancií s antimikrobiálnym účinkom, napríklad bakteriocínov/enterocínov a to za preventívnym, ale aj za terapeutickým účelom. Preto boli v tejto práci testované fekálne stafylokoky z viacerých druhov zvierat na rôzne parametre s cieľom vytvorenia súboru MRS na základe ich rezistencie na meticilín/oxacilín/cefexitín, vrátane ich citlivosti na enterocíny. Kmene stafylokokov (185) boli taxonomicky zaradené ku 26 druhom pomocou identifikačného systému MALDI-Tof. Na základe pozitívnych výsledkov rezistencie na meticilín/oxacilín/cefexitín bol vytvorený súbor 118 MRS. Meticilínová rezistencia PBP² aglutinačným testom bola potvrdená len u 30 MRS kmeňov, molekulárna identifikácia *mecA* génu bola zatiaľ potvrdená u 15 z 39 testovaných kmeňov. Kmene MRS boli zväčša nehemolytické, negatívne na DNázu, netvorili biofilm resp. vykazovali nízku produkciu biofilmu. Stafylokoky vykazovali citlivosť ku 9 enterocínom (Ent) v rozmedzí 100-25 600 AU/ml. Najvyššiu aktivitu vykazovali Ent A/P, Ent 412, Ent 9296, Ent 2019, Ent 55, Ent M a Durancín ED26E/7, ktoré inhibovali 69 až 92 zo 118 stafylokokov. Najcitlivejšie boli kmene *S. hominis* R/36/2, *S. warneri* R/16/2 a R/28/20, izolované zo pstruhov inhibované 8 resp. 7 enterocínmi v rozmedzí 12 800–25 600 AU/ml; 14 kmeňov bolo rezistentných na testované enterocíny. Keďže MRS predstavujú značné riziko najmä pre chov potravinových zvierat, doterajšie výsledky o ich citlivosti ku enterocínom naznačujú sľubné využitie týchto substancií v chovateľskej praxi.

ÚVOD

V súčasnej dobe predstavuje antibiotická rezistencia globálny problém nielen v humánnej medicíne, ale aj v živočíšnej výrobe. Zníženie jej výskytu či zvolenie vhodnej terapie je veľmi ťažké, pretože dochádza k neustálemu prenosu génov a k vzniku novej rezistencie na ďalšie antibiotiká. Rezistencia na meticilín sa čoraz viac vyskytuje u potravinových zvierat a v ich produktoch a následkom toho vzniká risk kontaminácie konzumentov. Meticilín-rezistentný kmeň *Staphylococcus aureus* (MRSA) sa objavil už pred 50 rokmi ako nozokomiálny patogén, no v súčasnosti kolonizuje najmä hospodárske zvieratá (Pantosti a kol., 2012). Sľubný spôsob eliminácie MRSA predstavuje používanie naturálnych substancií s antimikrobiálnym účinkom, tzv. „-biotiká“, teda pro-, pre-, syn, parapro-, postbiotiká. Postbiotiká sú definované ako prípravok neživých mikroorganizmov a/alebo ich zložiek, ktorý má na hostiteľa priaznivý účinok (Salminen a kol., 2021). Do tejto skupiny zaraďujeme aj bakteriocíny, ktoré sú najčastejšie charakterizované ako antimikrobiálne peptidy, ribozomálne syntetizované a produkované najmä kyselinu mliečnu produkujúcimi baktériami. Veľkú skupinu bakteriocínov tvoria enterocíny – bakteriocíny produkované enterokokmi (Franz a kol., 2007). Vzhľadom na ich silný antimikrobiálny aj imunostimulačný účinok sa využívajú v živočíšnej výrobe na preventívne, ale aj terapeutické účely (Lauková a kol., 2023). Preto naším cieľom bolo otestovať inhibičný účinok enterocínov na MRS, s perspektívou budúcej aplikácie týchto bioaktívnych substancií v chovoch zvierat.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky (210) bolo odobratých z trusu a obsahu tráviaceho traktu hospodárskych zvierat (hydina, ovce, králiky, ošípaná), spoločenských zvierat (psy, kone, mačky) a zo zvierat voľne žijúcich (ryby, srny, jelene, zubre, bobre, ježko). Na spracovanie vzoriek bola použitá štandardná mikrobiologická metóda podľa ISO normy. Vzorky boli vyriedené v Ringerovom roztoku (pH 7,0; Oxoid, Veľká Británia) a inokulované na kultivačné média Mannitol Salt agar a Baird Parker agar (Difco, USA) obohatený vaječným žĺtkom a kultivované 18-24 hod./37°C. Z najvyšších riedení vzoriek boli následne odpichnuté viaceré kolónie, ktoré boli identifikované pomocou MALDI-Tof systému (Bruker Daltonics, USA). Vyselektované kmene boli uložené pomocou systému Mikrobank. Naším cieľom bolo vytvoriť súbor MRS otestovaných ich antibiotickej rezistencie pomocou diskovej difúznej metódy na Mueller-Hinton agare (Oxoid; EUCAST 2023). Sústredili sme sa na meticilín (MET-30µg; Liofilchem, Taliansko), oxacilín (OX-5µg; Oxoid) a cefoxitín (FOX-5µg; Oxoid). Na základe výsledkov rezistencie na minimálne 2 z uvedených antibiotík bol vytvorený súbor 118 MRS. Rezistencia na meticilín bola ďalej potvrdená aj testom PBP'2 Latex Agglutination Test (Oxoid) a v súčasnosti prebieha molekulárna identifikácia *mecA* génu (otestovaných je 39 kmeňov). Boli testované aj ďalšie vlastnosti MRS: hemolytická aktivita na Brain Heart Infusion agare (BHI; Difco) s 5% obsahom defibrinovanej baranej krvi, aktivita DNázy na DNase agare (Oxoid). Tvorba biofilmu bola testovaná kvalitatívnou metódou na BHI agare s kongo červeňou - 24h/48h/72h podľa Freemana a kol. (1989) a kvantitatívnou platničkovou metódou tzv. biofilm plate assay v mikrotitračných platničkách - 24 h/570 nm s použitím BHI kultivačného média po odčítaní pomocou readra Synergy TM4570 nm (Chaieb a kol., 2007). Citlivosť MRS ku čiastočne purifikovaným enterocínom (Ent), izolovaným a charakterizovaným v našom laboratóriu bola testovaná na BHI agare s použitím „agar spot testu“ (De Vuyst a kol., 1996). V teste boli použité tieto enterocíny: Ent A/P, Ent M, Ent 2019, Ent 9296, Ent 55, Ent 412, Ent EF9a, Ent KI2b a Durancin ED26E/7.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmene stafylokokov (185) boli MALDI-Tof identifikáciou taxonomicky zaradené ku 26 druhom patriacich do 9 klusterov. Súbor pozostával z 26 koaguláza-pozitívnych stafylokokov zastúpených druhmi *S. aureus* (18) a *S. pseudointermedius* (8). Zo 139 koaguláza-negatívnych stafylokokov najväčší podiel predstavovali druhy *S. equorum* (19), *S. epidermidis* (17), *S. warneri* (17), *S. vitulinus* (14), *S. hominis* (11) a *S. xylosus* (10). Dvadsať kmeňov zatiaľ nebolo taxonomicky zaradených. Rezistenciu na všetky tri antibiotiká vykazovalo 79 kmeňov (67%) a aspoň na 2 z menovaných antibiotík 39 kmeňov (33%). V súčasnej dobe sa čoraz viac stretávame s MRS nielen v ľudskej populácii, ale sú izolované aj z rôznych druhov zvierat, vrátane spoločenských, potravinových, ale aj voľne žijúcich a exotických zvierat (Aires de Sousa a kol., 2017). Meticilínová rezistencia u stafylokokov je sprostredkovaná najmä génom *mecA*, ktorý kóduje nový proteín viažuci penicilín (PBP2a). Tento proteín sprostredkuje rezistenciu na meticilín (oxacilín) u stafylokokov, keďže znižuje ich afinitu k β-laktámovým antimikrobiálnym látkam (Chambers 1997). Rezistencia na meticilín PBP'2 testom bola potvrdená u 30 MRS (25%). Prítomnosť *mecA* génu bola potvrdená u 15 z 39 otestovaných kmeňov, pričom molekulárna identifikácia stále prebieha. Vzhľadom na nízke percento výskytu *mecA* génu ale predpokladáme, že za rezistenciu na meticilín (oxacilín) môže byť zodpovedný iný *mec* gén, napr. *mecC* (Peacock a Paterson, 2015). Testované MRS boli väčšinou nehemolytické (61); α- a β-hemolýza bola zistená u 44 resp. 13 kmeňov. DNázová aktivita bola zaznamenaná u 41 kmeňov. Produkcia biofilmu na Kongo agare bola potvrdená u 48 stafylokokov. Hodnoty produkcie biofilmu sa pri platničkovej metóde pohybovali u 46 kmeňov od 0,001 do 0,532, čo podľa klasifikácie znamená nízku ($A_{570} < 0.1$) resp. miernu schopnosť tvorby biofilmu ($0.1 \leq A_{570} < 1$; Chaieb a kol., 2007). Zvyšných 108 kmeňov

netvorilo biofilm. Enterocíny inhibovali rast väčšiny testovaných kmeňov v rozmedzí 100 až 25 600 AU/ml, teda kmene boli citlivé ku enterocínom. Najvyššiu aktivitu vykazovali Ent A/P (inhibícia 92 kmeňov zo 118; 78%), Ent 412 (86/118; 73%), Ent 9296 (82/118; 69%), Ent 2019 (79/118; 67%), Durancín ED26E/7 (75/118; 64%), Ent 55 (72/118; 61%) a Ent M (69/118; 58%). Najväčšiu citlivosť kmeňa voči testovaným enterocínom sme zaznamenali v prípade *S. hominis* R/36/2, *S. warneri* R/16/2 a R/28/20, ktoré boli inhibované 8 resp. 7 enterocínmi v rozmedzí 12 800 – 25 600 AU/ml. U 14 stafylokokov sme však okrem meticilínu zaznamenali rezistenciu aj na testované enterocíny. Vysoká inhibičná aktivita testovaných enterocínov na väčšinu kmeňov animálnych MRS však poukazuje na sľubné aplikačné možnosti týchto substancií v chovoch hospodárskych zvierat. V izolácii MRS z nových zdrojov/zvierat ako aj v testovaní prítomnosti génu *mecA* pokračujeme. V budúcnosti by sme chceli tieto kmene otestovať aj na prítomnosť génu *mecC* a génov pre tvorbu biofilmu, ako aj ich citlivosť ku enterocínom za *in situ* podmienok pomocou bioreaktora BIOSAN.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 2/0005/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aires De Sousa M, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. Clin Microbiol Inf. 2017; 23(6):373-80.
- De Vuyst L, et al. Characterization of the antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. Syst Appl Microbiol. 1996; 19(1):9-20.
- EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, version 11.0, 2023, p.1-22, www.eucast.org
- Franz Ch, et al. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol Rev. 2007; 31(3):293-310.
- Freeman DJ, et al. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. J Clin Pathol. 1989; 42:872-4
- Chaieb K, et al. In vitro effect of pH and ethanol on biofilm formation by clinical *ica*-positive *Staphylococcus epidermidis* strains. Ann Microbiol. 2007; 57:431-7.
- Chambers HF, Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997; 10(4):781-91.
- Laukova A. et al. Enterocins and Their Application Potential in Animal Breeding. Proceedings of the 16th International Scientific Conference on Probiotics, Prebiotics, Gut Microbiota and Health, 2023; pp 41.
- Pantosti A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. Front Microbiol. 2012; 3(127):1-12.
- Peacock SJ, Paterson GK, Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Biochem. 2015; 84:577-601.
- Salminen S, et al. The International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of postbiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021; 18(9): 649-67.

ANALÝZA VÝSKYTU RETINÁLNEJ DYSPLÁZIE U PLEMENA ČESKOSLOVENSKÝ VLČIAK – ZÁKLAD ŠTÚDIE DEDIČNEJ PREDISPOZÍCIE

Zubrický P.¹, Trbolová A.¹, Miluchová M.²

¹ *Univerzitná veterinárna nemocnica, Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81
Košice*

² *Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Ústav výživy a genomiky, SPU, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra*

ABSTRAKT

Pojmom retinálna dysplázia označujeme poruchu normálneho vývoja sietnice. Ochorenie vzniká na základe hereditárneho alebo environmentálneho vplyvu. U psov sa klinicky prejavuje širokým rozsahom oftalmoskopických lézií s veľmi rozdielnym vplyvom na zrakovú schopnosť. Podľa závažnosti rozoznávame multifokálnu, geografickú a celkovú retinálnu dyspláziu. Doteraz publikované informácie o výskyte, type a spôsobe dedičnosti RD u československého vlčiaka (ČSV) nie sú dostatočné na hlbšie poznanie problematiky u tohto plemena. Cieľom našej práce bolo zmapovanie výskytu retinálnej dysplázie, klasifikácia očných nálezov, a kvantitatívne posúdenie závažnosti zachytených defektov sietnice u ČSV. Vyšetrením 117 jedincov oboch pohlaví a rôzneho veku sme zachytili retinálnu dyspláziu vo forme záhybov, multifokálnej a geografickej forme s rôznym podielom poškodenia sietnice. Na základe výberových parametrov – klinický stav, vek, pohlavie a príbuznosť sme vytvorili referenčnú skupinu 36 jedincov a uskutočnili genotypizáciu použitím čipovej technológie Illumina. Získané hrubé dáta boli kvalitatívne upravené a poskytnú základ pre pilotnú celogenómovú asociačnú štúdiu zameranú na identifikáciu genetickej predispozície retinálnej dysplázie u plemena ČSV.

ÚVOD

Retinálna dysplázia (RD) je termín používaný na označenie chybných proliferácií a nedokonalej diferenciácie vyvíjajúcej sa sietnice (Mellersh, 2014). Ide o heterogénnu skupinu stavov, ktorá sa prejavuje rôznymi stupňami, od tých, ktoré nemajú žiadny vplyv na videnie až po tie, ktoré vedú k slepote (Peterson-Jones a Mowat, 2021).

Fokálna/multifokálna forma je charakterizovaná širokým spektrom oftalmoskopicky viditeľných abnormalít siahajúcich od sietnicových záhybov, ktoré sa javia ako pruhy, bodky a/alebo červovité lézie prítomné jednotlivo alebo vo viacerých a lokalizovaných v tapetálnych alebo netapetálnych oblastiach (Iwabe a kol., 2020). Keď sa táto forma RD pozoruje u šteniat, môže sa s dospelosťou čiastočne alebo úplne vyriešiť. Genetický vzťah medzi záhybmi a závažnejšími formami dysplázie sietnice nie je stanovený (Zubrický a Trbolová, 2022). Charakteristickou léziou geografickej formy RD je zhrubnutý kruhový plak tkaniva sietnice lokalizovaný v zadnom póle a/alebo v ekvatoriálnych oblastiach očného pozadia (Holle a kol., 1999). Celková dysplázia sietnice je popisovaná ako závažná dezorganizácia sietnice spojená s oddelením neurosenzorickej sietnice od pigmentového epitelu sietnice (ACVO, 2022) a je súčasťou závažných dedičných syndrómových ochorení, známych ako okuloskeletálna dysplázia (Iwabe a kol., 2020).

Celogenómová asociačná štúdia – GWAS (Genome_Wide Association Study) reprezentujúca spojenie genomických technológií, bioinformatiky a bioštatistiky využíva skenovanie celého genómu jedinca a identifikáciu genetických variantov, ktoré sú spojené s fenotypovými prejavmi (Machiela a Chanock, 2014). Podstatou GWAS analýzy je porovnávanie veľkých súborov genetických dát medzi jedincami s rozdielnymi fenotypmi. Tieto analýzy môžu poskytnúť informácie o spojitosti genetických variantov s určitými ochoreniami (Momozawa a kol., 2020) alebo vzorcami správania psov (Shan a kol., 2021) a ich spôsobe

ovplyvňovania biologických procesoch v organizme a zároveň ponúkajú cenné informácie pre vývoj nových diagnostických a terapeutických prístupov.

MATERIÁL A METODIKA

Komplexné očné vyšetrenie bolo vykonané u 117 československých vlčiakov oboch pohlaví, 82 jedincov bolo vo veku od 1 do 13 rokov a 35 šteniat 5 rôznych vrhov vo veku 6-7 týždňov. Všetky psy boli s preukazom o pôvode a pochádzali zo širokého spektra chovateľských staníc. Oftalmologické vyšetrenie zahŕňalo behaviorálne testy a neurooftalmologické testovanie, meranie vnútroočného tlaku a produkcie slz, posúdenie predného segmentu, iridokorneálneho uhla a zadného segmentu. Fundus bol vyšetrovaný s použitím mydriatik (1% Unitropic, Unimed, SK), priameho oftalmoskopu Heine (Nemecko), monokulárneho nepriameho oftalmoskopu (Pan Opticophthalmoscope, Welch Allyn, USA) a nepriameho oftalmoskopu (Heine Omega 600, Optotechnik GmbH, Nemecko), s dvojitou asferickou šošovkou (Volk 20D, Volk, USA). U jedincov, u ktorých bolo v šteňacom veku zistený očný nález boli znovu vyšetrené vo veku 6 mesiacov na posúdenie vývoja očných abnormalít. Každý zachytený očný nález bol zdokumentovaný pomocou fundus kamery Aurora (Optomed, Fínsko). U jedincov so zistenou retinálnou dyspláziou bol záznam očného nálezu podrobený kvantitatívnej analýze pomocou programu ImageJ (National Institutes of Health, USA), pomocou ktorého bol zmapovaný počet lézií a percentuálny podiel postihnutia sietnice. Genomická analýza bola vykonaná na referenčnej skupine 36 jedincov vybraných zo základného súboru 117 československých vlčiakov. Biologickým materiálom pre molekulárne analýzy bola celková krv odobratá jedincom počas komplexného vyšetrenia. Príprava genomickej DNA bolo vykonaná v laboratóriu genetiky živočíchov na Ústave výživy a genomiky, SPU Nitra. Genotypizácia bola vykonaná použitím celogenómového SNP čipu Illumina CanineHD 230K BeadChip (Illumina, USA) prostredníctvom spoločnosti Neogen Europe Ltd (Scotland). Hodnotenie kvality získaných hrubých dát bolo vykonané v spolupráci s pracoviskom Ústavu výživy a genomiky, SPU Nitra.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Populácia československého vlčiaka nebola zatiaľ cielene skúmaná na zachytenie výskytu jednotlivých očných ochorení, vrátane retinálnej dysplázie. Štatistiky Americkej vysokej školy veterinárnych oftalmológov (ACVO, 2022) uvádzajú u československých vlčiakov záhyt len retinálnych záhybov a to u jedného jedinca z 15 vyšetrených za obdobie rokov 1991-2016. Údaje o veku, či výsledkoch opakovaného vyšetrenia nie sú k dispozícii. V našej štúdii sme z celkového počtu 117 vyšetrených československých vlčiakov zachytili 7 jedincov (5,9%) s nálezom rôznych foriem retinálnej dysplázie. 3 jedince (2,5%) s nálezom retinálnych záhybov mali v čase vyšetrenia 6-7 týždňov. Pri opakovanom vyšetrení vo veku 6 mesiacov bola ich sietnica bez akýchkoľvek defektov, keďže takéto záhyby zvyčajne miznú s rastom oka (Gellat a Plummer, 2022). U dospelých československých vlčiakov sme retinálnu dyspláziu zachytili v 4 prípadoch (3,4%), z toho u 3 jedincov (2,5%) v multifokálnej forme a 1 jedinca (0,9 %) v geografickej forme.

Pri kvantitatívnom posúdení očných nálezov vykazovali retinálne záhyby u šteniat priemerný podiel poškodenia sietnice na úrovni 1,06 %, u dospelých jedincov s nálezom multikokálnej formy bol podiel poškodenia 3,59% a u jedinca s geografickou formou predstavoval podiel 8,81%. Výsledky z kvantitatívneho posudzovania uvedených defektov korelujú s tvrdením Peterson-Jonesa a Mowata (2021), podľa ktorých geografická dysplázia sietnice má výrazne horší dopad na zrakovú schopnosť oproti fokálnej/multifokálnej forme. Zároveň pri nízkom podiele retinálneho poškodenia sietnice vo forme záhybov zachytených u šteniat, dochádza dozrievaním sietnice k vymiznutiu defektov.

Prvotné hodnotenie genotypizačných dát sme vykonali použitím softvéru PLINK 1.9 (Chang a kol., 2015). Celkovo sa analyzovalo 220 853 SNP markerov, ktoré boli spoločné pre všetkých 36 jedincov. Získaný súbor hrubých dát bol ošetrovaný na základe výberu autozomálnych SNP markerov lokalizovaný na 38 chromozómoch, zohľadnenia frekvencie minoritnej alely (MAF <0,05) a kvality vyvolanej bázy (<0,90). Výsledný súbor po kvalitatívnej korekcii pozostával zo 112 668 SNP markerov a bol dosiahnutý pri všetkých 36 jedincoch referenčnej skupiny. Získané dáta po korekcii predstavujú vstupný súbor pre rozsiahlu celogenómovú asociačnú štúdiu zameranú na analýzu genetickej predispozície pre vznik retinálnej dysplázie u plemena ČSV.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- ACVO Genetics Committee. Ocular Disorders Presumed to be Inherited in Purebred Dogs. 13th edn., American College of Veterinary Ophthalmologists. 2022. Dostupné online: ACVO-Blue-Book-2022.pdf (ofa.org)
- Chang CC, et al. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4. 2015
- Gelatt KN, Plummer CE. *Essentials of Veterinary Ophthalmology*, John Wiley & Sons, Inc., Fourth Edition, 2022- 492. ISBN:9781119801320.
- Iwabe S, et al. Focal/multifocal and geographic retinal dysplasia in the dog-In vivo retinal microanatomy analyses. *Veterinary Ophthalmology*. 2020; 23:2-292-304.
- Holle DM, et al. The geographic form of retinal dysplasia in dogs is not always a congenital abnormality. *Veterinary Ophthalmology*. 1999; 2: 61–66.
- Machiela MJ, Chanock SJ. “GWAS is going to the dogs”. *Genome Biology*. 2014; 15:3-105. <https://doi.org/10.1186/gb4166>.
- Mellersh CS. The genetics of eye disorders in the dog. *Canine genetics and epidemiology*, 2014;1,3. DOI: 10.1186/2052-6687-1-3.
- Momozawa Y, et al. Genome wide association study of 40 clinical measurements in eight dog breeds. *Sci Rep*. 2020;16;10(1):6520. doi: 10.1038/s41598-020-63457-y.
- Peterson-Jones SM, Mowat F. 2021. Diseases of the Canine Ocular Fundus. In Gellat K.N., et al.: *Veterinary Ophthalmology*. Volume 1. John Wiley and Son Inc. Sixth Edition, 1477-1497.
- Shan, Shuwen, Fangzheng Xu, a Bertram Brenig. “Genome-Wide Association Studies Reveal Neurological Genes for Dog Herding, Predation, Temperament, and Trainability Traits”. *Frontiers in Veterinary Science*. 2021; 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.693290>.
- Zubrický P, Trbolová A. 2022. Hereditary Eye Diseases in German Shepherd Dog. *Folia Veterinaria*, 2022;66:3-48-53. doi:10.2478/fv-2022-0026.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2023
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XVIII. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2023

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 978-80-974246-4-0