



ÚSTAV
FYZIOLÓGIE
HOSPODÁRSKYCH
ZVIERAT

CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2025

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

XX. ročník

Košice, 6. a 7. november 2025

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2025

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

XX. ročník

Košice, 6. a 7. november 2025

**Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný pamiatke
akademika Bod'u
6. a 7. november 2025
Košice**

Organizátori seminára:

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

Zborník zostavila:

RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

Recenzovali:

doc. MVDr. Renáta Szabóová, PhD.
RNDr. Božena Kočíková, PhD.

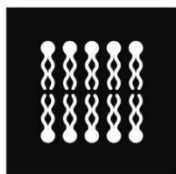
Organizačný a programový výbor:

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



ÚSTAV
FYZIOLÓGIE
HOSPODÁRSKYCH
ZVIERAT



CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED





Akademik prof. MVDr. Bod'a Koloman, DrSc.

* 4. apríl 1927 Horná Strehová † 11. november 2005 Bratislava

Profesor Koloman Bod'a (1927 - 2005) patril medzi popredných slovenských vedeckých pracovníkov, ktorého meno sa spája s tradíciou základného výskumu v oblasti fyziológie hospodárskych zvierat na Slovensku. V roku 1964 kreoval Oddelenie fyziológie hospodárskych zvierat ÚEB SAV v Košiciach, z ktorého v r. 1969 vznikol Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV. Jeho cieľom bolo vybudovať moderný ústav reprezentujúci československú veterinársku fyziológiu nielen v Československu, ale aj vo svete. S

odstupom času môžeme právom konštatovať, že tieto zámery sa úspešne naplnili.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat mal pôvodne tri pracoviská, v Košiciach, Ivanke pri Dunaji a vo Zvolene. V roku 1990 vznikli na ich základe 2 samostatné ústavy: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat v Košiciach a Ústav biochémie a genetiky živočíchov v Ivanke pri Dunaji. Vedecká činnosť ústavu pod vedením profesora Bod'u bola zameraná najmä na tri základné smery:

- analýzu základných mechanizmov efektívnej transformácie rastlinných bielkovín a nebielkovinového dusíka do živočíšnych bielkovín vrátane kontroly týchto procesov,
- kvantifikáciu výmenných procesov dusíkatých látok medzi krvou a tráviacim traktom oviec,
- poznanie odpovedí organizmu na zmenené podmienky prostredia na neurohumorálnej úrovni najmä u prežúvavcov.

K významným výsledkom ústavu patria prioritné poznatky najmä v oblastiach využitia dusíka, fyziológie trávenia a využitia rôznych zdrojov energie, ktoré boli ocenené celým radom vyznamenaní a cien.

Profesor Koloman Bod'a inicioval na ústave výskum v niektorých progresívnych oblastiach biotechnológií, ktoré sa rozvíjali naďalej a tvoria súčasť dnešného vedeckého programu ÚFHZ SAV. Ide napríklad o rozvoj poznania mikrobioty (vrátane bacherových prvokov) tráviaceho traktu hospodárskych zvierat využitím metód molekulárnej biológie, štúdium fyziologických procesov v bachore v *in vitro* podmienkach, mikropunkcie obličiek hospodárskych zvierat, výskum v oblasti preimplantačnej embryológie, analýza mechanizmov regulácie príjmu potravy na úrovni tráviaceho traktu a centrálnej nervovej sústavy. Obzvlášť významné sú práce pána profesora zamerané na oblasť kozmickej fyziológie, ktoré boli riešené na pracovisku v Ivanke pri Dunaji, v rámci medzinárodného programu Interkosmos. Tento výskum mu bol veľmi blízky a aktívne sa v ňom angažoval aj po odchode do zaslúženého dôchodku.

Profesor Bod'a vychoval celú generáciu nových vedeckých pracovníkov, najmä v odbore veterinárnej fyziológie a fyziológie živočíchov, položil základy dvoch úspešných ústavov SAV. Jeho meno je naozajstným pojmom nielen na Slovensku a okolitých krajinách, ale aj vo svete.

Autor textu: prof. MVDr. Juraj Koppel, DrSc.

OBSAH

ÚČINOK NANOČASTÍC ZnO NA VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÉ A ZÁPALOVÉ PARAMETRE U JAHNIAT	
Bombárová A., Čobanová K.	9
VÝSKYT ZOONOTICKÝCH PATOGENOV V <i>IXODES RICINUS</i> V MESTSKÝCH OBLASTIACH SEVERNÉHO SLOVENSKA	
Cellengová Z., Hajdová B., Schreiberová A., Kočišová A.	12
VYŠŠIE ORGANIZOVANÉ NANOŠTRUKTÚRY NA BÁZE PROTEÍN-DNA BIONIČNOSTI	
Fedorová V., Huntošová V., Šipošová K., Humeník M.	15
MOLEKULÁRNA CHARAKTERISTIKA KMEŇOV <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZOLOVANÝCH Z HNAČKUJÚCICH TELIAT	
Galambošiová, T., Bujňáková, D., Karahutová, L.	18
FUNKCIONALIZÁCIA UPKONVERZNÝCH NANOČASTÍC S CIEĽOM DORUČENIA LIEČIVA DO HER2 NÁDOROVÝCH BUNIEK	
Gulyášová T., Vasylyshyn T., Patsula V., Horák D., Sedlák E., Huntošová V.	21
MOLEKULÁRNA A SÉROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA <i>ANAPLASMA</i> SPP. V KĽEŠTOCH A U VOĽNE ŽIJÚCEJ ZVERI NA SLOVENSKU	
Hudáková K., Petroušková P., Korytár L., Ondrejková A. ¹ , Drážovská M., Gogol'ová L., Franková K., Lipinský J., Čurlík J., Lazár J., Kostičák M., Prokeš M.	24
POROVNANIE HLADINY IMUNOGLOBULÍN V KRVNOM SÉRE TELIAT V OBDOBÍ MESIACOV OKTÓBER AŽ MAREC A VPLYV IMUNOGLOBULÍN NA ÚMRTNOSŤ	
Ješík J., Mudroň P.	27
POROVNANIE RÁDIOGRAFICKÝCH MERACÍH METÓD VYUŽÍVAJÚCICH VERTEBRÁLNE, HRUDNÉ A MANUBRIÁLNE REFERENČNÉ BODY PRI HODNOTENÍ VEĽKOSTI SRDCEVEJ SILUETY U PSOV	
Kacková G., Horňák S., Figurová M., Agudelo C. F., Vargová N.	30
<i>TOXOPLASMA GONDII</i> U HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT – RIZIKO PRE VETERINÁRNU PRAX A VEREJNÉ ZDRAVIE	
Kaňuk D., Antolová D., Valentová D., Strišková K.	33
VYUŽITIE VČELÍCH ČREVNÝCH EXPLANTÁTOV PRE ŠTÚDIUM IMUNITNEJ ODPOVEDE U <i>APIS MELLIFERA</i>	
Kollár Moskáľová L., Hudecová P., Ratvaj M., Chomová N., Mudroňová D.	36
EPIZOOTOLOGICKÝ PRIESKUM <i>ANAPLASMA</i> SPP. U DOMÁCIH PREŽÍVAJÚCICH NA SLOVENSKU	
Kostičák M., Hudáková K., Drážovská M., Ondrejková A., Korytár L., Lipinský J., Petroušková P., Pelegrinová A., Ješík J., Prokeš M.	39
EFFECT OF THYMOL ENTEROSOLVENT GASTRORESISTANT PELLETS ON RABBITS' INTESTINAL INTEGRITY AND MICROBIOTA	
Kristofova R., Zitterl-Eglseer K., Capucchio M. T., Ippolito D., Gai F., Cikos S., Spirkova A., Laukova A., Pogany Simonova M., Placha I.	42
VPLYV KÁVOVEJ USADENINY BOHATEJ NA BIOAKTÍVNE ZLÚČENINY NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A ANTIHELMINTICKÚ AKTIVITU <i>IN VITRO</i>	
Leško M., Várady M.	45
VÝVOJ NEUTRALIZUJÚCICH VYSOKO DIVERZITNÝCH CDR3 Z JEDNODOMÉNOVÝCH PROTILOK VOČI VÍRUSU KĽEŠTOVEJ ENCEFALITÍDY	
Maľarik T., Jozefiaková J., Bhide K., Kulkarni A., Kucková K., Maľarik L., Čurlík J., Bhide M.	48

SILÁŽNA ZRELOSŤ ZELENÝCH KUKURÍC – METODIKA SM (SILAGE MATURITY)

Mitrik A., Mitrik T., Maskal'ová I.51

POROVNANIE ZMIEN V BIELKOVINOVOM PROFILE U TELIAT S HNAČKOU A BEZ

Oršul'aková V., Ješík J., Tóthová C.54

ZVIERACIE MODELY NA VÝSKUM FETÁLNEHO ALKOHOLOVÉHO SYNDRÓMU

Pokorná B., Štefancová S., Petrovová E., Luptáková L.57

PRÍPRAVA KONJUGOVANÝCH FLUORESCENČNÝCH PROTEÍNOV PRE CIELENÝ TRANSPORT DO HER2 RECEPTOROV BUNIEK NÁDORU PRSNÍKA

Poliaková A., Gulyásová T., Tomková S., Ambro L., Repovská M., Holotová V., Nemergut M., Sedlák E., Huntošová V.60

VPLYV RANNÉHO STRESU NA NEURÓNOVÉ POPULÁCIE V ČUCHOVEJ NEUROGÉNNEJ OBLASTI MOZGU POTKANA

Popovičová, A., Fabianová, K., Žideková, M., Martončíková, M., Račeková, E.63

VPLYV ORGANICKÝCH A ANORGANICKÝCH FORIEM SELÉNU NA JATOČNÉ A BIOCHEMICKÉ PARAMETRE PREPELÍC

Récky A., Zigo F., Hoppejová T., Reitznerová A., Balážová L.66

ZMENY AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY A JEJ IZOENZÝMOV U PSEUDO GERM-FREE ANIMÁLNEHO MODELU PO APLIKÁCIÍ PROBIOTÍK, PREBIOTIKA A TRANSPLANTÁTU FEKÁLNEJ MIKROBIOTY OD NEUROTYPICKÝCH DONOROV A DONOROV S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Rodáková K., Andrejčáková Z., Vlčková R., Gancarčíková S., Lauko S., Spišáková D., Fusek M., Sashova Tomova A., Sopková D.68

PREVALENCIE VYBRANÝCH PATOGÉNOV U ZÁSTUPCOV *LIPOPTENA* SPP. (DIPTERA: HIPPOBOSCIDAE)

Švirlochová K.M., Vichová B., Vargová L., Blažeková V., Syrota Y., Oboňa J., Csánady A., Čisovská-Bazsalovicsová E., Heglasová I., Zubriková D.71

POROVNANIE MIKROSKOPICKEJ A MOLEKULOVEJ DIAGNOSTIKY *NOSEMA* SPP. U *APIS MELLIFERA*

Szabó I., Sučík M., Morochovičová J., Sabová L.74

VPLYV SUPLEMENTÁCIE ZDROJOV OMEGA-3 MASTNÝCH KYSELÍN NA KRVNÝ OBRAZ A PROFIL MASTNÝCH KYSELÍN V KRVI U KONÍ S CHRONICKÝMI DÝCHACÍMI PROBLÉMAMI

Tvrďá A., Hreško Šamudovská A., Bujňák L.77

NUKLEOKAPSIDOVÝ PROTEÍN SARS-COV-2 SPROSTREDKUJE INTERAKCIU VÍRUSU S REGULÁTORMI KOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU

Víglaský J., Bhide K., Talpašová L., Fialová L., Bhide M.80

IN VIVO INTERAKCIA METICILÍN-REZISTENTNÉHO KMEŇA *KOCURIA VARIANS* R33/4 S ENTEROCÍNOM ENT7420 NA MODELI MYŠÍ

Zábolyová N., Dvorožňáková E., Bino E., Kandričáková A., Maloveská M., Krištofová R., Plachá I., Grešáková L., Lauková A., Pogány Simonová M.83

ÚČINOK NANOČASTÍC ZnO NA VYBRANÉ ANTIOXIDAČNÉ A ZÁPALOVÉ PARAMETRE U JAHNIAT

Bombárová A., Čobanová K.

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

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo porovnať účinok rôznych dávok nanočastíc oxidu zinočnatého (ZnO NPs) a anorganického ZnO na aktivitu antioxidačných enzýmov a lipidovú peroxidáciu v tkanivách ako aj na vybrané zápalové markery u jahniat, aby sme objasnili potenciálne prínosy a prípadné nežiaduce účinky spojené s používaním nanočastíc ZnO vo výžive prežuvavcov. Experiment sa uskutočnil na jahňatách (Zošľachtená valaška), ktoré boli počas adaptačnej periódy kŕmené bazálnou diétou (BD), ktorá pozostávala z 350g jačmeňa + 700g sena na deň a následne boli rozdelené do 4 experimentálnych skupín (n = 7): 1. kontrolná skupina bola bez prídavku Zn, 2. a 3. skupina dostávala diétu suplementovanú ZnO NPs (40 alebo 80 mg Zn/kg diéty) a 4. skupina dostávala diétu s prídavkom anorganického ZnO (80 mg Zn/kg diéty). Podávanie diét suplementovaných zinkom po dobu 70 dní viedlo k signifikantnému zvýšeniu koncentrácie zinku v pečeni a obličkách. Príjem Zn NPs mal za následok zvýšenie koncentrácie metalotioneínu v pečeni a obličke a taktiež aktivity celkovej superoxid dismutázy (SOD) a špecifickej Cu/Zn SOD v obličke. Nezistili sme signifikantné zmeny v lipidovej peroxidácii a aktivite glutatión peroxidázy (GPx) v tkanivách, zatiaľ čo celkový antioxidačný status bol signifikantne zvýšený v pečeni jahniat dostávajúcich anorganickú formu ZnO. Výsledky sledovania zápalových markerov ukázali, že príjem ZnO NPs mal za následok mierny pokles hladiny kalprotektínu v sére, zatiaľ čo koncentrácia sérového amyloidu A nebola ovplyvnená príjmom diéty. Naše výsledky naznačujú, že nanočasticová forma ZnO priaznivo moduluje antioxidačnú odpoveď a neovplyvňuje zápalové markery u jahniat.

ÚVOD

Nanočastice oxidu zinočnatého (ZnO NPs) sa v posledných rokoch intenzívne skúmajú pre svoje využitie vo výžive aj medicíne. Predstavujú účinnú alternatívu ku konvenčným zdrojom zinku, keďže aj pri nižších dávkach prinášajú porovnateľné výsledky a znižujú riziko environmentálnej záťaže (Al-Zubaidi a kol., 2025). Ich malé rozmery a vysoká reaktivita umožňujú vyššiu biologickú dostupnosť v organizme a majú potenciálne antioxidačné účinky, no zároveň vyvolávajú obavy z možnej toxicity (Rahman a kol., 2022). Toxické účinky ZnO NPs sa môžu prejavovať na bunkovej, orgánovej aj ekologickej úrovni a sú úzko spojené s faktormi, ako sú koncentrácia, veľkosť častíc, dĺžka expozície, či ich rozpustnosť vo vodnom prostredí. Mechanizmus toxicity je komplexný a zahŕňa nadmernú produkciu reaktívnych foriem kyslíka, uvoľňovanie zinkových iónov, mechanické poškodzovanie bunkových membrán a následnú aktiváciu zápalových procesov. Tieto mechanizmy môžu viesť k oxidačnému stresu, poškodeniu DNA, apoptóze, narušeniu metabolických funkcií a v konečnom dôsledku k poškodeniu orgánov, ako sú pečeň, obličky, pľúca, či tráviaci trakt (Youn a Choi, 2022; Fujihara a Nishimoto, 2024). Preto je nevyhnutné vyhodnotiť ich bezpečnosť a vyvážiť prínosy ich používania vo výžive zvierat s ohľadom na ich zdravie ako aj na životné prostredie.

MATERIÁL A METODIKA

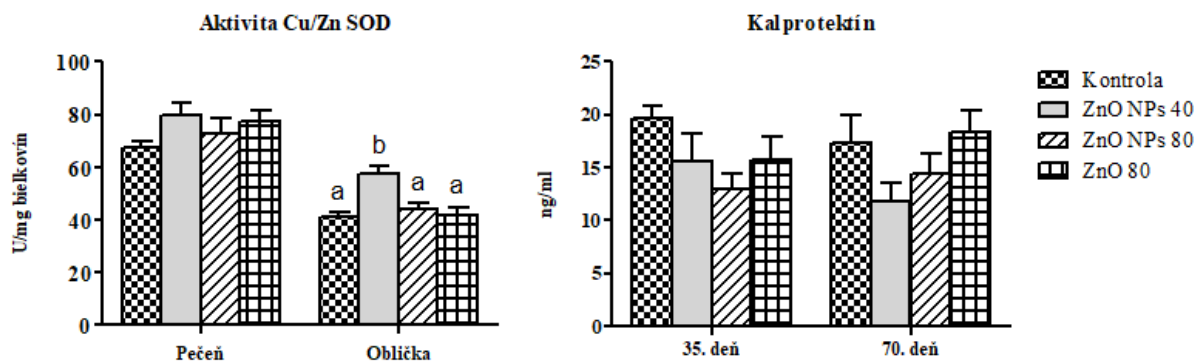
Experiment sa uskutočnil na 28 jahňatách (Zošľachtená valaška), vo veku 4 mesiacov. Zvieratá boli ustajnené v spoločných priestoroch s neobmedzeným prísunom vody. Počas adaptačnej periódy boli všetky zvieratá kŕmené bazálnou diétou (BD), ktorá pozostávala z 350 g jačmeňa + 700g sena na deň (analyzované množstvo Zn: 23,3 mg Zn/kg diéty). Následne boli náhodne rozdelené do 4 skupín (n = 7). Kontrolná skupina, dostávala iba BD bez prídavku aditíva. Jahňatá v druhej (ZnO NPs 40 mg Zn/kg diéty) a tretej (ZnO NPs 80 mg Zn/kg diéty) skupine

dostávali BD s prídavkom nanočastíc ZnO (< 30 nm, SkySpring Nanomaterials, Houston, USA) v rôznej dávke. Zvieratá štvrtej skupiny boli kŕmené BD suplementovanou anorganickým ZnO (80 mg Zn/kg diéty, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Po 35. a 70. dňoch príjmu experimentálnych diét sa odobrali vzorky krvi z jugulárnej žily každého zvieraťa a na konci experimentu (70. deň) boli všetky zvieratá humane usmrtené a boli im odobraté vzorky pečene a obličiek na príslušné analýzy. Vzorky sa uskladnili pri teplote -80°C až do ich analyzovania. Podrobný postup stanovenia aktivity antioxidantných enzýmov GPx, celkovej SOD a Cu/Zn SOD v tkanivách, ako aj koncentrácie malondialdehydu (MDA) v plazme a tkanivách, je detailne opísaný v práci Čobanová a kol. (2020). Aktivitu SOD a GPx v krvi, ako aj koncentráciu hemoglobínu, sme určovali spektrofotometricky pomocou komerčných kitov (Randox, UK). Na detekciu zápalovej odpovede bola sledovaná koncentrácia sérového amyloidu A (SAA) a kalprotektínu – pomocou kvantitatívnej ELISA metódy s využitím komerčných súprav (MyBioSource). Sérový amyloid A je proteín akútnej fázy a slúžil ako citlivý marker akútneho zápalu a kalprotektín je považovaný za marker črevného zápalu. Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá jednocestná a dvojcestná analýza variancie (ANOVA) s Tukey post-testom.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Príjem diét obohatených o zinok mal za následok zvýšenie koncentrácie zinku v pečeni ($P < 0,05$) a obličkách ($P < 0,05$) jahniat, bez ohľadu na jeho formu a dávku, v porovnaní s kontrolnou skupinou. Koncentrácia Zn v plazme bola signifikantne zvýšená v skupinách dostávajúcich vyššiu dávku Zn ($P < 0,001$). Metalotioneín zohráva významnú úlohu v antioxidantnej ochrane buniek, keďže účinne viaže voľné radikály a reaktívne formy kyslíka (Marreiro a kol., 2017). V našej štúdii sa potvrdilo, že suplementácia diét ZnO NPs viedla k signifikantne vyšším koncentráciám MT v pečeni ($P < 0,01$), obličkách ($P < 0,01$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Zistili sme signifikantné zvýšenie aktivity celkovej aj špecifickej Cu/Zn SOD v obličkách jahniat po podaní nižšej dávky ZnO NPs v porovnaní so všetkými skupinami ($P < 0,01$) (Obr. 1). Grešáková a kol. (2021) zaznamenali zvýšenú aktivitu Cu/Zn SOD v pečeni jahniat pri podávaní diéty obohatenej o organický zinok a celkovo lepší antioxidantný status po suplementácii zinkom, bez ohľadu na formu. V našom experimente najvyššia aktivita celkovej SOD v erytrocytoch bola zaznamenaná u jahniat dostávajúcich diéty suplementované nanočasticami ZnO v množstve 80 mg Zn/kg ($P = 0,05$), avšak signifikantný rozdiel oproti kontrolnej skupine nebol zaznamenaný. Zvýšenie aktivity GPx bolo pozorované v krvi jahniat prijímajúcich nanočasticovú formu Zn v nižšej dávke ($P < 0,01$) a v skupine dostávajúcej anorganickú formu zinku ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolnými jahňatami, avšak aktivita GPx v tkanivách jahniat nebola významne ovplyvnená príjmom experimentálnych diét. Tieto poznatky korešpondujú so zisteniami Pati a kol. (2024), ktorí preukázali pozitívny účinok suplementácie diét ZnO NPs (25 a 50 mg Zn/kg diéty počas 90 dní) na rast a antioxidantný status kôz, vrátane zvýšenej aktivity SOD a katalázy a zníženej lipidovej peroxidácie. V našom experimente suplementácia diét zinkom nemala za následok signifikantné zmeny v koncentracii MDA v plazme a tkanivách, ktorý je považovaný za sekundárny produkt pri peroxidácii lipidov, ktorá je odpoveďou na oxidačný stres. Celkový antioxidantný status (TAS) v plazme sa medzi skupinami nelíšil, zatiaľ čo v pečeni boli zistené signifikantne vyššie hodnoty TAS v skupine dostávajúcej anorganickú formu zinku v porovnaní s kontrolnou skupinou ($P < 0,05$). Čo sa týka sledovania zápalových markerov v sére, u zvierat dostávajúcich nanočastice Zn bola sledovaná tendencia k nižším hladinám kalprotektínu v sére ($P = 0,05$) (Graf 1), kým koncentrácia SAA v sére nebola ovplyvnená príjmom experimentálnych diét, ale sa signifikantne znížila v priebehu času ($P = 0,001$). Tieto výsledky naznačujú, že suplementácia diét nanočasticami Zn nemá za následok nežiadúce zápalové reakcie. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať, že príjem zinku po dobu 70 dní mal pozitívny účinok na

antioxidačný status zvierat. Sledovaním zinok závislých metaloproteínov zohrávajúcich významnú úlohu v antioxidačnej ochrane buniek sme zistili, že podávanie nanočastíc Zn v dávke 40 mg Zn/kg krmiva malo za následok signifikantné zvýšenie aktivity špecifickej Cu/Zn SOD v obličke a koncentrácie metalotioneínu v pečeni v porovnaní s kontrolnou skupinou a dostávajúcou štandardnú anorganickú formu Zn, čo naznačuje porovnateľnú biovyužitelnosť zinku z nano ZnO pri jeho nižšom príjme. Výsledky merania antioxidačných parametrov v pečeni, obličke a v krvi/plazme ukázali, že príjem nanočastíc Zn v dávke do maximálnej v EU povolenej koncentrácie Zn v krmive oviec (120 mg Zn/kg kompletnej diéty) nespôsobuje oxidačný stres u jahniat.



Graf 1. Aktivita špecifickej Cu/Zn SOD v tkanivách (pečeň, oblička) a koncentrácia kalprotektínu v sére jahniat. ^{ab}Rozdielne písmená označujú signifikantný rozdiel ($p < 0,05$) medzi skupinami.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-21-0301, grantom pre doktorandov SAV Doktogrant APP0588 a EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V02-00020.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Al-Zubaidi R, et al. Functional assessment of kidneys and liver functions in lambs treated with zinc oxide nanoparticles. *Open Vet J.* 2025;15:3177-3184.
- Čobanová K, et al. Does herbal and/or zinc dietary supplementation improve the antioxidant and mineral status of lambs with parasite infection? *Antioxidants.* 2020; 9:1172.
- Fujihara J, Nishimoto N. Review of zinc oxide nanoparticles: Toxicokinetics, tissue distribution for various exposure routes, toxicological effects, toxicity mechanism in mammals, and an approach for toxicity reduction. *Biol Trace Elem Res.* 2024;202:9-23.
- Marreiro DN, et al. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants.* 2017; 6:24-33.
- Rahman HS, et al. Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles in animals. *Vet Med Sci.* 2022; 8:1769-1779.
- Youn SM, Choi SJ. Food Additive Zinc Oxide Nanoparticles: Dissolution, Interaction, Fate, Cytotoxicity, and Oral Toxicity. *Int J Mol Sci.* 2022; 23:6074.

VÝSKYT ZOONOTICKÝCH PATOGÉNOV V *IXODES RICINUS* V MESTSKÝCH OBLASTIACH SEVERNÉHO SLOVENSKA

Cellengová Z., Hajdová B., Schreiberová A., Kočišová A.

Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Kliešť *Ixodes ricinus* je na Slovensku najrozšírenejším a epidemiologicky najvýznamnejším druhom, ktorý prenáša široké spektrum zoonotických patogénov. Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotiť prítomnosť vybraných kliešťami prenášaných agensov v mestskom prostredí severného Slovenska. Zber kliešťov prebiehal od marca do novembra 2024 v meste Žilina metódou vľajkovania na piatich lokalitách s častým pohybom obyvateľov. Celkovo bolo zozbieraných 264 jedincov identifikovaných ako *I. ricinus* (67 samíc, 85 samcov a 112 nýmfov). Molekulárnou analýzou sa potvrdila prítomnosť *Borrelia* spp. v 34,5 % vzoriek, pričom najčastejším druhom bola *B. afzelii*. Okrem toho boli detegované zoonotické piroplazmy *Babesia microti* a *B. venatorum* (1,5 %) a *Rickettsia* spp. (0,4 %). U troch kliešťov (1,1 %) sa potvrdila koinfekcia viacerých patogénov. Naše výsledky poukazujú na to, že aj mestské ekosystémy v severných regiónoch Slovenska predstavujú rezervoár zoonotických agensov a potenciálne riziko pre verejné zdravie, zároveň ide o prvú štúdiu zameranú na zoonotické kliešťami prenosné patogény priamo z mesta Žilina.

ÚVOD

Klimatické zmeny, globálne otepľovanie a zásahy ľudskej činnosti prispievajú k nárastu populácií kliešťov v Európe a ich expanzii do severnejších oblastí, mestských a prímestských lokalít ako aj do vyšších nadmorských polôh (Estrada-Peña a kol. 2006, Medlock a kol. 2013, Pangráčová a kol. 2013). Tvrdé kliešte (Ixodidae) sú významnými vektormi patogénov, ktoré spôsobujú závažné ochorenia u ľudí, domácich i voľne žijúce živočíchov.

Najrozšírenejším a epidemiologicky najvýznamnejším druhom kliešťa na Slovensku je *Ixodes ricinus* (Gray a kol. 2021, Bona a kol. 2022). Ide o trojhostiteľský druh kliešťa, ktorého vývin prechádza štádiami vajíčka, larvy, nymfy a dospelého jedinca, pričom jednotlivé štádiá parazitujú na širokom spektre hostiteľov, vrátane človeka (Gern 2008, Gray a kol. 2016). Všetky vývinové štádiá sú pritom schopné prenášať široké spektrum vírusových, bakteriálnych a protozoálnych patogénov významných pre humánnu aj veterinárnu medicínu (Gern 2008).

Viacere štúdie už potvrdili výskyt kliešťami prenosných patogénov v mestských oblastiach Slovenska (Pangráčová a kol. 2013; Špitalská a kol. 2014; Svitáľková a kol. 2015; Kazimírová a kol. 2016; Stanko a kol. 2021). Druh *Ixodes ricinus* bol pritom identifikovaný ako významný prenášač pôvodcov zoonotických ochorení vrátane vírusu kliešťovej encefalitídy (TBEV), spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato, rickettsií, ako aj baktérií *Coxiella burnetii* a *Francisella tularensis*. Okrem toho bol tento druh spájaný aj s novými či prehliadanými patogénmi predstavujúcimi potenciálne riziko pre ľudí, ako sú *Borrelia miyamotoi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neoehrlichia mikurensis*, *Babesia microti* a *Babesia venatorum* (Stanko a kol. 2022).

MATERIÁL A METODIKA

Táto štúdia bola realizovaná v meste Žilina, ktoré sa nachádza na severe Slovenska, v nadmorskej výške 342 m n. m. Oblasť je charakteristická chladnejšou klímou s priemernou ročnou teplotou približne 8 °C. Napriek týmto, na prvý pohľad menej vhodným podmienkam, môžu mestské zelené plochy podporovať výskyt populácií kliešťov.

Zber kliešťov prebiehal od marca do novembra roku 2024 metódou vľajkovania, ktorá spočíva v ťahaní bielej vľajky (1m²) cez vegetáciu s cieľom zachytiť kliešte v číhajúcej pozícii. Vzorky

boli zbierané z mestskej a prímestskej vegetácie v piatich lokalitách s pravidelným pohybom obyvateľov. Celkovo bolo navlajkovaných a pozbieraných 264 jedincov.

Všetky kliešte boli uchovávané v polypropylénových skúmavkách typu Eppendorf s obsahom 70 % etanolu. Po zbere boli morfológicky identifikované na základe diagnostického kľúča (Siuda 1993) ako druh *I. ricinus*.

Molekulárnej analýze boli podrobené všetky zozbierané kliešte bez rozdielu vývinového štádia či pohlavia. Izolácia DNA bola vykonávaná pomocou komerčného kitu DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Nemecko) podľa protokolu výrobcu. Diagnostika prítomnosti patogénov bola vykonávaná pomocou PCR analýzy s použitím špecifických primerov pre rody *Borrelia*, *Babesia* a *Rickettsia*. Po vykonaní PCR bola pre potvrdenie výsledku vykonaná gélová elektroforéza na 1 % agarózovom géli. Pozitívne vzorky boli bližšie špecifikované pomocou sekvenčnej analýzy v komerčnom laboratóriu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V rámci našej štúdie v meste Žilina bolo získaných 264 kliešťov. Všetky kliešte boli identifikované ako druh *I. ricinus*, ktorý je najbežnejším kliešťom vyskytujúcim sa na Slovensku. Z celkového počtu bolo 67 samíc, 85 samcov a 112 nýmľ.

Pomocou molekulovej analýzy boli všetky samce, samice aj nymfy vyšetrené na patogény rodu *Borrelia*, *Babesia* a *Rickettsia*. Molekulová analýza preukázala prítomnosť *Borrelia* spp. v 91 z 264 vyšetrených kliešťov, čo predstavuje celkovo 34,5 %. Pozitivita *Borrelia* spp. v závislosti od jednotlivých vývinových štádií bola zaznamenaná u samíc 41,8 % (28/67), u samcov 28,2 % (24/85) a u nýmľ 34,8 % (39/112). Najvyšší podiel pozitívnych vzoriek tvorila *Borrelia afzelii*, ktorá sa vyskytovala u všetkých vývinových štádií (73/264; 27,7 %), nasledovaná *B. garinii*, taktiež s výskytom u všetkých vývinových štádií (10/264; 3,8 %), *B. valaisiana* sa vyskytovala u jedného samca a dvoch samíc (3/264; 1,1 %) a *B. burgdorferi* sensu stricto u jednej samice (1/264; 0,4 %). V štyroch prípadoch u samcov (1,5 %) sa podarilo potvrdiť prítomnosť *Borrelia* spp., avšak druhová identifikácia pomocou sekvenčnej analýzy nebola úspešná. Najčastejším druhom bola *B. afzelii*, ktorá je zároveň najvýznamnejším pôvodcom lymskej boreliózy u ľudí v Európe. Podobné druhové zastúpenie *Borrelia* spp. bolo zaznamenané aj v predchádzajúcich štúdiách na Slovensku, kde dominovala práve *B. afzelii*, zatiaľ čo *B. garinii* a *B. valaisiana* sa vyskytovali menej často (Špitalská a kol. 2014; Stanko a kol. 2021).

Vo vyšetrovaných kliešťoch sa potvrdila aj prítomnosť rodu *Babesia*. Celkovo bolo pozitívnych 5 vzoriek (1,9 %). Identifikované druhy zahŕňali *B. venatorum* (2/264; 0,8 %) potvrdené výhradne u samíc (2/67; 3,0 %), a *B. microti* (2/264; 0,8 %) sa vyskytla u jednej samice (1/67; 1,5 %) a u nýmľ (2/112; 1,8 %). Oba tieto druhy majú zoonotický potenciál a ich výskyt v mestskom prostredí predstavuje riziko aj pre ľudí.

V jednom prípade u samca (0,4 %) bola potvrdená prítomnosť *Rickettsia* spp. Hoci bola prevalencia nízka, tento nález poukazuje na cirkuláciu rickettsií v mestskom prostredí. Najčastejším druhom zaznamenaným v iných štúdiách na Slovensku je *R. helvetica*, ktorá bola potvrdená ako pôvodca febrilných ochorení u ľudí v Európe (Špitalská a kol. 2012). Z celkového počtu niesli 3 kliešte (1,1 %) viac ako jeden patogén. V dvoch prípadoch išlo o súčasný výskyt *B. afzelii* a *B. microti* (samica a nymfa), pričom v jednom prípade bola detegovaná koinfekcia *B. afzelii* a *Rickettsia* spp. (samec). Výskyt koinfekcií je z hľadiska epidemiológie významný, pretože môže ovplyvňovať klinický priebeh ochorení u hostiteľov a komplikuje diagnostiku v humánnej i veterinárnej medicíne. Podobné zistenia boli popísané aj v iných štúdiách zo Slovenska a strednej Európy, kde sa koinfekcie *Borrelia* spp. s piroplazmami alebo rickettsiami vyskytovali v nízkych, avšak epidemiologicky významných percentách (Špitalská a kol. 2014).

Tieto výsledky poukazujú na epidemiologický význam mestských ekosystémov a zdôrazňujú potrebu prevencie a zvyšovania povedomia obyvateľov o riziku nákazy aj pri rekreačných aktivitách v mestských parkoch či sídliskovej zeleni.

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol financovaný z projektu Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied - VEGA 1/0287/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bona, M. et al.. Impact of climate factors on the seasonal activity of ticks and temporal dynamics of tick-borne pathogens in an area with a large tick species diversity in Slovakia, Central Europe. *Biologia*. 2022;77(7)
- Estrada-Peña A, Venzal JM. and Sánchez Acedo C.. The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. *Medical and Veterinary Entomology*. 2006; 20(2):189–197.
- Gern L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme: life in the wilds. *Parasite*, 2008;15(3), 244–247.
- GRAY JS, et al. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2016; 7(6), 992–1003.
- Gray J, Kahl O, And Zintl A. What do we still need to know about *Ixodes ricinus*? *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2021; 12(3), 101682.
- Kazimírová M, et al. Relative density of host-seeking ticks in different habitat types of south-western Slovakia. *Experimental and Applied Acarology*, 2016; 69(2), 205–224
- Medlock JM, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & Vectors*, . 2013; 6(1), 1
- Pangráčová L. et al.. *Ixodes ricinus* abundance and its infection with the tick-borne pathogens in urban and suburban areas of Eastern Slovakia. *Parasites & Vectors*, 2013; 6, 238.
- Siudak. *Kleszcze Polski (Acari: Ixodida)*. Systematyka i rozmieszczenie. Łódź: Polskie Towarzystwo Parazytologiczne, 1993; 357 s. ISBN: 9788390134901.
- Stanko M. Kliešte a ich epidemiologický význam v mestách: na príklade košickej aglomerácie. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied. 2021; ISBN: 9788022427575.
- Stanko M, et al. Ticks and their epidemiological role in Slovakia: from the past till present. *Biologia*, 2022;77(7), 1575–1610
- Svitáľková Z, et al. *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in South-Western Slovakia. *Parasites & Vectors*. 2015; 8:276
- Špitalská E, et al.. Rickettsial infection in *Ixodes ricinus* ticks in urban and natural habitats of Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2014; 5(2), 161–165

VYŠŠIE ORGANIZOVANÉ NANOŠTRUKTÚRY NA BÁZE PROTEÍN-DNA BIOKONJUGÁTOV

Fedorová V.¹, Huntošová V.², Šipošová K.¹, Humeník M.³

¹Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, Slovenská akadémia vied, Košice, Slovensko

²Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný park, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Slovensko

³Katedra biomateriálov, Fakulta technických vied, Univerzita Bayreuth, Bayreuth, Nemecko

ABSTRAKT

Narastajúce požiadavky biomedicíny a biotechnológií pre bezpečné a efektívne aplikácie otvárajú priestor pre využitie potenciálu amyloidných proteínov. Funkčné amyloidné proteíny, vrátane rekombinantného pavúčieho proteínu, tvoria vo vhodných podmienkach fibrilárne útvary, ktoré po chemickej modifikácii dokážu cielene viazať funkčné ligandy. Navyše, vďaka schopnosti spontánneho samo-usporiadania je možné naprogramovať takéto štruktúry k vzniku vyšších usporiadaných morfológických zoskupení. Predkladaná práca sa sústreďí na porovnanie riadeného samo-usporiadania biokonjugátov pavúčí proteín-DNA s dvomi typmi cieľového ligandu – trombínu a ATP. Výsledky dokazujú vysokú programovateľnosť a vznik usporiadaných morfológií na rovnakej báze aj napriek odlišným podmienkam.

ÚVOD

Potreba bezpečných, efektívnych a bio-inšpirovaných systémov podporujúcich hojenie či transport liečiv vedie súčasne výskumy k aktívnemu štúdiu a využívaniu amyloidných proteínov. Vďaka ich výnimočným fyzikálno-chemickým a mechanickým vlastnostiam sa takéto proteíny stávajú potenciálnou stavebnou jednotkou funkčných nanomateriálov so širokým využitím v biomedicíne či v biotechnologickom priemysle (Bleem a Daggett, 2017; Ling a kol., 2018; Ezike a kol., 2023). Spomedzi amyloidných proteínov vyniká najmä skupina tzv. funkčných amyloidov s dôležitými životnými funkciami hlavne u nižších organizmov. Jedným z najviac a najlepšie študovaných proteínov tejto vetvy je pavúčí proteín ADF4, respektíve jeho rekombinantná forma eADF4(C16), skrátene C16. C16 dokáže v závislosti od použitých experimentálnych podmienok vytvárať mnoho rôznych morfológií, vrátane nanofilmov, sfér či fibríl (Heinritz a kol., 2022; Liu a kol., 2021). Jeho chemickou modifikáciou, napr. pripojením DNA aptamérov, vzniká biokonjugát proteín-DNA, ktorý si zachováva vlastnosti oboch zložiek, teda je schopný vytvárať požadované morfológie či interagovať so zložkami svojho okolia, zatiaľ čo DNA časť umožňuje viazať špecifické cieľové ligandy (Humeník a kol., 2020). Kým významné množstvo štúdií sústreďí svoj výskum na vývoj hybridných materiálov na pevnom povrchu alebo v hydrogélových štruktúrach, optimalizáciou podmienok a techník pre vznik materiálov na základe fibríl v roztoku by mohlo dôjsť k vytvoreniu potenciálne jednoducho inžektibilných biosenzorov/systémov pre transport liečiv (Wan a kol., 2016; Wu a kol., 2014). V rámci našej práce sa zaoberáme štúdiom a optimalizáciou riadeného samo-usporiadania hybridných proteín-DNA materiálov prostredníctvom funkčných ligandov ľudského α -trombínu a ATP. Napriek tomu, že oba typy si v súvislosti s DNA aptamérmi vyžadujú mierne odlišný prístup, experimenty naznačujú vysokú programovateľnosť a vznik morfológií s uniformnou bázou. Cieľom tejto práce je porovnať odlišné typy DNA aptamérov a ich vplyv na funkcionálnosť a adaptabilitu systému, ktorý by mohol položiť základ pre bezpečné transportné systémy liečiv s možnosťou riadeného uvoľňovania v cieľnom mieste.

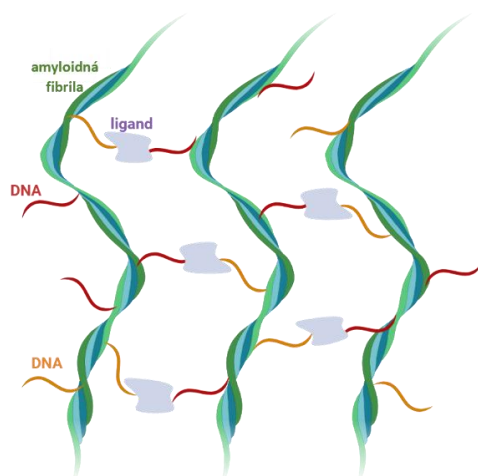
MATERIÁL A METÓDY

Konjugáty pavúčí proteín-DNA, C16-TBA15, C16-TBA29, C16-ATPAPT1hT a C16-ATPAPT2, boli vopred syntetizované použitím chemickej modifikácie oboch zložiek a následným využitím „klik“ chémie na partnerskom pracovisku na Katedre biomateriálov,

Univerzita Bayreuth, Nemecko (Humenik a kol., 2020; Heinritz a kol., 2022)). Jednotlivé konjugáty boli rozpustené v 6 M roztoku guanozíntiokyanátu (GuaSCN) v koncentrácii 5 mg/ml a následne dialyzované proti 10 mM HEPES, pH = 8.0 približne 24 hodín, pričom dialyzačný roztok bol menený 4x. Následne boli použitím ultracentrifugácie (55 000 rpm, 55 min, 4 °C; Optima MAX-XP, Beckman Coulter, Nemecko) zbavené nerozbalených molekúl. Biokonjugáty viažuce trombín boli v pomere koncentrácií 2:1 biokonjugát:trombín inkubované po dobu 7 dní pri teplote 25 °C. Jednotlivé študované vzorky obsahovali jeden konjugát alebo ich zmes a fibrilizáciu podporujúci fosforečnan draselný (KPi) alebo tzv. aptamérový tlmivý roztok s obsahom NaCl a KCl v rôznych koncentráciách. ATP-viažuce biokonjugáty boli inkubované s AMP (100 µM) a KPi tlmivom roztoku (30 alebo 100 mM) v PCR cykléri s teplotným gradientom s postupne pomaly klesajúcou teplotou z 95°C na 40 °C po dobu 7 dní. Po inkubácii bol k všetkým vzorkám pridaný prislúchajúci fluorescenčne značený komplementárny DNA aptamér (TBA15comp-FAM, TBA29comp-TAM, apt2comp-FAM, 1hTcomp-FAM) a po 60 min. inkubácii pri laboratórnej teplote boli vzorky študované/vizualizované pomocou konfokálneho mikroskopu (LSM 700, Zeiss, Oberkochen, Nemecko).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Potreba biokompatibilných a biodegradovateľných materiálov, ktoré by znížili rozsah imunitných reakcií a vedľajších účinkov a zároveň zlepšili priebeh hojenia sa v súčasnosti stáva čoraz výraznejšou a tým pádom aj atraktívnejšou pre vedecké výskumy. Pútavé sú tak najmä proteíny schopné vytvárať fibrilárne útvary, ktoré sú bežne nachádzané v živých organizmoch a vďaka svojim vlastnostiam ponúkajú nový náhľad na bio-inšpirované nanomateriály. Biokonjugáty pavúčí proteín-DNA si zachovávajú schopnosť fibrilizácie sprostredkovanú proteínovou časťou a zároveň schopnosť viazať špecifické ligandy prostredníctvom DNA zložky. Tieto vlastnosti boli preukázané v prvom experimentálnom kroku po ich syntéze. Zloženie týchto biokonjugátov tak spolu s týmito poznatkami viedlo k vytvoreniu hypotézy, že DNA aptaméry môžu slúžiť ako tzv. „agenti samo-usporiadania“ a vďaka odlišným väzbovým miestam na cieľovej molekule, resp. charaktere „rozdelených“ (z angl. split) aptamérov dokážu riadiť usporiadanie smerom k zosieťovaným morfológiám na báze fibríl (obr. 1).



Obr. 1. Schéma usporiadania biokonjugátov proteín-DNA po fibrilizácii v prítomnosti funkčného ligandu.

Pre overenie tejto hypotézy boli vykonané experimenty samo-usporiadania v prostredí, ktoré obsahovalo jeden alebo oba biokonjugáty, príslušný cieľový ligand a fibrilizáciu-inicializujúce ióny. Po inkubácii takto pripravených zmesí bol preukázaný vznik vyšších štruktúr v oboch prípadoch biokonjugátov, pričom vysoká úspešnosť organizácie a zároveň reprodukcie

experimentov nastala v prípade zmesí, ktoré obsahovali oba typy biokonjugátov a nižšiu koncentráciu KPi ako iniciátora fibrilizácie. Podľa očakávania, reakčné zmesi bez cieleného ligandu nepreukázali vznik komplexných štruktúr. Avšak, v zmesiach obsahujúcich ideálne zložky bol pozorovaný vznik aspoň troch odlišných morfológií zároveň s nami očakávanými štruktúrami. Doposiaľ uskutočnené experimenty naznačujú, že optimálnymi podmienkami je možné docieľiť vznik usporiadaných a komplexných tzv. raftových morfológií, ktoré môžu položiť základ pre vznik bezpečných transportných systémov liečiv a iných podporných látok s jednoduchou prípravou a injektabilným zavedením v tekutej forme.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantami APVV 23-0013, VEGA 2/0034/22, SK-DAAD (2024-2025) and Doktograd APP0643. V.H. vyjadruje vďaka za podporu financovanú z programu EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti pre Slovensko v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00007.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bleem A, Daggett V. Structural and functional diversity among amyloid proteins: Agents of disease, building blocks of biology, and implications for molecular engineering. *Biotechnol. Bioeng.* 2017; 114:7–20.

Ezike TC, et al.. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions. *Heliyon* 9 2023; e17488.

Heinritz C, et al. DNA Functionalized Spider Silk Nanohydrogels for Specific Cell Attachment and Patterning. *ACS Nano.* 2022; 16:7626–7635.

Humenik M, et al. Functionalized DNA-spider silk nanohydrogels for controlled protein binding and release. *Mater. Today Bio.* 2020; 6:100045.

Ling S, Kaplan DL, Buehler MJ. Nanofibrils in nature and materials engineering. *Nat. Rev. Mater.* 2018; 3:18016.

Liu Y, et al. Progress in the application of spider silk protein in medicine. *J. Biomater. Appl.* 2021; 36: 859–871.

Wan L, et al. Programmable Self-Assembly of DNA–Protein Hybrid Hydrogel for Enzyme Encapsulation with Enhanced Biological Stability. *Biomacromolecules.* 2016; 17:1543–1550.

Wu Y, et al. Protein-DNA Hybrid Hydrogels for the Immobilization and Release of Functional Proteins. *Chem Commun* 2014; 50.

MOLEKULÁRNA CHARAKTERISTIKA KMEŇOV *ESCHERICHIA COLI* IZOLOVANÝCH Z HNAČKUJÚCICH TELIAT

Galambošiová, T.^{1,2}, Bujňáková, D.¹, Karahutová, L.¹

¹Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, CBv SAV, Košice

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Escherichia coli je bežne sa vyskytujúcim mikroorganizmom tráviaceho traktu. Za špecifických podmienok (prostredie, faktory virulencie) môžu pôsobiť ako IPEC (intestinálne patogénne *E. coli*) alebo ExPEC (extraintestinálne patogénne *E. coli*). Výskyt neonatálnej kolibacilózy u teliat predstavuje vysoké straty v chove v dôsledku chradnutia až úmrtia zvierat. IPEC zahŕňa viaceré patotypy, ktoré sa odlišujú faktormi virulencie. Enterotoxigénne *E. coli* (ETEC) disponujú termolabilnými a termostabilnými faktormi (*st*, *lt*). Pre enteropatogénne *E. coli* (EPEC) je typický gén pre intimín (*eae*), ktorý zohráva úlohu pri adherencii a enterohemoragické (EHEC) produkujú verotoxíny (*vt*) (Desvaux a kol., 2020). V našej práci sme sa zamerali na fylogenetickú typizáciu a virulentnú schopnosť kmeňov *E. coli* získaných z hnačkujúcich teliat chovaných na slovenských farmách. Najčastejšie detegovanou fyloskupinou bola potenciálne patogénna skupina D2 (29,9 %). Schopnosť vychytávať železo je nevyhnutným faktorom pre prežívanie mikroorganizmov. Nami izolované kmene produkovali prevažne gény pre siderofóry transportujúce Fe^{2+} (*feoB* = 70,1 %; *sitA* = 62,6 %) a *iutA* (70,1 %), ktorý je zodpovedný za prenos Fe^{3+} do bakteriálnej bunky. Z ďalších analyzovaných faktorov virulencie bola najpočetnejšia produkcia P fimbrií (*papC* = 42,1 %), najmä u kmeňov zaradených do skupiny D, ktorá je spájaná hlavne s infekciami močového aparátu. Ostatné virulentné faktory boli najčastejšie potvrdené v skupine B1, čo vypovedá o možnosti horizontálneho transportu génov medzi komenzálnymi a patogénnymi kmeňmi.

ÚVOD

Napriek tomu, že je *E. coli* komenzálnou baktériou tvoriacou väčšinu mikrobioty u teplokrvných živočíchov, za určitých podmienok môžu jej patotypy vyvolať závažné infekcie tráviaceho traktu, či extraintestinálne infekcie (Farfán-García a kol., 2016). Na základe prítomnosti faktorov virulencie sa patotypy *E. coli* delia do skupín: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC (enteroinvazívne *E. coli*), EAEC (enteroagregatívne *E. coli*), DAEC (difúzne adherenčné *E. coli*), AIEC (adherentne invazívne *E. coli*), NTEC (nekrotoxické *E. coli*), APEC (aviárne patogénne *E. coli*), UPEC (uropatogénne *E. coli*) a NMEC (*E. coli* spôsobujúce neonatálnu meningitídu) (Geurtsen a kol., 2022). Hnačky sú najčastejšou príčinou morbiditu a mortality u teliat. Teľatá sú najviac náchylné na vypuknutie hnačkovitého ochorenia prvý mesiac po narodení (Meganck a kol., 2014). Výkaly zvierat môžu byť zdrojom kontaminácie živočišných produktov - mlieka alebo mäsa a výrobkov z nich, ale aj rastlinných produktov, čím predstavujú riziko nákazy ľudí (Hu a kol., 2017).

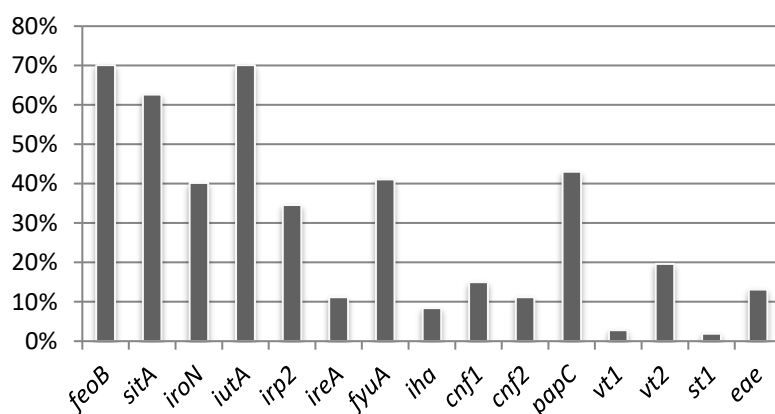
MATERIÁL A METODIKA

Spolu bolo izolovaných 107 kmeňov *E. coli* z novonarodených hnačkujúcich teliat. Kmene boli identifikované pomocou MALDI-TOF hmotnostného spektrofotometra (Bruker Daltonics, Leipzig, Nemecko). Fylogenetická typizácia bola vykonaná podľa metódy opísanej Clermontom a kol. (2013) a Lescatom a kol. (2012). Následne boli analyzované gény virulencie *cnf1*, *cnf2*, *papC*, *vt1*, *vt2*, *st1*, *eaeA* (Bujňáková a kol., 2021; Pass a kol., 2000) a vychytávania železa *feoB*, *sitA*, *irp2*, *fyuA*, *ireA*, *iutA*, *iha*, *iroN* (Kocúreková a kol., 2021).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Skupiny A a B1 disponujú menším počtom faktorov virulencie a sú často označované ako komenzálne. Avšak A, B1 a C sú za špecifických podmienok pôvodcami intestinálnych

infekcií. Naproti tomu, skupiny B2 a D majú väčšiu zásobu génov kódujúcich virulenciu, sú prevažne spájané s extraintestinálnymi infekciami, a tým označované ako patogénne skupiny (Lagerstrom, Hadly, 2023). Do tejto skupiny patrí aj línia *E. coli* O157:H7 (Clermont a kol., 2021). Nami izolované kmene patrili až v 52,3 % k extraintestinálnym skupinám (B2 = 11,2 %, D = 29,9 %, E = 9,4 %, F = 1,8 %). Zvyšných 47,7 % kmeňov bolo v skupinách A (9,4 %), B1 (28 %) a C (10,3 %). Železo je nevyhnutným prvkom, kofaktorom viacerých biochemických reakcií, pre prežívanie prokaryotov aj eukaryotov, komezállov aj patogénov. Preto v organizme vzniká tzv. „bakteriálny boj“ o železo. Patogény majú rôzne mechanizmy vychytávania železa, ktoré sú považované za významné faktory virulencie (Cook-Libin a kol., 2022). Analyzované gény pre utilizáciu železa boli prítomné v rôznom počte. Najčastejšie kmene disponovali génmi *feoB*, *iutA* (70,1 %), *sitA* (62,6 %) a *chuA* – transport hemu (55,1 %). Ďalej boli potvrdené gén kódujúci receptor pre yersiniobaktín (*fyuA* = 41,1 %), salmochelínový receptor (*iroN* = 40,2 %) a gén pre syntézu yersiniobaktínu (*irp2* = 34,6 %). V najmenšej miere boli potvrdené gény *ireA* a *iha* (11,2 % a 8,4 %). Vedecký kolektív z Indie taktiež študoval kmene *E. coli* získané od hnačkujúcich teliat. Prevalencia génov utilizácie železa bola do značnej miery nižšia v porovnaní s našimi výsledkami. *IroN* bol zastúpený v 22,85 % kmeňoch, *fyuA* a *chuA* v 17, 14 % izolátoch (Kumar a kol., 2022). Z génov virulencie sme sa zamerali na gény *cnf1* (15 %), *cnf2* (11,2 %), *papC* (42,1 %), *vt1* (3,7 %), *vt2* (19,6 %), *st1* (1,9 %) a *eaeA* (13,1 %). Gén *papC* kóduje syntézu P fimbrií, ktoré slúžia na adhéziu baktérií k bunkám hostiteľa. Je typický pre UPEC, ktoré môžu, prenosom z čreva do močových ciest, vyvolať infekcie močového traktu. Jednotlivé patotypy *E. coli* disponujú rôznymi balíkmi virulentných faktorov, ale platí, že UPEC môžu mať faktory charakteristické pre DEC (*E. coli* vyvolávajúce hnačku) a naopak (Khairy a kol., 2019). Cytotoxický nekrotizujúci faktor (*cnf1*, *cnf2*) je často exprimovaný rovnako v patotype UPEC. *Cnf1* a *papC* sú silne asociované s fyloskupinou B2 (Katouli, 2010). V našom prípade bolo *cnf1* častejšie potvrdené u kmeňov patriacich do komezálnej skupiny B1 a *papC* zase u extraintestinálnej skupiny D. Verotoxíny (*vt1*, *vt2*) sú hlavným faktorom virulencie u EHEC a spôsobujú patologické zmeny v organizme vedúce k hemolyticko-uremickému syndrómu (HUS) u ľudí a k zlyhaniu obličiek (Pakbina kol., 2021). U teliat sme detegovali verotoxíny ako druhé najčastejšie sa vyskytujúce faktory virulencie zastúpené u komezálnych, aj patogénnych skupín. Hovädzí dobytok je významným rezervoárom EHEC a infekcie ľudí sú spájané s konzumáciou kontaminovaného mäsa a mlieka. Trus dobytka môže kontaminovať okolie a zdroje vody, čím vzniká riziko nákazy aj iných druhov zvierat.



Graf 1. Prevalencia génov virulencie u *E. coli* z hnačkujúcich teliat

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená slovenským grantom VEGA 2/0040/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bujňáková D, Karahutová L, Kmet' V. *Escherichia coli* Specific Virulence-Gene Markers Analysis for Quality Control of Ovine Cheese in Slovakia. *Microorganisms*. 2021;9(9):1808.
- Clermont O, et al. The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole *E. coli* species population structure. *Environmental Microbiology*. november 2021;23(11):7139–51.
- Clermont O, et al. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups: A new *E. coli* phylo-typing method. *Environmental Microbiology Reports*. február 2013;5(1):58–65.
- Cook-Libin S, et al. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Acinetobacter baumannii*. Richardson AR, editor. *Infect Immun*. 20. október 2022;90(10):e00223-22.
- Desvaux M, et al. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 25. september 2020;11:2065.
- Farfán-García AE, et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Rev chil infectol*. august 2016;33(4):438–50.
- Geurtsen J, et al. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews*. 02. november 2022;46(6):fuac031.
- Hu Y, Cheng H, Tao S. Environmental and human health challenges of industrial livestock and poultry farming in China and their mitigation. *Environment International*. október 2017;107:111–30.
- Katouli M. Population structure of gut *Escherichia coli* and its role in development of extra-intestinal infections. *Iran J Microbiol*. 2010 Jun;2(2):59-72.
- Khairy RM, et al. Phylogenic classification and virulence genes profiles of uropathogenic *E. coli* and diarrhegenic *E. coli* strains isolated from community acquired infections. Thumbikat P, editor. *PLoS ONE*. 12. september 2019;14(9):e0222441.
- Kocúreková T, Karahutová L, Bujňáková D. Antimicrobial Susceptibility and Detection of Virulence-Associated Genes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Commercial Broilers. *Antibiotics*. 26. október 2021;10(11):1303.
- Kumar S, et al. Determination of iron acquisition genes in *E. coli* from diarrheic calves in arid regions of India. *IJAH* [Internet]. 28. december 2022 [cit 02. september 2025]; Available at: https://ijah.in/upload/snippet/90_0.pdf
- Lagerstrom KM, Hadly EA. Under-Appreciated Phylogroup Diversity of *Escherichia coli* within and between Animals at the Urban-Wildland Interface. Dozois CM, editor. *Appl Environ Microbiol*. 28. jún 2023;89(6):e00142-23.
- Lescat M, et al. Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure: Commensal *Escherichia coli* population structure. *Environmental Microbiology Reports*. február 2013;5(1):49–57.
- Meganck V, Hoflack G, Opsomer G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Vet Scand*. december 2014;56(1):75.
- Pakbin B, Brück WM, Rossen JWA. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *IJMS*. 14. september 2021;22(18):9922.
- Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for Identification of *Escherichia coli* Virulence Genes. *J Clin Microbiol*. máj 2000;38(5):2001–4.

FUNKCIONALIZÁCIA UPKONVERZNÝCH NANOČASTÍČ S CIEĽOM DORUČENIA LIEČIVA DO HER2 NÁDOROVÝCH BUNIEK

Gulyásová T.^{1,2}, Vasylyshyn T.³, Patsula V.³, Horák D.³, Sedlák E.^{1,4}, Huntošová V.^{2,5}

¹Katedra biofyziky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

²Centrum interdisciplinárnych biovied, TIP Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

³Ústav makromolekulárnej chémie, Akademie věd České Republiky, Praha

⁴Katedra biochémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

⁵Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Centrum biovied SAV, v. v. i., SAV, Bratislava

ABSTRAKT

Upkonverzné nanočastice (UCNPs) sú významné svojim špecifickým zložením, vďaka ktorému dokážu využívať anti-Stokesov posun a tak konverziou infračerveného žiarenia do viditeľnej oblasti môžu zvýšiť efektívnosť fotodynamickej terapie (PDT), ktorej hlavnou nevýhodou je jej nízka penetračná schopnosť do tkaniva vo viditeľnom spektre. Pomocou funkčných povrchových úprav týchto častíc je dokonca možné docieľiť ich selektívnosť voči nádorovým bunkám a tak zabezpečiť efektívnejšiu a bezpečnejšiu terapiu pre pacienta. V našom experimentálnom modeli sme využili funkcionalizáciu UCNPs pomocou špecifického DARPinu s vysokou afinitou na HER2 receptory. Tieto receptory sa nachádzajú na nádorových bunkách prsníka bunkovej línie SKBR3. Na UCNPs sme kovalentne pripojili verteporfin, ktorý je bežne využívaný fotosenzibilizátor pri PDT. Vizualizáciou verteporfinu sme dokázali lokalizovať prítomnosť UCNPs na bunkovej membráne SKBR3 buniek, čo nasvedčuje úspešné špecifické zacielenie našich UCNPs na nádorové bunky. Funkcionalizácia UCNPs pomocou DARPinov tak predstavuje sľubnú alternatívu pre zefektívnenie PDT.

ÚVOD

Voľba správneho systému pre transport liečiva do miest lokalizácie nádoru v onkologických ochoreniach sa stáva čím ďalej, tým viac dôležitou. Najmä čo sa týka liečby fotodynamickou terapiou (PDT), kde účinnosť liečby závisí od efektívneho transportu fotosenzibilizátora (PS) t. j. látky, ktorá po ožiarení dokáže generovať singletový kyslík a produkovať tak oxidačný stres, v cieľových bunkách. Perspektívnymi transportérmi PS sú rôzne nanonosiče, príkladom ktorých sú upkonverzné nanočastice (UCNPs). Tie vďaka svojmu špecifickému zloženiu dokážu absorbovať svetlo v blízkej infračervenej oblasti (NIR) a následne ho konvertovať na viditeľné svetlo, ktoré je absorbované transportovaným PS. To z nich robí dokonalý nástroj pre cielenú PDT. Ich samotné zloženie a štruktúra dáva možnosť rôznych povrchových úprav a funkcionalizácie, vďaka čomu môžu byť využité pri liečbe rôznych druhov onkologických ochorení.

UPKONVERZNÉ NANOČASTICE

UCNPs sa vyznačujú vysokou fotostabilitou a nízkou autofluorescenciou. UCNPs na báze lantanoidov dokážu absorbovať fotóny v NIR oblasti a emitovať žiarenie s vyššou energiou a nižšou vlnovou dĺžkou. Možnosť excitácie NIR svetlom (najčastejšie 808 a 980 nm), ktoré preniká hlbšie do tkaniva než UV/viditeľné svetlo, z nich robí vhodné nosiče pre biomedicínu (Mahata a kol., 2021). 808 nm predstavuje ešte vhodnejšiu vlnovú dĺžku pre excitáciu než častejšie využívaných 980 nm, pretože sa nachádza uprostred tzv. optického okna, kde je absorpcia a rozptyl svetla v tkanive najnižší. (Qiu a kol., 2018). Presným dopovaním pomerov lantanoidových iónov je možné dosiahnuť špecifickú vlnovú dĺžku emisie, ktorá sa prekrýva s absorpčným maximom požadovaného molekulového fotosenzibilizátora. (Mahata a kol., 2011; Yang Li a kol., 2022). Na základe požadovanej hodnoty emisií sa ako fotosenzibilizátory najčastejšie používajú porfyríny (Qiao a kol., 2012), ftalokyaníny (Xia a kol., 2014), chlorín-e6, Rose Bengal (Lee a kol., 2020) a dokonca aj hypericin (Vasylyshyn a kol., 2025).

FUNKCIONALIZÁCIE UCNPS PRE CIELENÚ TERAPIU

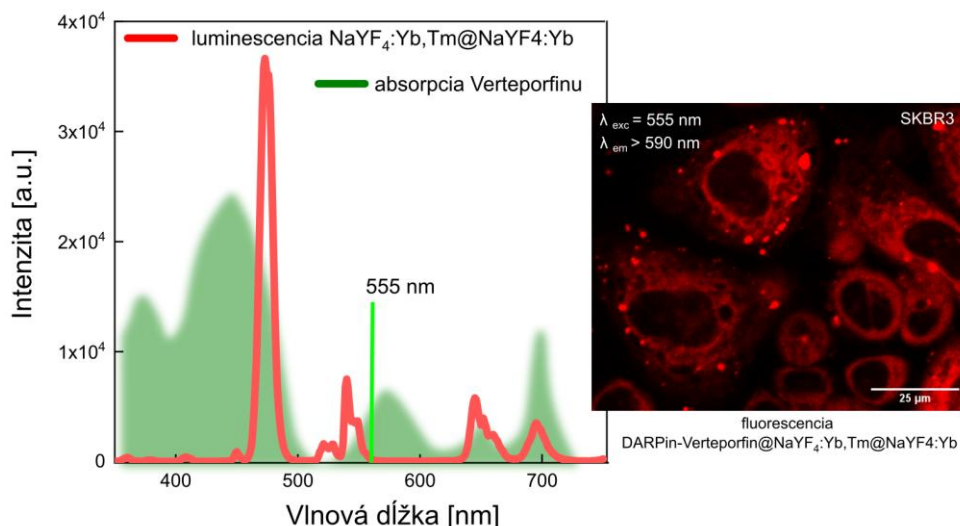
Funkčná úprava (funkcionalizácia) povrchu UCNPs dokáže zlepšiť ich biokompatibilitu a umožňuje naviazanie ligandov pre selektívne zacielenie terapie (Muhr a kol., 2014). Tým sa otvára priestor pre ich využitie v diagnostike a cielej terapii rôznych typov nádorov, medzi inými aj HER2 pozitívnych nádorov, ktorým sa venujeme v našom experimentálnom modeli. UCNPs boli používané pri terapii nádorových buniek línie MDA-MB-231 (nádor prsníka), kde boli povrchovo upravené silikou a hyalurónovou kyselinou, ktoré vytvorili „obal“ zamedzujúci nechcené predčasné uvoľňovanie liečiva (Yin a kol. 2014). Funkčná modifikácia poréznou silikou konjugovanou s protilátkami anti-MUC1 bola prvýkrát popísaná už pri cielej terapii nádorov exprimujúcich MUC1 (episialín) nachádzajúci sa na povrchu týchto buniek (Zhou a kol. 2012). Iným prípadom cieleho transportu je využitie kyseliny listovej, ktorá sa viaže na špecifický receptor, nachádzajúci sa na HeLa bunkách (nádor krčka maternice) (Zhang a kol. 2016). Takou modifikáciou je možné sa selektívne zamerať na špecifický typ onkologického ochorenia a umocniť internalizáciu UCNPs do týchto buniek. Následne NIR kontrolovaná fotodynamická terapia (PDT) vyvolá nezvratné poškodenie nádorového tkaniva generovaním reaktívnych foriem kyslíka. Navyše, kombinácia UCNPs – PDT a chemoterapeutická liečba využívajúca doxorubicín vykazuje oveľa vyššiu účinnosť než samotná chemoterapia (Zhang a kol. 2016). Uvedené štúdie ukazujú, že funkcionalizácia UCNPs má široké využitie pri liečbe viacerých typov nádorov a vhodne zvolená zvyšuje efektivitu cielej PDT.

MATERIÁL A METODIKA

UCNPs boli pripravené modifikáciou postupu podľa (Song Y. a kol., 2018; Vaylyshyn a kol., 2025) s kovalentne pripojeným verteporfínom ako fotosenzibilizátorom a ďalej boli funkcionalizované špecifickým DARPinom s vysokou afinitou k HER2 receptorom (HER2r). Nanočastice boli následne inkubované s bunkami nádoru prsníka SKBR3 s vysokou expresiou HER2r po dobu 15 min–1 h. Vizualizácia distribúcie funkcionalizovaných nanočastíc v bunkách bola sprostredkovaná pomocou konfokálnej fluorešcenčnej mikroskopie excitáciou vzorky pri 555 nm.

VÝSLEDKY

Ilustračné spektrum luminiscencie nemodifikovaných UCNPs (Obr.1, vľavo, vyznačené krivkou) sa čiastočne prekrýva s absorpčnými pásmi verteporfínu (Obr.1, vľavo, vyznačené plochou), čo potvrdzuje vhodnosť výberu fotosenzibilizátora, ktorý je v okne emisie vybraných nanočastíc (zdroj žiarenia pre excitáciu verteporfínu). Pre priamu identifikáciu verteporfínu v bunkách sme zvolili excitáciu 555 nm laserom. Excitáciou funkcionalizovaných UCNPs DARPinom pri 555 nm sme pozorovali výraznú červenú fluorešcenciu (>590 nm) lokalizovanú do aglomerátov na plazmatickej membráne buniek SKBR3 (Obr.1, vpravo). Distribúcia aglomerátov naznačuje istú bunkovú selektivitu vďaka DARPinu, keďže pri niektorých bunkách sú nanočastice viditeľne lokalizované na plazmatickej membráne, zatiaľ čo pri iných úplne chýbajú. To môže byť spôsobené nerovnomerným naviazaním DARPinu na jednotlivé nanočastice. V ďalšom výskume sa budeme venovať optimalizácii funkcionalizácie nanočastíc ako aj spusteniu PDT prostredníctvom NIR žiarenia.



Obr. 1. Reprezentatívne absorpčné spektrum verteporfinu a charakteristické luminescenčné spektrum UCNP s stimuláciou 980 nm (vľavo). Vizualizácia distribúcie modifikovaných UCNP s DARPinom v bunkách nádoru prsníka SKBR3 pomocou konfokálneho fluorescenčného mikroskopu (vpravo).

POĎAKOVANIE

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00007, projektom APVV-20-0340 a projektom vvg-2025-3481.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Lee SY, et al. Near-infrared light-triggered photodynamic therapy and apoptosis using upconversion nanoparticles with dual photosensitizers. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020; 8:275.
- Li Y, Chen G. Upconversion nanoparticles for cancer therapy. *Adv NanoBiomed Res.* 2022; 2(12):2200092.
- Mahata MK, De R, Lee KT. Near-infrared-triggered upconverting nanoparticles for biomedicine applications. *Biomedicines.* 2021; 9(7):756.
- Muhr V, et al. Upconversion nanoparticles: from hydrophobic to hydrophilic surfaces. *Acc Chem Res.* 2014; 47(12):3481-93.
- Qiao XF, et al. Triple-functional core-shell structured upconversion luminescent nanoparticles covalently grafted with photosensitizer for luminescent, magnetic resonance imaging and photodynamic therapy in vitro. *Nanoscale.* 2012; 4(15):4611-23.
- Qiu H, et al. Recent progress in upconversion photodynamic therapy. *Nanomaterials (Basel).* 2018; 8(5):344.
- Song Y. et al. Fast synthesis of sub-10 nm β -NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺@NaYF₄ core-shell upconversion nanocrystals mediated by oleate ligands. *Mater. Res. Bull.* 2018; 103:279-84.
- Vasylyshyn T, et al. Surface-engineered core-shell upconversion nanoparticles for effective hypericin delivery and multimodal imaging. *Nanoscale.* 2025; 17(10):5838-57.
- Xia L, et al. An upconversion nanoparticle-zinc phthalocyanine based nanophotosensitizer for photodynamic therapy. *Biomaterials.* 2014; 35(13):4146-56.
- Yin M, et al. Upconverting nanoparticles with a mesoporous TiO₂ shell for near-infrared-triggered drug delivery and synergistic targeted cancer therapy. *Chem Eur J.* 2014; 20(43):14012-7.
- Zhang T, et al. Near infrared light triggered reactive oxygen species responsive upconversion nanoplatform for drug delivery and photodynamic therapy. *Eur J Inorg Chem.* 2016; 2016(8):1206-13.
- Zhou A, et al. Pyropheophorbide A and c(RGDyK) comodified chitosan-wrapped upconversion nanoparticle for targeted near-infrared photodynamic therapy. *Mol Pharm.* 2012; 9(6):1580-9.

MOLEKULÁRNA A SÉROLOGICKÁ DIAGNOSTIKA ANAPLASMA SPP. V Kliešťoch a u voľne žijúcej zveri na Slovensku

Hudáková K.¹, Petroušková P.¹, Korytár L.¹, Ondrejková A.¹, Drážovská M.¹, Gogoľová L.¹, Franková K.¹, Lipinský J.¹, Čurlík J.², Lazár J.², Kostičák M.¹, Prokeš M.¹

¹Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF v Košiciach

²Katedra chovu a chorôb zveri, rýb a včiel, ekológie a kynológie, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť výskyt *Anaplasma* spp. v kliešťoch *Ixodes ricinus* z vegetácie a prevalenciu protilátok proti *Anaplasma* spp. v populáciách voľne žijúcej zveri na vybraných lokalitách Slovenska. Metódou nested PCR bolo pozitívnych na prítomnosť DNA *Anaplasma* spp. 11,1 % poolov kliešťov z Trenčianskeho a 6,9 % poolov kliešťov zo Žilinského kraja. Sérologické vyšetrenie protilátok proti *Anaplasma* spp. u 49 kusov voľne žijúcej zveri odhalilo ich prítomnosť u 71,4 % jedincov, pričom prevalencia u daniela škvrnitého (*Dama dama*) bola 63,6 % a u muflóna lesného (*Ovis musimon*) 73,7 %. Ide o prvú štúdiu zameranú na sérologický záchyt protilátok proti *Anaplasma* spp. u voľne žijúcej zveri na Slovensku. Získané výsledky potvrdzujú enzootickú cirkuláciu patogénu v prírodných biotopoch a zdôrazňujú potrebu ďalšieho monitorovania jeho výskytu.

ÚVOD

Baktérie rodu *Anaplasma* sú gram-negatívne, striktne intracelulárne patogény patriace do čeľade Anaplasmataceae. Tieto mikroorganizmy, prenášané predovšetkým kliešťami, sú pôvodcami anaplazmózy, zoonotického ochorenia, ktoré môže predstavovať závažné riziko pre zdravie zvierat aj ľudí. Rezervoárom *Anaplasma* spp. sú voľne žijúce cicavce (Stuenkel a kol., 2013). Za najvýznamnejšieho vektora *Anaplasma phagocytophilum* v miernom pásme Európy je považovaný kliešť *Ixodes ricinus*. Okrem *I. ricinus* bola prítomnosť *Anaplasma* spp. zaznamenaná aj u ďalších druhov kliešťov, ako *Dermacentor reticulatus*, *Haemaphysalis concinna*, *Hyalomma marginatum*, *I. ventralis* a *I. trianguliceps*, čím sa rozširuje spektrum možných prenášačov na európskom kontinente (Rizzoli a kol., 2014).

Na Slovensku bola *A. phagocytophilum* prvýkrát detegovaná v populácii kliešťov *I. ricinus* v juhozápadnej časti krajiny v roku 2002 (Špitálská a kol., 2008). Napriek tomu je výskum zameraný na jej výskyt v kliešťoch a najmä na sérologickú prevalenciu vo voľne žijúcej zveri stále nedostatočný. Tieto údaje sú však kľúčové pre pochopenie cirkulácie patogénu v prírodnom ohnisku a hodnotenie rizík pre verejné aj veterinárne zdravie. Našou prácou sa snažíme doplniť chýbajúce údaje a prispieť k lepšiemu poznaniu ekológie tohto významného patogénu v stredoeurópskom priestore.

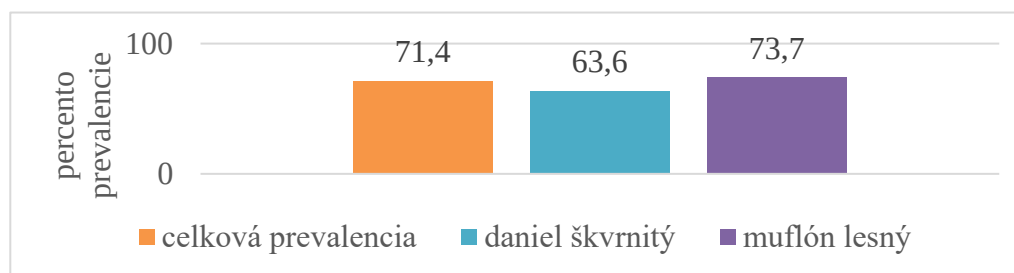
MATERIÁL A METODIKA

Zber kliešťov z vegetácie prebiehal metódou vľajkovania na jar a jeseň 2024 v Žilinskom a Trenčianskom kraji. Každý kliešť bol spracovaný individuálne, pričom sa z neho izolovala celková DNA použitím kitu BlackPrep DNA/RNA Tick Kit (Analytik Jena). Vzhľadom na predpokladanú nízku prevalenciu *Anaplasma* spp. v populácii kliešťov boli individuálne vzorky následne zoskupené do poolov po päť kusov. Detekcia DNA patogénu bola realizovaná pomocou nested PCR s použitím štyroch primerov (Tab. 1) zameraných na 16S rRNA gén.

Do sérologického prieskumu boli zaradené vzorky sér získané v rokoch 2023 – 2025 zo zvierat chovaných v Účelovom zariadení pre chov a choroby zveri, rýb a včiel UVLF v Košiciach, v obci Rozhanovce, okres Košice-okolie. Vzorky pochádzali od daniela škvrnitého (*Dama (Cervus) dama (mesopotamica)* Linnaeus, 1758) – 11 kusov a muflóna lesného (*Ovis musimon* Pallas, 1811) – 38 kusov. Na detekciu špecifických protilátok proti *Anaplasma* spp. v sérach bol použitý *Anaplasma* Antibody Test Kit, cELISA v2 (VMRD, USA).

ACn-16S-F1	CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC
ACn-16S-R1	TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC
ACn-16S-F2	AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT
ACn-16S-R2	GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG

Tab. 1. Primery použité pri PCR reakcii



Obr. 1. Prevalencia protilátok proti *Anaplasma* spp. u voľne žijúcej zveri

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výskyt *A. phagocytophilum* v kliešťoch *I. ricinus* bol doteraz zaznamenaný predovšetkým v enzootických oblastiach východného Slovenska. Derdákova a kol. (2003) analyzovali 60 kliešťov z vegetácie, pričom prítomnosť *A. phagocytophilum* bola potvrdená v 8,3 % prípadov. Aj napriek malej vzorke tieto výsledky naznačujú cirkuláciu tohto patogénu v prírodných ohniskách východného Slovenska. Podobne, Svitáľková a kol. (2015) preukázali, že prevalencia *A. phagocytophilum* v kliešťoch z vegetácie bola významne vyššia v urbanizovaných oblastiach (7,2 %) v porovnaní s prírodnými biotopmi, kde dosahovala len 3,1 %. Tieto zistenia potvrdzujú rozdiely v distribúcii patogénu v závislosti od typu prostredia. Naše výsledky prítomnosti DNA *Anaplasma* spp. v kliešťoch z vegetácie rozširujú poznatky o výskyte anaplaziem aj v ďalších, doposiaľ menej skúmaných regiónoch Slovenska. V Žilinskom kraji bolo analyzovaných 29 poolov kliešťov, z ktorých 2 pooly (6,9 %) boli PCR pozitívne na prítomnosť *Anaplasma* spp. V Trenčianskom kraji bolo vyšetrených 36 poolov, pričom 4 pooly (11,1 %) boli pozitívne. V našej štúdii sme stanovením špecifických protilátok proti *Anaplasma* spp. zistili, že z celkového počtu 49 vyšetrených vzoriek sér bolo 35 pozitívnych, čo predstavovalo 71,4 % prevalenciu. U daniela škvrnitého ($n = 11$) bolo zaznamenaných 7 pozitívnych vzoriek (63,6 %) a u muflóna lesného ($n = 38$) bola pozitívna reakcia detegovaná v 28 vzorkách (73,7 %) (Obr. 1). Podľa nám dostupných údajov ide o prvú štúdiu, ktorá sa zameriava na prítomnosť protilátok proti *Anaplasma* spp. v populáciách voľne žijúcej zveri na Slovensku.

ZÁVER

Naše výsledky poukazujú na prítomnosť *Anaplasma* spp. aj v severnejších oblastiach Slovenska a podčiarkujú potrebu rozšíreného monitoringu v ďalších lokalitách a mestských oblastiach s cieľom lepšie porozumieť ekologickej distribúcii a epizootológii anaplazmózy v krajine.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 03/2025 „Identifikácia a výskyt *Anaplasma capra* u hospodárskych a voľne žijúcich zvierat na území Slovenskej republiky“, KEGA 007UVLF-4/2025 a OH SURVector č. 101132974.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Derdáková M, et al. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. *Ann Agric Environ Med*. 2003;10(2):269-74.

Rizzoli A, et al. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Front Public Health*. 2014;2:251. doi:10.3389/fpubh.2014.00251.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. *Anaplasma phagocytophilum*--a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3:31.

Svitáľková Z, et al. *Anaplasma phagocytophilum* prevalence in ticks and rodents in an urban and natural habitat in south-western Slovakia. *Parasites Vectors*. 2015;8:276.

Špitalská E, et al. First report of *Anaplasma phagocytophilum* in ticks in Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis*. 2008;1(1):50-4.

POROVNANIE HLADINY IMUNOGLOBULÍNŮV KRVNÉHO SÉRA TELIAT V OBDOBÍ MESIACOV OKTÓBER AŽ MAREC A VPLYV IMUNOGLOBULÍNŮV NA ÚMRTNOST

Ješík J., Mudroň P.

Klinika prežívacov, UVLF v Košíciach

ABSTRAKT

Hladina imunoglobulínův v krvnom sére teliat predstavuje dôležitý ukazovateľ kvality kolostrálnej výživy. Synepiteliochoriálne placentárne spojenie u hovädzieho dobytku vytvára bariéru medzi plodom a matkou, ktorá znemožňuje prenos imunoglobulínův. Z tohto dôvodu je príjem imunoglobulínův prostredníctvom kolostra rozhodujúcim mechanizmom pasívneho prenosu materských protilátok. Množstvo absorbovaných imunoglobulínův významne ovplyvňuje zdravotný stav a vývoj jedinca nielen v prvých dňoch života, ale aj z dlhodobého hľadiska. Cieľom práce bolo zhodnotiť sezónne zmeny v hladine imunoglobulínův v krvnom sére teliat v období od októbra do marca a posúdiť vplyv množstva imunoglobulínův na úmrtnosť teliat. Údaje boli získané počas klinického vyšetrenia teliat na farme na východnom Slovensku počas mesiacov október až marec a zo záznamov od chovateľa. Vzorky boli odobraté celkovo od 134 teliat vo veku 24 hodín až 7 dní. Najvyššia priemerná hladina celkových imunoglobulínův za mesiac bola zaznamenaná v decembri (20,51 U ZST) zatiaľ čo najnižšia v októbri (10,48 U ZST). Najvyššia úmrtnosť (36,84 %) bola zistená v novembri, pri priemernej hodnote celkových imunoglobulínův 13,51 U ZST. Naopak, najnižšia úmrtnosť (0 %) sa zaznamenala v decembri a v marci, pri priemernej hodnote celkových imunoglobulínův 20,51 U ZST za december, resp. 17,10 U ZST za marec. Štatistická významnosť sa nepreukázala vo vzťahu medzi mesiacmi v roku a hladinou imunoglobulínův. Medzi hladinou imunoglobulínův a úmrtnosťou teliat sa zistila stredne silná negatívna korelácia, avšak tento vzťah nebol štatisticky významný.

ÚVOD

Teľatá po narodení sú odkázané na príjem imunoglobulínův prostredníctvom kolostra, nakoľko synepiteliochoriálna placenta u hovädzieho dobytku neumožňuje ich prechod z matky na plod počas gravidity (Borghesi a kol. 2014). Imunitný systém novorodených teliat je nezrelý a vytvárať vlastné protilátky začína približne až v troch týždňoch veku (Franklin a kol. 2003). Preto je dôležité včasné napojenie teliat kvalitným kolostrom obsahujúcim dostatok imunoglobulínův (Jaster 2005). Pasívny prenos materských imunoglobulínův prebieha najmä počas prvých 24 hodín po narodení absorpciou cez stenu tenkého čreva. Dostatočné množstvo imunoglobulínův zabezpečuje ochranu teliat pred bežnými patogénnymi mikroorganizmami do doby, pokiaľ sa ich imunitný systém nestane plne funkčným. Adekvátne kolostrálna imunita teliat je spájaná so zníženým rizikom morbidít a mortality pred odstavom, ale aj po odstave, so zlepšením hmotnostných prírastkov, skrátením veku pri prvom telení, zlepšením produkcie mlieka počas prvej a druhej laktácie a znížením brakácie dojnic počas prvej laktácie (Godden a kol. 2019). Medzi hlavné faktory ovplyvňujúce úspešnosť pasívnej imunity patria kvalita kolostra, množstvo prijatého kolostra, vek teliat pri napojení kolostrom (Lopez a Heinrichs 2022) a bakteriálna kontaminácia kolostra (Gelsinger a kol. 2015). Ďalej sú opisované aj ďalšie faktory ovplyvňujúce kvalitu kolostra a pasívnej imunity u teliat – plemeno, vek kráv pri telení, výživa v období pred pôrodom, ročné obdobie, vakcinácia matiek, dĺžka státi na sucho, množstvo kolostra vyprodukovaného na prvý pôdaj a čas po otelení, po ktorom sa získa kolostrom (Godden a kol. 2019). Cieľom tejto práce bolo zistiť výskyt sezónnych zmien v hladine celkových imunoglobulínův stanovených u teliat počas obdobia október až marec a vplyv úrovne kolostrálnej imunity na úmrtnosť teliat.

MATERIÁL A METODIKA

Úroveň celkových imunoglobulínov sme stanovili zo vzoriek krvi, ktoré sme odobrali počas klinického vyšetrenia teliat na farme dojníc na východnom Slovensku. Do štúdie bolo zaradených 134 teliat vo veku 24 hodín až 7 dní. Teľatá na farme boli po narodení oddelené od matiek a napojené kolostrom dvakrát počas prvých 24 hodín života. Prvé napojenie bolo v čo najkratšom čase po narodení a druhé približne o 12 hodín. Odbery vzoriek sme vykonali v mesiacoch október až marec. Teľatá boli manuálne fixované pomocným personálom a odber krvi sme vykonali z *vena jugularis* do skúmavky bez antikoagulačného činidla. Po transporte vzoriek do laboratória sme získali krvné sérum pomocou centrifugácie. Z krvného séra sme zistili hodnotu celkových imunoglobulínov pomocou zink-sulfátového turbidimetrického testu. Zo získaných údajov sme zistili priemerné hodnoty imunoglobulínov za jednotlivé mesiace. Zároveň sme vypočítali smerodajné odchýlky pre jednotlivé mesiace. Pomocou testu ANOVA sme zistili štatistickú významnosť medzi hodnotami imunoglobulínov. Následne sme pomocou Tukey HSD testu zistili štatistické rozdiely v hodnotách imunoglobulínov medzi konkrétnymi dvojicami mesiacov. Súvis medzi mesiacmi v roku a hodnotou imunoglobulínov sme overili pomocou lineárnej regresnej analýzy. Zo získaných údajov od chovateľa sme zistili, ktoré z teliat zaradených do štúdie uhynuli počas prvých 6 týždňov života. Následne sme zistili percentuálnu úmrtnosť teliat narodených v jednotlivých mesiacoch. Štatistickú významnosť vzťahu medzi priemernou hodnotou celkových imunoglobulínov a úmrtnosťou teliat sme overili lineárnou regresnou analýzou.

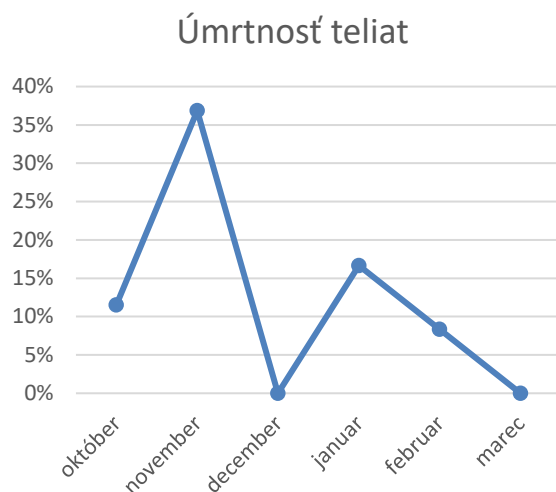
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Mesiac	Počet teliat	Celkové imunoglobulíny		Úmrtnosť (%)
		Priemerná hodnota (U ZST)	SD	
Október	26	10,48	7,19	11,54
November	19	13,51	8,09	36,84
December	21	20,51	8,30	0,00
Január	30	11,84	4,75	16,67
Február	24	14,07	7,51	8,33
Marec	14	17,10	6,30	0,00

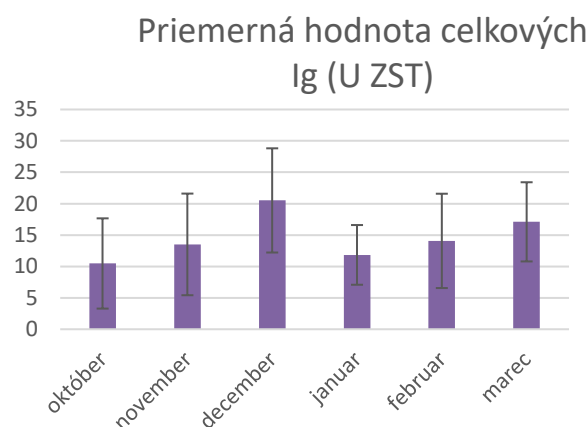
Tab. 1. Údaje o CIg a úmrtnosti teliat ($n = 134$)

Najvyššia priemerná hladina celkových imunoglobulínov (CIg) za mesiac bola v decembri s hodnotou 20,51 jednotiek zink-sulfátového turbidimetrického testu (U ZST). Najnižšia hladina CIg bola v októbri s hodnotou 10,48 U ZST. Štatisticky významné rozdiely v hodnotách CIg sme zistili Tukey HSD testom medzi mesiacmi október – december ($q = 4,76$) a december- január ($q = 4,24$). Vzťah medzi CIg a jednotlivými mesiacmi podľa lineárnej regresnej analýzy nie je štatisticky významný ($p > 0,05$), hladina CIg má v čase stúpajúci aj klesajúci charakter. Čas (mesiace) vysvetľuje iba 14,5 % variability ($R^2 = 0,145$) v hodnotách imunoglobulínov, t.j. vzťah je veľmi slabý. Najvyššia úmrtnosť 36,84 % bola zistená v novembri pri priemernej hodnote CIg 13,51 U ZST. Najnižšia úmrtnosť 0 % bola zistená v decembri a v marci pri priemernej hodnote CIg 20,51 U ZST za december, resp. 17,10 U ZST za marec. Na základe lineárnej regresnej analýzy sme zistili, že priemerná mesačná hladina imunoglobulínov negatívne korelovala s úmrtnosťou teliat ($R^2 = 0,30$), avšak tento vzťah nebol štatisticky významný ($p > 0,05$), čo môže súvisieť s nízkym počtom pozorovaní. Vajda a Maskal'ová (2016) uvádzajú ako optimálnu hodnotu CIg stanovenú v sére teliat medzi 3. a 7. dňom života na úrovni 20 U ZST. Úroveň imunoglobulínov dosahujúcu túto hodnotu sme v našej štúdii pozorovali len v decembri. Zároveň v tento mesiac nebola pozorovaná úmrtnosť

u teliat. Fallon (1978) pri hodnote CIg v rozmedzí 10-14 U ZST zistil úmrtnosť teliat 6,5 %, čo je menej ako sme pozorovali v našej práci, kde sme v tomto rozmedzí CIg pozorovali úmrtnosť 8,33 % - 36,84 %. Taktiež pri hodnotách CIg 15-19 U ZST pozoroval Fallon (1978) úmrtnosť 5 % a pri CIg 20-24 U ZST úmrtnosť 3 %. My sme pri týchto hodnotách zaznamenali 0 % úmrtnosť. Rozdiely môžu byť spôsobené tým, že v našom prípade sme vychádzali z priemerných hodnôt CIg za mesiac a malým počtom štatistických skupín zahrnutých do štúdie.



Graf 1. Grafické znázornenie úmrtnosti teliat



Graf 2. Priemerné hodnoty CIg (U ZST) v jednotlivých mesiacoch s vyznačením smerodajných odchýlok

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Borghesi J et al. Immunoglobulin transport during gestation in domestic animals and humans - A review. Open Journal of Animal Science. 2014; 4:323–336
- Fallon RJ. The effect of immunoglobulin levels on calf performance and methods of artificially feeding colostrum to the newborn calf. Annals of Veterinary research. 1978; 9(2):347-352
- Franklin ST et al. Health and Performance of Holstein Calves that Suckled or Were Hand-Fed Colostrum and Were Fed One of Three Physical Forms of Starter. Journal of Dairy Science. 2003; 86:2145-2153
- Gelsinger SL et al. Effect of colostrum heat treatment and bacterial population on immunoglobulin G absorption and health of neonatal calves. Journal of Dairy Science, 2015; 98:4640-4645
- Godden SM et al. Colostrum Management for Dairy Calves. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2019; 35:535-556
- Jaster EH. Evaluation of Quality, Quantity, and Timing of Colostrum Feeding on Immunoglobulin G1 Absorption in Jersey Calves. Journal of Dairy Science. 2005; 88:296-302
- Lopez AJ, Heinrichs AJ. The importance of colostrum in the newborn dairy calf. Journal of Dairy Science. 2022; 105:2733-2749
- Vajda V, Maskáčová I. Hodnotenie kvality krmív a tvorba produkčného zdravia zvierat. 1. vyd. Košice : UVLF, 2016. ISBN 978-80-8077-526-1, 406 s.

POROVNANIE RÁDIOGRAFICKÝCH MERACÍCH METÓD VYUŽÍVAJÚCICH VERTEBRÁLNE, HRUDNÉ A MANUBRIÁLNE REFERENČNÉ BODY PRI HODNOTENÍ VEĽKOSTI SRDCOVEJ SILUETY U PSOV

Kacková G., Horňák S., Figurová M., Agudelo C. F., Vargová N.

Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Hodnotenie veľkosti srdcovej siluety je dôležité pre diagnostiku kardiomegálie u psov. Najčastejšie používané stavcové srdcové skóre (VHS) je najviac akceptovanou a overenou metódou, avšak výsledky môžu byť ovplyvnené plemennými a anatomickými odlišnosťami. Novšie spôsoby merania, ako manubriálne srdcové skóre (MHS) a srdcové skóre podľa hrudného vchodu (TIHS), môžu priniesť vyššiu presnosť a stabilitu meraní. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať hodnoty VHS, MHS a TIHS u zdravých psov rovnakého plemena. Do výskumu bolo zaradených 39 jedincov po kompletnom internom a kardiologickom vyšetrení vrátane echokardiografie. Priemerná hodnota VHS bola 10,54, MHS 5,05 a TIHS 2,95. Bland–Altmanova analýza ukázala systematické rozdiely medzi VHS a oboma alternatívnymi metódami, pričom najvyššiu zhodu vykazovali MHS a TIHS. Korelačná analýza ukázala slabý, ale významný vzťah medzi VHS a MHS ($r = 0,33$; $p = 0,04$). Medzi VHS a TIHS sa nepreukázala významná súvislosť ($r = 0,19$; $p = 0,25$). Najvyššiu koreláciu sme zaznamenali medzi MHS a TIHS, kde bola stredne silná a štatisticky významná ($r = 0,48$; $p = 0,0018$). Výsledky naznačujú, že MHS a TIHS predstavujú stabilnejšie metódy hodnotenia veľkosti srdcovej siluety v porovnaní s VHS, ktoré môže u niektorých zdravých jedincov dosahovať hraničné alebo zvýšené hodnoty.

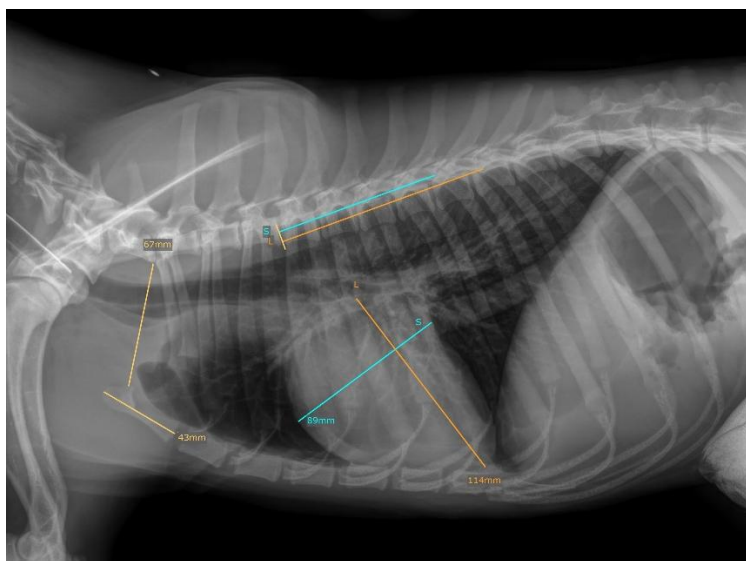
ÚVOD

Rádiografické hodnotenie veľkosti srdca je kľúčové pri diagnostike kardiomegálie u psov. Najčastejšie používané VHS je široko akceptované, no vykazuje variabilitu medzi plemenami a je ovplyvnené individuálnou anatómiou (Tangpakornsak a kol., 2023; Baisan a Vulpe, 2025). Ako alternatíva sa skúmajú nové referenčné body, najmä rukoväť hrudnej kosti a hrudný vchod, ktoré môžu znížiť variabilitu. MHS sa ukazuje ako spoľahlivý ukazovateľ nezávislý od plemena a telesnej konštitúcie (Bilgiç a kol., 2025). Metóda TIHS, založená na pomere k hrudnému vchodu, preukázala vyššiu reprodukovateľnosť než VHS, najmä u malých plemien (Fernández a kol., 2023). Napriek týmto poznatkom zostáva VHS v klinickej praxi preferovanou metódou pre svoju jednoduchosť, zatiaľ čo MHS a TIHS prinášajú výhodu najmä pri atypických alebo hraničných prípadoch (Mostafa a Berry, 2022).

MATERIÁL A METODIKA

Majitelia psov podpísali informovaný súhlas so zaradením zvierat do štúdie a so spracovaním údajov. Do výskumu boli zahrnutí iba klinicky zdraví jedinci rovnakého plemena po kompletnom internom a kardiologickom vyšetrení vrátane laboratórnych testov, elektrokardiografie a echokardiografie. Psy s akýmkoľvek nálezom boli vylúčené. Vyšetrovanie prebiehalo od mája do augusta 2023. Rádiologické vyšetrenia sa realizovali pod celkovou anestéziou podľa jednotného protokolu, aby sa vylúčil vplyv sedácie na veľkosť srdca. Digitálne snímkovanie sa uskutočnilo systémom Perform-X F100 (Control-X Medical, Zrt.), pričom expozičné parametre sa prispôbovali individuálne podľa prednastavených protokolov. Na každom pacientovi boli následne realizované všetky tri merania – VHS, MHS aj TIHS – čo poskytlo homogénny a štatisticky dobre porovnateľný súbor údajov. VHS sa meralo na pravej laterálnej projekcii podľa metódy Buchanana a Büchelera (1995). TIHS sa určovalo podľa Fernández a kol. (2023) ako pomer krátkej osi srdca a dĺžky hrudného vchodu. MHS sa počítalo podľa Bilgiça a kol. (2025) ako súčet krátkej a dlhšej osi srdca delený dĺžkou

manubria hrudnej kosti. Na porovnanie jednotlivých metód bola použitá Bland–Altmanova analýza na hodnotenie zhody a Pearsonova korelačná analýza na posúdenie lineárnej asociácie medzi výsledkami.



Obr. 1. Meranie srdcovej siluety pomocou VHS, MHS a TIHS na laterálnej RTG projekcii psa

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Do štatistickej analýzy bolo zahrnutých 39 jedincov. Bland–Altmanova analýza ukázala systematické rozdiely medzi jednotlivými meracími metódami. VHS dosahovalo konzistentne vyššie hodnoty v porovnaní s alternatívnymi prístupmi – priemerný rozdiel oproti MHS bol 5,82 (95 % LoA: 4,86 až 6,79) a oproti TIHS 7,63 (95 % LoA: 6,65 až 8,60). V porovnaní medzi MHS a TIHS bol rozdiel menší, s biasom 1,81 (95 % LoA: 1,23 až 2,38), čo naznačuje ich vzájomnú bližšiu zhodu. Korelačná analýza potvrdila rozdielnu mieru vzťahu medzi metódami. VHS a MHS vykázali slabú, ale štatisticky významnú koreláciu ($r = 0,33$; $p = 0,04$), vzťah medzi VHS a TIHS bol veľmi slabý a nevýznamný ($r = 0,19$; $p = 0,25$). Najvyššia miera korelácie bola zistená medzi MHS a TIHS, kde sa potvrdila stredne silná a štatisticky významná asociácia ($r = 0,48$; $p = 0,0018$).

Porovnanie	Bias	95 % LoA (dolná)	95 % LoA (horná)	Korelácia r	p - hodnota
VHS vs MHS	5,82	4,86	6,79	0,33	0,0400
VHS vs TIHS	7,63	6,65	8,60	0,19	0,2500
MHS vs TIHS	1,81	1,23	2,38	0,48	0,0018

Tab. 1. Výsledky Bland–Altmanovej analýzy a Pearsonovej korelačnej analýzy medzi jednotlivými meracími metódami. Bias predstavuje priemerný rozdiel medzi dvoma metódami, 95 % LoA vyjadruje interval zhody a hodnota r udáva silu lineárnej korelácie.

V našom súbore 39 zdravých psov sme zistili priemerné hodnoty VHS = 10,54, MHS = 5,05 a TIHS = 2,95. Hodnoty VHS tak mierne prevyšovali pôvodný referenčný priemer $9,7 \pm 0,5$ navrhnutý Buchananom a Büchelerom (1995), avšak zodpovedali aktualizovanému hornému limitu 10,5 publikovanému v roku 2000 (Buchanan, 2000). Priemerná hodnota MHS v našom súbore bola veľmi podobná výsledkom uvádzaným u zdravých psov vo viacerých štúdiách (Mostafa a kol., 2020; Bilgiç a kol., 2021), kde sa pohybovala približne medzi 5,0 a 5,5 v závislosti od veľkostnej kategórie. Priemerná hodnota TIHS (2,95) sa nachádzala pod navrhovanou významnou hranicou 3,2 publikovanou Marbella Fernández a kol., (2023). Naše výsledky ukazujú, že MHS a TIHS sú u zdravých psov pomerne stabilné a dobre zodpovedajú

hodnotám popísaným v literatúre, zatiaľ čo VHS môže u niektorých jedincov dosahovať až hraničné alebo vyššie hodnoty.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 08/2025 „Rádiologická štúdia hrudnej dutiny slovenského národného plemena Tatranský durič.“.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Baisan RA, Vulpe V. Vertebral heart score and vertebral left atrial size as radiographic measurements for cardiac size in dogs—a literature review. *Animals*. 2025; 15(5):683.

Bilgiç B, et al. Evaluation of cardiomegaly in dogs using the manubrium heart score method and determination of its diagnostic accuracy in comparison with the vertebral heart score. *Vet Sci*. 2025; 12(7):619.

Buchanan JW, Bücheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc*. 1995; 206(2):194-9.

Buchanan JW. Vertebral scale system to measure heart size in radiographs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2000; 30(2):379-93.

Marbella Fernández D, et al. The thoracic inlet heart size, a new approach to radiographic cardiac measurement. *Animals*. 2023; 13(3):389.

Mostafa AA, Peper KE, Berry CR. Use of cardiac sphericity index and manubrium heart scores to assess radiographic cardiac silhouettes in large- and small-breed dogs with and without cardiac disease. *J Am Vet Med Assoc*. 2020; 256(8):888-98.

Tangpakornsak T, et al. Thoracic vertebral length-to-height ratio, a promising parameter to predict the vertebral heart score in normal Welsh Corgi Pembroke dogs. *Vet Sci*. 2023; 10(2):168.

TOXOPLASMA GONDII U HOSPODÁRSKÝCH ZVIERAT – RIZIKO PRE VETERINÁRNU PRAX A VEREJNÉ ZDRAVIE

Kaňuk D.^{1,2}, Antolová D.¹, Valentová D.³, Strišková K.³

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

² Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

³ Veterinárny a potravinový ústav v Bratislave

ABSTRAKT

Toxoplasma gondii je obligátny intracelulárny parazit s kozmopolitným výskytom, ktorý je schopný infikovať prakticky všetky druhy teplokrvných živočíchov. Toxoplazmóza predstavuje významné zdravotné riziko predovšetkým pre tehotné ženy a osoby so zníženou imunitou. Prezentovaná štúdia sa zamerala na sledovanie séroprevencie *T. gondii* u domácich prežúvavcov – hovädzieho dobytku, oviec a kôz na Slovensku. V spolupráci s Veterinárnym a potravinovým ústavom v Bratislave boli od januára do decembra 2024 odobraté vzorky 1298 sér. Analýza ukázala prítomnosť IgG protilátok proti *T. gondii* u 168 z 517 testovaných oviec (32,5 %) a u 122 zo 280 kôz (43,6 %). Z 501 vyšetrených vzoriek pochádzajúcich od kráv bolo 92 pozitívnych, čo predstavuje 18,4 %. Výsledky potvrdili nezanedbateľné riziko prenosu toxoplazmózy pri manipulácii a konzumácii tepelne neupraveného mäsa, živočíšnych produktov a prípadne aj mlieka, najmä oviec a kôz na Slovensku.

ÚVOD

T. gondii je intracelulárny parazit, ktorý sa vyskytuje po celom svete. Tento parazit vykazuje odlišné spôsoby reprodukcie u svojich hostiteľov. U definitívnych hostiteľov, medzi ktoré patria mäsožravce z čeľade *Felidae*, dochádza k pohlavnému rozmnožovaniu, zatiaľ čo u medzihostiteľov (všetky teplokrvné živočichy, vrátane človeka) sa jeho vývinové štádiá (tachyzoity a bradyzoity) rozmnožujú nepohlavne. *T. gondii* je považovaná za významného patogéna z hľadiska humánnej aj veterinárnej medicíny, pričom podľa správy FAO/WHO „Multicriteria-Based Ranking for Risk Management of Foodborne Parasite“, je zaradená na štvrté miesto medzi najnebezpečnejšie potravinami prenosné parazity s dopadmi na verejné zdravie (FAO/WHO, 2014).

Infekcia *T. gondii* sa u ľudí vyskytuje pomerne často, pričom až u 80 % nakazených prebieha infekcia bez príznakov, prípadne sa objavia len mierne symptómy ako napríklad lymfadenitída. Medzi najčastejšie symptómy patrí cervikálna lymfadenopatia, niekedy sprevádzaná zvýšenými teplotami, bolesťami hlavy, hrdla, svalov, vyrážkami, bolesťami brucha a zväčšením pečene a sleziny. Na druhej strane, tehotné ženy a osoby s oslabeným imunitným systémom, ako sú pacienti s AIDS, po transplantácii alebo na imunosupresívnej terapii, sú vystavení vyššiemu riziku rozvoja vážnych klinických príznakov (myokarditída, pneumónia, myozitída, encefalitída). V prípade primoinfekcie počas tehotenstva môže dôjsť k prenosu *T. gondii* na plod, čo môže viesť k potratu alebo vzniku závažných vývojových abnormalít (Montoya a kol., 2000; Gelenky a kol., 2017).

Z hľadiska prenosu parazita *T. gondii* prostredníctvom potravín je najvýznamnejším rizikovým faktorom konzumácia alebo manipulácia so surovým či nedostatočne tepelne spracovaným mäsom pochádzajúcim z domácich alebo voľne žijúcich zvierat. Vývojové štádiá parazita, ako sú tkanivové cysty alebo tachyzoity, môžu pri kontakte mäsa z infikovaným zvierat s kuchynskými nástrojmi a kontaminovať aj tieto predmety. Viaceré štúdie uvádzajú, že práve konzumácia alebo spracovanie mäsa, ktoré neprešlo dostatočnou tepelnou úpravou, je hlavným zdrojom nákazy u ľudí, pričom v Európe môže byť zodpovedná za 30 až 63 % prípadov toxoplazmózy (Dubey a kol., 2002; Tenter, 2009).

MATERIÁL A METODIKA

Od januára do decembra 2024 bolo v spolupráci s Veterinárnym a potravinovým ústavom v Bratislave zozbieraných a následne vyšetrených 517 krvných sér oviec, 280 sér kôz a 501 vzoriek sér hovädzieho dobytku (HD) zo všetkých ôsmich krajov Slovenska (menovite Bratislavský, Nitriansky, Trnavský, Trenčiansky, Žilinský, Banskobystrický, Prešovský a Košický kraj).

Vzorky sér boli na prítomnosť špecifických IgG protilátok proti *T. gondii* vyšetrené komerčne dostupným kitom ID Screen® Toxoplasmosis Indirect multi-species (ID Vet, Francúzsko) podľa protokolu určeného výrobcom a nepriamou in-house metódou za použitia antigénu *T. gondii* (TOXO-CF-Ag Lyophil.; TestLine, Clinical Diagnostics, ČR) riedeného 1:100, podľa protokolu uvedeného v publikácii Antolovej a kol. (2013).

VÝSLEDKY

V rámci séroepizootologickej štúdie bolo analyzovaných 517 vzoriek od oviec, 280 od kôz a 501 od hovädzieho dobytku. Najvyšší výskyt protilátok sa zistil u kôz, kde bola séropozitivita potvrdená u 122 jedincov, čo predstavuje 43,6 % (95 % CI 37,8 – 49,4). U oviec bola prevencia nižšia, s pozitívnym výsledkom u 168 vzoriek, teda 32,5 % (95 % CI 28,5 – 36,5). Najnižšia miera positivity bola zaznamenaná u hovädzieho dobytku, kde malo protilátky 92 zvierat (18,4 %; 95 % CI 15,0 – 21,8). Rozdiely v séroprevalencii protilátok u sledovaných druhov zvierat boli štatisticky významné ($p < 0,001$; $X = 58,84$). Pri porovnaní jednotlivých druhov bola séropozitivita kôz vyššia ako pozitivita oviec ($p < 0,001$, $X = 9,62$) aj hovädzieho dobytku ($p < 0,001$, $X = 57,37$) a séropozitivita oviec bola vyššia ako séropozitivita HD ($p < 0,001$, $X = 26,72$). Vyšetrené zvieratá pochádzali z ôsmich krajov Slovenska; pozitivita u oviec a kôz bola potvrdená vo všetkých krajoch, kým pozitívne jedince hovädzieho dobytku pochádzali najmä z Bratislavského, Nitrianskeho a Trnavského kraja.

Porovnanie výskytu protilátok proti *T. gondii* v závislosti od spôsobu chovu nepreukázalo štatisticky významné rozdiely ($p > 0,05$) medzi zvieratami z veľkochovov a z drobných (domácich) chovov. U oviec bola séropozitivita zaznamenaná u 66,7 % jedincov pochádzajúcich z domácich chovov a u 72,3 % oviec z veľkochovov. U kôz boli protilátky prítomné u 57,4 % zvierat z domácich chovov a u 72,7 % zvierat z veľkochovov (Tab. 1.), čo naznačuje podobnú úroveň expozície *T. gondii* bez ohľadu na spôsob chovu.

Spôsob chovu	Ovca		Koza		Hovädzí dobytok	
	N/n	% (95% CI)	N/n	% (95 % CI)	N/n	% (95 % CI)
Veľkochov	47/34	72,3 (57,4 – 87,34)	11/8	72,7 (39,0 – 93,4)	116/14	12,1 (6,8 – 19,4)
Domáci chov	15/10	66,7 (38,4 – 88,2)	54/31	57,4 (43,2 – 70,1)	1/0	nc

N – počet vyšetrených; n- počet pozitívnych; % - prevencia; 95 % CI – 95 % interval spoľahlivosti; nc – nepočítané

Tab. 1. Séroprevencia IgG protilátok proti *Toxoplasma gondii* podľa spôsobu chovu zvierat

DISKUSIA

Séroepizootologický prieskum bol zameraný na tie druhy hospodárskych zvierat, ktoré predstavujú potenciálne riziko pre verejné zdravie vzhľadom na ich zapojenie do potravinového reťazca. Kým hovädzie mäso patrí medzi bežné zložky stravy obyvateľstva Slovenska, spotreba mäsa oviec a kôz je nižšia. Na druhej strane, záujem o mlieko a mliečne

produkty z týchto zvierat, predovšetkým z kôz, v posledných rokoch rastie. Osobitne surové kozie mlieko sa často využíva nielen na priamu konzumáciu, ale aj ako podporný prostriedok pri liečbe rôznych zdravotných ťažkostí. Možnosť prenosu *T. gondii* prostredníctvom konzumácie nepasterizovaného ovčieho, kozieho alebo kravského mlieka nie je možné vylúčiť, keďže viaceré štúdie preukázali prítomnosť tachyzoitov v mlieku infikovaných zvierat a bol aj preukázaný priamy vzťah medzi ochorením u ľudí a konzumáciou nepasterizovaného kozieho mlieka a syra (Camossi a kol., 2011; Dehkordi a kol., 2013). Tento spôsob expozície predstavuje potenciálne riziko najmä v prípadoch, keď sa mlieko konzumuje surové, bez tepelného ošetrenia, ktoré by inaktivovalo infekčné štádium parazita.

Výsledky realizovaného prieskumu poukazujú na vysokú mieru séropozitivity v populácii oviec a kôz chovaných na Slovensku. Protilátky proti *T. gondii* boli detegované u 43,6 % kôz a 32,5 % oviec, čo svedčí o výraznej premorenosti týchto druhov. V prípade hovädzieho dobytku bola zaznamenaná nižšia séroprevencia (18,4 %), čo môže byť spôsobené nižšou citlivosťou tohto druhu na infekciu *T. gondii*. Po prekonaní akútnej fázy infekcie dochádza u zvierat, rovnako ako u ľudí, k tvorbe tkanivových cýst s obsahom bradyzoitov, ktoré sa lokalizujú najmä v svalovom a nervovom tkanive. Tieto cysty sú infekčné počas celého života hostiteľa a predstavujú dlhodobý zdroj nákazy pre ďalšie organizmy, vrátane človeka. Výskyt séropozitívnych oviec a kôz vo všetkých analyzovaných okresoch a krajoch poukazuje na celoplošné rozšírenie infekcie *T. gondii* v populáciách týchto hospodárskych zvierat na území Slovenska. Negatívny nález u HD z niektorých krajov môže byť ovplyvnený nízkym počtom vyšetrených zvierat.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol finančne podporený projektom VEGA 2/0024/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Antolová D, et al. Small mammals: paratenic hosts for species of *Toxocara* in eastern Slovakia. J Helminthol. 2013; 87:52–8.

Camossi LG, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. Vet Parasitol. 2011; 177:256 – 61.

Dehkordi FS, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine, and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. Foodborne Pathog Dis. 2013; 10:120–25.

Dubey JP, et al. High prevalence of viable *Toxoplasma gondii* infection in market weight pigs from a farm in Massachusetts. J Parasitol. 2002; 88:1234–38.

FAO/WHO. “Top Ten” list of food-borne parasites released. 2014; [Citované 2025-09-02]. Dostupné na: <https://www.fao.org/newsroom/detail/-Top-Ten-list-of-food-borne-parasites-released/en>

Geleneky M, Prášil P, Kodým P. Doporučený postup pro diagnostiku a léčbu toxoplazmózy. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství. 2017; 23:104–19.

Montoya JG, Remington JS. *Toxoplasma gondii*. In Principles and Practice of Infectious diseases (Mandell GI, Bennett JE, Dolin R, Eds.) Churchill Livingstone: Philadelphia, PA, USA. 2000; 2858–88.

Tenter AM. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104, 2:364-9.

VYUŽITIE VČELÍCH ČREVNÝCH EXPLANTÁTOV PRE ŠTÚDIUM IMUNITNEJ ODPOVEDE U *APIS MELLIFERA*

*Kollár Moskáľová L., Hudecová P., Ratvaj M., Chomová N., Mudroňová D.
Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach*

ABSTRAKT

Črevné explantáty predstavujú účinný nástroj pri krátkodobých experimentoch, keďže si zachovávajú prirodzenú štruktúru čreva. V oblasti výskumu imunity včely medonosnej však tento model zatiaľ nie je dostatočne preskúmaný ani optimalizovaný. Cieľom našej práce bolo upraviť metodiku a preskúmať využitie črevných explantátov pri štúdiu imunity a zdravia včely medonosnej. V našom experimente sme po 4-hodinovej aplikácii humínovej látky (HL) a esenciálneho oleja (EO) nezaznamenali žiadny signifikantný pokles metabolickej aktivity črevných explantátov, a to ani v porovnaní s oboma kontrolnými skupinami. Počas sledovania účinku HL sme však zaznamenali možnú interferenciu, čo poukazuje na potrebu ďalšej optimalizácie metód merania metabolickej aktivity pri použití týchto látok.

ÚVOD

Črevo je zložitý orgán tvorený rôznymi zložkami, ktoré spoločne zabezpečujú rozličné fyziologické funkcie vysoko koordinovaným a regulovaným spôsobom (Kiššová a kol., 2025). Črevné explantáty sa široko využívajú ako ex vivo modely pri štúdiu fyziológie gastrointestinálneho traktu, mechanizmov ochorení a interakcií medzi hostiteľom a patogénom (Costa a kol., 2024; Kothari a Rajagopalan, 2019; Reisinger a kol., 2016). Tieto explantáty si zachovávajú komplexnú architektúru a bunkovú diverzitu čreva (Kothari a Rajagopalan, 2019), avšak ich použitie je vo všeobecnosti obmedzené na krátkodobé experimenty (zvyčajne do 24 hodín) z dôvodu postupného zhoršovania integrity a životaschopnosti tkaniva (Mátis a kol., 2025; Reisinger a kol., 2016). Využitie a metodika prípravy črevných explantátov u včely medonosnej doposiaľ nie sú dostatočne preskúmané. V rámci nášho experimentu sme sa zamerali na možnosti ich využitia a optimalizáciu metodiky pre ďalšie využitie v oblasti štúdia imunity včely, ako aj na testovanie metabolickej aktivity črevných explantátov včely medonosnej po aplikácii humínovej látky a esenciálneho oleja.

MATERIÁL A METODIKA

Na účely experimentu bolo použitých 12 mladušiek, ktoré pochádzali z rovnakého úľa. Explantáty čriev boli získané z ilea včely, pričom bol príslušný úsek čreva vyrezaný pomocou skalpela. Získané explantáty boli vložené do 96-jamkových kultivačných platní (Greiner Bio One Hungary, Kremsmünster, Rakúsko). Platnička bola vopred naplnená kultivačným médiom BM 3, ktoré je zložené z média L15 (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), fetálneho bovinného séra (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), PIPES (Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), autolyzovaného kvasničného extraktu Difco™ TC Yeastolate, (UF) (Gibco, New York, USA) s prídavkom antibiotík (1 % Penicilin-Streptomycin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA); 0,1% Genatamicin sulfate (Biowest, Rue de la Caille, Francúzsko); 1% Amphotericin B (Biosera, Rue de la Caille, Francúzsko).

Počas nášho experimentu boli explantáty rozdelené do kontrolnej skupiny (CTRL), kontrolnej skupiny obsahujúcej Tween 20 (TW20), skupiny s prídavkom (0,4 %) HL HUMAC® Natur AFM Liquid (Humac s.r.o., Košice, SR) a skupiny s prídavkom (0,06 µL/ml) tymiánového (*Thymus vulgaris* L.) EO (Calendula a.s., Nová Ľubovňa, SR). Metabolická aktivita bola stanovovaná v rôznych časových úsekoch (0 hodín, 4 hodiny po aplikácii) použitím CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, Madison, Wisconsin, USA) a následným meraním absorbancie (490 nm). Percento metabolickej aktivity bolo prepočítané oproti kontrole nasledovne: (absorbancia pokusnej skupiny/absorbancia CTRL) x 100. Výsledky boli štatisticky vyhodnocované pomocou nepárového T-testu (štatistický softvér

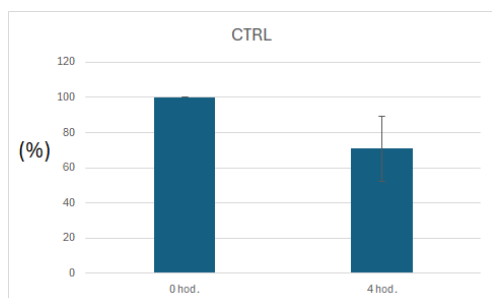
GraphPad Prism 8.0). Hodnoty líšiac sa na hladine významnosti $P < 0,05$ boli považované za štatisticky významné.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

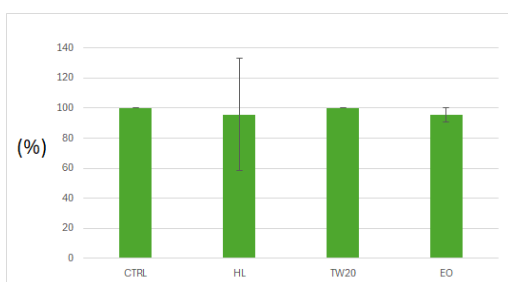
Cieľom našej práce bolo optimalizovať metodiku a využitie črevných explantátov v oblasti výskumu včely medonosnej. Naše výsledky poukazujú na fakt, že skupina ktorej bola aplikovaná HL (Obr. 1) sa vyznačovala nadštandardne vysokou smerodajnou odchýlkou. Tento



Obr. 2. Percento metabolickej aktivity pre kontrolnú skupinu obsahujúcu Tween 20.



Obr. 3. Percento metabolickej aktivity pre kontrolnú skupinu



Obr. 1. Percento metabolickej aktivity v štvrtej hodine od aplikácie.

jav mohol nastať v dôsledku samotnej štruktúry HL, ktorá obsahuje drobné častice o veľkosti uvádzanej výrobcou od 0,1 až 50 μm . Tieto častice mohli počas samotného merania absorbancie metabolickej aktivity spôsobiť interferenciu. Preto našim budúcim cieľom bude nájsť vhodný spôsob merania metabolickej aktivity a aplikácie HL. Avšak počas 4-hodinového pôsobenia HL látok sme nezaznamenali signifikantný pokles metabolickej aktivity, čo môže naznačovať, že prídavok HL 0,4% významne neovplyvňoval samotné explantáty, rovnako ako počas 4-hodinovej kultivácie sme v kontrolnej skupine (Obr. 2) oproti hodine 0 nezaznamenali signifikantný pokles metabolickej aktivity. Štúdia kuracích ileálnych explantátov zaznamenala pokles metabolickej aktivity po 12 hodinách ako aj zvýšenú aktivitu laktátdehydrogenázy pri explantátoch s priemerom 2 mm (Mátis a kol., 2025). Reisinger a kol. (2016) zaznamenali signifikantné zníženie viability už po 4 hodinách oproti čerstvým explantátom. Pri 4 hodinách pôsobenia EO (Obr. 1.) sme nezaznamenali signifikantné zmeny metabolickej aktivity črevných modelov, čo môže poukazovať na fakt, že správne zvolená koncentrácia vybraného EO nemá negatívny vplyv. Samotná koncentrácia EO hrá významnú rolu, pretože nevhodne zvolená koncentrácia môže znižovať životaschopnosť buniek a pôsobiť až toxicky (Lanzerstorfer a kol., 2021). Pre kontrolnú skupinu obsahujúcu Tween 20 sme taktiež nezaznamenali signifikantné zmeny počas 4-hodinovej kultivácie oproti 0 hodine (Obr. 3).

Explantáty ako animálne modely sa využívajú na štúdium fyziológie a patológie nielen u cicavcov.

Tento systém umožňuje sledovať rôzne funkcie samotného čreva, ale aj farmatokinetiku látok (Fedi a kol., 2021), bariérovú funkciu čreva (Way a kol., 2024) ako aj mnohé iné. Avšak napriek intenzívnemu výskumu v oblasti včelej mikrobioty a črevnej imunity je zatiaľ len limitované množstvo publikácií zaoberajúcich sa včelími črevnými modelmi, ako aj ich využitím na skúmanie imunity a vplyvu rôznych látok na imunitnú reakciu včely medonosnej.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 07/2025 „In vitro črevný model ako nástroj skúmania vplyvu látok prírodného pôvodu u *Oncorhynchus mykiss* a *Apis mellifera*“.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Costa CM. et al. A Critical Review on In Vitro and Ex Vivo Models of the Intestinal Epithelium of Humans and Monogastric Animals. In *Gastrointestinal Disorders*

Fedi, A. et al. In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. In *Journal of Controlled Release*. 2021,.

Kiššová, Z. et al. Research note: utilizing a novel chicken ileal explant model to assess the efficacy of probiotic *Limosilactobacillus reuteri* CCM 9425 against *Salmonella* Enteritidis infection. In *Poultry Science*. 2025.

Kothari, A. et al. Isolating Rat Intestinal Explants for In Vitro Cultures. In *Current Protocols in Toxicology*. 2019.

Lanzerstorfer, P. et al. Acute, reproductive, and developmental toxicity of essential oils assessed with alternative in vitro and in vivo systems. In *Archives of Toxicology*. 2021.

Mátis, G. et al. Miniature chicken ileal explant culture to investigate the inflammatory response induced by pathogen-associated molecular patterns. In *Frontiers in Veterinary Science*. 2025.

Reisinger, N. et al. Porcine intestinal explants as ex vivo/in vitro model to study gastrointestinal disease. In *Journal of Animal Science*. 2016.

Way, R. et al. A microphysiological system for studying barrier health of live tissues in real time. In *Communications Engineering*. 2024.

EPIZOOTOLOGICKÝ PRIESKUM
ANAPLASMA SPP. U DOMÁCICH PREŽÚVAVCOV NA SLOVENSKU
*Kostičák M.¹, Hudáková K.¹, Drážovská M.¹, Ondřejková A.¹, Korytár L.¹, Lipinský J.¹,
Petrůšková P.¹, Pelegrinová A.¹, Ješík J.², Prokeš M.¹*

¹Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF v Košiciach

²Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo zhodnotiť výskyt *Anaplasma* spp. u domácich prežúvavcov využitím sérologickej a molekulárnej diagnostiky. Analyzovaných bolo 384 vzoriek séra a 408 vzoriek plnej krvi. Sérologicky (cELISA) bola zistená prevalencia protilátok proti *Anaplasma* spp. u 70 % oviec, u 43 % kôz a u 10 % hovädzieho dobytku. Metódou nested PCR sme detegovali DNA *Anaplasma* spp. u 10 % oviec a 12 % kôz. Sekvenčné analýzy 16S rRNA potvrdili prítomnosť *Anaplasma phagocytophilum*. Získané výsledky potvrdili cirkuláciu *A. phagocytophilum* u malých prežúvavcov na Slovensku a zdôrazňujú potrebu ďalšieho monitoringu v rámci prístupu *One Health*.

ÚVOD

Rod *Anaplasma* zahŕňa intracelulárne baktérie prenášané prevažne kliešťami. Medzi významné druhy patria *A. marginale*, *A. centrale*, *A. ovis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys* a *A. bovis* (Dumler a kol., 2001). Dôležitým zástupcom rodu je *A. phagocytophilum*, u zvierat spôsobuje tzv. *tick-borne fever* a u ľudí granulocytárnu anaplazmózu. Prenos baktérie v Európe zabezpečuje predovšetkým kliešť *Ixodes ricinus* (Stuenkel a kol., 2013). Zistenie nových taxónov so zoonotickým potenciálom (napr. *A. capra*) v Ázii zvýraznilo potrebu molekulárnej diagnostiky pri epizootologických prieskumoch a hodnotení rizika v rámci koncepcie *One Health* (Li a kol., 2015). Environmentálne faktory ako klíma, vegetačný kryt, typ chovu a prítomnosť voľne žijúcej zveri a kliešťov významne zvyšujú rizika prenosu *Anaplasma* spp. na domáce zvieratá a ľudí (Gray a kol., 2009).

MATERIÁL A METODIKA

V rokoch 2023 – 2025 bolo v rôznych okresoch Slovenska odobratých 384 vzoriek krvi na prípravu séra, od 124 oviec, 104 kôz a 156 ks hovädzieho dobytku a 408 vzoriek plnej krvi (s EDTA) od 148 oviec, 104 kôz a 156 ks hovädzieho dobytku.

Sérologická diagnostika

Na detekciu špecifických protilátok proti *Anaplasma* spp. sme použili kompetitívnu ELISA metódu s využitím *Anaplasma Antibody Test Kit*, cELISA v2 (VMRD, USA) podľa protokolu výrobcu.

Molekulárna diagnostika (nested PCR — 16S rRNA)

DNA sme izolovali z krvi komerčným kitom DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Germany) a následne sme použili nested PCR protokol cielený na 16S rRNA gén rodu *Anaplasma*. Primery:

- ACn-16S-F1 (5' CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC 3')
- ACn-16S-R1 (5' TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC 3')
- ACn-16S-F2 (5' AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT 3')
- ACn-16S-R2 (5' GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG 3')

Očakávaná veľkosť produktu po druhej reakcii bola: ≈546 bp. Pozitívne amplikóny sme vizualizovali na agarózovom géli, purifikovali a odoslali na sekvenovanie. Použitie nested PCR zvyšuje citlivosť pri nízkych titroch DNA a je bežné pri detekcii intracelulárnych patogénov v krvi. Sekvencie sme spracovali a porovnali prostredníctvom BLASTn (NCBI).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Z 384 vzoriek séra sme ELISA metódou diagnostikovali špecifické protilátky proti *Anaplasma* spp. u 70 % oviec (87/124), 43 % kôz (45/104) a u 10 % jedincov hovädzieho dobytku (17/156) (Tab. 1). Nested PCR metódou sme potvrdili prítomnosť DNA *Anaplasma* spp. u 10 % oviec (14/148) a 12 % kôz (12/104). Krvné vzorky z hovädzieho dobytku boli všetky PCR negatívne. Sekvenačné analýzy 16S rRNA (n = 26) ukázali 20 sekvencií s 100 % identitou a 6 sekvencií so 99,7 % zhodou s *A. phagocytophilum*.

Druh zvierat'a	cELISA		nested PCR	
	počet vzoriek	pozitívne	počet vzoriek	pozitívne
Ovce	124	87 (70 %)	148	14 (10 %)
Kozy	104	45 (43 %)	104	12 (12 %)
Hovädzí dobytok	156	17 (10 %)	156	0 (0 %)

Tab. 1. Výsledky sérologickej a molekulárnej diagnostiky *Anaplasma* spp. u domácich prežívavcov

Nami získané výsledky sérologickej diagnostiky prítomnosti špecifických protilátok proti *Anaplasma* spp. u 70 % oviec a 43 % kôz korešpondujú so štúdiou Torina a kol. (2007) zo Sicílie, kde zachytili protilátky u 69,6 % oviec 45,5 % kôz. V Nemecku sa preukázala vysoká expozícia *Anaplasma* spp. v mnohých stádach (Rubel a kol., 2021), čo zodpovedá regionálnej variabilite (niektoré okresy až takmer 100 %) na Slovensku. V štúdii Chochlakis a kol. (2009) z Cypru boli publikované výsledky nižšie séroprevallencie (u oviec 31 % a u kôz 18 % prípadov) v porovnaní s našimi zisteniami, čo môže byť aj v dôsledku použitia rozdielnej sérologickej metodiky (IFA) alebo predpokladanej nižšej expozície zvierat kliešťami.

V Turecku v provincii Niğde zistili Karatepe a kol. (2025) dokonca 69,4 % PCR-pozitívnych oviec a 44,7 % kôz, čo výrazne presahuje nami zistené hodnoty 10 – 12 %, čo môže poukazovať na niektoré oblasti s masívne rozšírenou aktívnou infekciou zvierat. Naopak Silaghi a kol. (2011) vo Švajčiarsku detegovali *A. phagocytophilum* metódou PCR len u 4 kusov z 373 testovaných kôz. Dokumentované rozdiely medzi krajinami zdôrazňujú regionálne špecifiká enzootických ohnisk a dôležitosť lokálnych epizootologických prieskumov.

Rozdiel medzi vysokou séropozitivitou a relatívne nízkou PCR-pozitivitou zistený v našej práci je v súlade s poznatkami Stuen a kol. (2013), ktorí poukazujú na to, že sérologické testy zachytávajú dlhodobú expozíciu, kým PCR len aktuálnu bakteriémiu. Regionálna heterogenita, keď v niektorých okresoch dosiahla séroprevallencia takmer 100 %, zatiaľ čo v iných bola nízka alebo nulová, zodpovedá publikovaným údajom z Európy, kde lokálne podmienky zásadne ovplyvňujú výskyt anaplaziem (Gray a kol., 2009).

Sekvenačné výsledky potvrdzujú, že v detegovaných pozitívnych vzorkách dominoval druh *A. phagocytophilum*, čo je významné z dôvodu jeho zoonotického charakteru (Almazán a kol., 2020)

ZÁVER

Epizootologický prieskum potvrdil enzootickú cirkuláciu *Anaplasma* spp. u malých domácich prežívavcov na Slovensku, s výraznou regionálnou heterogenitou. Kombinácia sérologických a molekulárnych metód poskytla komplexný obraz expozície a prítomnosti baktérií. Výsledky majú význam aj z hľadiska hodnotenia zoonotického rizika a prevencie nákazy pre človeka v rámci koncepcie *One Health*.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 03/2025 „Identifikácia a výskyt Anaplasma capra u hospodárskych a voľne žijúcich zvierat na území Slovenskej republiky“.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Almazán C, et al. Experimental Ixodes ricinus–sheep cycle of Anaplasma phagocytophilum NV2Os propagated in tick cell cultures. Front Vet Sci. 2020; 6;7:40.

Dumler JS, et al. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(6):2145-2165.

Gray JS, et al. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;2009:593232.

Chochlakis D, et al. Prevalence of Anaplasma sp. in goats and sheep in Cyprus. Vector Borne Zoonotic Dis. 2009;9(5):457-463.

Silaghi C, et al. PCR detection of Anaplasma phagocytophilum in goat flocks in an area endemic for tick-borne fever in Switzerland. Parasite. 2011;18(1):57-62.

Karatepe M, et al. Investigation of Anaplasma species with veterinary and public health significance in sheep and goats. Acta Parasitol. 2025;70(3):114.

Li H, et al. Human infection with a novel tick-borne Anaplasma species in China: a surveillance study. Lancet Infect Dis. 2015;15(6):663-670.

Rubel F, et al. Seroprevalence and risk factors of Anaplasma spp. in German small ruminant flocks. Animals (Basel). 2021;11(10):2793.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:31.

Torina A, et al. Observed prevalence of tick-borne pathogens in domestic animals in Sicily, Italy during 2003-2005. Zoonoses Public Health. 2007;54(1):8-15.

EFFECT OF THYMOL ENTEROSOLVENT GASTRORESISTANT PELLETS ON RABBITS' INTESTINAL INTEGRITY AND MICROBIOTA

Kristofova R.^{1,2}, Zitterl-Eglseer K.³, Capucchio M. T.^{4,5}, Ippolito D.⁴, Gai F.⁵, Cikos S.¹, Spirkova A.¹,
Laukova A.¹, Pogany Simonova M.¹, Placha I.¹

¹Centre of Biosciences, Slovak Academy of Sciences, Institute of Animal Physiology, Kosice, Slovakia

²University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Slovakia

³Centre for Veterinary Systems Transformation and Sustainability, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria

⁴Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Italy

⁵National Research Council of Italy, Institute of Sciences of Food Production, Turin, Italy

ABSTRACT

Bioactive compounds from medicinal plants, such as thymol, have gained increasing importance in recent decades due to their broad therapeutic effects and benefits to animal health. To enhance the oral bioavailability of thymol and improve its absorption in the rabbit organism, encapsulation was applied to achieve its targeted release in the small intestine, where absorption is the most intensive. Thymol-containing pellets were coated with an enterosolvent, gastro-resistant film specifically designed under the biological and physiological characteristics of the rabbit gastrointestinal tract. The experimental diet was supplemented with the gastro-resistant form of thymol at a concentration of 250 mg/kg, while the control group received only the basal diet. Rabbits were fed the thymol-supplemented diet for 21 days, followed by a withdrawal period of 7 days. The gastro-resistant form of thymol enabled targeted release in the duodenum and jejunum, preventing gastric degradation and maintaining stable concentrations throughout the gastrointestinal tract via caecotrophy and biotransformation. It preserved intestinal morphology, tended to improve the villus height to crypt depth ratio, exhibited antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, and enhanced caecal fermentation. These findings indicate that stabilized thymol formulations are a promising strategy to optimize oral bioavailability and gut health in rabbits.

INTRODUCTION

Following the ban on antibiotic growth promoters in the veterinary sector, increasing attention has been directed towards phytogetic additives as natural alternatives that could support animal health and performance without undesirable side effects. Within this context, our research has focused on thymol, a major bioactive compound of *Thymus vulgaris*, widely recognized for its antimicrobial, antioxidative, and modulatory effects on gastrointestinal physiology. Despite its potential, the precise mechanisms governing the absorption, metabolism, tissue distribution, and interactions with intestinal microbiota in rabbits remain poorly understood (Placha et al. 2022). Previous studies have suggested beneficial effects of thymol on gut health, however, information regarding its effects on intestinal morphology and integrity, absorption, fermentation and biotransformation processes in the rabbit gastrointestinal tract remains limited. Moreover, the interaction between thymol concentration, microbial composition, and metabolite production have not been fully elucidated. Rabbits provide a relevant model for such investigations due to their distinctive digestive physiology, including caecotrophy and extensive microbial fermentation, which allows detailed assessment of plant compound metabolism. Our study aimed to investigate the absorption, distribution, and metabolic pathways of the gastro-resistant form of thymol on intestinal morphology, tight junction gene expression, and microbiota composition in rabbits, thereby highlighting its functional role in gut health.

MATERIAL AND METHODS

After weaning at 35 days of age, 48 rabbits of both sexes were randomly divided into two groups, a control group receiving a basal diet (BD) and an experimental group fed the BD supplemented with coated self-emulsifying pellets of thymol at a concentration of 250 mg/kg for 21 days, followed by a withdrawal period of 7 days. Nine rabbits were sacrificed after 21 days (56 days of age) and 28 days (63 days of age), and blood, intestinal wall and tissues, and faeces were collected. Samples for thymol analysis were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C until further processing. Detection of thymol in plasma, intestinal wall and tissues, and faeces was performed using headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry, as described by Bacova et al. (2021). For histomorphometry, duodenum and jejunum were flushed with saline, and villus height, crypt depth, and villus height/crypt depth ratio were measured (Dabbou et al., 2018). Intestinal barrier integrity was assessed by qPCR analysis of tight junction genes (occludin, claudin-1, mucin-1, JAM2, JAM3, ZO-1), normalized to GAPDH. Microbiota composition was evaluated from faeces, caecum, and appendix content (1 g each) by ISO-recommended serial dilutions in Ringer solution, cultivation on selective agars at 37°C for 24–48 h (Pogany Simonova et al. 2020). Representative colonies were confirmed by MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Organic acids (lactic, acetic, propionic, butyric) in caecal content were analysed by gas chromatography (Perkin Elmer, USA). Data distribution was tested with the Kolmogorov-Smirnov test. Differences in thymol concentrations were analysed by Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test, correlations by Spearman's rank coefficient (r_s). Effect of thymol on morphometry, gene expression, microbiota composition, and organic acids were evaluated using two-way data analysis. Data are presented as mean $\pm$ SEM; $P < 0.05$ was considered significant (GraphPad Prism version 10.4.2 for Windows). ŠVPS approval number: 1046/2023.

RESULTS

Thymol concentration was in balance throughout the intestinal tract during both periods. During the administration, thymol in DW was 1,4x higher than in the jejunum; 1,3x higher than in the colon; 1,7x higher than in the caecum. During the withdrawal, thymol in the DW was 1,1x higher than in the jejunum; 1,3x higher than in the colon; 1,9x higher than in the caecum. Thymol in plasma correlated significantly with DW during administration ($r_s = 0.9429$, $P < 0.05$). Thymol decreased crypt depth in the DW, reduced JAM3 expression in the JW; reduced lactic acid bacteria (LAB) in the appendix and caecum, decreased coagulase-positive (CoPS), coagulase-negative staphylococci (CoNS), and increased coliforms in the caecum and faeces; and elevated propionic and lactic acid levels in the caecum.

DISCUSSION

The relatively balanced thymol concentration throughout the intestinal tract during both the administration and withdrawal periods suggests that the applied gastro-resistant form of thymol ensured controlled release and distribution of thymol along the gastrointestinal tract, thereby enhancing its absorption and bioavailability. Moreover, a significant correlation ($r_s = 0.9429$, $P < 0.05$) was observed between thymol content in plasma and DW, indicating intensive absorption from the intestine. Similarly, Bacova et al. (2020) reported a significant correlation in their study; however, unlike our results, the thymol concentrations were not in balance, as they applied thymol in powder form. This comparison highlights that the gastro-resistant formulation not only facilitated continuous thymol release throughout the intestinal tract but also allowed its subsequent biotransformation processes within the intestinal wall. Thymol significantly reduced crypt depth in the DW, which may improve absorptive capacity. Similar observations were reported by Guo et al. (2021), who linked reduced crypt depth in the jejunum to improved intestinal morphology. Analysis of tight junction genes revealed a significant effect

of thymol on the expression of the adhesion molecule JAM3 in the jejunum. Nagoor Meeran et al. (2017) demonstrated that thymol can reduce pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α , which are key mediators of inflammation. JAM3 is typically upregulated in response to these cytokines. We suggest that thymol decreased inflammatory signaling by lowering cytokine levels, which reduced JAM3 expression. Thymol administration also modulated the microbial profile of the rabbit intestine. We observed reduced levels of LAB in the appendix and caecum, decreased CoPS in the caecum, and CoNS in the caecum and faeces. We suggest that these changes were caused by thymol's hydrophobic interactions with the lipid membranes of Gram-positive bacteria, leading to disruption of their cellular structures (Placha et al. 2021). In contrast, an increase in coliform bacteria in the caecum and faeces was observed, which may reflect the stronger membrane structure of Gram-negative bacteria (Kachur and Suntres, 2019). We also observed significantly elevated levels of propionic and lactic acids, indicating enhanced microbial fermentation activity in the caecum. We suggest that thymol improves the metabolic efficiency of LAB, thereby supporting fermentation processes critical for gut health, as also demonstrated by Placha et al. (2021). In conclusion, these findings suggest that stabilised thymol formulations represent a promising strategy to enhance its oral bioavailability in rabbits.

ACKNOWLEDGEMENTS

The current experiment was financed with funds from the Vega 2/0005/24, Action Austria-Slovakia (MPC-2023-01046), CNR-SAS-2022-02, Open-Mob-2022-01 and COST CA22109.

REFERENCES

- Bacova K, et al. Effect of Sustained Administration of Thymol on Its Bioaccessibility and Bioavailability in Rabbits. *Animals*. 2021; 11:2595.
- 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.
- Dabbou S, et al. Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features. *J. Anim. Sci. Biotechnol*. 2018; 9:9:49.
- Guo S, et al. Modulation of intestinal morphology and microbiota by dietary *Macleaya cordata* extract supplementation in Xuefeng Black-boned Chicken. *Animal*. 2021; 12:100399.
- Kachur, K., and Suntres, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. 2020; *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60:3042–3053.
- Nagoor Meeran, M. F., et al. Pharmacological properties and molecular mechanisms of thymol: prospects for its therapeutic potential and pharmaceutical development. *Front Pharmacol*. 2017; 8:380.
- 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. Thymol in fattening rabbit diet, its bioavailability and effects on intestinal morphology, microbiota from caecal content and immunity. 2021; *J Anim Physiol Anim Nutr*, 106:368–377.
- Pogany Simonova, M., et al. Can enterocin M in combination with sage extract have beneficial effect on microbiota, blood biochemistry, phagocytic activity and jejunal morphometry in broiler rabbits? 2020; *Animals*, 10:115.

VPLYV KÁVOVEJ USADENINY BOHATEJ NA BIOAKTÍVNE ZLÚČENINY NA BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A ANTIHELMINTICKÚ AKTIVITU *IN VITRO*

Leško M.¹, Várady M.²

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

²Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bola kvantifikácia bioaktívnych zlúčenín etiópskej kávy (ETH), použitej kávovej usadeniny etiópskej kávy (SCG-ETH) a zmiešanej použitej kávovej usadeniny (SCG-MIX) z filtračných metód prípravy kávy. Hodnotili sme vplyv SCG na bachorovú fermentáciu a posúdili antihelmintickú aktivitu vodného extraktu ETH. Na meranie bachorových fermentačných parametrov substrátov bola použitá metóda 24 hodinovej inkubácie *in vitro* a technika merania produkcie plynu. Lúčne seno a jačmeň (MH-BG), MH-SCG-ETH a BG-SCG-ETH (1:1, w/w) boli použité ako fermentačné substráty. Celkové bioaktívne zlúčeniny boli kvantifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie s ultravysokým rozlíšením s najvyššou koncentráciou zaznamenanou u SCG-ETH (35,2 mg/g sušiny) a nižšími koncentraciami u SCG-MIX (31,2 mg/g) a ETH (20,9 mg/g). V porovnaní s MH-BG, substráty MH-SCG-ETH a BG-SCG-ETH mali približne o 20 - 40 % nižšiu koncentráciu metánu *in vitro*, avšak stráviteľnosť MH-SCG-ETH a BG-SCG-ETH substrátov bola signifikantne vyššia ($p < 0,001$). Na vyhodnotenie antihelmintického účinku sme vykonali test vývoja larií endoparazita malých prežúvavcov *Haemonchus contortus* pomocou vodného extraktu ETH, ktorý vykazoval silnú larvicídnu aktivitu s priemernou letálnou koncentráciou 13,2 mg/ml pre 50 % mortalitu a 31,9 mg/ml pre 99 % mortalitu. Výsledky naznačujú, že substráty s obsahom SCG môžu ovplyvňovať fermentáciu v bachorovej tekutine a môžu byť zároveň aj sľubným zdrojom bioaktívnych zlúčenín s antihelmintickým účinkom u malých prežúvavcov.

ÚVOD

Káva je jedným z najrozšírenejších nápojov na svete a jej produkcia aj spotreba sa v posledných desaťročiach výrazne zvýšila, najmä v súvislosti s rozvojom trhu s výberovou kávou. Na rozdiel od komerčných (konvenčných) káv, výberová káva sa vyrába štandardizovaným spôsobom, ktorý sa vyznačuje kvalitou a jedinečnosťou pôvodu, čo zahŕňa kritériá používané od výberu kávových plantáží až po metódy prípravy kávového produktu. Použitá kávová usadenina (SCG) je hlavným vedľajším produktom prípravy kávy, ktorý vzniká pri rôznych metódach jej prípravy. Pri spracovaní kávy vzniká približne 0,65 kg odpadu z 1 kg zelenej kávy a približne 2 kg mokrého odpadu z 1 kg instantnej kávy (Campos-Vega a kol., 2015). SCG sa však dá zhodnotiť a opätovne použiť, čím sa zvyšuje udržateľnosť obehového hospodárstva zlepšením nakladania s odpadom v kávovom priemysle (Ahmed a kol., 2024). SCG je bohatá na živiny a bioaktívne zlúčeniny, je zdrojom vlákniny, bielkovín, polyfenolov a lipidov, hlavne polynenasýtených mastných kyselín (Choi et al., 2018). Vzhľadom na vysoký obsah bioaktívnych látok v SCG sme predpokladali, že SCG z filtrovaných výberových káv použitá ako náhrada krmiva by mohla významne ovplyvniť bachorovú fermentáciu prežúvavcov a pomôcť zmierniť aj produkciu enterického metánu ako skleníkového plynu. Preto sme použili etiópsku výberovú kávu (ETH) pripravenú filtračnými metódami a SCG-ETH a SCG zo zmesi výberových káv (SCG-MIX). Naším cieľom bolo kvantifikovať bioaktívne zlúčeniny v ETH, SCG-ETH a SCG-MIX, určiť vplyv SCG-ETH na bachorovú fermentáciu a metánovú produkciu *in vitro* a vyhodnotiť antihelmintický účinok vodného extraktu ETH *in vitro*.

MATERIÁL A METODIKA

Bachorová tekutina bola odobratá od šiestich oviec (Cigája, 10 mes., $32,7 \pm 3,45$ kg) a zmiešaná v pomere 1:2 s McDougallovým pufrom. SCG z výberovej etiópskej filtrovanej kávy (*Coffea arabica*, Ethiopia Konga Natural, Yirgacheffe, Gedeo) a iných zmiešaných výberových káv

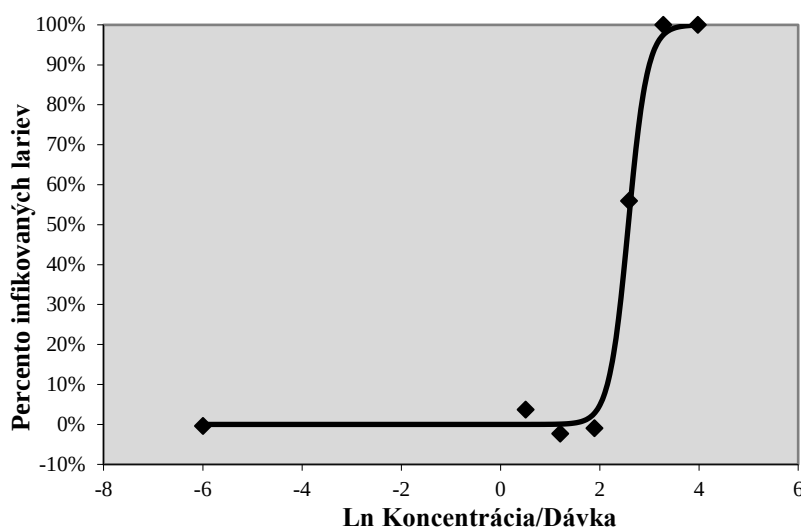
(SCG-MIX) sa sušila 24 hodín pri 40 °C do konštantnej hmotnosti. Zloženie substrátov sa analyzovalo podľa štandardných metód a polyfenoly sa identifikovali pomocou hmotnostnej spektrometrie s ultravysokým rozlíšením. Testovali sa tri substráty: lúčne seno a jačmeň (MH-BG), MH-SCG-ETH a BG-SCG-ETH. Každý substrát (0,25 g) sa inkuboval s pufrovanou bachorovou tekutinou v inkubačných fľašiach (100 ml) pri 39 °C počas 24 hodín v anaeróbných podmienkach. Inkubácie sa uskutočnili v troch opakovaniach počas troch po sebe nasledujúcich dní ($n = 3 \times 3$). Fermentačné merania zahŕňali analýzy stráviteľnosti sušiny *in vitro*, produkcie plynov, hlavne metánu, koncentrácie unikavých mastných kyselín (plynová chromatografia), pH, amoniakálny dusík a počet bachorových prvokov. Na zistenie antihelmintickej aktivity bol použitý izolát *Haemonchus contortus* citlivý na antihelmintiká, ktorý bol získaný od oviec. Na test vývoja lariiev *H. contortus* bol použitý roztok vodného kávového extraktu, ktorý sa sériovo riedil v pomere 1:2 s destilovanou vodou, čím sa získalo 12 rôznych koncentrácií. Larvicídna aktivita (LDT) sa stanovila výpočtom strednej letálnej dávky (LD50 alebo LD99), ktorá predstavuje koncentráciu vodného kávového extraktu potrebnú na zabránenie 50 %, resp. 99 % lariiev vo vývoji do infekčného štádia L3 (Váradyová a kol., 2018). Na štatistické vyhodnotenia bola použitá jednocestná ANOVA (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Dáta LDT boli analyzované pomocou štatistického logistického regresného modelu na stanovenie LD50 a LD99.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkový obsah bioaktívnych zlúčenín bol v SCG-ETH vyšší ako v SCG-MIX a ETH. Cykly varenia kávy však môžu zvýšiť obsah vlhkosti a pórovitosť v SCG a vyvolať uvoľňovanie väčšieho množstva bioaktívnych zlúčenín a navyše etiópske kávy patria medzi kávy najvyššej kvality (Várady a kol., 2024). Avšak všetky tri vzorky vykazovali potenciálne biologické aktivity s priaznivými účinkami na zdravie hlavne vďaka bioaktívnym izomérom kyseliny chlorogénovej. Hodnoty meraných fermentačných parametrov, metánu ($p < 0,001$), stráviteľnosti ($p < 0,001$), pH ($p < 0,001$), ako aj celkového počtu prvokov ($p = 0,002$) sa medzi testovanými substrátmi líšili (Tab. 1). Bachorové prvoky môžu ovplyvniť diverzitu bachorových baktérií a fermentačných produktov, čo naznačuje, že SCG môžu slúžiť ako sľubné substráty na moduláciu bachorovej fermentácie. Zároveň sa významne znížili emisie metánu z bachorovej fermentácie keď sa SCG použila ako náhrada sena alebo koncentrátového krmiva. Toto zistenie je v súlade s predchádzajúcou štúdiou, kde SCG v krmive významne znížilo produkciu metánu o 12,9 % (Batbekh a kol., 2023). Na druhej strane sa ovicídny a larvicídny účinok vodných extraktov ETH prejavil už po 48 h inkubácie. Priemerné liahnutie vajíčok bolo v kontrolných jamkách približne 96 %, ale pri koncentráciách extraktu 1,66 - 6,66 mg/ml sa liahnutie pohybovalo len medzi 0 a 20 %. Je pozoruhodné, že hoci sa larvy L1 nevyliarli po 48 h pri koncentráciách 1,66 - 6,66 mg/ml, boli sformované, pohyblivé a plne embryonované a väčšina z nich po 7 dňoch dosiahla štádium L3. Na druhej strane sa však 90 – 95 % lariiev vyliarlo pri vyšších koncentráciách 13,3 - 53,2 mg/ml, ale väčšina z nich nedosiahla infekčné štádium L3 (Graf 1). Avšak použitie substrátov s bioaktívnymi zlúčeninami, a to aj tých s najlepšimi antihelmintickými vlastnosťami *in vitro*, nemusí mať dostatočné účinky *in vivo*. Náš výskum poukázal na potenciál použitej kávovej usadeniny z filtrovanej výberovej kávy ako náhrady krmiva pre prežúvavce, ale *in vivo* pokusy sú nevyhnutné na potvrdenie účinku SCG ako alternatívneho zdroja krmiva s antimetanogénnym a antihelmintickým účinkom.

	MH-BG	MH-SCG-ETH	BG-SCG-ETH	<i>p</i>
Metán (mmol/l)	5.12 ± 0.56 ^c	2.98 ± 0.66 ^a	3.80 ± 0.15 ^b	< 0.001
Stráviteľnosť <i>in vitro</i> (g/kg DM)	534 ± 1.98 ^a	545 ± 2.98 ^b	543 ± 2.37 ^b	< 0.001
pH	6.77 ± 0.07 ^a	6.68 ± 0.07 ^a	6.88 ± 0.10 ^b	< 0.001
Celkové UMK (mmol/l)	44.6 ± 3.06	47.6 ± 6.19	47.5 ± 2.14	0.233
Celkový počet prvokov (10 ³ /ml)	108 ± 52.6 ^b	66 ± 36.2 ^a	61 ± 39.7 ^a	0.002

Tab. 1. Vplyv substrátov na fermentačné parametre (priemer ± SD). MH-BG, lúčne seno a jačmeň, MH-SCG-ETH, lúčne seno s kávovou usadeninou z etiópskych výberových káv, BG-SCG-ETH, jačmeň s SCG-ETH, UMK, unikavé masťné kyseliny. Významné rozdiely v rámci premenných sú označené rôznymi písmenami (*p* < 0,05).



Graf 1. Vzťah medzi dávkou (prirodzený logaritmus, Ln) a účinkom vodného extraktu etiópskej kávy proti vývoju lariev *H. contortus* po siedmich dňoch inkubácie pri 26 °C.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektami PostdokGrant APD0032 a VEGA 2/0007/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahmed H, et al. Toward circular economy: potentials of spent coffee grounds in bioproducts and chemical production. *Biomass* 2024;4(2):286–312.
- Batbekh B, et al. Assessment of the impact of coffee waste as an alternative feed supplementation on rumen fermentation and methane emissions in an *in vitro* study. *Fermentation* 2023;9:858.
- Campos-Vega R, et al. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends Food Sci Technol.* 2015;45:24–36.
- Choi Y, et al. Effects of dietary fermented spent coffee ground on nutrient digestibility and nitrogen utilization in sheep. *Asian Australas J Anim Sci.* 2018;31:363–368.
- Várady M, et al. Fatty acid composition and sensory properties as descriptors of differentiation of specialty coffees based on spontaneous and induced processing methods. *Appl Food Res.* 2024;4:100512.
- Váradyová Z, et al. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Exp Parasitol.* 2018;195:71–77.

VÝVOJ NEUTRALIZUJÚCICH VYSOKO DIVERZITNÝCH CDR3 Z JEDNODOMÉNOVÝCH PROTILÁTK VOČI VÍRUSU KLIŠŤOVEJ ENCEFALITÍDY

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

¹Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

²Neuroimunologický ústav, Slovenská akadémia vied, v.v.i., Bratislava

³Katedra chovu a chorôb zveri, rýb a včiel, ekológie a kynológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Táto štúdia detailne popisuje vývoj neutralizujúcich peptidov voči vírusu kliešťovej encefalitídy (TBEV). Vysoko diverzná CDR3 knižnica, vytvorená z *in vitro* imunizovaných lymfocytov lamy, bola podrobená fágovému paningu voči DIII doméne E proteínu vírusu. Tento selekčný proces izoloval jedinú dominantnú peptidovú sekvenciu (N'YYCAKLRGTNFWGWDAGMDYWCQGT-C'). Syntetizovaný peptid, testovaný ako fúzny proteín CDR3-GFP, preukázal silnú, netoxickú vírusovú neutralizáciu, pričom najúčinnější klon vykazoval EC50 138 ng/ml. Tento peptid predstavuje sľubného kandidáta pre vývoj terapeutík proti TBEV.

ÚVOD

Vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV) je neurotropný flavivírus, schopný prenikať skrz hematoencefalickú bariéru (HEB) a spôsobovať infekcie centrálného nervového systému (Pranclova a kol. 2024). Genóm TBEV je tvorený 11 kb RNA vláknom pozitívnej polarita, obsahujúcim 1 ORF, ktorý kóduje 1 polyproteín tvoriaci 3 štrukturálne proteíny a 7 neštrukturálnych proteínov (Formanová a kol. 2015). Súčasné experimentálne prístupy vo vývoji terapeutík proti TBEV sa zameriavajú na štrukturálne proteíny (Bifani a kol. 2023). Obalový proteín (E proteín) zohráva kľúčovú úlohu pri flavivírusovej infekcii (Zhang, Xu a Liu 2015). Zmena jeho konformácie môže viesť k zvýšeniu alebo zníženiu infekčnosti vírusu (Hu a kol. 2021). Hlavnou doménou E proteínu je DIII, ktorá zabezpečuje interakciu s endotelovými bunkami mikrociev mozgu (BMEC) a vstup vírusu do bunky (Bhide a kol. 2022). Jednou z hlavných výziev pri vývoji nových liečiv proti infekciám CNS je zabezpečiť ich prienik cez HEB - najneprepustenejšou bariérou v ľudskom tele (Lochhead a kol. 2020). Viac než 99 % vyvinutých terapeutických látok nedosiahne v mozgu koncentráciu potrebnú na elimináciu infekcie (Newton 2019). Jednou z použitých stratégií je zníženie ich molekulovej hmotnosti. Nanoprotilátky (Nb) sú efektívnejšie v penetrácii do tkanív (Jin a kol. 2023). CDR3 oblasť nanoprotilátok je kľúčová pre interakciu s epitopmi antigénov (Truong a kol. 2022). Vývoj CDR3 peptidov zameraných na epitopy E proteínu môže modifikovať jeho konformáciu a viesť k neutralizácii vírusu.

MATERIÁL A METODIKA

Lymfocyty odobrané z lamy krotkej (*Lama glama*) boli imunizované *in vitro* rekombinantou rDIII doménou E proteínu TBEV (Bhide a kol. 2022) (Comor a kol. 2017). Z lymfocytov bola následne extrahovaná RNA, ktorá slúžila ako templát na prepis do cDNA. CDR3 oblasť bola amplifikovaná pomocou degenerovaných primérov. Amplifikované CDR3 gény boli klonované do pSEX81 fagemidu (Progen, Nemecko) a rekombinantný fagemid bol elektroporovaný do *E. coli* XL-1 Blue. Variabilita CDR3 sekvencií vyprodukovanej CDR3-*E.coli* knižnice bola testovaná sekvenovaním a následne infikovaná Hyperfágom M13 KO7 ΔpIII (Progen, USA), ako popisuje naša publikácia (Hruškovcová a kol. 2022). Amplifikovaná CDR3-fágová knižnica bola podrobená 3 kolám paningov na fixovanom TBEV Hypr víruse. Diverzita fágov

bola testovaná z hľadiska variability CDR3 sekvenovaním fágov po 2. a 3. paningu. Interakcia eluovaných fágov s inaktivovaným TBEV bola po každom kole paningu overená pomocou ELISA testu. Z vyselektovaných po poslednom kole panningu, bola izolovaná ssDNA, ktorá bola použitá na produkciu CDR3-GFP fúzovaných proteínov. Selektovaných bolo 24 najlepšie rastúcich klonov a CDR3-GFP proteíny boli následne purifikované. CDR3-GFP boli testované z hľadiska interakcie s rDIII doménou a TBEV pomocou ELISA a dot-blot testov. Proteíny, s najsilnejšiou interakciou (5) s rDIII doménou, fixovaným TBEV Hypr vírusom a s minimálnou nešpecifickou interakciou, boli produkované vo väčšom množstve v *E. coli* T5 Shuffle a purifikované. Toxicita CDR3-GFP proteínov bola testovaná na obličkových bunkách mláďat škrečka (BHK21). Koncentrácie CDR3-GFP, ktoré neinhibovali proliferáciu boli použité vo vírus neutralizačnom teste (VNT). Najlepšie neutralizujúce CDR3-GFP boli podrobené plak-redukčnému neutralizačnému testu (PRNT). PTJ boli spočítané v každej jamke a koncentrácia CDR3-GFP potrebná pre neutralizáciu 50 % plakov, určená na základe redukcie počtu plakov vzhľadom k vírusovej kontrole.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Klonovaním CDR3 génov v pSEX81 fagemide do *E. coli* XL1 Blue bola vytvorená CDR3-*E. coli* knižnica so 100% variabilitou. Knižnica bola infikovaná Hyperfágom M13 KO7 ΔpIII. Sekvenované CDR3-fágy vykazovali po 2. kole paningu variabilitu 75%, zatiaľ čo po 3. kole panningu iba 7% variabilitu. Najviac zastúpenou sekvenciou bola – N-YYCAKLRTNWFWDAGMDYWCQGT-C. Interakcia eluovaných fágov s rDIII doménou E proteínu TBEV Hypr vírusu, bola testovaná po každom kole paningu ELISA testom. CDR3-fágy po 1. kole paningu vykazovali interakciu – 1,37_{A450nm}, po 2. kole – 3,80_{A450nm} a po 3. kole – 3,82_{A450nm}. Izolovaná ssDNA z CDR3-fágov po poslednom kole paningov bola použitá na amplifikáciu CDR3 génov a ich klonovanie do *E. coli* T5 Shuffle za účelom zvýšenej produkcie CDR3-GFP fúzovaných proteínov. Celkovo bolo selektovaných 24 klonov. Z dôvodu nízkej výťažnosti (123,1 μg/ml) bol klon CDR3TC4, vylúčený. Ostatných 23 CDR3-GFP bolo testovaných z hľadiska afinity k rDIII doméne a k fixovanému TBEV Hypr vírusu. Prvým skríningom prešlo 12 CDR3-GFP s interakciou vyššou ako 3,78_{A450nm} a bez nešpecifickej interakcie s plastom. Afinita vybraných CDR3-GFP voči rDIII bola ďalej overená dot blot testom s 11 prominentnými klonmi. Z CDR3-GFP klonov boli izolované CDR3 gény, ktoré boli následne sekvenované. Vo všetkých klonoch bola CDR3 sekvencia uniformná. Spomenuté selektované CDR3-GFP klony boli testované z hľadiska afinity voči fixovanému TBEV Hypr vírusu (1x10⁶ PTJ/jamku) pomocou ELISA testu. Klony s interakciou vyššou ako 0,5_{A450nm} boli selektované, a to: CDR3TA4, CDR3TB3, CDR3TB4, CDR3TB5 a CDR3TC1. Predošlé skríningy preukázali afinitu CDR3-GFP voči rDIII doméne TBEV Hypr vírusu. Potenciálna toxicita CDR3-GFP bola testovaná na BHK21 bunkách. Vybrané koncentrácie CDR3-GFP (2,5 μg a 1 μg) nevykazovali žiaden cytotoxický alebo inhibičný efekt na rast buniek po dobu 48 h. Klony: CDR3TA4, CDR3TB3, CDR3TB4, CDR3TB5, CDR3TC1 boli testované vo VNT, pričom 1 μg každého CDR3-GFP vykazoval 100% neutralizáciu 50 PTJ TBEV Hypr vírusu. Následné selekčné kritérium pre CDR3-GFP bola ľahká produkcia a dobrá výťažnosť. CDR3-GFP klony: CDR3TB3 a CDR3TB5 mali pri rovnakom objeme *E. coli* T5 Shuffle kultúry a rovnakom spôsobe purifikácie najvyššie koncentrácie, preto boli zvolené na ďalšie testovanie. Tieto CDR3-GFP boli pred samotným PRNT 4-násobne riedené, pričom najvyššia koncentrácia bola 750 ng a najnižšia 11,7 ng. Schopnosť neutralizovať 50% PTJ vírusu (EC₅₀) bola preukázaná pri oboch klonoch, a to: 155 ng/ml pri CDR3TB3 a 138 ng/ml pri CDR3TB5. Blokujúca CDR3 peptidová sekvencia: N'YYCAKLRTNWFWDAGMDYWCQGT C' teda potenciálne môže poskytnúť prvý krok k vývinu terapeutík voči TBEV infekciám v CNS.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená z IGA-ESGD/03/2024, APVV-22-0084 a VEGA- 1/0381/23

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bhide K, et al. Signaling events evoked by domain III of envelop glycoprotein of tick-borne encephalitis virus and West Nile virus in human brain microvascular endothelial cells. *Scientific Reports*, 2022; 12: 8863.

Bifani AM, et al. Therapeutics for flaviviral infections. *Antiviral Res*, 2023; 210: 105517.

Comor L, et al. Joining the in vitro immunization of alpaca lymphocytes and phage display: rapid and cost effective pipeline for sdAb synthesis. *Microbial Cell Factories*. 2017; 16: 13.

Formanová P, et al.. Full genome sequences and molecular characterization of tick-borne encephalitis virus strains isolated from human patients. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015; 6: 38-46.

Hrušková J. Engineering the Single Domain Antibodies Targeting Receptor Binding Motifs Within the Domain III of West Nile Virus Envelope Glycoprotein. *Frontiers in Microbiology*. 2022; 3

Hu T, et al. The key amino acids of E protein involved in early flavivirus infection: viral entry. *Virol J*. 2021; 18: 136.

Jin BK, et al. NANOBOODIES®: A Review of Diagnostic and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2023; 24

Lochhead J, et al. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in Physiology*. 2020; 11

Newton M. Solid lipid nanoparticles for skin and drug delivery: Methods of preparation and characterization techniques and applications. *Nanoarchitectonics in biomedicine* 2019

Pranclova V, et al.. Unraveling the role of human microglia in tick-borne encephalitis virus infection: insights into neuroinflammation and viral pathogenesis. *Microbes Infect*. 2024; 26: 105383.

Truong TTT, et al. Studying the characteristics of nanobody CDR regions based on sequence analysis in combination with 3D structures. *J Genet Eng Biotechnol*. 2022; 20: 157.

Zhang F, et al. Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood-brain barrier for treatment of glioma. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 2089-100.

SILÁŽNA ZRELOSŤ ZELENÝCH KUKURÍC – METODIKA SM (SILAGE MATURITY)

Mitrik A.¹, Mitrik T.², Maskal'ová I.¹

¹Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF v Košiciach

²FEEDLAB s.r.o., Spišská Nová Ves

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce bolo identifikovať a kvantifikovať vzťahy medzi obsahom živín (VRC, škrob a NDV) a obsahom sušiny rôznych hybridov kukurice (*Zea mays* L.) v rôznych podmienkach. Analyzovali sme súbor 1 972 vzoriek celých rastlín silážnych kukuríc zložený z 206 rôznych hybridov pestovaných v dvoch rozdielnych oblastiach z hľadiska pôdnych a klimatických podmienok v priebehu 7 pestovateľských sezón (rokov). Pozornosť sme zamerali na obsah sušiny a obsah kľúčových energetických živín (VRC, škrob, NDV) a hlavne na ich vzájomné interakcie. Naše výsledky poukazujú na to, že transformácia VRC na škrob má štyri kľúčové body: (1) začína pri obsahu sušiny 150 g.kg⁻¹, (2) kulminuje pri obsahu sušiny okolo 235 g.kg⁻¹, (3) výrazne začne klesať od obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹ a (4) po prekročení obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ sa prakticky rýchlo zastavuje. Obsah VRC (R² 0,728) a aj obsah škrobu (R² 0,873) súvisia a sú veľmi tesne spojené s obsahom sušiny. S postupujúcou transformáciou VRC na škrob, ktorý sa ukladá v zrne, obsah sušiny dynamicky stúpa. Tieto charakteristiky, s malými odchýlkami sa nám potvrdili na všetkých úrovniach (všetky rozbery, oblastí, sezóny, SM_skupiny aj hybridy). Z týchto výsledkov vyplýva, že obsah sušiny 300 až 350 g.kg⁻¹ môžeme považovať ako optimálne zberové okno pre silážovanie kukurice a za optimálnu fázu silážnej zrelosti celých rastlín kukurice, pretože po prekročení obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ sa zastavuje transformácia VRC na škrob a začína fáza usychania rastlín.

ÚVOD

Obsah sušiny, živinové zloženie, ale aj stráviteľnosť živín sa v priebehu vegetačného vývoja porastov silážnych kukuríc dynamicky menia (Horst a kol., 2020; Ferraretto a kol., 2018). Výživná hodnota a produkčná účinnosť kukuričných siláží tesne súvisí s obsahom sušiny (Ferraretto a Shaver, 2012) a aj preto považujeme obsah sušiny za základný a charakteristický živinový parameter kukuričných siláží. Pri obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹ v celej rastline dosahuje sušina zrna hodnotu 500 g.kg⁻¹ (Daynard a Hunter, 1975). So stúpajúcim obsahom sušiny klesá stráviteľnosť škrobu aj neutrálne detergentnej vlákniny (Di Marco a kol., 2002). Pri obsahu sušiny 280 - 320 g.kg⁻¹ bola dosahovaná najvyššia úroveň produkcie mlieka (FCM) (Ferraretto a Shaver, 2012). Zlomový bod pre minimalizáciu strát odtokom silážnych štiav nastáva pri obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹ (Bastiman a Altman, 1985). Zhrnutie výsledkov z týchto zdrojov zreteľne naznačuje, že pri obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹ začína optimálny čas pre zber a silážovanie, avšak otázkou je, aké živinové zmeny prebiehajú v ďalších štádiách vegetačného vývoja.

MATERIÁL A METODIKA

V priebehu siedmich pestovateľských sezón (2015 - 2021) sme vykonávali skupinové pokusy a aj individuálne monitorovanie živinového zloženia vybraných porastov v dvoch rôznych výrobných oblastiach: VÝCHOD (ďalej oblasť V) : chladnejšia a vyššie položená oblasť - 3 lokality v regióne stredného a severného Spiša (S 49,0°, V 21,0°). Nová Ľubovňa: 543 m n. m., S 49,059°, V 20,325°; Poprad: 710 m n. m., S 49,276°, V 20,684°; Smižany: 545 m n. m., S 48,961°, V 20,503°. Celkový počet vzoriek 1 320. ZÁPAD (ďalej oblasť Z) : teplejšia a nižšie položená oblasť (S 48,5°, V 17-21°) ohraničená obcami Nové Sady (168 m n.m.), Kočín (207 m n.m.) a Bátka (182 m n.m.). Celkový počet vzoriek 652. Odbery vzoriek začínali v štádiu začiatku mliečnej zrelosti a odbery sa opakovali v 5 - 10 dňových intervaloch (podľa možnosti) až do štádia plnej zrelosti zrna. Z porastov boli odoberané vzorky zložené z 5 – 10 celých rastlín odseknutých cca 20 cm nad pôdou alebo z 3 - 4 kg porezanej hmoty rezanej v období

silážovania. Počas dlhšej prepravy boli vzorky balené: celé rastliny balené do PE vakov a porezaná hmota do PE sáčkov. Celé vzorky boli posekané na rezanku s priemernou veľkosťou častíc okolo 15 mm a kvalitne zhomogenizované miešaním. Navážky vzoriek s hmotnosťou 500 – 750 g boli sušené v sušiarňach MEMMERT UFE 500 a UFE 700 pri teplote do 60 °C 16 - 24 hodín. Vysušené vzorky boli rozomleté na mlynch SM-100 (RETC), 2 mm sito a následne premleté na mlyne TWISTER (RETC) s 1 mm sitom alebo na mlyne SM-100 (RETC) s 1 mm sitom. Obsah sušiny a vybraných živín (vodorozpusťné cukry, škrob a NDV) v laboratórnych vysušených vzorkách bol stanovený na analyzátore NIRS Antaris II FT-NIR Analyzer (Thermo Fisher Scientific) použitím vlastných validovaných kalibračných modelov. Metodiky mokrých analýz: VRC - UV VIS spektrofotometria pri 315 nm so štandardným roztokom glukózy a fruktózy 50/50 (Albalasmeh a kol., 2013). Škrob - metóda podľa AOAC 996.11 (AOAC 2005), NDV: sáčková metóda ANKOM. Celkový obsah sušiny bol vyhodnotený na základe gravimetrického stanovenia laboratórnej sušiny korigovaného obsahom sušiny vo vysušených vzorkách. Celkom bolo testovaných 206 rôznych hybridov silážnych kukuríc so širokým rozsahom skupín FAO 120 až 600 (VÝCHOD FAO 120 až 400; ZÁPAD FAO 240 až 600). Obsah sušiny je vo vzťahu s kalendárnym dňom a predstavuje charakteristickú vlastnosť pre daný hybrid (Mitrík a Mitrík, 2022). Silážna zrelosť: skupina silážnej zrelosti (ďalej **SM**) bola určená na základe minimálne štyroch rozborov v časovom rade pre každý hybrid a predstavuje kalendárny deň roku (zaokrúhlený na celé 10), v ktorom dosiahol daný hybrid obsah sušiny 300 g.kg⁻¹ (Mitrík a Mitrík, 2022). Štatistické vyhodnotenia sme vykonávali pomocou NCSS 2024 Statistical Software a s použitím metód: ANOVA, lineárna a nelineárna polynomičná regresia.

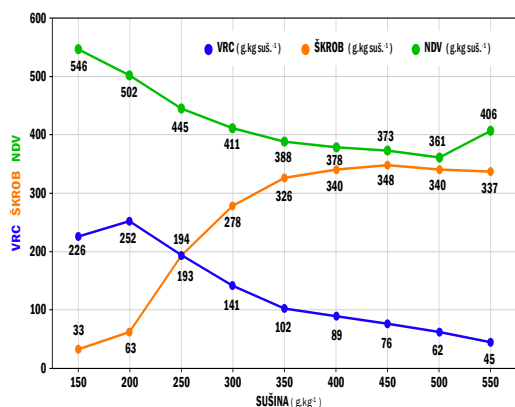
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Obsah sušiny, škrobu a NDV bol meraný v 1 972 vzorkách a obsah VRC v 1 824 vzorkách (metódu NIRS na meranie VRC sme vyvinuli až v roku 2016). Z oblasti V pochádzalo 66,94 % vzoriek a z oblasti Z 33,06 % vzoriek. Obsah sušiny každej vzorky sme zaokrúhlili na celých 50 (± 25) g.kg⁻¹ a vzniklo 9 postupných klastrov. Obsah VRC kulminuje pri obsahu sušiny 200 g.kg⁻¹ a následne postupne klesá. Od bodu kulminácie VRC dynamicky stúpa obsah škrobu, ktorý od obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ začína stagnovať a kulminuje pri obsahu sušiny 450 g.kg⁻¹. Obsah NDV kulminuje v najmladších vývojových

Tabuľka 1 Obsah VRC, škrobu a NDV podľa obsahu sušiny

Sušina*	parameter	jedn.	n	priemer	SD	minimum	maximum	rozsah
150	VRC	g.kg suš. ⁻¹	131	225,82 ^a	33,90	168,00	319,53	151,53
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	131	32,58 ^a	22,69	1,00	99,00	98,00
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	131	546,23 ^a	42,06	449,00	680,24	231,24
200	VRC	g.kg suš. ⁻¹	512	251,53 ^b	35,87	140,40	356,05	215,65
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	541	62,70 ^b	49,96	1,09	274,33	273,24
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	541	501,73 ^b	40,46	408,00	614,81	206,81
250	VRC	g.kg suš. ⁻¹	494	194,24 ^c	43,89	80,00	332,00	252,00
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	533	193,18 ^c	57,42	43,00	325,85	282,85
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	533	445,01 ^{ci}	33,09	347,00	583,67	236,67
300	VRC	g.kg suš. ⁻¹	399	141,46 ^d	35,80	45,28	245,00	199,72
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	440	278,45 ^{dhi}	40,79	147,39	388,00	240,61
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	440	411,45 ^{di}	33,85	321,00	510,28	189,28
350	VRC	g.kg suš. ⁻¹	158	102,44 ^{ehi}	25,20	51,39	189,92	138,53
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	188	325,93 ^{efghi}	40,82	210,53	409,53	199,00
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	188	388,26 ^{efghi}	31,83	320,00	488,14	168,14
400	VRC	g.kg suš. ⁻¹	81	89,34 ^{efghi}	22,69	46,00	180,16	134,16
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	89	339,88 ^{efghi}	43,45	237,71	454,00	216,29
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	89	378,17 ^{efhi}	31,65	315,82	454,76	138,94
450	VRC	g.kg suš. ⁻¹	40	75,88 ^{fhi}	21,80	47,86	137,65	89,79
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	41	347,72 ^{efghi}	38,62	274,02	422,00	147,98
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	41	373,30 ^{efghi}	32,17	302,90	423,70	120,80
500	VRC	g.kg suš. ⁻¹	7	62,48 ^{efghi}	16,42	43,72	90,26	46,54
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	7	340,21 ^{efghi}	37,23	294,55	400,82	106,27
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	7	360,77 ^{efhi}	49,04	273,05	432,71	159,66
550	VRC	g.kg suš. ⁻¹	2	44,77 ^{efghi}	7,42	39,52	50,01	10,49
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	2	336,67 ^{efghi}	13,20	327,33	346,00	18,67
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	2	406,38 ^{cdefghi}	58,26	365,18	447,57	82,39
celkom	VRC	g.kg suš. ⁻¹	1 824	185,17	66,86	39,52	356,05	316,53
	ŠKROB	g.kg suš. ⁻¹	1 972	188,90	116,17	1,00	454,00	453,00
	NDV	g.kg suš. ⁻¹	1 972	449,55	61,02	273,05	680,24	407,19

Legenda: * obsah sušiny ± 25 g.kg⁻¹



Graf 1. VRC, škrob a NDV pri rôznych obsahoch sušiny.

štádiách na úrovni obsahu sušiny 150 g.kg⁻¹ a od obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ pokles začína stagnovať (Graf 1.). Obsah VRC, škrobu a NDV sa z narastajúcim obsahom sušiny dynamicky mení. Namerané údaje poskytujú veľmi komplexný pohľad na vývoj živinového zloženia silážnych kukuríc v priebehu ich vegetačného vývoja od najrannejších štádií až po úplnú zrnovú zrelosť. Obsahy VRC, škrobu aj NDV sú štatisticky významne rozdielne a hlavne v klastri s obsahom sušiny do 350 g.kg⁻¹ čo poukazuje na to, že obsah sušiny 300 g.kg⁻¹ predstavuje zlomový bod v konverzii VRC na škrob.

Naše výsledky poukazujú na to, že transformácia

VRC na škrob má štyri kľúčové body: (1) začína pri obsahu sušiny 150 g.kg⁻¹, (2) kulminuje pri obsahu sušiny okolo 235 g.kg⁻¹, (3) výrazne začne klesať od obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹, (4) po prekročení obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ sa prakticky rýchlo zastavuje.

Obsah VRC (R^2 0,728) a aj obsah škrobu (R^2 0,873) súvisia a sú veľmi tesne spojené s obsahom sušiny. Postupujúcou transformáciou VRC na škrob, ktorý sa ukladá v zrne, obsah sušiny dynamicky stúpa. Tieto charakteristiky, s malými odchýlkami sa nám potvrdili na všetkých úrovniach (všetky rozbory, oblasti, sezóny, SM group aj hybridy). Obsah sušiny, okrem extrémne suchých podmienok, je odrazom metabolickej transformácie nevláknitých sacharidov. Časová dynamika prírastku obsahu sušiny je špecifická pre každý hybrid a u mnohých hybridov sme zistili vysokú miery opakovateľnosti tohto vzťahu aj naprieč sezónami a lokalitami (Mitrík a Mitrík, 2023). Pre praktickú výrobu kvalitných kukuričných siláží je dôležité, že pri prekročení obsahu sušiny 300 g.kg⁻¹ už nehrozí riziko odtoku silážnych štiav (Zimmer, 1967; Bastiman a Altman, 1985). Stráviteľnosť škrobu pri obsahu sušiny 350 g.kg⁻¹ klesá aj pri veľmi vysokom stupni mechanického narušenia zrna (KPS 70%) na úroveň 91,65 % (Mertens, 2010), čím stúpa riziko vysokých strát nestráveného škrobu vo výkaloch. Tieto skutočnosti v kontexte našich výsledkov naznačujú, že obsahu sušiny 300 až 350 g.kg⁻¹ môžeme stanoviť ako optimálne zberové okno pre silážovanie kukurice a fázu silážnej zrelosti celých rastlín kukurice. V tomto okne sa udržiava obsah VRC nad 100 g.kg suš.⁻¹, čo vytvára veľmi dobré východiská pre úspešnú silážnu fermentáciu (Mitrík, 2021).

Z hľadiska najvyššej produkčnej účinnosti živín sú tieto výsledky a závery v súlade s výsledkami práce Ferrareto a Shaver (2012), z ktorých vyplýva, že najvyššia produkcia mlieka (FCM) bola dosiahnutá v skupine siláží s obsahom sušiny 280 - 320 g.kg⁻¹.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Bastiman B, Altman JFB. Losses at various stages in silage making. Research and Development. Agriculture, 1985; 2:19–25.

Ferrareto LF, Shaver RD. Meta-analysis: Effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. The Professional Animal Scientist. 2012; 28:141–149.

Mertens DR. Particle Size, Fragmentation Index and Effective Fiber: Tools for evaluating the physical attributes of corn silages. USDA – Agricultural Research Service US Dairy Forage Research Center Madison, WI. Mertens_CS_processing.pdf. 2010

Mitrík T, Mitrík A. Silage maturity of maize in a foothill area with NIRS method support. Acta fytotechn. 2022; 25(4):259–268

Mitrík T, Mitrík A. Silage maturity of maize in a foothill area with NIRS method support – part II. Acta fytotechn. 2023; 26(2):102–108.

Mitrík T. Silage - illustrated manual for expert and beginner alike. Wageningen Academic Publishers. 2021
NCSS 2024 Statistical Software (2024). NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA, ncss.com/software/ncss

POROVNANIE ZMIEN V BIELKOVINOVOM PROFILE U TELIAT S HNAČKOU A BEZ

Oršuláková V. , Ješík J. , Tóthová C.

Klinika prežúvavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

ABSTRAKT

Hnačka teliat sa stala takmer neodmysliteľnou súčasťou chovu teliat. Dlhšie pretrvávajúce hnačky vedie k metabolickým poruchám, ktoré majú za následok zmeny v bielkovinovom profile. Do sledovania bolo zaradených 9 teliat s hnačkovým syndrómom a 6 klinicky zdravých teliat. Zámerom nášho výskumu bolo hodnotenie vplyvu hnačkového syndrómu u teliat na elektroforetický obraz bielkovín krvného séra a zastúpenie hlavných bielkovinových frakcií. Na stanovenie celkových bielkovín sme využili Biuretovú metódu a pomocou elektroforetickej separácie na agarózovom gély sme získali zastúpenie hlavných bielkovinových frakcií. V celkových koncentráciách bielkovín krvného séra neboli zistené rozdiely medzi chorými a zdravými teľatami avšak, elektroforetickou separáciou na jednotlivé bielkovinové frakcie, boli zistené nižšie hodnoty albumínu a vyššie hodnoty α_1 a γ globulínov vo frakciách chorých teliat v porovnaní so zdravými. Trend vyšších hodnôt u chorých zvierat bol zaznamenaný aj v hodnotách fibrinogénu v krvnej plazme. Širšie rozpätie v smerodajných odchýlkach u zdravých a chorých teliat môže súvisieť s ich väčšou vekovou rozdielnosťou. Z tohto dôvodu je dôležité do výskumu zaradiť viac jedincov následným rozdelením do vekových skupín a zamerať sa na hľadanie takého parametra, ktorý nie je ovplyvnený fyziologickými zmenami v organizme.

ÚVOD

Hnačka teliat sa považuje za jednu z hlavných príčin morbidita a mortality mladého hovädzieho dobytku. Bolo preukázané, že práve hnačka teliat má za následok viac ako 50 % úmrtí teliat, s čím súvisia aj značné ekonomické a produkčné straty v chovoch hovädzieho dobytku (Vega a kol. 2020). Prítomnosť pretrvávajúcej hnačky vedie k metabolickým poruchám, ktoré sú často spojené s poruchami súvisiacimi so zmenenými koncentraciami celkových bielkovín v krvnom sére (Subhash a kol. 2012). Zmeny v koncentracii celkových bielkovín sú závislé od stupňa poškodenia vyvolaného ochorením a od štádia ochorenia v ktorom sa pacient nachádza. Avšak, často v klinickej diagnostike je potrebné poznať ako sú separované jednotlivé bielkovinové frakcie a aká je ich koncentrácia, nakoľko pri niektorých procesoch v organizme nemusí dôjsť k zvýšeniu koncentrácie celkových bielkovín, ale dôjde len k zmene zastúpenia jednotlivých bielkovín krvného séra. Elektroforetická separácia je účinným nástrojom na identifikáciu abnormálnych bielkovinových frakcií a taktiež nám pomáha určiť typ zápalu, deficit tvorby protilátok alebo mono- a polyklonálne gamapátiie. Aj keď využitie elektroforézy je známe už od 30. rokov 20. storočia, vo veterinárnej medicíne sa jedná o málo preskúmanú časť medicíny, avšak v súčasnosti je zaznamenaný čoraz väčší nárast využitia elektroforézy u veterinárnych pacientov vďaka jej širokému spektru pôsobenia (Cray a kol. 2009). Cieľom našej štúdie bolo hodnotenie vplyvu hnačkového syndrómu u teliat na elektroforetický obraz bielkovín krvného séra a zastúpenie jednotlivých bielkovinových frakcií v porovnaní s klinicky zdravými teľatami.

MATERIÁL A METODIKA

Výskum sa realizoval na Klinike prežúvavcov UVLF a ŠPP Zemplínska Teplica od júna 2025. Do sledovania bolo zahrnutých 9 teliat s klinickými príznakmi hnačky vo veku v rozmedzí od jedného týždňa až 1 mesiac. Prevažná väčšina teliat bola plemena holštajnský dobytok. Teľatá boli ustajnené v Steimanových búdkach, s neustálym prístupom k vode, napájané mliečnou kŕmnom zmesou, starším teľatám bola ponúkaná šarterova kŕmna zmes s neobmedzeným prístupom k senu. Do štúdia boli zaradené aj klinicky zdravé teľatá ako kontrolná skupina

v počte 6 kusov. Základné klinické vyšetrenie teliat bolo vykonané bežnými klinickými vyšetrovacími metódami, ktoré boli doplnené ďalšími diagnostickými metódami (koprologické vyšetrenie, detekcia patogénov). Intenzita hnačky sa hodnotila stupnicou od 0 po 3, pričom 0= bez prítomnosti hnačky a 3= silná vodnatá hnačka. Väčšina teliat zaradených do výskumu mala stredne silnú až silnú hnačku. Detekcia patogénov hnačkového syndrómu v truse teliat bola vykonaná viacparametrovou diagnostickou súpravou Rainbow calf Scours (BIO K 288, bioX diagnostics, Belgicko), určenou na diagnostiku Bovínneho koronavírusu, Bovínneho rotavírusu, *Escherichia coli* a *Cryptosporidium parvum*, *C. Perfringens*. Výsledky ukázali, že častokrát sa jednalo o zmiešanú infekciu, avšak najčastejšie bola zachytená prítomnosť Bovínneho rotavírusu a *Cryptosporidium parvum*. Vzorky trusu na koprologické vyšetrenie boli odoberané priamo z rekta a následne vyšetrené na zistenie prítomnosti vajčiek parazitov a na vyhodnotenie infestácie organizmu parazitmi štandardnou flotačnou metódou s použitím flotačného roztoku na báze chloridu sodného so špecifickou hmotnosťou 1,20. Vajíčka parazitov prítomne v truse boli identifikované pomocou mikroskopickej analýzy. Vo väčšine prípadov sa jednalo o zmiešanú infekciu a to *Eimeria spp.*, *Strongyloides spp.*, *Nematodirus* v ojedinelom prípade sa zachytila aj prítomnosť *Toxocara vitulorum*. Za účelom zistenia zmien v bielkovinovom profile bolo nutné odobrať krv od vyšetrovanej a kontrolnej skupiny zvierat. Krv na analýzu bola odoberaná priamou punkciou v. *jugularis* do skúmaviek s gélom a urýchľovačom zrážania pre získanie séra a do špeciálnych skúmaviek pre odber nezrážanlivej krvi s obsahom 3,8 % Na- citrátu, z ktorých bola získaná krvná plazma po centrifugácii pri 4000 g po dobu 30 minút. Krvná plazma a krvné sérum boli následne odoberaté do dvoch skúmaviek s označením a uložené do mrazničky pri teplote -18 °C, pre ich neskoršie spracovanie. V krvnom sére boli hodnotené koncentrácie celkových bielkovín (CB, g/l) a jednotlivé bielkovinové frakcie. V krvnej plazme boli stanovené koncentrácie fibrinogénu (Fib, g/l). Koncentráciu celkových bielkovín (CB, g/l), bola stanovovaná Biuretovou metódou na automatizovanom biochemickom analyzátore RX Monaco (Randox, Spojené kráľovstvo) s použitím komerčných diagnostických súprav (Randox, Spojené kráľovstvo). Jednotlivé frakcie sérových bielkovín boli rozdelené na základe zónovej elektroforézy na agarózovom gély, pomocou automatizovaného elektroforetického systému Hydrasis (Sebia Corporate, Francúzsko), podľa postupu určeného výrobcom. Elektroforetické gély boli skenované pomocou denzitometrického skenovacieho systému Epson Perfection V 700 (Epson America Inc, California, USA). Vizualizácia elektroforetických gélov, identifikácia proteínových frakcií bola vykonaná pomocou počítačového softvéru Phoresis, verzia 5.50 (Sebia Corporate, Francúzsko). Stanovenie koncentrácií fibrinogénu boli vykonané na poloautomatickom stvorkanálovom koagulometri Behnk CL-4 (Behnk Elektronik GmbH & Co., Nemecko) s využitím komerčných diagnostických testov (Diagon Kft, Maďarsko) metódou založenou na princípe elektromagnetickej detekcie tvorby koagula. Na štatistickú analýzu získaných výsledkov sme využili Mann- Whitney neparametrický test. Hodnotenie bolo vykonané v programe GraphPad Prism V5.02 (GraphPad Software Inc.).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podrobné výsledky od teliat trpiacich hnačkovým syndrómom a od klinicky zdravých teliat sú znázornené v tabuľkách 1 a 2. Doposiaľ získané výsledky poukazujú na to, že hnačkový syndróm teliat ovplyvňuje zmeny v zastúpení bielkovín krvného séra. Zmeny boli pozorované v albumínovej, α_1 a γ bielkovinovej frakcií. Albumínová frakcia mala tendenciu poklesu koncentrácií v porovnaní s kontrolnou skupinou teliat. Naopak u α_1 a γ frakcií došlo k zvýšeniu koncentrácií v krvnom sére v porovnaní s kontrolnou skupinou. Podobné výsledky dosiahli v štúdií aj Choi a kol. (2021) avšak, zvýšenie koncentrácií bolo v ich výskume výraznejšie v α_2 frakcií ako u α_1 . Vyššie hodnoty v smerodajných odchýlkach v skupine teliat s hnačkou a klinicky zdravých teliat poukazujú na širšie rozpätie hodnôt, čo môže súvisieť s vekovým

zastúpením teliat ktoré bolo od jedného týždňa až po 1 mesiac veku zvierat. Tóthová a kol. (2016) popisujú vo svojej štúdií, že v prvom mesiaci života teľaťa nastávajú najväčšie zmeny v bielkovinovom zastúpení ovplyvnené fyziologickými procesmi ako je napr. príjem kolostra a rast zvierat. Z toho dôvodu je potrebné do štúdií zaradiť viac zvierat a rozdeliť ich do jednotlivých vekových kategórií, zároveň zamerať sa na hľadanie takého parametra, ktorý sa špecificky zvyšuje len pri hnačkovom syndróme teliat a nie je ovplyvnený fyziologickými procesmi (rast, vývoj).

	Choré teľatá	Zdravé teľatá	p
alb %	49,34 ± 9,80	55,66 ± 2,45	n.s
α₁ %	9,59 ± 2, 89	8,45 ± 3,98	n.s
α₂ %	11,32 ± 1,2	12,15 ± 1,23	n.s
β₁ %	10,40 ± 1,75	10,28 ± 1,20	n.s
β₂ %	5,03 ± 2,01	4,4 ± 1,22	n.s
γ %	14,31 ± 10, 39	9,05 ± 4,13	n.s
A/G	1,03 ± 0,36	1,26 ± 0,12	n.s

Tab. 1. Rozdiely v relatívnych koncentráciách frakcií sérových proteínov (%) a pomeru albumín/globulín (A/G) u teliat s hnačkou a kontrolnej skupiny (priemer ± SD)

	Choré teľatá	Zdravé teľatá	p
CB	58,73 ± 10,46	57,17 ± 6,69	n.s
alb g/l	28,54 ± 5,58	31,68 ± 2,36	n.s
α₁ g/l	5,47 ± 1,28	4,73 ± 1,89	n.s
α₂ g/l	6,62 ± 1,20	6,98 ± 1,19	n.s
β₁ g/l	6,08 ± 1,25	5,85 ± 0,76	n.s
β₂ g/l	3,06 ± 1,69	2,55 ± 0,96	n.s
γ g/l	8,99 ± 7,85	5,37 ± 3,02	n.s
Fib g/l	2,64 ± 0,52	2,24 ± 0,40	n.s

Tab. 2. Rozdiely v absolútnych koncentráciách celkových sérových bielkovín, proteínových frakcií (g/l) a fibrinogénu (g/l) u teliat s hnačkou a kontrolnej skupiny (priemer ± SD)

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 09/2025 „Sledovanie dynamiky bielkovín krvného séra a vybraných zápalových markerov počas terapie hnačky teliat”.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Cray C, et al. Changes in the concentration of serum proteins in calves during the first month of life. *Comparative Medicine*. 2009; 59:517-526.
- Choi KS, et al. Changes in serum protein electrophoresis profiles and acute phase proteins in calves with diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2021; 85:45-50.
- Subhash M, et al. Incidence of Calf Diarrhea in Cattle and Buffalo Calves in UttarPrades, India. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012; 7:1049-1054.
- Tóthová C, et al. Changes in the concentration of serum proteins in calves during the first month of life. *Journal of Applied Animal Research*. 2016; 44: 338-346.
- Vega CG, et al. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Vet Res*. 2020; 16:264.

ZVIERACIE MODELÝ NA VÝSKUM FETÁLNEHO ALKOHOLOVÉHO SYNDRÓMU

Pokorná B.¹, Štefancová S.¹, Petrovová E.², Luptáková L.¹

¹Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

²Katedra morfológických disciplín, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Zvieracie modely sú kľúčové pre štúdium fetálneho alkoholového spektra porúch (FASD). *Caenorhabditis elegans* umožňuje sledovanie genetických a bunkových mechanizmov, *Danio rerio* vizualizáciu narušenia bunkovej migrácie počas gastrulácie a hlodavce umožňujú skúmať neurobehaviorálne dôsledky prenatalnej expozície alkoholu. Kuracie embryo predstavuje etickejšiu a nákladovo efektívnu alternatívu s vysokou biologickou podobnosťou s ľudským embryom, čo spoločne poskytuje komplexný pohľad na účinky alkoholu na vývoj plodu.

ÚVOD

Testy teratogenity sa používajú na hodnotenie rizika, ktoré predstavujú lieky a chemické látky pre vyvíjajúci sa plod počas tehotenstva. Výskum ukázal, že niektoré látky môžu spôsobiť vrodené vývojové chyby, preto je nevyhnutné testovať ich potenciálne embryotoxické a teratogénne účinky ešte pred ich použitím u tehotných žien. Tieto testy pomáhajú identifikovať škodlivé látky a prispievajú k bezpečnému používaniu liekov, pričom systém ich klasifikácie sa priebežne aktualizuje na základe nových vedeckých poznatkov (Shabalout a Aydin 2023). Analýza vplyvu teratogénov na vývoj plodu a hodnotenie rizík pre človeka sú základom predklinického výskumu (Acharya a kol. 2024). Monitorovanie bezpečnosti liekov počas tehotenstva je kľúčové pre prevenciu úmrtia plodu a vrodených vývojových chýb (Tajanpure a kol. 2022). Laboratórne hlodavce, ako sú myši a potkany, sa často využívajú ako *in vivo* modely na skúmanie účinkov farmaceutických látok, potravinových aditív a environmentálnych chemikálií. Tieto modely umožňujú detailné sledovanie toxicity a mechanizmov účinku po priamej či nepriamej expozícii testovaným látkam. Hodnotenie toxicity prostredníctvom týchto zvieracích modelov si však vyžaduje značný počet jedincov na pokrytie celého životného cyklu, čo predstavuje vysoké finančné a časové náklady a zároveň vyvoláva významné etické otázky (Ghimire a kol. 2022). Pri práci so zvieracími modelmi je potrebné zohľadniť aj etické aspekty, keďže experimenty môžu spôsobovať bolesť alebo stres. Preto vedci čoraz častejšie dodržiavajú zásady 3Rs s cieľom minimalizovať utrpenie zvierat. Alternatívne metódy, ako sú bunkové kultúry či mikroorganizmy, predstavujú rýchlejší, lacnejší a etickejší prístup, avšak s obmedzenou schopnosťou simulovať metabolické a dlhodobé účinky u živých organizmov (Kaplan-Arabaci a kol., 2025). V tomto kontexte sa ako mimoriadne hodnotný predklinický model ukazuje kuracie embryo, a to pre svoju výraznú biologickú podobnosť s ľudským embryom (Acharya a kol. 2024). Hoci jeho využitie v rámci farmaceutického výskumu nie je nové, v posledných rokoch zaznamenalo významný nárast, predovšetkým pri hodnotení toxicity a účinnosti liekov či nanosystémov (Ribeiro a kol. 2022).

ZVIERACIE MODELÝ VO VÝSKUME FETÁLNEHO ALKOHOLOVÉHO SPEKTRA PORÚCH (FASD)

1. Hád'atko (*C. elegans*)

Na experimentálny výskum účinkov alkoholu sa využíva viacero druhov bezstavovcov. V kontexte štúdia FASD je najčastejším modelovým organizmom *C. elegans*. Hoci cicavce poskytujú neoceniteľné možnosti pri skúmaní zložitých mozgových štruktúr a vyšších prejavov správania, jednoduchšie bezstavovce, ako je *C. elegans*, predstavujú efektívny nástroj na analýzu základných alebo kľúčových biologických procesov. Umožňujú detailné skúmanie vývinových mechanizmov na úrovni buniek, molekulových dráh a genetických regulácií, čím poskytujú dôležité poznatky aplikovateľné aj na vyššie organizmy (Patten a kol. 2014). *C.*

elegans je ideálny model na transgeneračné štúdium účinkov etanolu, pretože má krátky životný cyklus, produkuje veľké množstvo potomkov, umožňuje presné sledovanie epigenetických zmien a zároveň vykazuje merateľné behaviorálne reakcie na alkohol (Guzman a kol. 2022).

2. Dánio pruhované (*Danio rerio*)

Ďalším zaujímavým animálnym modelom je dánio pruhované, tiež známe ako zebrička, ktorá predstavuje ideálny model na štúdium FASD, pretože jej transparentné telo umožňuje sledovať ako etanol narúša skorú bunkovú migráciu počas embryogenézy, čo vedie k poruchám formovania nervovej platničky a následným malformáciám mozgu, miechy a kraniofaciálnych štruktúr. Výsledky ukázali, že etanol narúša kľúčové bunkové mechanizmy počas gastrulácie, konkrétne konvergenciu, extenziu a epibolické procesy. Sekundárne sú ovplyvnené aj ďalšie vývinové procesy, ako je neurulácia, morfogenéza očného poľa či migrácia neurálneho hrebeňa, čo vedie k závažným malformáciám mozgu a miechy vrátane mikrocefálie, cyklopie, rásžtepu chrbtice a kraniofaciálnych abnormalít (Alsakran a Kudoh 2021).

3. Hlodavce

Viaceré vedecké skupiny použili na štúdium FASD hlodavce. Incerti a kol. (2010) skúmali na myšiach, či podanie špecifických peptidov môže zabrániť poruchám učenia vyvolaným prenatálnou expozíciou alkoholu. Autori sa pritom zamerali na úlohu NMDA a GABA_A receptorov a hodnotili aj expresiu neuroprotektívnych a gliových markerov, keďže gliové bunky patria medzi hlavné ciele toxického pôsobenia etanolu počas vývoja mozgu. Ďalší autori využili na štúdium FASD potkany, pričom zistili, že prenatálna expozícia etanolu vedie k problémom v reverznom učení. Zvieratá ťažšie opakovali pôvodne naučené reakcie a častejšie robili chyby, čo sa prejavovalo impulzívnym správaním. Tieto prejavy behaviorálne napodobňovali symptómy ADHD u detí (Atalara kol., 2016).

4. Vtáacie embryo

Vtáacie embryo sa bežne používajú v oblasti vývojovej biológie na štúdium vývojových procesov a sú vhodným modelom pre štúdium FAS. Práve vtáacie embryo bolo prvým experimentálnym modelom, v ktorom bola preukázaná teratogenita alkoholu (Flentke a Smith 2018). Umožňuje určiť priame účinky etanolu na začiatku gravidity, bez vplyvu podvýživy matky, súbežného užívania drog, tvorby toxického metabolitu (acetaldehydu) alebo narušenej funkcie placenty (Fernandes 2013). Štúdie na vtáčích embryách preukázali, že prenatálna expozícia etanolu vedie ku kardiovaskulárnym anomáliám, ako sú defekty septa a zmeny srdcovej fyziológie, typické pre FAS (McLaughlin a kol. 2025).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená s finančnou podporou EÚ v rámci iniciatívy NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti Slovenskej republiky, a to na základe projektu č. 09I03-03-V05-00017 (IGA-ESGD/04/2024) a KEGA 004UULF-4/2023.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Acharya B, et al. Perspectives on chick embryo models in developmental and reproductive toxicity screening. *Reproductive Toxicology*. 2024; 126:108583.

Alsakran A, Kudoh T. Zebrafish as a model for fetal alcohol spectrum disorders. *Frontiers in Pharmacology*. 2021; 12:721924.

Atalar EG, Uzbay T, Karakas S. Modeling symptoms of attention-deficit hyperactivity disorder in a rat model of fetal alcohol syndrome. *Alcohol and Alcoholism*. 2016; 51.6:684-690.

Fernandes E. (2013). Effects of ethanol dosage and ascorbic acid antioxidant therapy on embryonic chick development.

Flentke GR, Smith SM. The avian embryo as a model for fetal alcohol spectrum disorder. *Biochemistry and cell biology*. 2018; 96.2:98-106.

Ghimire S, et al. Use of chicken embryo model in toxicity studies of endocrine-disrupting chemicals and nanoparticles. *Chemical research in toxicology*. 2022; 35.4:550-568.

Guzman DM, et al. Transgenerational effects of alcohol on behavioral sensitivity to alcohol in *Caenorhabditis elegans*. *Plos one*. 2022; 17.10: e0271849.

Incerti M, et al. Reversal of alcohol-induced learning deficits in the young adult in a model of fetal alcohol syndrome. *Obstetrics & Gynecology*. 2010; 115.2:350-356.

Kaplan-Arabaci O, Dančišinová Z, Paulsen RE. The Chicken Embryo: An Alternative Animal Model in Development, Disease and Pharmacological Treatment. *Pharmacology Research & Perspectives*. 2025; 13.2:e70086.

Mclaughlin D. et al. The chick embryo model as an educational tool to explore the effect of alcohol on cardiovascular development. *Advances in Physiology Education*. 2025; 49.2:438-460.

Patten AR, Fontaine CJ, Christie BR. A comparison of the different animal models of fetal alcohol spectrum disorders and their use in studying complex behaviors. *Frontiers in pediatrics*, 2014; 2:93.

Ribeiro LNM, et al. Chicken embryo: a useful animal model for drug testing?. *European Review for Medical & Pharmacological Sciences*. 2022; 26:13.

Shabalout, NT, Aydin H. Embryotoxicity and Teratogenicity. *Advanced and contemporary studies in health sciences*. 67.

Tajanpure AB, et al. Toxicity Study of Chlorzoxazone and Isosorbide Dinitrate using Chick Embryo. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2022; 19.4:1025-1036.

.

PRÍPRAVA KONJUGOVANÝCH FLUORESCENČNÝCH PROTEÍNOV PRE CIELENÝ TRANSPORT DO HER2 RECEPTOROV BUNIEK NÁDORU PRSNÍKA

Poliaková A., Gulyásová T., Tomková S., Ambro L., Repovská M., Holotová V., Nemergut M.,
Sedlák E., Huntošová V.

¹Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Katedra biofyziky

²Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a inovačný
park

³Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Katedra biochémie

⁴Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, v. v. i., Ústav biochémie a genetiky živočíchov

ABSTRAKT

V posledných rokoch je jednou z hlavných výziev v liečbe rakoviny dosiahnuť, aby sa liečba účinne zameriavala priamo na nádorové bunky a pritom čo najmenej poškodila zdravé tkanivá. Ako vhodný prístup sa ukazuje zacielenie na špecifické receptory, napríklad HER2, ktoré sa nachádzajú na povrchu niektorých nádorových buniek. Pomocou špecifického zacielenia sa dá do bunky zaviesť napríklad fotosenzibilizátor (PS), ktorý by mohol spustiť fotodynamickú terapiu, ako minimálne invazívnu liečebnú a na rakovinu špecifickú liečebnú metódu. Medzi najslubnejšie proteíny, ktoré môžu slúžiť ako nosiče fotosenzibilizátora, patrí proteín obsahujúci doménu AsLOV2. Táto doména už prirodzene obsahuje flavín mononukleotid (FMN), ktorý funguje ako fotosenzibilizátor. Cieľom našej štúdie bolo vytvoriť proteínový konjugát, ktorý by umožnil zacielenie na receptory HER2. Na tento účel sme použili DARPiny (Designed Ankyrin Repeat Proteins) označené fluoresceín-izotiokyanátom (FITC).

ÚVOD

Vývoj terapeutických stratégií, ktoré by umožnili selektívne zasiahnuť nádorové bunky, predstavuje aktuálnu tému súčasného výskumu. Cílený transport liečiva do nádorových buniek môže byť dosiahnutý použitím špecifických proteínov, ako sú dizajnované ankyrín repetitívne proteíny– DARPiny (angl. Designed Ankyrin Repeat Proteins), ktoré boli vyvinuté tak, aby sa špecificky a s vysokou afinitou viazali na charakteristické receptory nádorových buniek, ako je napríklad HER2 receptor na povrchu buniek nádoru prsníka (Jost a kol., 2013). Pokiaľ by sa takéto proteíny pripojili k nosičom liečiva, dokážeme efektívne zvýšiť terapeutickú koncentráciu liečiva a zároveň efektívne zacieliť takýto transportný systém do cieľovej bunky nádoru.

Jedným zo sľubných modelov natívneho transportného systému môže byť geneticky kódovaný svetlo-citlivý proteín obsahujúci LOV2 doménu pochádzajúci z *Avena sativa*, nazývaný fototropín 1 (AsLOV2). Je známe, že AsLOV2 doména prirodzene viaže flavínmononukleotid (FMN) ako kofaktor (Petrenčáková a kol., 2020). Predchádzajúce štúdie odhalili, že bodová mutácia C450A v štruktúre natívneho AsLOV2 vedie k produkcii singletového kyslíka počas ožarovania modrým svetlom. Naviac je FMN pevnejšie viazaný v proteínovej štruktúre než v nemutovanej forme. Zároveň vplyvom tvorby singletového kyslíka dochádza v štruktúre k rozsiahlejším oxidačným poškodeniam (Petrenčáková a kol., 2020). FMN sa takto ako svetlo-citlivá molekula stáva aj fotodynamicky aktívnou molekulou. Kombinácia PS (FMN), nosiča (AsLOV2) a mediátora (DARPin) tak predstavuje sľubný krok vpred v liečbe rakoviny s cieľom zvýšiť presnosť a účinnosť terapie.

Cieľom tejto práce bolo pripraviť metódou proteínového inžinierstva konjugáty pozostávajúce z AsLOV2 (mutácia C450A) a bivalentného DARPinu vyznačujúceho sa vysokou špecifitou voči HER2 receptorom.

MATERIÁL A METÓDY

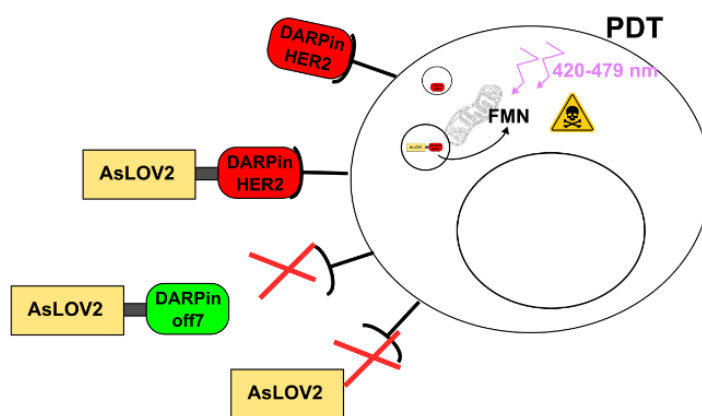
Proteíny a proteínové konjugáty boli exprimované v *E. coli* kmeni *BL21(DE3)*. Bakteriálne bunky rástli pri 37 °C v TB médiu obsahujúcom kanamycín (100 µg/ml), kým nedosiahli OD₆₀₀

~ 0,6–0,8. Proteínová expresia bola indukovaná pridaním izopropyl-P-D-tiogalaktopyranozidu (100 μ M) po znížení teploty z 37 °C na 16 °C počas 24 hodín. Proteíny boli purifikované pomocou afinitnej chromatografie – chromatografická matrica Ni-NTA. Po purifikácii boli proteíny nanesené na kolónu Superdex 75 10/300 GL a koncentrované v tlmivom roztoku HEPES, pH = 8,0. Všetky kroky boli vykonávané v tme. Molekulovú hmotnosť proteínu, ako aj čistotu izolovaného proteínu sme stanovili pomocou SDS-PAGE, pričom koncentrácie proteínov aplikované do gélu na SDS-PAGE mali rovnakú hodnotu. Proteíny sme overili aj spektrofotometricky pomocou UV/VIS spektrofotometrie a fluorescenčnej spektroskopie, výsledky sme normalizovali. Stabilitu našich proteínov sme overili pomocou DSC pri koncentrácii 1mg/ml. Testy toxicity vytvoreného konjugátu boli prevedené na líniiach buniek nádorov prsníka. Následne sme proteíny označili FITC v pomere 1:5 (proteín:FITC) a pomocou konfokálnej mikroskopie sme identifikovali HER2 receptory nádorových buniek.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou metód proteínového inžinierstva boli nadizajnované proteíny s cieľom pripraviť transportný systém schopný aktívneho a cieleného transportu PS do nádorových buniek exprimujúcich vyšší počet HER2 receptorov v porovnaní so zdravými bunkami.

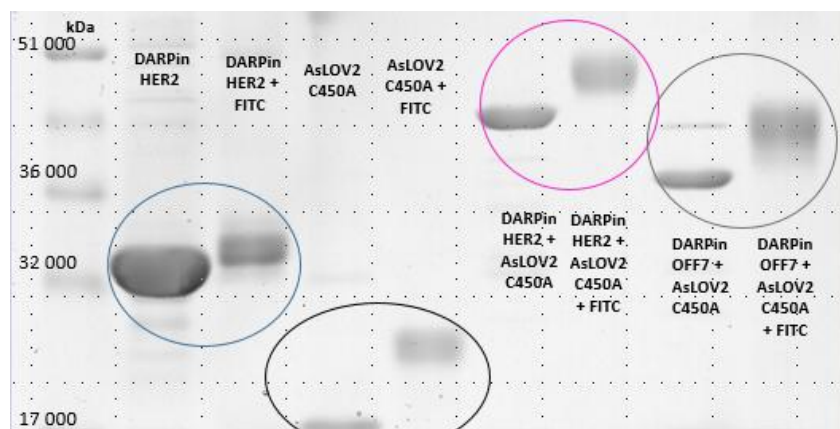
Vzhľadom na možnosť využitia FMN v procese fotodynamickej terapie bol ako transportný systém zvolený proteín AsLOV2 s bodovou mutáciou C450A, ktorá zabezpečuje dostatočne stabilné ukotvenie FMN vo vnútri proteínu. Takýto transportný systém je možné optogeneticky „otvoriť“ pomocou modrého svetla (420–470 nm) a uvoľniť tak FMN do okolitého prostredia. Zvýšená akumulácia FMN v bunke môže následne viesť k výraznému ovplyvneniu oxidačno-redukčných reakcií, čím sa následne spúšťa signalizácia vedúca k autofágii a apoptóze.



Obr. 1. Schéma cieleného transportu AsLOV2 do nádorových buniek.

Cielený transport a prechod FMN do bunky je umožnený pre fúzny proteín DARPin HER2 AsLOV2.

Pre špecifické zacielenie HER2 receptorov bol navrhnutý konjugát s bivalentným DARPinom HER2 a AsLOV2 C450A (schematická reprezentácia je znázornená na Obr. 1). Ako nešpecifická alternatíva takéhoto konjugátu bola zvolená fúzia DARPin off7 a AsLOV2 C450A. Čistota izolovaných proteínov bola dosiahnutá pomocou ich separácie metódou gélovej elektroforézy. Reprezentatívny obrázok z SDS PAGE metódy takto purifikovaných proteínov, z ktorého je možné usúdiť čistotu a veľkosť izolovaných proteínov, je znázornený na Obrázku 2. Výrazný pás bivalentného DARPinu HER2 sa nachádzal okolo 31 kDa. AsLOV2 C450A bol identifikovaný pri 18 kDa. Fúzané proteíny DARPin HER2 AsLOV2A450C boli identifikované pri približných 50 kDa a DARPin off7 AsLOV2A450C pri 36 kDa. Všetky hodnoty korešpondujú s reálnou veľkosťou proteínov.



Obr. 2. Fúzia DARPinov a AsLOV2C450A.

Fúzované proteíny boli identifikované pomocou SDS-PAGE. Nárast proteínovej hmotnosti indukuje úspešné napojenie FITC značenia pre následnú vizualizáciu proteínov pod mikroskopom.

Pripravené fúzne proteíny boli testované na SKBR3 bunkách nádoru prsníka, ktoré exprimujú zvýšený počet HER2 receptorov. Pomocou konfokálnej fluorescenčnej mikroskopie sa nám podarilo identifikovať interakciu DARPIn s HER2 receptorom buniek. Tento výsledok podporuje hypotézu o úspešnosti nášho konceptu a potvrdzuje efektívnosť cieľeného transportu proteínu prostredníctvom jeho konjugácie s DARPinom. Je však potrebné zdôrazniť, že na zabezpečenie maximálnej efektivity fotodynamickej terapie (PDT), konkrétne na dosiahnutie dostatočnej vnútrobunkovej koncentrácie fotocitlivého proteínu (FMN), bude nevyhnutné optimalizovať experimentálny protokol. Až následná optimalizácia umožní presné stanovenie dávkovania fotosenzibilizátora (PS) a definovanie parametrov ožiarenia potrebných pre účinnú PDT.

ZÁVER

Úspešnosť prípravy fotocitlivého fúzneho proteínu s DARPinom bola experimentálne potvrdená prostredníctvom gélovej elektroforézy, UV/VIS a fluorescenčnej spektroskopie. Zacielenie HER2 receptorov SKBR3 bunkových línií bolo preukázané prostredníctvom konfokálnej mikroskopie. Budúce výskumné aktivity sa zamerajú na zvýšenie transportnej kapacity pre fotosenzibilizátor a optimalizáciu samotného procesu fotodynamickej terapie.

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporený NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektov č. 09I03-03-V04-00007 a 09-I02-03-V01-00021, ako aj projektom vvg-2025-3481.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Jost, Ch., a kol. "Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2." *Structure* 21.11 (2013): 1979
- Petrenčáková, M., a kol. "Photoinduced damage of AsLOV2 domain is accompanied by increased singlet oxygen production due to flavin dissociation." *Scientific reports* 10.1 (2020): 4119.
- Petrenčáková, M., a kol. "Conformational properties of LOV2 domain and its C450A variant within broad pH region." *Biophysical chemistry* 259 (2020): 106337.

VPLYV RANNÉHO STRESU NA NEURÓNOVÉ POPULÁCIE V ČUCHOVEJ NEUROGÉNNEJ OBLASTI MOZGU POTKANA

*Popovičová, A., Fabianová, K., Žideková, M., Martončíková, M., Račeková, E.
Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice*

ABSTRAKT

Nedávne dôkazy naznačujú, že neurogenéza v subventrikulárnej zóne (SVZ) a v rostrálnej migračnej dráhe (RMS) môže byť regulovaná neurónmi nachádzajúcimi sa v týchto neurogénnych oblastiach. V SVZ/RMS dospelých potkanov boli identifikované dve populácie buniek s morfológickými a biochemickými charakteristikami zrelých neurónov: neuróny produkujúce oxid dusnatý (NO) a neuróny exprimujúce sekretagogín (SCGN).

Cieľom našej práce bolo získať nové morfológické údaje o týchto populáciách neurónov u intaktných potkanov a u potkanov, ktoré boli separované od matky (maternal separation - MS) počas prvých troch neonatálnych týždňov (3 hodiny/deň).

Skúmali sme počet a distribúciu týchto neurónov v SVZ a v jednotlivých častiach RMS. Dvojité imunofluorescenčné značenie pomocou neuronálnej syntetázy NO (nNOS) a SCGN potvrdilo prítomnosť nNOS⁺ a SCGN⁺ neurónov v SVZ/RMS s odlišnými morfológickými charakteristikami a distribúciou. Reakcia na MS bola pre každý typ buniek odlišná. U potkanov po MS, kvantitatívna analýza odhalila zvýšenie počtu nitrergických neurónov v SVZ/RMS, ktoré bolo signifikantné iba v SVZ. V prípade SCGN⁺ buniek, MS spôsobila signifikantný pokles ich počtu v kaudálnej časti RMS, kým v rostrálnej časti migračnej dráhy došlo k signifikantnému nárastu počtu týchto buniek. Distribúcia NO⁺ buniek v SVZ/RMS experimentálnych potkanov bola obdobná ako u kontrolnej skupiny. Čo sa týka distribúcie SCGN⁺ buniek, po MS nebolo zachované kaudorostrálne zníženie počtu týchto buniek, pozorované u kontrolných potkanov. U zvierat po MS sme pozorovali vyššiu hustotu SCGN⁺ buniek v rostrálnej časti RMS. Naše výsledky naznačujú, že populácie nitrergických a SCGN exprimujúcich neurónov v SVZ/RMS reagujú na separovanie mláďat od matky odlišnými zmenami v počte a distribúcii týchto neurónov.

ÚVOD

Postnatálna neurogenéza v čuchovej neurogénnej oblasti - SVZ/RMS - predstavuje komplexný proces, ktorý zahŕňa viaceré štádiá proliferácie, migrácie a diferenciácie neurálnych prekursorových buniek až po ich maturáciu do funkčných neurónov. Regulačné mechanizmy týchto procesov sú zložité a sú predmetom intenzívneho výskumu. Najnovšie poznatky poukazujú na to, že neurogenéza v SVZ/RMS by mohla byť regulovaná neurónmi nachádzajúcimi sa v týchto oblastiach. V RMS dospelého potkana boli doteraz identifikované dva typy buniek, ktoré vykazujú typické morfológické charakteristiky zrelých neurónov - neuróny produkujúce oxid dusnatý (NO) a neuróny exprimujúce sekretagogín (SCGN) (Hanics a kol., 2017; Račeková a kol., 2005). Oba typy neurónov zohrávajú v RMS dôležitú úlohu v regulácii neurogenézy. NO funguje ako významný regulátor bunkového delenia (Gutiérrez-Mecinas a kol., 2007; Packer a kol., 2003) a neuróny, ktoré exprimujú SCGN podporujú migráciu neuroblastov cez RMS, tým že uvoľňujú enzým matrix metalloprotease-2 (MMP-2) (Hanics a kol., 2017). Cieľom našej štúdie bolo sledovanie vplyvu opakovaného oddeľovania mláďat od matky, na NO⁺ a SCGN⁺ neuróny v čuchovej neurogénnej oblasti mozgu potkana (SVZ/RMS).

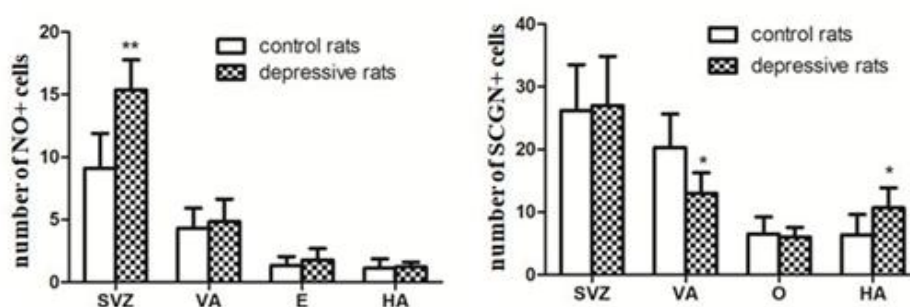
MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili potkany oboch pohlaví, kmeňa Wistar albino, ich chov prebiehal za štandardných podmienok zvieratníka NbÚ BMC SAV v Košiciach. Experimentálne zvieratá (mláďatá) sme separovali od matky na 3 hodiny denne, počnúc prvým dňom od ich narodenia,

a to počas prvých troch neonatálnych týždňov. Počas separácie sme mláďatá umiestňovali do inkubátora s teplotou približne 34 °C, čo zodpovedá prirodzenej teplote hniezda. Následne sa zvieratá dožívali dospelosti. Pred odberom tkaniva sme potkany uspali a transkardiálne prepláchli cez ľavú srdcovú komoru fyziologickým roztokom a následne 4 % paraformaldehyd v 0,1 M PBS. Potkany sme dekapitovali, vybrali sme mozgy z lebiek a postfixovali ich. Za pomoci kryomikrotómu sme mozgy potkanov nakrájali na 30 µm hrubé sagitálne rezy a uložili do 0,1 M PBS. Na identifikáciu NO⁺ a SCGN⁺ buniek v SVZ/RMS sme použili dvojité imunofluorescenčné značenie s použitím protilátok proti nNOS a SCGN.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Je známe, že rôzne exogénne faktory môžu významne ovplyvňovať špecifické mechanizmy postnatálnej neurogenézy v čuchovej oblasti mozgu. Naše predchádzajúce štúdie preukázali, že separácia mláďat od matky vedie k výrazným zmenám v bunkovej proliferácii, apoptóze buniek v oblasti RMS či zmenám v správaní zvierat (Fabiánová a kol., 2014; Lievajová a kol. 2011). Výsledky tejto štúdie preukázali, že separácia mláďat od matky má dlhodobý vplyv aj na počet a distribúciu NO⁺ a SCGN⁺ buniek v RMS potkana. Početnosť NO⁺ buniek v RMS nepreukázala signifikantné rozdiely medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou. V SVZ však bola u experimentálnych zvierat pozorovaná signifikantne vyššia hustota NO⁺ buniek v porovnaní s kontrolnou skupinou. Distribúcia NO⁺ buniek v SVZ/RMS experimentálnych potkanov bola obdobná ako u kontrolnej skupiny - s najvyššou hustotou buniek lokalizovanou v SVZ a vo vertikálnom ramene RMS v blízkosti laterálnej komory, a s najnižšou hustotou v horizontálnom ramene RMS. Pokiaľ ide o počet SCGN⁺ buniek u experimentálnych potkanov, zaznamenali sme signifikantný pokles ich počtu vo vertikálnom ramene RMS, zatiaľ čo v horizontálnom ramene RMS došlo k signifikantnému nárastu týchto buniek. Čo sa týka distribúcie SCGN⁺ buniek, za fyziologických podmienok sme pozorovali kaudorostrálne zníženie počtu SCGN⁺ buniek, pričom ich minimum sa nachádzalo v horizontálnom ramene RMS. Mikroskopická analýza odhalila signifikantné rozdiely v hustote SCGN⁺ buniek v čuchovej neurogénnej oblasti medzi kontrolnou a experimentálnou skupinou zvierat. U experimentálnej skupiny zvierat sme zistili vyššiu hustotu SCGN⁺ buniek v horizontálnom ramene RMS v porovnaní s ohybom migračnej dráhy (Graf 1). U zvierat po MS sme pozorovali aj masívnu agregáciu SCGN⁺ buniek lemujúcich dorzálny vonkajší okraj RMS. Odlišné zmeny v počte a distribúcii nitrergických a SCGN produkujúcich neurónov po MS naznačujú priestorovú selekciu účinku ranného stresu a odrážajú špecifickú citlivosť týchto neurónov na zmeny prostredia ako aj ich rozdielnu funkciu.



Graf 1. Kvantitatívna analýza počtu NO⁺ a SCGN⁺ buniek v SVZ a RMS u kontrolných a experimentálnych zvierat, (SVZ - subventricular zone, VA - vertical arm, E - elbow, HA - horizontal arm). Arithmetic mean ± SEM. Statistical significance: * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$

POĎAKOVANIE

Grantová podpora: APVV-23-0274 a VEGA 2/0101/25

POUŽITÁ LITERATÚRA

Fabianová K, et al. Diverse effect of different odor stimuli on behavior and Fos production in the olfactory system neurogenic region of adult rats. *Behav Brain Res*, 2014; 265: 38-48.

Gutiérrez-Mecinas M, et al. Migrating neuroblasts of the rostral migratory stream are putative targets for the action of nitric oxide. *Eur J Neurosci*. 2007; 26:392–402.

Hanics J, et al. Secretagogin-dependent matrix metalloprotease-2 release from neurons regulates neuroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114:E2006-E2015.

Lievajová K, et al. Delayed maturation and altered proliferation within the rat rostral migratory stream following maternal deprivation. *Eur J Histochem*, 2011; 55(4): 182-186.

Packer MA, et al. Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:9566–9571.

Račková E, et al. Age-related changes of NADPH-diaphorase positivity in the rat rostral migratory stream. *Cell Mol Neurobiol*, 2005; 25: 1093-1105.

VPLYV ORGANICKÝCH A ANORGANICKÝCH FORIEM SELÉNU NA JATOČNÉ A BIOCHEMICKÉ PARAMETRE PREPELÍC

Récky A.¹, Zigo F.¹, Hoppejová T.¹, Reitznerová A.², Balážová L.³

¹Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF v Košiciach

²Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, UVLF v Košiciach

³Katedra farmaceutickej technológie, farmakognózie a botaniky, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo určiť vplyv suplementácie rôznych foriem selénu (Se) vrátane nanočastíc Se ako doplnku v kŕmnej zmesi na kvalitu jatočného tela prepelíc. Do štúdie bolo zahrnutých celkovo 200 japonských prepelíc, rozdelených do štyroch skupín (n = 50/skupina). Ukázalo sa, že suplementácia Se, najmä v organickej a anorganickej forme, má pozitívny vplyv na kvalitu mäsa (znížený obsah tuku a zvýšený obsah bielkovín) ako aj na jeho oxidačnú stabilitu, pričom špecifické prínosy sa pravdepodobne líšia v závislosti od formy selénu.

ÚVOD

V poslednej dobe sa výrazne zvýšil záujem o potenciálne využitie nanomateriálov vo výžive hydiny. Primárne využitie nanotechnológie v tejto oblasti zahŕňa minerálne prvky v nanorozmeroch, ktoré môžu zmierniť antagonistické interakcie často pozorované s konvenčnými anorganickými minerálmi v gastrointestinálnom trakte a zvýšiť ich biologickú dostupnosť, čo umožňuje aplikáciu nižších účinných dávok (Gopi a kol., 2017). Nanočastice sa používajú v krmive hydiny na zníženie zaťaženia patogénnymi baktériami a zároveň na podporu prospešných probiotických baktérií, čo môže viesť k zlepšeniu výkonnosti (Mahmoud, 2012). Nanočastice selénu (SeNP) môžu tiež zlepšiť účinnosť kŕmenia, reprodukciu, rast a imunitné funkcie (Marković a kol., 2018).

MATERIÁL A METODIKA

V tejto štúdii bolo použitých celkovo 200 prepelíc. Prepelice boli chované za rovnakých podmienok v klietkach (150 × 150 × 200 cm), s 50 prepelicami na klietku. Všetky prepelice boli kŕmené štandardnou zmesou *ad libitum*. Mali neobmedzený prístup k pitnej vode. Na začiatku experimentu boli zvieratá rozdelené do štyroch skupín (n = 50/skupina) s dvoma opakovaniami v každej skupine: C (kontrolná skupina, štandardná strava bez prísad), skupina EXG1 (experimentálna skupina 1, dostávala štandardné krmivo + nanočastice selénu - 0,4 mg Se/kg krmiva), skupina EXG2 (experimentálna skupina 2, dostávala štandardné krmivo + seleničitan sodný - 0,4 mg Se/kg krmiva), skupina EXG3 (experimentálna skupina 3, dostávala štandardné krmivo + kvasinky so selénom - 0,4 mg Se/kg krmiva).

Priebeh experimentu

Na päťdesiaty deň boli prepelice zabité prerezaním krčnej žily a bola im odobratá krv na ďalšie vyšetrenie. Hmotnosť jatočného tela bola zaznamenaná po odstránení hlavy, kože a peria, vnútorností a distálnych častí končatín. Následne bola zo vzoriek prsného svalu vyhodnotená chemická analýza základných svalových zložiek.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1 sumarizuje výsledky vybraných ukazovateľov prepeličieho mäsa na 50. deň výkrmu. Obsah vody sa zvýšil ($P < 0,05$) v experimentálnej skupine prepelíc doplnených anorganickým selénom (Na_2SeO_3) v porovnaní so všetkými ostatnými skupinami. Obsah tuku bol nižší ($P < 0,05$) vo všetkých experimentálnych skupinách v porovnaní s kontrolnou skupinou, s najnižšími hodnotami v skupine suplementovanej organickeou formou selénu. Mierne zníženie obsahu bielkovín ($P < 0,05$) bolo zaznamenané v skupine SeNP a tiež v skupine suplementovanej organickeou formou selénu (kvasnicový Se) v porovnaní s kontrolnou

skupinou a skupinou s anorganickým selénom (Na_2SeO_3). Hodnota pH bola nižšia v skupine SeNP a v skupine doplnenej organickou formou selénu (kvasnicový Se) v porovnaní s kontrolnou skupinou a skupinou s anorganickým selénom. Hodnota MDA bola nižšia ($P < 0,05$) v experimentálnych skupinách doplnených organickou formou selénu a anorganickým selénom v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Parameter	SeNP		Na_2SeO_3		Kvasinky so Se		Kontrola	
	x	Sd	x	sd	x	sd	x	sd
Voda	69.36 ^b	0.28	70.47 ^a	0.31	69.81 ^b	0.29	69.70 ^b	0.51
Tuk	2.52	0.18	2.62	0.13	2.47 ^b	0.18	2.77 ^a	0.08
Popol	1.03 ^a	0.01	1.07 ^b	0.07	1.05	0.02	0.94	0.03
Bilkoviny	24.18 ^b	0.40	25.15 ^a	0.80	24.45 ^b	0.40	25.24 ^a	0.44
Ph	6.56 ^b	0.02	6.93 ^a	0.06	6.40 ^b	0.05	6.86 ^a	0.05
MDA	1.05 ^a	0.13	0.691 ^c	0.09	0.829 ^b	0.12	1.01 ^a	0.17

Tab. 1. Porovnanie vybraných ukazovateľov prepeličieho mäsa na 50. deň

Poznámka: SeNP – skupina prepelíc doplnená nanočasticami; Na_2SeO_3 – skupina prepelíc doplnená Na_2SeO_3 ; Kvasinky Se – skupina prepelíc doplnená kvasinkami so selénom, rôzne písmená v stĺpci na úrovni štatistickej významnosti $p < 0,05$.

ZÁVER

V záverečnej časti štúdie možno konštatovať, že na 50. deň výkrmu neboli medzi experimentálnymi skupinami a kontrolou žiadne významné rozdiely v jatočných parametroch. Tieto výsledky ukazujú, že suplementácia organickým alebo anorganickým Se nemá významný vplyv na rast prepelíc počas pozorovacieho obdobia, ale ďalší výskum by mohol objasniť potenciálne dlhodobé alebo nižšie účinky na zdravie a výkonnosť tejto formy hydiny. Na druhej strane, suplementácia rôznymi formami Se ovplyvnila vybrané parametre kvality prepeličieho mäsa počas monitorovaného obdobia. Analýzou prsnej svaloviny na 50. deň po odporazení v skupine prepelíc s organickým selénom (kvasnicový Se) boli zaznamenané nižšie hodnoty tuku a pH a znížené hladiny MDA, zatiaľ čo obsah vody sa opäť zvýšil v porovnaní s ostatnými skupinami. Celkovo výsledky naznačujú, že suplementácia Se, najmä v organickej a anorganickej forme, má pozitívny vplyv na kvalitu prepeličieho mäsa, najmä pre jeho oxidačnú stabilitu a obsahu tuku a bielkovín, pričom konkrétne prínosy sa pravdepodobne líšia v závislosti od použitej formy Se.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená grantom KEGA č. 011UVLF-4/2024: Zlepšenie kvality praktického vyučovania s podporou chovu zvierat a vysokoškolského vzdelávania pre študentov predmetu Chov zvierat.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Gopi MB, et al. Role of Nanoparticles in Animal and Poultry Nutrition: Modes of Action and Applications in Formulating Feed Additives and Food Processing. *International Journal of Pharmacology*. 2017; 13:724–731.
- Mahmoud UT. Silver Nanoparticles in Poultry Production. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 2012; 2:303–306.
- Marković RJ, et al. The Effects of Dietary Selenium-Yeast Level on Glutathione Peroxidase Activity, Tissue Selenium Content, Growth Performance, and Carcass and Meat Quality of Broilers. *Poultry Science*, 2018; 97:2861–2870

ZMENY AKTIVITY LAKTÁTDEHYDROGENÁZY A JEJ IZOENZÝMOV U PSEUDO GERM-FREE ANIMÁLNEHO MODELU PO APLIKÁCIÍ PROBIOTÍK, PREBIOTIKA A TRANSPLANTÁTU FEKÁLNEJ MIKROBIOTY OD NEUROTYPICKÝCH DONOROV A DONOROV S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Rodáková K.¹, Andrejčáková Z.¹, Vlčková R.¹, Gancarčíková S.², Lauko S.², Spišáková D.², Fusek M.³,
Aleksandra Sashova Tomova⁴, Sopková D.¹

¹ Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

² Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

³ Ústav matematiky, Fakulta elektrotechniky a komunikačných technológií, VUT Brno, Česká republika

⁴ Fyziologický ústav LF UK, Bratislava

ABSTRAKT

Neustále narastajúce počty pacientov s poruchami autistického spektra (PAS) podporujú vedeckú komunitu v štúdiách týchto ochorení, ich mechanizmov a vplyvu črevnej mikrobioty (ČM) na celkové fungovanie organizmu. V našej štúdii sme sa sústredili na bunkové poškodenie obličiek a pečene, zistené meraním aktivity laktátdehydrogenázy (LDH) a jej izoenzýmov, po aplikácii transplantátu fekálnej mikrobioty (FMT) od neurotypických darcov a detí s PAS s následným podávaním probiotík a prebiotík ako podpornej terapie. Výsledky preukázali signifikantný vplyv zdravej a autistickej (dysbiotickej) črevnej mikrobioty na aktivitu celkovej LDH a jej izoenzýmov v pečeni a obličkách u pseudo germ-free (PGF) animálneho modelu s redukovanou črevnou mikrobiotou. Podporná terapia pozostávajúca z bujónu s prídavkom *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* a krmiva so 4 % šrotovaným ľanovým semenom vyvolala signifikantnú redukciu poškodenia buniek v nami sledovaných orgánoch, čo sa preukázalo znížením aktivity LDH a jej izoforiem.

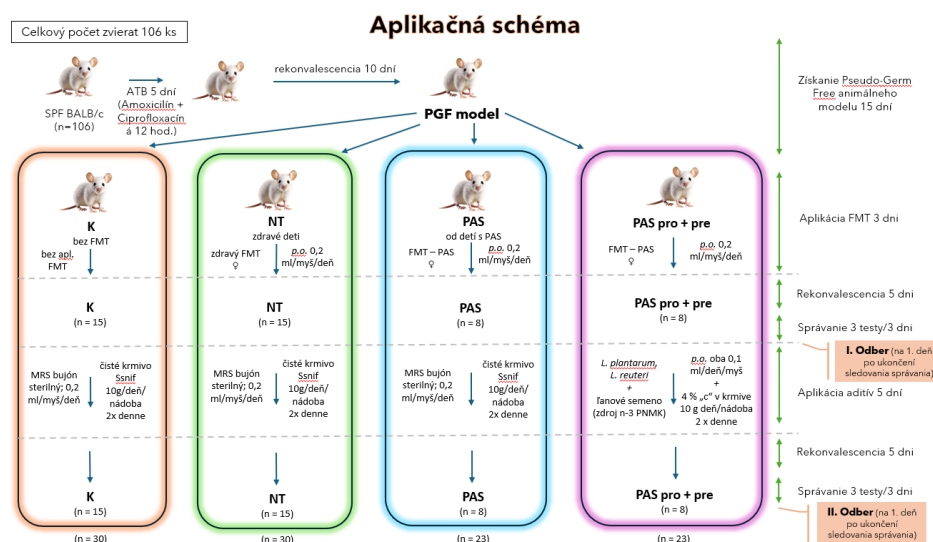
ÚVOD

Porucha autistického spektra je multifaktoriálna, dedičná a komplexná neurovývojová porucha charakterizovaná deficitmi v sociálnych interakciách, poruchami učenia, reči, stereotypným správaním, redukciou aktivít a záujmov (Cola a kol., 2020; Angrand a kol., 2022; Zhang a kol., 2023). Preferencia príjmu určitých potravín spôsobuje zmeny ČM, hlavne baktérii a plesní. Dysbióza je jedným z charakteristických znakov u niektorých pacientov s PAS, avšak do dnes nemá špecifickú bakteriálnu schému (Yang a kol., 2020, Zebrowska a kol., 2021). Mnohé štúdie potvrdili úzke prepojenie medzi ČM a fungovaním celého organizmu prostredníctvom osi mikrobiota-črevo-mozog (Kassam a kol., 2013, Wang a kol., 2019; Dongyue a kol., 2022; Zhang a kol., 2023). V našej štúdii sme sa zmerali na sledovanie poškodenia pečene a obličiek stanovením aktivity laktátdehydrogenázy a jej izoenzýmov po p.o. aplikácii FMT od neurotypických detí a detí s PAS, ktorým bola následne aplikovaná terapia vo forme probiotík (*Lactobacillus reuteri*, *Lactiplantibacillus plantarum*) a prebiotika (ľanové semeno).

MATERIÁL A METODIKA

V postupe boli použité BALB/c myši z chovného zariadenia Velaz s.r.o. (Praha, Česká republika). Specific pathogen free myši boli transportované do Laboratória gnotobiológie (SK U 16016) a vložené do izolátorov EHRET THF 3271/E 101/ (EHRET Labor-und Pharmatechnik GmbH Co.& KG, Emmendingen, Nemecko) a CBC (CBC, Ltd, Madison, Wisconsin, USA). Prijímali štandardnú radiačne žiarenú krmnu zmes ST-1 *ad libitum* a autoklávovanú vodu v sklenených fľašiach. Ďalší metodický postup je opísaný na Obr.1. Na antibiotickú dekontamináciu bol použitý amoxicilín (*Amoksiklav* 2 x 457 mg/5 ml) a ciprofloxacín (*Ciprinol con infusione* 5 x 10 ml/100 mg. Klinický stav zvierat bol sledovaný

v priebehu celého postupu. V supernatantoch tkanivových vzoriek (pečeň, obličky) bola analyzovaná celková laktátdehydrogenáza (TLDH) a jej izoenzýmy (izoLDH 1 – 5). Identifikačné číslo projektu ŠVPS: 4356/2022-220.



Obr. 1. Aplikačná schéma

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Meraním aktivity celkovej LDH v pečeni a obličkách sme nezaznamenali žiadne významné rozdiely medzi skupinami v rámci podávania FMT (I. obdobie). Rekonvalescencia (II. obdobie) spôsobila redukciu deštrukčných procesov pečenných buniek, čo naznačujú významné rozdiely medzi skupinami K a NT, NT a PAS. Aplikácia probiotík a prebiotík (II. obdobie) významne zredukovala TLDH v pečeni ($p < 0,05$) aj obličkách ($p < 0,001$).

Tkanivovo špecifický izoLDH-5 charakterizuje významné ($p < 0,05$; $p < 0,001$) zníženie poškodenia pečene v I. aj II. období v skupine NT a v II. období v skupine PAS pro+pre ($p < 0,001$). Naopak v skupine K a PAS zaznamenávame významne vyššiu ($p < 0,05$; $p < 0,001$) aktivitu, čo naznačuje zvýšenie deštrukcie buniek v pečeni. Významné zmeny v aktivite izoLDH-4 v jednotlivých skupinách môžu poukazovať na zápalový proces v tomto tkanive.

Výsledky meraní aktivity obličkových izoenzýmov naznačujú významne väčšie poškodenie v obličkách u skupiny K ($p < 0,05$; $p < 0,001$) v porovnaní s NT v I. aj II. období. Podobne významné zmeny zaznamenávame aj medzi skupinami PAS a NT, PAS a K ($p < 0,05$) v II. období postupu. Tieto hodnoty sa významne ($p < 0,05$; $p < 0,001$) zredukovali podaním probiotík a ľanového semena ako naznačuje skupina PAS pro + pre.

Na základe našich výsledkov konštatujeme, že aplikácia FMT od neurotypických detí u skupiny NT spôsobila zníženie aktivity meraných izoLDH aj TLDH v porovnaní so skupinou PAS, ktorým bol aplikovaný FMT od autistických detí v I. období postupu. Naznačuje to silný vplyv FMT na redukciu poškodenia buniek sledovaných orgánov a jeho prospešnosť pri osídlení zdravej ČM v čreve. Aplikáciou probiotík a prebiotika (II. obdobie) došlo k významnému poklesu deštrukcie buniek.

Záverom konštatujeme pozitívny vplyv aplikácie ľanového semena a probiotík na redukciu poškodenia pečene, obličiek a podporu obnovenia funkčnosti týchto orgánov.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola uskutočnená vďaka podpore projektu APVV-20-0114 a VEGA č. 1/0414/23. „Financované EÚ Next Generation EU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00017.“

POUŽITÁ LITERATÚRA

Aggletopoulou I, et al. The role of the Gut Microbiota in the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Microbial Pathogenesis*. 2019; 137.

Angrand L, et al. Inflammation and Autophagy: A Convergent Point between ASD-Related Genetic and Environmental Factors: Focus on Aluminium Adjuvants. *Toxic*. 2022; 10 (9), 518.

Cola M, L, et al. Sex Differences in the First Impressions Made by Girls and Boys with Autism. *Molecular Autism*. 2020; 11(49).

Dongyue L, et al. Fecal microbiota transplantation improves intestinal inflammation in mice with ulcerative colitis by modulation intestinal flora composition and down-regulating NF-kB signaling pathway. *MicrobialPathogenesis*. 2022; 173.

Feng P, et al. A review of probiotics on the treatment of autism spectrum disorders: Perspectives from the gut-brain-axis. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14.

Kassam Z, et al. Fecal microbiota transplantation for *Clostridium difficile* infection: Systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*. 2013; 108(4):500-508.

Rodáková K, et al. Therapeutic potential of faecal microbiota transplantat (FMT) on the biochemical marker of lactate dehydrogenase (LDH) and its isoenzymes in gastrointestinal disorders using the PGF animal model. *Book of abstract Animal Physiology*. 2023.

Wang J-W, et al. Fecal microbiota transplantation: Review and update. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2019; 118(1):23-31.

Yang J, et al. Effects of gut microbial-based treatments on gut microbiota, behavioral symptoms, and gastrointestinal symptoms in children with autism spectrum disorder: A systematic review. *Psychiatry Research*. 2020; 293.

Zebrowska P, et al. Future direction in reducing gastrointestinal disorders in children with ASD using fecal microbiota transplantation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11.

Zhang J, et al. Effect of fecal microbiota transplantation in children with autism spectrum disorder: A systematic review. *Frontiers in Psychiatry*. 2023; 14.

PREVALENCIE VYBRANÝCH PATOGÉNOV U ZÁSTUPCOV *LIPOPTENA* SPP. (DIPTERA: HIPPOBOSCIDAE)

Švirlochová K.M.^{1,2}, Víchová B., Vargová L.¹, Blažeková V.¹, Syrota Y.¹, Oboňa J.³, Csánady A.³,
Čisovská-Bazsalovicsová E.¹, Heglasová I.⁴, Zubriková D.¹

¹ Parazitologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice

² Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva
a farmácie v Košiciach

³ Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove

⁴ Katedra biológie a environmentálnych štúdií, Fakulta prírodných vied, Univerzita Mateja Bela v Banskej
Bystrici

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo posúdiť prítomnosť a prevalenciu vybraných patogénov prenášaných vektormi v kuklorodkách *Lipoptena* spp. na Slovensku. Ektoparazity boli odchytené z voľnej prírody z 15 lokalít a zároveň odobraté z jeleňov lesných (n = 13) a danielov škvritných (n = 2) z 3 oblastí Slovenska v rokoch 2023 a 2024. Nazbierané jedince boli morfológicky determinované a podrobené molekulárnemu skríningu vybraných patogénov. Celkovo bolo získaných 782 jedincov rodu *Lipoptena* (437 *L. fortisetosa* a 345 *L. cervi*). Na voľne žijúcej zveri bolo nájdených 230 jedincov *L. cervi* a 10 jedincov *L. fortisetosa*. Z voľnej prírody bolo odchytených 427 jedincov *L. fortisetosa*, a 115 jedincov *L. cervi*. Boli zistené vysoké prevalence *Bartonella* spp. (*L. cervi*: 88,3 %, *L. fortisetosa*: 90 %) a *Babesia/Theileria* spp. (*L. cervi*: 62,2 %, *L. fortisetosa*: 40 %) vo vzorkách zo zveri, zatiaľ čo z voľnej prírody bola prevalencia *Bartonella* spp. výrazne nižšia (*L. cervi*: 5,2 %, *L. fortisetosa*: 8 %). Nižšie hodnoty prevalence v jedincoch zo zveri boli zistené pri *Anaplasma phagocytophilum* (*L. cervi*: 24,3 %, *L. fortisetosa*: 30 %) a bičíkovcoch Kinetoplastida (*L. cervi*: 20,4 %, *L. fortisetosa*: 10 %). Prítomnosť *Babesia/Theileria* spp., *A. phagocytophilum* a zástupcov Kinetoplastida nebola vo vzorkách z voľnej prírody potvrdená. V signifikantne nižších hodnotách prevalence bola potvrdená prítomnosť hemotropných *Mycoplasma* spp. u oboch skupín kuklorodiek a *Rickettsia* spp. u jedincov z voľnej prírody. *Borrelia* spp. nebola detegovaná v žiadnej vzorke.

ÚVOD

Kuklorodky patriace do rodu *Lipoptena* (Hippoboscidae) sú obligátnymi ektoparazitmi cicavcov. V Európe je v súčasnosti známych päť druhov rodu *Lipoptena* (Salvetti a kol., 2020), z ktorých boli na Slovensku potvrdené dva druhy, a to pôvodný *Lipoptena cervi* (Linnaeus, 1758) a invázny *Lipoptena fortisetosa* Maa, 1965 (Oboňa a kol. 2019, 2020). U oboch druhov je hostiteľská preferencia na čel'ad' jeleňovitých, avšak boli zaznamenané aj na iných druhoch cicavcov (Oboňa a kol. 2019). Samice a samce *Lipoptena* spp. sú obligátne hematofágne sa živiace dvojkrídlovce, ktoré aktívne vyhľadávajú svojho hostiteľa (Oboňa a kol. 2019). Po nájdení vhodného hostiteľa zhodia krídla a usadia sa v srsti zvieraťa, kde sa živia krvou prostredníctvom prerušovaného cicania krvi. Pre kuklorodky je charakteristická adenotrofná viviparia (Dibo a kol. 2023). Molekulárno-genetické štúdie potvrdili v asociácii so zástupcami Hippoboscidae niekoľko patogénov veterinárneho i medicínskeho významu (Bruin a kol. 2015; Werszko a kol., 2020; Dibo a kol., 2023; Peña-Espinoza a kol., 2023). Podobné štúdie sú na Slovensku pomerne obmedzené. Víchová a kol. (2011) potvrdili výskyt baktérie *Anaplasma phagocytophilum* v kuklorodkách druhu *L. cervi* odstránených z jeleňov.

MATERIÁL A METODIKA

Prvá skupina kuklorodiek bola odobraná z legálne ulovených jedincov jeleňa lesného (*Cervus elaphus*) a daniela škvritného (*Dama dama*) z lokalít Hrabušice, Rozhanovce a Zákopčie/Podvysoká na jeseň 2024. Druhú skupinu tvorili kuklorodky hľadájúce hostiteľa, ktoré boli odchytené z vlajky využívanej na zber kliešťov alebo z odevu v októbri a novembri

2023 a v období od mája do septembra 2024 na 15 lokalitách (Korňa, Gelnica, Sabinov, Ruská Nová Ves, Prešov mesto, Prešov Dúbrava, Prešov Cemjata, Budimír, Košice Šaca, Košice Ľudvíkov dvor, Rudník, Hrhov, Nová Sedlica, Fijaš, Dublín). Identifikácia druhov bola vykonaná pomocou taxonomických kľúčov (Oboňa a kol., 2019). Extrakcia DNA zo skupiny kuklorodiek, ktoré boli získané z prostredia prebehla prostredníctvom metódy alkalické hydrolyzy (Guy a Stanek, 1991). DNA kuklorodiek z voľne žijúcej zveri bola izolovaná podľa príslušného protokolu komerčnej súpravy NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Düren, Nemecko). Vzorky boli následne vyšetrené na prítomnosť DNA vybraných patogénov. Každá vzorka bola individuálne vyšetrená na prítomnosť *Bartonella* spp. (Diaz a kol., 2012), *Babesia/Theileria* spp. (Casati a kol., 2006) a Kinetoplastida (Maslov et al., 1996; Votýpka et al., 2015). Na prítomnosť hemotropných *Mycoplasma* spp. (Varanat a kol., 2011), *Rickettsia* spp. (Choi a kol., 2005), *Borrelia* spp. (Derdáková a kol., 2003) a *Anaplasma phagocytophilum* (Massung a Slater, 2003) bola DNA analyzovaná v pooloch (každý 10 vzoriek). V prípade, že boli zoskupené vzorky pozitívne, PCR analýza sa vykonala pre každú vzorku zo zmesi individuálne. Výnimku tvorili hemotropné *Mycoplasma* spp., pri ktorých bola prevalencia meraná ako minimálna miera infekcie (MIR). Vybrané pozitívne PCR produkty boli purifikované pomocou NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Nemecko) a následne sekvenované.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo bolo za dané obdobie nazbieraných 782 jedincov rodu *Lipoptena* (437 *L. fortisetosa* a 345 *L. cervi*). Na voľne žijúcej zveri (13 jeleňov lesných, 2 daniely škvrnité) bolo nájdených 240 kuklorodiek, a to 106 samcov a 124 samíc *L. cervi* a 5 jedincov *L. fortisetosa* každého pohlavia. Na 15 lokalitách bolo nazbieraných 542 jedincov z voľnej prírody. Dominoval druh *L. fortisetosa*, v počte 427 jedincov (209 samíc a 218 samcov) a druh *L. cervi* bol zastúpený 115 jedincami (55 samíc a 60 samcov). Molekulárnymi analýzami bola potvrdená prítomnosť *Bartonella* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia/Theileria* spp., Kinetoplastida a hemotropných *Mycoplasma* spp. vo vzorkách z voľne žijúcej zveri. V jedincoch *Lipoptena* spp. odchytých vo voľnej prírode bola potvrdená prítomnosť hemotropných mykoplaziem, *Bartonella* spp. a *Rickettsia* spp. Rod *Borrelia* spp. nebol detegovaný ani u jednej skupiny. Najčastejšie sa vyskytujúcim patogénom boli baktérie *Bartonella* spp., pričom v kuklorodkách zo zveri bola zistená prevalencia s hodnotou 90 % u *L. fortisetosa* a 88,3 % u *L. cervi*. V druhej skupine pochádzajúcej z vegetácie bola zaznamenaná prevalencia *Bartonella* spp. podstatne nižšia, a to 8 % u *L. fortisetosa* a 5,2 % u *L. cervi*. Štatisticky vyššia prevalencia bartonél bola zaznamenaná u samíc oboch skupín a druhov. Druhá najvyššia prevalencia u kuklorodiek zo zveri bola zaznamenaná pri analýzach piroplaziem *Babesia/Theileria* spp. Pri druhu *L. fortisetosa* išlo o hodnotu 40 % a u *L. cervi* o 62,2 %. Tretím najčastejším potvrdeným patogénom v kuklorodkách hľadajúcich hostiteľa bola *A. phagocytophilum*. Hodnota prevalencie u *L. cervi* dosiahla 24,3 % a u *L. fortisetosa* 30 %. Bičíkovce Kinetoplastida boli potvrdené u 10% jedincov *L. fortisetosa* a u 20,4 % *L. cervi* zo zveri. Prítomnosť hemotropných *Mycoplasma* spp. bola zisťovaná v zmesi viacerých vzoriek a boli tak potvrdené u oboch skupín kuklorodiek. Pri skupine kuklorodiek z voľne žijúcej zveri bolo pozitívne testovaných 9 poolov DNA pochádzajúcej z *L. cervi* (MIR=3,9%) a žiadny pool tvorený z DNA *L. fortisetosa*. Naopak u jedincov z vegetácie boli hemotropné mycoplazmy detegované v 2 pooloch *L. fortisetosa* (MIR=0,47 %). Rod *Rickettsia* bol detegovaný len u kuklorodiek z vegetácie, s prevalenciou 0,7 % u *L. fortisetosa* a 1,7% u *L. cervi*.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola realizovaná vďaka finančnej podpore projektov VEGA 2/0033/25 (0,8) a VEGA 2/0051/24 (0,2).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bruin A, et al. Vertical transmission of *Bartonella schoenbuchensis* in *Lipoptena cervi*. *Parasit Vectors*. 2015; 8(176)
- Casati S, et al. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. For human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann Agric Environ Med*. 2006; 13(1): 65-70
- Choi YJ, et al. Spotted Fever Group and Typhus Group Rickettsioses in Humans, South Korea. *Emerg. Infect. Dis*. 2005; 11:237–244
- Derdáková M, et al. Genetic Variability within *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Genospecies Established by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of the rrfA-rrlB Intergenic Spacer in *Ixodes ricinus* Ticks from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol*. 2003; 69:509–516.
- Diaz MH, et al. Development of a novel genus-specific real-time PCR assay for detection and differentiation of *Bartonella* species and genotypes. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(5):1645-9.
- Dibo N, et al. A brief review on deer keds of the genus *Lipoptena* (Diptera: Hippoboscidae). *Veterinary Parasitology*. 2023; 313(5): 109850.
- Maslov DA, et al. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Mol Biochem Parasitol*. 1996; 75(2):197-205
- Massung RF and Slater KG. Comparison of PCR Assays for Detection of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Clin. Microbiol*. 2003; 41: 717-722.
- Oboňa J, et al. A revised annotated checklist of louse flies (Diptera: Hippoboscidae) from Slovakia. *Zookeys*. 2019; 862:129–152.
- Oboňa J, et al. Updated taxonomic keys of European Hippoboscidae (Diptera), with expansion in Central Europe of the bird louse fly *Ornithomya comosa* (Austen, 1930), first recorded from Slovakia. *Zookeys*. 2022; 1115:81–101.
- Peña-espinoza M, et al. Molecular pathogen screening of louse flies (Diptera: Hippoboscidae) from domestic and wild ruminants in Austria. *Parasites*. 2023; 16(179)
- Salvetti M, et al. Deer keds on wild ungulates in northern Italy, with a taxonomic key for the identification of *Lipoptena* spp. of Europe. *Medical and Veterinary Entomology*. 2020; 34(1): 74–85.
- Varanat M, et al. Molecular prevalence of *Bartonella*, *Babesia*, and hemotropic *Mycoplasma* sp. in dogs with splenic disease. *J Vet Intern Med*. 2011; 25(6):1284-91.
- Vichová B, et al. PCR detection of re-emerging tick-borne pathogen, *Anaplasma phagocytophilum*, in deer ked (*Lipoptena cervi*) a blood-sucking ectoparasite of cervids. *Biologia*. 2011; 66:1082–1086.
- Votýpka, J, et al. A tsetse and tabanid fly survey of African great apes habitats reveals the presence of a novel trypanosome lineage but the absence of *Trypanosoma brucei*. *Int. J. Parasitol*. 2015; 45:741–748.
- Werzsko J, et al. Molecular detection of *Trypanosoma* spp. in *Lipoptena cervi* and *Lipoptena fortisetosa* (Diptera: Hippoboscidae) and their potential role in the transmission of pathogens. *Parasitology*. 2020; 147(14): 1629–1635

POROVNANIE MIKROSKOPICKEJ A MOLEKULOVEJ DIAGNOSTIKY

NOSEMA SPP. U APIS MELLIFERA

Szabó I.¹, Sučík M.¹, Morochovičová J.¹, Sabová L.²

¹ Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

² Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

V tejto štúdii sme sa zamerali na určenie prevalencie *Nosema* spp. u včiel medonosných na Slovensku. Na tento účel boli odobraté vzorky dospelých včiel medonosných (*Apis mellifera*) z 500 včelstiev. Pri porovnaní troch diagnostických metód na 500 vzorkách boli zistené rozdiely v počte pozitívnych nálezov. Mikroskopia potvrdila infekciu v 23 % vzoriek, Duplex PCR v 21,4 % a RT PCR v 22 %. Negatívne výsledky sa pohybovali medzi 77 – 78,6 %. Všetky pozitívne vzorky boli identifikované ako *Nosema ceranae*, čo poukazuje na jej dominanciu a absenciu druhu *N. apis* v skúmanej populácii na Slovensku.

ÚVOD

Nozematóza je ochorenie spôsobené mikrosporídiami, prísne intracelulárnymi patogénmi príbuznými hubám. Výrazne postihuje včely medonosné (*Apis mellifera*) a jej pôvodcami sú najmä *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Hoci sú tieto druhy morfológicky podobné, *N. ceranae* sa považuje za agresívnejší patogén, keďže ide o novší druh pre včelu medonosnú (Emsen et al. 2016; Ansari et al. 2017).

Diagnostika prešla od tradičnej svetelnej mikroskopie k moderným molekulárnym metódam, najmä PCR, ktoré umožňujú presnejšiu detekciu na úrovni druhu a genotypu. Napriek technologickému pokroku však výskum nozematózy zostáva náročný a prináša ďalšie výzvy (Marín-García et al. 2022; Moeini et al. 2022).

MATERIÁL A METODIKA

Mikroskopia

Brušká včiel sme oddelili, rozomleli v 5 ml vody a následne pridali vodu v množstve 1 ml na včelu. Zo suspenzie sme pripravili preparát na podložnom sklíčku a vyšetrili ho mikroskopom pri 400-násobnom zväčšení (Fries et al. 2013).

Molekulárna diagnostika

DNA sme izolovali z brušiek včiel pomocou súpravy DNA-sorb-AM (AmpliSense) podľa pokynov výrobcu. Spóry sme rozbili homogenizátorom PRECELLYS (6500 ot./min., 2×45 s). Pre každú vzorku sme pripravili PCR zmes z PCR vody, master mixu a 10 µM primerov pre oba druhy *Nosema* spp., ku ktorej bol pridaný templát a zmes sa premiešala.

Zložky PCR zmesi	Množstvo
PCR voda	11,5 µl
Firepol Master Mix (Solis Biodine)	4 µl
APIS FOR (5'-GGGGCCATGTGTTTGACGTACTATGTA-3')	0,5 µl
APIS REV (5'-GGGGGGCGTTTAAAAATGTGAAACAACACTATG-3')	0,5 µl
MITOC FOR (5'-CGGCGACGATGATGATGATGAAAATATTAA-3')	0,5 µl
MITOC REV (5'-CCCGGTCATTCTCAAAAAAACC-3')	0,5 µl
Templát	2,5 µl

Tab. 1. Zložky PCR zmesi a ich množstvá

Duplexná PCR bola vykonaná na termocykleri VWR RISTRETTO s úvodnou denaturáciou (95 °C/4 min), nasledovanou 28 cyklami (95 °C/25 s, 58 °C/45 s, 72 °C/2 min) a záverečnou extenziou (72 °C/7 min). Produkty sme analyzovali gélovou elektroforézou (1,5 % agaróza),

vizualizovali UV transiluminátorom, koncentráciu DNA merali pomocou NanoDrop a následne sekvenovali.

Na detekciu *Nosema spp.* zo vzoriek včiel realizovanú prostredníctvom Real-time PCR sme použili PCR mix obsahujúci SYBR Green. Celkový objem reakčnej zmesi bol 25 µl, pričom obsahoval:

- FastStart Universal SYBR Green Master (Roche): 12,5 µl
- Špecifické primery (0,3 µM)- Použité pre detekciu *Nosema apis*
 APIS FOR (5'-GGGGCCATGTGTTTGACGTACTATGTA-3'): 0,5 µl
 APIS REV (5'-GGGGGGCGTTTAAAAATGTGAAACAACACTATG-3'): 0,5 µl
- PCR voda: 4,5 µl
- Templát: 7 µl
- FastStart Universal SYBR Green Master (Roche): 12,5 µl
- Špecifické primery (0,3 µM)- Použité pre detekciu *Nosema ceranae*
 MITOC FOR (5'-CGGCGACGATGATGATGATGAAAATATTAA-3'): 0,5 µl
 MITOC REV (5'-CCCGGTCATTCTCAAAAAAACC-3'): 0,5 µl
- PCR voda: 4,5 µl
- Templát: 7 µl

PCR reakcie prebiehali podľa (Malčeková et al. 2013) v termocykléri (LightCycler 480 II, Roche). Program pozostával z nasledujúcich krokov: inkubácia, počiatočná denaturácia, 40 cyklov denaturácie a hybridizácie a meltingu (teploty topenia) (Tab. 2).

Krok	Teplota	Čas	Počet cyklov
Inkubácia	50°C	2 minúty	1
Počiatočná denaturácia	95°C	10 minút	1
Denaturácia	95°C	15 sekúnd	
Hybridizácia	60°C	1 minúta	
Melting	95°C	15 sekúnd	1

Tab. 2. Program použitý pre Real-time PCR

Za pozitívnu sa považovala vzorka, ktorej teplota topenia bola rovnaká, alebo v rozsahu $\pm 0,5$ °C oproti teplote topenia vzorky pozitívnej kontroly. Pozitívne PCR produkty boli následne zasielané na sekvenáciu z oboch smerov. Získané sekvencie boli porovnané s databázou GenBank pomocou BLAST.

VÝSLEDKY

Tabuľka 3 porovnáva výťažnosť troch metód na 500 vzorkách. Najviac pozitívnych vzoriek detegovala mikroskopia, ktorá je zároveň najmenej nákladná. Duplexná PCR preukázala najnižší počet pozitívnych výsledkov, čo mohlo súvisieť s manipuláciou so vzorkami alebo ľudskou chybou. V porovnaní s real-time PCR je časovo náročnejšia, pričom finančné náklady oboch metód sú podobné.

Detekčná metóda	Celkový počet vzoriek	Pozitívne	Negatívne
Mikroskopia	500	115	385
Duplex PCR	500	107	393
RT PCR	500	110	390

Tab. 3. Porovnanie výťažnosti jednotlivých metód podľa nášho pracoviska

DISKUSIA

Mikroskopická analýza nosematózy je bežne využívaná včelármi aj výskumnými centrami, keďže je rýchla a finančne nenáročná. Obmedzuje sa však len na pozorovanie a počítanie spór,

ktoré predstavujú iba časť životného cyklu mikrosporídií, čo môže viesť k podhodnoteniu infekcie (Gray et al. 1969). Mikroskopia je preto spoľahlivá na základnú detekciu, no nepostačuje na presnú identifikáciu druhov a genotypov. Potrebu využitia molekulárnych metód (napr. PCR) potvrdzujú aj nedávne štúdie (Baigazanov et al. 2022).

POĎAKOVANIE

Ďakujeme všetkým včelárom za zaslanie vzoriek a podporu projektu.

Podakovanie: Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00017; APVV-21-0185; GP MŠVVaŠ SR VEGA 1/0161/23

POUŽITÁ LITERATÚRA

Ansari MJ, et al. Geographical distribution and molecular detection of *Nosema ceranae* from indigenous honey bees of Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci.* 2017; 24:983–991.

Baigazanov A, et al. Occurrence of Nosemosis in honey bee, *Apis mellifera* L. at the apiaries of East Kazakhstan. *PeerJ.* 2022; 10:e14430.

Emsen B, et al. Higher prevalence and levels of *Nosema ceranae* than *Nosema apis* infections in Canadian honey bee colonies. *Parasitol Res.* 2016; 115:175–181.

Fries I, et al. Standard methods for *Nosema* research. *J Apic Res.* 2013; 52.

Gray FH, Cali A, Briggs JD. Intracellular stages in the life cycle of the microsporidian *Nosema apis*. *J Invertebr Pathol.* 1969; 14:391–394.

Malčeková B, et al. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in wild waterfowl of Slovakia. *Acta Parasitol.* 2013; 58.

Marín-García PJ, et al. The Role of *Nosema ceranae* (Microsporidia: Nosematidae) in Honey Bee Colony Losses and Current Insights on Treatment. *Vet Sci.* 2022; 9:130.

Moeini S, Malekifard F, Tavassoli M. Identification of the *Nosema spp.*, a microsporidian parasite isolated from the honey bees (*Apis mellifera*) and its association with honey bee colony losses in apiaries of Iran. *J Hell Vet Med Soc.* 2022; 73:3667–3672.

VPLYV SUPLEMENTÁCIE ZDROJOV OMEGA-3 MASTNÝCH KYSELÍN NA KRVNÝ OBRAZ A PROFIL MASTNÝCH KYSELÍN V KRVI U KONÍ S CHRONICKÝMI DÝCHACÍMI PROBLÉMAMI

Tvrda A., Hreško Šamudovská A., Bujňák L.
Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom našej štúdie bolo zistiť účinky perorálneho, komerčne dostupného doplnku omega-3 mastných kyselín (MK) konkrétne oleja z morských rias *Schizochitrium lamaricum* na profil vybraných MK v krvi koní. Štúdia bola vykonaná na 6 koňoch s diagnostikovanou stredne závažnou konskou astmou. Koňom bola upravená kŕmna dávka tak, aby neobsahovala iný zdroj omega-3 MK. Do večernej kŕmnej dávky bol pridávaný DHA Vet Oil, v dávke ktorú odporúča výrobca – prvých 20 dní v množstve 50 ml / deň a následne ďalších 30 dní 30 ml / deň. Žiaden koň nevykazoval problémy s príjmom krmiva s pridaným olejom. Všetky kone boli odvážené, podrobené klinickému vyšetreniu s hodnotením celkového stavu, vitálnych funkcií a prítomnosti kašľa v pokoji a následne v miernej záťaž. Bola im odobratá krv a zaslaná na laboratórnu analýzu – hematologické vyšetrenie a profil mastných kyselín. Merania a odber krvi prebehol 0. a 51. deň sledovacieho obdobia a následne sme porovnali skúmané parametre pred a po 50. dňoch skrmovania oleja z morských rias. Pozorovali sme zvýšenie hmotnosti a zlepšenie sledovaných vitálnych funkcií. Pri všetkých koňoch nastala úprava hematologických parametrov a celkové zlepšenie kondičného stavu podľa subjektívneho hodnotenia majiteľov koní. Pri porovnaní hodnôt MK v krvi pred a po suplementácii oleja, bol zistený štatisticky významný rozdiel ($P < 0,01$) v prípade kyseliny dokosaheptaénovej a koeficientu ω -3, ktorý je súčtom percentuálnych hodnôt troch mastných kyselín (EPA, DHA, DPA) z celkového množstva MK v krvi.

ÚVOD

Astma je chronické neinfekčné zápalové obštrukčné ochorenie dolných dýchacích ciest (Leclerc a kol., 2011). Konská astma je klinicky reverzibilná, predispozícia ku vzniku astmy je geneticky podmienená. Nie je vyliečiteľná, dá sa kontrolovať úpravou prostredia. Astma je typická civilizačná choroba koní s genetickým potenciálom (Bezděková, 2020). Zvládnutie astmy vyžaduje zníženie prítomnosti alergénov na minimum, pretože spúšťajú zápalovú reakciu. Po úprave manažmentu, môžu výživové doplnky zohrávať úlohu pri podpore imunitného systému a zdravia dýchacích ciest. Omega-3 MK majú protizápalové vlastnosti, ktoré môžu modulovať imunitnú odpoveď po vystavení alergénom a tlmiť hyperreakcie (Bazay a kol., 2025). Kys. alfa-linolénová je esenciálna polynenasýtená MK a prekursor ω -3 MK. Prirodzene sa vyskytuje v ľane a chia semenkách, môže sa metabolizovať na kys. eikozapentaénovú (EPA) a kys. dokosaheptaénovú (DHA). Rybí olej je bohatým zdrojom EPA aj DHA, zatiaľ čo riasy obsahujú vysoké koncentrácie DHA. Pozitívny efekt suplementácie bol preukázaný pri dávke 1,5 - 3g DHA pri podávaní minimálne dvoch mesiacov. Inkorporácia ω -3MK, prebieha v závislosti od dávky na úkor kyseliny arachidónovej, a v dôsledku toho je k dispozícii menej substrátu pre syntézu prozápalových eikosanoidov. Ďalšie úlohy ω -3MK v zápale zahŕňajú zníženie aktivácie nukleárneho faktora kappa-b a zníženie tvorby zápalových cytokínov, ako je tumor nekrotizujúci faktor- α , interleukín-1b (IL-1b), IL-6, IL-8 a menšiu expresiu adhézných molekúl (Nogradi a kol., 2015). Cieľom našej štúdie bolo vyhodnotiť klinickú účinnosť doplnku krmiva pre kone bohatého na DHA u koní postihnutých konskou astmou na základe zmien klinického skóre, tolerance záťaže, hematologických parametrov a profilu MK v krvi.

MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu bolo zaradených 6 koní plemena Slovenský teplokrvník vo veku 12 – 25 rokov, kobyly $n = 4$ a valach $n = 2$, s váhovým rozmedzím 450 – 540 kg. Všetky kone mali už diagnostikovaný stredne závažný stupeň konskej astmy a boli ľahko jazdené 2x týždenne. Zvieratá boli ustajnené v 3 rôznych maštaliach v okolí Košíc, s rovnakým režimom 12/12 (12 hodín pasienok, 12 hodín box s otvoreným paddockom), s voľným prístupom k vode, senu v sieťke raz denne (ráno) a boli dokrmované bezobilninovým krmivom na báze senných granúl (Fitmin Musli Grainfree) večer. U koní bol skrmovaný olej DHA Vet Oil, ktorý obsahuje olej z morských rias *Schizochitrium lamaricum* so štandardizovaným obsahom DHA (za studena lisovaný ľanový, repkový olej, rozmarínový extrakt CO₂, tokoferoly - tuk 99,9 %). Dĺžka sledovacieho obdobia bola 50 dní. Koňom bolo prvých 20 dní podávaných 50 ml (3 g DHA) a nasledujúcich 30 dní 30 ml (1,5 g DHA) oleja. Po rannom kŕmení senom (0. deň) bola všetkým koňom odobratá venózna krv do sterilných skúmaviek s prídavkom antikoagulačného činidla kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA) na hematologické vyšetrenie. Toto vyšetrenie bolo vykonané v laboratóriu Unilabs, realizované automatickým hematologickým analyzátorom. V laboratóriu Medirex bol z nezrazenej plnej krvi vyšetrený profil MK. Analýza bola realizovaná po zmrazení vzoriek pomocou plynovej chromatografie, štandardnou metódou pre stanovenie profilu MK. Kone boli odmerané pomocou pásky na meranie hmotnosti EQUI-LIFE, zhodnotil sa ich celkový zdravotný stav a vykonalo sa meranie vitálnych funkcií. Pulzová frekvencia za 60 sekúnd bola stanovená palpáciou *a. facialis* v mieste jej priebehu po dolnom okraji mandibuly. Dychová frekvencia za 60 sekúnd a typ dýchania boli hodnotené vizuálnym pozorovaním pohybov hrudníka a nozdier. Sledovali sme prítomnosť análneho a alárneho dýchania, kašľa, výtoku z nozdier a dýchavičnej stružky. Merania prebehli 4x – v pokoji, po 5tich minútach krokovania na lonži, po 5tich minútach v kluse na lonži a následne po 5tich minútach v pokoji. Tým sme sledovali aj toleranciu záťaže. Na 51. deň ráno sa zopakoval odber krvi a celý postup meraní. Na štatistickú analýzu bola použitý t-test v softvéri GraphPad Prism 8.0.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po suplementácii DHA oleja u koní s astmou sme zaznamenali nesignifikantný pokles počtu neutrofilov a súčasne zvýšenie počtu lymfocytov v periférnej krvi (Tab.1). Tento efekt možno vysvetliť imunomodulačným účinkom ω -3MK. DHA sa začleňuje do fosfolipidov bunkových membrán a metabolizuje sa na specialized pro-resolving mediators (SPMs). Tieto látky tlmia migráciu a aktiváciu neutrofilov v dýchacích cestách, čím redukujú neutrofilnú zložku zápalu, súčasne podporujú prežívanie a funkciu lymfocytov, najmä regulačných T-buniek, čo môže viesť k zvýšeniu lymfocytov v periférnej krvi (Monteverde a kol., 2016).

Okrem hematologických zmien sa potvrdil aj nárast hladín ω -3 MK v krvi (Tab.2), štatisticky významný u DHA a koeficientu ω -3 ($P < 0,01$). Tieto výsledky dokumentujú efektívnu inkorporáciu doplnenej DHA do lipidového profilu a naznačujú posun imunitnej odpovede smerom k rezolúcii zápalu a imunoregulačnému profilu.

Pearson a kol. (2022) vykonali štúdiu na 50 koňoch, ktorým bol podávaný Omega Benefits Oil s obsahom 0,092g/1g DHA a 0,148g/1g EPA MK s odbermi plnej venóznej krvi po 6 a 12 týždňoch. Prvá skupina koní dostávala 0,69g/deň DHA a 1,11g/deň EPA a druhá skupina koní dvojnásobok. Podľa ich výsledkov po suplementácii došlo k významnému zvýšeniu ($P < 0,05$) všetkých hodnotených ω -3MK, vrátane DHA a EPA, u oboch skupín, v porovnaní s východiskovými hodnotami a významnému poklesu ($P < 0,05$) omega-6 mastných kyselín v krvi po 6 týždňoch, avšak medzi odberom vykonanom v 6. vs. 12. týždni už nebol žiaden významný rozdiel. V štúdií Kinga a kol. (2008) skúmali zmeny hodnôt DHA a EPA v plazme koní pri podávaní vysokých dávok (10, 20, 40 g EPA a DHA/deň) počas 28 dní. Plazmatické EPA a DHA sa zvýšili ($P < 0,05$) spôsobom reagujúcim na dávku o 3 dni kŕmenia a dosiahli

maximálne koncentrácie o 7 dní. Maximálne koncentrácie EPA a DHA v skupine s doplnkom 40 g/d boli približne 13× a 10× vyššie ako ich koncentrácie v kontrolných skupinách. Plazmatické EPA a DHA preukázali prudký pokles ($P < 0,05$) z maximálnych hodnôt o 9 dní po ukončení suplementácie a o 42 dní boli blízko hodnôt pred suplementáciou. Tieto výsledky naznačujú, že cirkulujúce prostredie MK u koní možno ovplyvniť cielenou suplementáciou.

Sledovaný parameter	0. deň ($\bar{x} \pm \text{StD.}$)	51. deň ($\bar{x} \pm \text{StD.}$)
Leukocyty	$7,96 \pm 2,90$	$8,37 \pm 1,41$
Erytrocyty	$7,09 \pm 1,04$	$7,31 \pm 0,42$
Neutrofily	$70,75 \pm 13,09$	$65,75 \pm 12,60$
Lymfocyty	$27,5 \pm 12,37$	$30,5 \pm 9,98$

Tab. 1. Vybrané hematologické parametre a ich priemerné hodnoty v krvi (priemer $\pm$ smerodajná odchýlka)

Sledovaný parameter	0. deň ($\bar{x} \pm \text{StD.}$)	51. deň ($\bar{x} \pm \text{StD.}$)
Kys. α -linolénová (ALA), C18:3, ω -3	$16,62 \pm 2,69$	$17,93 \pm 2,52$
Kys. dokosapentaenová (DPA), C22:5, ω -3	$0,39 \pm 0,17$	$0,44 \pm 0,14$
Kys. eikosapentaenová (EPA), C20:5, ω -3	$0,51 \pm 0,19$	$0,61 \pm 0,25$
Kys. dokosaheptaenová (DHA), C22:6, ω -3	$0,63 \pm 0,05$	$1,22 \pm 0,27^{**}$
Koeficient ω -3	$1,40 \pm 0,24$	$2,10 \pm 0,24^{**}$

Tab. 2. Vybrané ω -3 MK a ich priemerné hodnoty v krvi (priemer $\pm$ smerodajná odchýlka) $^{}P < 0,01$**

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla s podporou projektu VEGA 1/0698/24 - Sledovanie účinku kŕmnych doplnkových látok prírodného pôvodu a alternatívnych kŕmnych komponentov na produkciu a zdravie monogastričných zvierat.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bazay C, Darani P, Bowyer C. Heaves in Horses: Symptoms, Treatment & How to Manage. MadBarn. 2025. <https://madbarn.com/equine-heaves/>.
- Bezděková, B. Onemocnění dýchacího aparátu v praxi. Blansko 2020.
- King SS, et al. Circulating fatty acid profiles in response to three levels of dietary omega-3 fatty acid supplementation in horses. J Anim Sci. 2008;86,5:1114–1123.
- Leclerc M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie J.-P. Heaves, an asthma-like disease of horses. Respirology. 2011;16:1027-1046.
- Monteverde V, et al. Influence of omega-3 in Standardbred horse: haematological parameters. Ann Anim Sci. 2016;16:145–154.
- Nogradi N, et al. Omega-3 Fatty Acid Supplementation Provides an Additional Benefit to a Low-Dust Diet in the Management of Horses with Chronic Lower Airway Inflammatory Disease. J Vet Intern Med. 2015;29:299–306.
- Pearson G, et al. Dose-Dependent Increase in Whole Blood Omega-3 Fatty Acid Concentration in Horses Receiving a Marine-Based Fatty-Acid Supplement. J Equi Vet Sci. 2022;108.

NUKLEOKAPSIDOVÝ PROTEÍN SARS-COV-2 SPROSTREDKUJE INTERAKCIU VÍRUSU S REGULÁTORMI KOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU

Víglaský J.¹, Bhide K.¹, Talpašová L.¹, Fialová L., Bhide M.^{1,2}

¹Laboratórium biomedicínskej mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

²Neuroimunologický ústav, SAV, Bratislava

ABSTRAKT

Nukleokapsidový (N) proteín SARS-CoV-2 je možné detegovať v plazme pacientov s COVID-19 a jeho koncentrácia koreluje so závažnosťou priebehu ochorenia. Je tiež významným imunomodulačným proteínom, ktorý má schopnosť stimulovať tvorbu zápalových cytokínov. Dysregulácia komplementového systému počas ochorenia COVID-19 a prítomnosť N proteínu v plazme pacientov viedla k formovaniu hypotézy, že vírusový spike (S), alebo N proteín môžu interagovať s regulátormi komplementového systému. V tejto práci sme preukázali, že N proteín, na rozdiel od S proteínu, interaguje s viacerými regulátormi, konkrétne C1 inhibítorom, C4-viažúcim proteínom, faktorom H a vitronektínom. Zároveň sme preukázali aj interakciu medzi S a N proteínom, ako aj priamu interakciu SARS-CoV-2 viriónov s N proteínom. Podarilo sa nám detegovať komplex viriónu, N proteínu a regulátorov komplementu, čo poukazuje na schopnosť tohto proteínu prinášať regulátory na povrch viriónu a potenciálne tak zabrániť aktivácii komplementového systému. Tieto výsledky naznačujú, že vzťah SARS-CoV-2 a komplementového systému si zaslúži ďalšiu pozornosť.

ÚVOD

Komplementový systém je súčasťou vrodenej imunity a pozostáva z viac ako 30 plazmových proteínov. Tie sa podieľajú na rozpoznávaní a neutralizácii patogénov ako sú baktérie, parazity a vírusy (Dunkelberger a Song 2010). Ide o nešpecifický systém, je prísne kontrolovaný pomocou regulačných proteínov (CRP; complement regulatory protein), ktoré zabráňujú jeho aktivácii na hostiteľských bunkách. Mnohé patogény si vyvinuli mechanizmy využívania regulátorov komplementu vo svoj prospech. Vírusy sa vyznačujú produkciou proteínov, ktoré napodobňujú hostiteľské regulátory (napr. VCP proteín vírusu ovčích kiahní) (Kotwal a Moss 1988) alebo proteínov bez homológie k tým hostiteľským. Takýmto proteínom je aj neštruktúrny proteín 1 (NS1) produkovaný flavivírusmi. NS1 sa viaže na rozpustný CRP faktor H (fH), C4-viažúci proteín (C4BP), vitronektín (VTN) a klasterín. Interakcie NS1 a rozpustných CRP vedú k urýchlenej degradácii aktivátorov komplementu a inhibícii terminálnej kaskády, ktorá by viedla k lýze infikovaných buniek (Avirutnan a kol. 2011; Chung a kol. 2006; Conde a kol. 2016; Kurosu a kol. 2007). Charakteristickým prejavom infekcie SARS-CoV-2 je dysregulácia komplementu. Väčšina výskumu bola spoiatku sústredená na hyperaktiváciu komplementu týmto vírusom, zatiaľ čo o jeho inhibícii vieme stále málo. Jedným z mechanizmov ako SARS-CoV-2 inhibuje komplement je jeho schopnosť inkorporovať do svojho obalu hostiteľské membránové CRP CD55 a CD59, čím blokuje komplementom sprostredkovanú neutralizáciu (Gebetsberger a kol. 2024). Cieľom tejto práce bolo odhaliť nové interakcie SARS-CoV-2 s rozpustnými CRP.

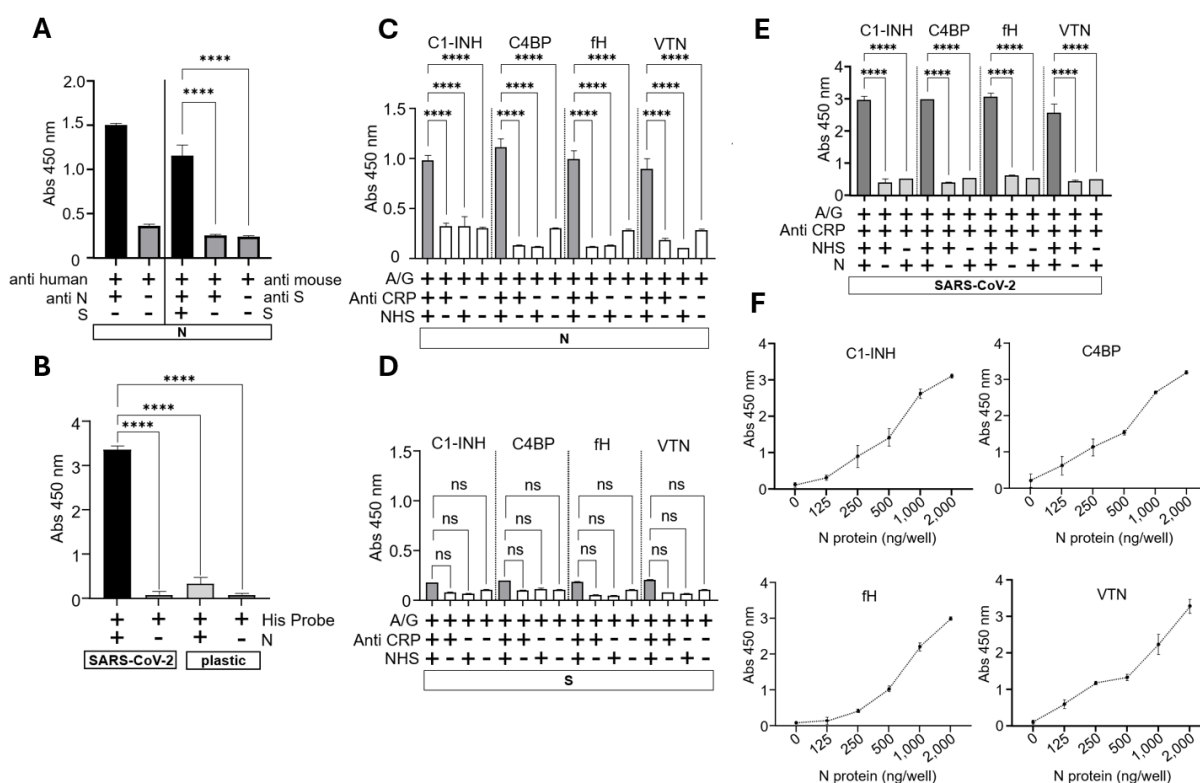
MATERIÁL A METODIKA

V práci boli využité rekombinantné proteíny SARS-CoV-2 (N protein a S protein), ľudské sérum získané pred pandémiou COVID-19 a vírus SARS-CoV-2 variant BA.5 Omicron. Práca s vírusovým materiálom, jeho pomnoženie, titrácia a príprava mikrotitračnej platničky boli vykonané v laboratóriu BSL-3. Na zistenie interakcie medzi N a S proteínmi bol použitý dot blot, ktorého výsledok bol validovaný pomocou ELISA testu. Interakcia N proteínu a SARS-CoV-2 viriónov bola potvrdená pomocou ELISA testu. Väzobné miesto N proteínu na S proteíne bolo mapované pomocou metódy čiastočnej trypsinizácie komplexu N-S na PVDF membráne a následnej analýzy pomocou MALDI-TOF MS (Mertinková a kol. 2020).

Interakcie vírusových proteínov s regulátormi komplementu boli detegované pomocou ELISA testu a far Western blotu s použitím ľudského séra a protilátok špecifických voči CRP: C1 inhibitor (C1-INH), C4BP, fH a VTN. Schopnosť N proteínu sprostredkovať väzbu medzi viriónom a CRP bola dokázaná na fixovaných viriónoch SARS-CoV-2 pomocou ELISA testu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V tejto práci sa nám podarilo potvrdiť už publikovanú interakciu proteínov N a S (Obr. 1A) (Park a kol. 2021), ako aj interakciu proteínu N s inaktivovaným SARS-CoV-2 viriónom (Obr. 1B). Mapovanie väzobných miest odhalilo, že táto interakcia prebieha pravdepodobne na N-terminálnej doméne proteínu S. Rovnako sa nám podarilo preukázať interakcie N proteínu s rozpustnými CRP (C1-INH, C4BP, fH a VTN) v ľudskom sére (Obr. 1C). Proteín S nevykazoval žiadnu interakciu s vybranými CRP (Obr. 1D). Interakcia rozpustných CRP s viriónmi prebiehala iba v prípade, že bol do séra pridaný N proteín, čo naznačuje nielen to, že N proteín môže prinášať tieto CRP na povrch viriónu, ale aj to, že väzobné miesta CRP na N proteíne sa neprekrývajú s väzobnými miestami S proteínu (Obr. 1E). Zároveň je väzba CRP na virión sprostredkovaná N proteínom závislá na koncentrácii N proteínu (Obr. 1F).



Obr. 1. Výsledky práce. A – Výsledok ELISA testu potvrdzujúci interakciu proteínov S a N. B – Výsledok ELISA testu potvrdzujúci interakciu proteínu N a viriónov. C – Výsledok ELISA testu preukazujúci interakcie N proteínu s rozpustnými CRP v ľudskom sére. D – Proteín S neinteraguje s vybranými CRP. E – Interakcie rozpustných CRP so SARS-CoV-2 prebiehajú iba v prítomnosti N proteínu. F – Väzba rozpustných CRP je závislá na koncentrácii N proteínu v sére.

Štúdium interakcií vírusových proteínov s komplementom ukázalo, ako dokážu vírusy efektívne obchádzať imunitnú odpoveď. Podobné interakcie, ako boli identifikované v tejto práci, sú známe u flavivírusov a ich proteínu NS1 (Avirutnan a kol. 2011; Chung a kol. 2006; Conde a kol. 2016; Kurosu a kol. 2007). Predpokladáme, že väzba komplexu N proteínu s CRP na virión môže predstavovať nový evázny mechanizmus vírusu SARS-CoV-2.

POĎAKOVANIE

Financované EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V05-00017 a grantami VEGA 1/0381/23, APVV-22-0084, APVV-21-0478.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Avirutnan P, et al. Binding of Flavivirus Nonstructural Protein NS1 to C4b Binding Protein Modulates Complement Activation. *The Journal of Immunology*. 2011; 187: 424-33.

Chung KM, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006; 103: 19111-16.

Conde JN, et al. Inhibition of the Membrane Attack Complex by Dengue Virus NS1 through Interaction with Vitronectin and Terminal Complement Proteins. *J Virol*. 2016; 90: 9570-81.

Dunkelberger JR and Song WCH. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*. 2010; 20: 34-50.

Gebetsberger L, et al. SARS-CoV-2 hijacks host CD55, CD59 and factor H to impair antibody-dependent complement-mediated lysis. *Emerg Microbes Infect*. 2024;13: 2417868.

Kotwal GJ and Moss B. Vaccinia virus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature*. 1988; 335: 176-78.

Kurosu T, et al. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 362: 1051-56.

Mertinková P, et al. A simple and rapid pipeline for identification of receptor-binding sites on the surface proteins of pathogens. *Sci Rep*. 2020; 10: 1163.

Park BK, et al. MERS-CoV and SARS-CoV-2 replication can be inhibited by targeting the interaction between the viral spike protein and the nucleocapsid protein. *Theranostics*. 2021; 11: 3853-67.

IN VIVO INTERAKCIA METICILÍN-REZISTENTNÉHO KMEŇA *KOCURIA VARIANS* R33/4 S ENTEROCÍNOM ENT7420 NA MODELI MYŠÍ

Zábolyová N.^{1,2}, Dvorožňáková E.³, Bino E.¹, Kandričáková A.³, Maloveská M.³, Krištofová R.^{1,2}, Plachá I.¹, Grešáková L.¹, Lauková A.¹, Pogány Simonová M.¹

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

²Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

³Parazitologický ústav SAV, Košice

ABSTRAKT

Problematika meticilínovej rezistencie (MR), napriek obmedzeniu jeho používania v klinickej praxi, predstavuje stále aktuálnu tému. V experimente sme sa zamerali na aplikáciu dvoch rôznych substancií – čiastočne purifikovaného enterocínu (Ent) 7420 a MR kmeňa *Kocuria varians* R33/4 a ich vplyvu na črevnú mikrobiotu a imunitnú odpoveď (slizničný imunoglobulín-sIgA a fagocytárna aktivita-FA) na modeli BALB/c myši. Podávaný MR kmeň R33/4 bol schopný kolonizovať črevný trakt myši v rozmedzí 1,55-2,73 log₁₀ KTJ/g. V skupine s podávaným kmeňom R33/4 sme pozorovali pokles hmotnosti zvierat v porovnaní s kontrolnou skupinou. Aplikované substancie stimulovali črevnú imunitu (zvýšenie sIgA). Ent7420 znížil počty kmeňa R33/4 o 0,2 log cyklu, teda sa potvrdil jeho antibakteriálny účinok. Výsledky poukazujú na negatívne účinky MR kmeňa *K. varians* R33/4 na črevný environment, ako aj na protektívny efekt Ent7420 počas pôsobenia podmienene patogénneho agens.

ÚVOD

Za posledné desaťročia došlo k výraznému posunu v epidemiológii infekcií meticilín-rezistentných stafylokokov (MRS), predovšetkým MR kmeňa druhu *Staphylococcus aureus* (MRSA). Infekcie, ktoré boli spočiatku obmedzené na zdravotnícke zariadenia, boli pozorované predovšetkým u zamestnancov nemocníc a pacientov s oslabeným imunitným systémom. Krátko nato sa objavili kmene získané v komunite (CA-MRSA), ktoré spôsobovali infekcie aj u zdravých jedincov a rýchlo sa šírili. MRSA asociovaná s hospodárskymi zvieratami (LA-MRSA) sa vyvinula prenosom z človeka na zvieracieho hostiteľa, prostredníctvom klonov, ktoré pôvodne infikovali dobytok, ale občas sa dokázali adaptovať a infikovať aj ľudí. Okrem MRSA možno za významné zdroje rezistencie považovať aj MR koaguláza-negatívne stafylokoky a príbuzné druhy – *Kocuria* spp., ktorá vyniká svojou známou schopnosťou prežiť v extrémnych podmienkach. Tento druh, ktorý je v mikrobiologických laboratóriách veľmi často nesprávne identifikovaný ako koaguláza-negatívny stafylokok (Kandi a kol., 2016), patrí do čeľade Micrococcaceae, radu Micrococcales a kmeňa Actinomycetota, bol prvýkrát navrhnutý v roku 1995 Stackebrandtom a kol. S cieľom nájsť nové spôsoby v boji proti tejto hrozbe - antimikrobiálnej rezistencie sa stále hľadajú možné alternatívy. Jednou z nich sú napríklad bakteriocíny/enterocíny (Ent; antimikrobiálne proteínové substancie produkované najmä kyselinu mliečnu produkujúcimi baktériami/niektorými bakteriálnymi kmeňmi druhu *Enterococcus* spp.) s inhibičným účinkom proti viac či menej príbuzným baktériám (Nes a kol., 2014) zo skupiny postbiotík, ktoré predstavujú reálnu možnosť účinnej kontroly nad stafylokokovými infekciami a zároveň minimalizáciu rozvoja rezistencie voči antimikrobiálnej liečbe. Cieľom tejto štúdie bolo preto overiť *in vivo* interakciu Ent7420 (charakterizovaného v našom laboratóriu) s MR kmeňom *K. varians* R33/4, ktorý obsahuje gény pre rezistenciu voči meticilínu (*mecA*, *mecC*) erytromycínu (*ermC*) a penicilínu (*blaZ*), zhodnotiť antibakteriálne účinky Ent7420, vplyv MR kmeňa *K. varians* R33/4 (simulácia podmienene patogénneho/patogénneho prostredia) ako aj kombinovanej aplikácie oboch substancií na fyziologické, mikrobiologické a imunologické parametre BALB/c myši.

METODIKA

Experiment bol realizovaný na Parazitologickom ústave SAV (schválený Etickou komisiou pre ochranu zvierat chovaných a používaných na vedecké účely a vzdelávacie účely) s využitím BALB/c myši (n=40) vo veku v priemere 39 dní oboch pohlaví. Myši boli rozdelené do 4 skupín: v skupine S bol podávaný rifapicínom značený MR kmeň *K. varians* R33/4 pre odlíšenie od ostatnej mikrobioty (10^8 KTJ/ml/g; v dávke 100 μ l/zviera/deň *per os*) po dobu 7 dní (0.-7. deň experimentu), v skupine E sa podával Ent7420 (100 μ l/zviera/deň *p.o.*) po dobu 14 dní (8. – 21. deň), a králikom v skupine S+E sa podávala kombinácia oboch aditív; myši v kontrolnej skupine (K) boli bez aplikácie substancií. Od 22. dňa boli všetky zvieratá kŕmené iba štandardnou diétou, bez podávania substancií. Experiment trval 42 dní. Vzorky trusu boli odoberané v 0/1. (zmesná vzorka), 7., 21. a 42. deň (n=3/skupina). Krv bola získaná pomocou celkovej pentobarbitálovej anestézy (50mg/kg ž.hm.), ktorá bola podaná intraperitoneálne. Následne sme pristúpili k samotnému odberu krvi punkciou srdca v dňoch 0., 7., 21. a 42., ktorá bola podrobená analýze na fagocytárnu aktivitu (FA; Šteruská a kol., 1981) a aktivitu enzýmu glutatión-peroxidáza (GPx; komerčný kit Randox; Anglicko). Na 0., 7., 21. a 42. deň boli zabité myši z každej skupiny (0. deň n=1/skupina; 7., 21., 42. deň n=3/skupina), pre odber jednotlivých úsekov čreva (tenké, hrubé, slepé črevo) na štandardné mikrobiologické vyšetrenie ako aj proximálnej časti jejuna pre stanovenie hladiny slizničného imunoglobulínu A v črevnej stene (sIgA; Nikawa a kol., 1999). Jednotlivé bakteriálne druhy (MR kmeň R33/4, stafylokoky, MRS, koliformné baktérie, kyselinu mliečnu produkujúce baktérie – KMPB) boli stanovené štandardnou mikrobiologickou riediacou metódou na selektívnych médiách podľa ISO. Platne sa inkubovali pri 37 °C počas 48 h. Počet baktérií bol vyjadrený v kolónie tvoriacich jednotkách na gram (KTJ/g, log₁₀) $\pm$ SD. Sledovaný bol i rast myší, prírastky na hmotnosti sa zaznamenávali v týždenných intervaloch.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Schopnosť aplikovaného MR kmeňa R33/4 kolonizovať tráviaci trakt sa potvrdila jeho záchytom v jednotlivých úsekoch čreva počas celého trvania experimentu, pričom sa postupujúcim časom etabloval a na 42. deň v truse dosahoval hodnotu $5,54 \pm 0,64$ log₁₀ KTJ/g v skupine S, resp. $4,58 \pm 0,25$ log₁₀ KTJ/g v skupine S+E (Tabuľka č. 1). Na 7. deň v týchto skupinách bol pozorovaný aj významný nárast počtu stafylokokov ($p < 0,0022$; resp. $p < 0,0036$) oproti kontrolnej skupine (o 2,11; resp. 1,50 log cyklu), čo môžeme vysvetliť samotnou aplikáciou kmeňa R33/4, keďže určité druhy stafylokokov sú schopné ovplyvniť rast baktérií druhu *K. varians* (a naopak; Tremonté a kol., 2007). Antimikrobiálny efekt Ent7420 na ostatnú črevnú mikrobiotu myší, vrátane koliformných baktérií sa počas experimentu nepotvrdil. Tieto výsledky nekorelujú s výsledkami predchádzajúcej štúdie (Simonová a kol., 2009), kedy s postupujúcim časom experimentu klesali počty koliformných baktérií po podávaní Ent7420 králikom. Pri sledovaní rastu myší bol zaznamenaný úbytok na hmotnosti počas aplikácie MR kmeňa R33/4 v skupine S ($-0,42$ g), čo naznačuje jeho negatívny vplyv na rast zvierat. Hodnoty sIgA sa výrazne zvýšili na 7. deň experimentu v pokusných skupinách (K: $8,13 \pm 0,76$; S: $15,49 \pm 7,43$; E: $13,41 \pm 0,79$; S+E: $13,46 \pm 1,78$; $p < 0,0096$); vyššie hodnoty sIgA v skupine S potvrdzujú negatívne pôsobenie kmeňa MR R33/4 na črevo resp. črevnú imunitu. Optimalizovaná/znížená koncentrácia sIgA počas podávania Ent7420 v kombinácii s MR kmeňom R33/4 svedčí o ochrannom efekte Ent7420. Protektívny účinok enterocínu EntA/P na morfológiu črevného epitelu počas pôsobenia MR kmeňa *S. epidermidis* P3Tr2a (MRSE) bol popísaný aj u králikov (Pogány Simonová a kol., 2024). Hodnoty FA a GPx boli počas celej doby experimentu vyrovnané resp. neboli ovplyvnené podávanými substanciami.

		K		S		E		S+E
MR R33/4	7.	NT	7.	1,70*	7.	NT	7.	2,45±0,18
	42.	NT	42.	5,54±0,64	42.	NT	42.	4,58±0,25
Stafylokoky	7.	2,00±0,06 ^a	7.	4,11±0,22 ^b	7.	2,39±0,26 ^a	7.	3,50±0,29 ^b
	42.	2,02±0,23 ^a	42.	2,49±0,11 ^a	42.	2,64±0,18 ^a	42.	3,59±0,16 ^b
KMPB	7.	8,54±0,71	7.	8,16±0,17	7.	7,93±0,00	7.	7,50±0,59
	42.	9,81±0,34	42.	9,64±0,29	42.	9,80±0,12	42.	9,47±0,21
Koliformné baktérie	7.	4,57±0,40	7.	3,82±0,94	7.	2,39±0,13	7.	2,97±0,26
	42.	3,60±0,99	42.	3,73±0,45	42.	4,45±0,21	42.	3,36±0,14
MRS	7.	NT	7.	2,25±0,78	7.	NT	7.	2,15*
	42.	NT	42.	2,35±0,92	42.	NT	42.	2,65±1,34

Tab.1. Počty sledovaných baktérií v truse (log₁₀ KTJ/g)

KTJ/g – kolónie tvoriace jednotky na gram; NT – netestované; * - ojedinelý výskyt (štatisticky nevýznamný)

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektami Doktogrant APP0595 a VEGA 2/0009/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Aboelnaga N, et al. Deciphering the dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: from molecular signaling to nanotherapeutic advances. Cell Commun Signal. 2024, 22.1: 188.

Kandi V, et al. Emerging bacterial infection: identification and clinical significance of *Kocuria* species. Cureus. 2016, 8.8.

Lauková A, et al. *Enterococcus faecium* AL 41: Its enterocin M and their beneficial use in rabbits husbandry. Probiotics and Antimicrob Proteins. 2012, 4.4: 243-249.

Ness IF, Diep DB, Ike Y. Enterococcal bacteriocins and antimicrobial proteins that contribute to niche control. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

Nikawa T, et al. Vitamin A prevents the decline in immunoglobulin A and Th2 cytokine levels in small intestinal mucosa of protein-malnourished mice. J Nutr. 1999, 129.5: 934-941.

Pogány Simonová M, et al. The effect of enterocin A/P dipeptide on growth performance, glutathione-peroxidase activity, IgA secretion and jejunal morphology in rabbits after experimental methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* P3Tr2a Infection. Vet Res Commun. 2024, 48.1: 507-517.

Pogány Simonová M, Chrastinová E, Lauková A. Autochthonous strain *Enterococcus faecium* EF2019 (CCM7420), its bacteriocin and their beneficial effects in broiler rabbits—A review. Animals. 2020,10:7:1188.

Simonová M. Pogány, et al. *Enterococcus faecium* CCM7420, bacteriocin PPB CCM7420 and their effect in the digestive tract of rabbits. Czech J Anim Sci. 2009, 54.8: 376-386.

Stackebrandt E, Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. Nov., *Nesterenkonia* gen. Nov., *Kytococcus* gen. Nov., *Dermacoccus* gen. Nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. Emend. Int J Syst Bacteriol. 2000, 45, 682–692

Šteruská M. Some tests intended for investigation of the function of leukocytes. In: Hematology and Transfusion. Osveta, Martin (Slovakia), 1981, 228-236.

Tremonte P, et al. Interactions between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. J Appl Microbiol. 2007, 103.3: 743-751.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2025

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XX. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2025

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 978-80-974246-8-8

ISBN 978-80-974246-8-8