

CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2024

Zborník zo seminára doktorandov venovaného
pamiatke akademika Boďu

XIX. ročník

Košice, 7. a 8. november 2024

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2024

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

XIX. ročník

Košice, 7. a 8. november 2024

**Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný pamiatke
akademika Bod'u
7. a 8. november 2024
Košice**

Organizátori seminára:

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

Zborník zostavila:

RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

Recenzovali:

doc. RNDr. Beáta Holečková, PhD.

doc. MVDr. Marián Prokeš, 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



CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED

OBSAH

DARCOM NAVODENÉ BAKTERIÁLNE INFEKCIE V TRANSPLANTOLÓGII : SÚČASNÉ POZNATKY A VÝZVY

Adandedjan D., Kalanin R., Hulík Š., Gaľa I.8

THE TEMPORAL VARIABILITY OF HALOTOLERANT AND HALOPHILIC MICROBIOTA OF SOLIVAR NEAR PRESOV (SLOVAKIA) SALT BRINE

Adhvaryu S., Kiskova J., Nasalova L., Piknova M., Pristas P.11

VPLYV N-3 PUFA NA VYBRANÉ RECEPTORY MYOMETRIA MYŠÍ

Babjáková D., Lecová M., Sopková D., Gancarčíková S., Rodáková K., Vlčková R.
.....14

VPLYV PODÁVANIA NANOČASTÍC ZINKU NA MINERÁLNY A ANTIOXIDAČNÝ STATUS JAHNIAT

Bombárová A.17

ANALÝZA DEDIČNÝCH OČNÝCH OCHORENÍ U PSOV POMOCOU KONVENČNÝCH METÓD PCR

Bučan J., Galdíková M., Halušková J., Schwarzbacherová, V.20

VPLYV MANAŽMENTU PASTVY NA RASTOVÉ UKAZOVATELE, BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A MIKROBIOTU JAHNIAT S ENDOPARAZITMI

Demčáková K., Petrič D., Várady M., Váradyová Z.23

ÉTERICKÉ OLEJE AKO ALTERNATÍVNE ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY V AKVAKULTÚRE

Hudecová P., Hajdučková V., Király J., Koščová J., Horňák.....26

RAAV VECTORS IN GENE THERAPY AND THEIR TESTING ON AN ALTERNATIVE CAM MODEL

Hurníková J., Demčíšáková Z., Cucchiarini M., Petrovová E.29

HORMONÁLNA NEROVNOVÁHA PO TRAUMATICKOM PORANENÍ MIECHY JE SPOJENÁ SO ZMENAMI V EXPRESII ANGIOTENZÍNŮVÝCH RECEPTOROV

Hvozdíková E., Kellerová E., Snopková J., Liptáková V., Pavel J.32

VYUŽITIE MULTIKRITERIÁLNEJ ANALÝZY NA HODNOTENIE RIZIKOVÝCH OBLASTÍ VÝSKYTU ČREVNÝCH ENDOPARAZITOV

Ihnacik L., Šmigová J., Papajová I.35

DETEKCIA ZMENY POHYBOVEJ AKTIVITY KRÍVAJÚCICH DOJNÍC POMOCOU AUTOMATIZOVANÉHO MONITOROVACIEHO SYSTÉMU

Ivančová P., Mudroň P.38

PRVÉ POTVRDENIE VTÁČÍCH HEMOSPORÍDÍ V PAKOMÁRIKOC (*CULICOIDES*) NA SLOVENSKU

Janošková N., Schreiberová A., Korytár L., Minichová L., Bernotienė R., Valavičiūtė-Pocienė
K., Kazak M., Kočišová A.41

KOMPARATÍVNE HODNOTENIE VEĽKOSTI SRDCOVEJ SILUETY U PSOV POMOCOU RÖNTGENOVÉHO VYŠETRENIA A POČÍTAČOVEJ TOMOGRAFIE

Kacková G., Horňák S., Figurová M., Agudelo C. F., Vargová N.44

OVPLYVNIA KLIMATICKÉ ZMENY DRUHOVÚ SKLADBU MACHOVCOV NA SLOVENSKU?

Kaduková M., Schreiberová A., Štrkolcová G.47

FORMATION OF INSULIN AMYLOID AGGREGATION UNDER SPECIFIC EXPERIMENTAL CONDITIONS

Kareem H. A., Bednarikova Z., Gažová Z.50

OVPLYVNENIE MIKROBIÓMU A IMUNITY VČIEL MEDONOSNÝCH PO APLIKÁCIÍ HUMÍNOVÝCH LÁTOK	
Kollár Moskáľová L., Ratvaj M., Chomová N., Danihlík J., Mudroňová D.....	53
THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF THYMOL IN THE FORM OF GASTRO-RESISTANT PELLETS ON ITS ABSORPTION FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF RABBITS	
Kristofova R., Zitterl-Eglseer K., Capucchio M. T., Ippolito D., Gai F., Franc A., Placha I.....	56
LINEÁRNY PLAZMID ZO <i>STREPTOMYCES</i> SP. P17	
Lorková Z., Kisková J., Pristaš P.	59
SYNERGICKÝ EFEKT KOMBINOVANEJ TERAPIE A JEHO ÚČINKY PRI LIEČBE TRAUMATICKÉHO POŠKODENIA MIECHY	
Magurová M., Bačová M., Papcunová Š., Ihnátová L., Lukáčová N., Gálik J	62
ANALÝZA SATELITNEJ DNA U TROCH DRUHOV HÁČIKOHLAVCOV RODU <i>ACANTHOCEPHALUS</i>	
Marková A., Orosová M.....	65
MATERIÁL UiO-66-NH₂ POVRCHOVO MODIFIKOVANÝ KYSELINOU LISTOVOU AKO NOSIČ PROTINÁDOROVÉHO LIEČIVA	
Migasová A., Huntošová V., Zelenka T., Almáši M.	68
FOTÓN-UPKOVERZNÉ NANOČASTICE A ICH POTENCIÁL ZVYŠOVAŤ ÚČINNOSŤ FOTODYNAMICKEJ TERAPIE	
Olejárová S., Gulyášová T., Huntošová V.	71
PRVÝ DÔKAZ O VÝSKYTE ÁZIJSKÉHO KMEŇA CPV-2B NA SLOVENSKU U OČKOVANÉHO PSA S ÁKUTNYM FATÁLNYM PRIEBEHOM PARVOVÍRUSOVEJ INFEKČIE: KAZUISTIKA	
Pelegrinová A., Petroušková P., Korytár L., Ondrejková A., Dražovská M., Vojtek B., Mojžišová J., Kostičák M., Zákutná L., Dolník M., Mandelík R.....	74
BAKTERIÁLNA MIKROBIOTA MIEST KONCENTRÁCIE VYSOKOHORSKEJ TURISTIKY SO ZAMERANÍM NA VÝSKYT A PATOGENITU <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> V TRUSE VRCHÁRKY ČERVENKAVEJ (<i>PRUNELLA COLLARIS</i>) DETEGOVANEJ POMOCOU RT-PCR	
Pitoňáková T., Koščová J.	77
ÚLOHA ČREVNÉHO MIKROBIÓMU V PATOGENÉZE ULCERÓZNEJ KOLITÍDY	
Ryniková M., Adamková P., Gancarčíková S., Lauko S., Hajdučková V., Janičko M., Demečková V.....	80
ANGIOGÉNNY POTENCIÁL BIOMATERIÁLOV URČENÝCH PRE REGENERAČNÚ MEDICÍNU	
Tirpáková Z., Luptáková L., Petrovová E., Musílková J., Bačáková L.....	83
VÝSKYT GÉNOV REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ A VIRULENTNÝCH FAKTOROV U STAFYLOKOKOV ANIMÁLNEHO PÔVODU	
Zábolyová N., Lauková A., Troscianczyk A., Pogány Simonová M.	86

DARCOM NAVODENÉ BAKTERIÁLNE INFEKČIE V TRANSPLANTOLÓGII: SÚČASNÉ POZNATKY A VÝZVY

Adandedjan D., Kalanin R., Hulík Š., Gaľa I.
Chirurgická klinika UNLP a LF UPJŠ

ABSTRAKT

Darcom navodené bakteriálne infekcie (DNBI) sú nedostatočne skúmanou, ale veľmi závažnou komplikáciou pri transplantácii orgánov. Tieto infekcie prenášané z darcov orgánov na príjemcov môžu mať za následok závažné následky vrátane zlyhania transplantátu a mortality príjemcov orgánov. Pokroky v skríningu darcov a diagnostických metodikách zlepšili diagnostiku bakteriálnych infekcií u darcu, ale problémy pretrvávajú, najmä pri zvládaní latentných, oportúnnych a hlavne multi-rezistentných patogénov. Táto mini-review sumarizuje súčasné poznatky o DNBI, skúma mechanizmy prenosu baktérií a prezentuje stratégie prevencie a liečby DNBI. Skúma tiež nové diagnostické technológie vrátane molekulárnych techník, ktorých cieľom je znížiť výskyt DNBI. Budúce úsilie by sa malo zamerať na integráciu týchto technológií do rutínnej praxe s cieľom zlepšiť výsledky u pacientov.

ÚVOD

Transplantácie orgánov výrazne zlepšili prežívanie pacientov v konečnom štádiu zlyhania orgánov. Infekčné komplikácie však naďalej zostávajú hlavnou príčinou morbidita a mortality u príjemcov transplantátov a predstavujú významnú príčinu úmrtí po transplantácii (Fishman, 2017). Bakteriálne infekcie pochádzajúce od darcu sú obzvlášť znepokojujúce, pretože ich môže byť ťažké odhaliť pred transplantáciou a prejavujú sa až po transplantácii, pričom môžu spôsobiť systémové infekcie, sepsu alebo dysfunkciu štepu (Ison a Nalesnik, 2011). Hoci sa vďaka zlepšeniu skríningu darcov podarilo znížiť niektoré riziká, DNBI stále predstavujú značnú hrozbu pre prežitie štepu aj príjemcu (Wolfe a kol., 2021).

MECHANIZMY PRENOSU

K DNBI dochádza v prípade bakteriálnej kolonizácie orgánov pred ich odberom. Pravdepodobnosť bakteriálnej kolonizácie zvyšujú faktory, ako je sepsa darcu, predĺžený pobyt na jednotke intenzívnej starostlivosti (JIS) a podstúpenie invazívnym zákrokom (Kotton a Fishman, 2005). Gramnegatívne baktérie, ako napríklad *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*, sú v týchto prípadoch najčastejšie prenášanými patogénmi (Schulz a kol., 2015). Riziko prenosu je obzvlášť vysoké v niektorých orgánoch, ako sú pľúca, obličky a pečeň, vzhľadom na ich prirodzenú náchylnosť na infekciu (Albright a kol., 2020).

DIAGNOSTIKA A SKRÍNING

Konvenčné skríningové metódy bakteriálnych infekcií u darcov sa opierajú predovšetkým o kultivačné techniky. Tieto metódy však môžu byť pomalé a môžu zlyhať pri odhaľovaní rýchlych alebo latentných organizmov (Morris a kol., 2020). Novšie diagnostické techniky vrátane polymerázovej reťazovej reakcie a sekvenovania novej generácie sľubujú rýchlejšiu a presnejšiu detekciu bakteriálnej DNA v tkanivách darcov (Zangwill a kol., 2018). Napriek tomu sa tieto metódy zatiaľ v klinickej praxi široko neuplatňujú a rozlišovanie medzi kolonizáciou a aktívnou infekciou zostáva výzvou (Ison a kol., 2019).

KLINICKÉ PREJAVY A VPLYV NA PRÍJEMCOV

Klinický obraz DNBI sa líši v závislosti od transplantovaného orgánu a špecifických baktérií. Napríklad bakteriálna pneumónia je bežná u príjemcov transplantovaných pľúc, zatiaľ čo infekcie močových ciest sú časté u príjemcov transplantovanej obličky (Cervera a kol., 2011). Ak sa tieto infekcie okamžite neliečia, môžu viesť k závažnej sepse, orgánovej dysfunkcii

alebo smrti (Pereira a kol., 2009). Hoci DNBI predstavujú len malé percento infekcií po transplantácii, sú často závažnejšie a spojené s horšími výsledkami ako iné typy infekcií (Green a kol., 2016).

PREVENČIA A LIEČBA

Prevenčia DNBI závisí najmä od dôkladného skríningu darcov a profylaxie príjemcov. V súčasnosti je štandardným prístupom antibiotická profylaxia založená na infekčnom profile darcu (Grossi a kol., 2009). Táto stratégia je však obmedzená neúplnými znalosťami o infekciách resp. bakteriálnej kolonizácii darcu v čase transplantácie. V prípadoch, kde sa diagnostikuje DNBI, je rozhodujúca okamžitá antibiotická liečba prispôbená konkrétnemu patogénu (Ison, 2011). Zvyšujúci sa výskyt multirezistentných baktérií komplikuje stratégie liečby, pretože si často vyžaduje používanie rezervných antibiotík, ktoré sa počas štandardnej antibiotickej profylaxie nepoužívajú. (Kotton a Fishman, 2005).

Inovatívnym riešením tohto problému môže byť v súčasnosti využívaná strojová perfúzia. Systémy strojovej perfúzie umožňujú uchovávanie orgánov darcov *ex vivo* v kontrolovanom prostredí, kde môžu byť nepretržite perfundované prezervačným roztokom. Táto metóda nielenže zlepšuje konzerváciu orgánov, ale poskytuje aj možnosť cielej liečby pred transplantáciou. V nedávnej štúdiu preukázala strojová perfúzia v kombinácii s antibiotikami významný úspech pri prevencii prenosu baktérií MDR z darcov na príjemcov (Liang a kol., 2022). Tento proces zahŕňa cirkuláciu perfuzátu napusteného antibiotikami cez orgán, ktorý sa priamo zameriava na patogény v orgáne darcu a minimalizuje riziko vzniku infekcie po transplantácii (Liang a kol., 2022). Napríklad orgány kolonizované multirezistentnými patogénmi, ako sú karbapeném-rezistentná *Klebsiella pneumoniae* alebo ESLB-produkujúca *Escherichia coli*, ktoré sa štandardnými metódami ťažko likvidujú, vykazujú zníženú bakteriálnu záťaž pri liečbe strojovou perfúziou v kombinácii so širokospektrálnymi antibiotikami. Táto stratégia je preto sľubná nielen pri znižovaní výskytu DNBI, ale aj pri zachovaní orgánov, ktoré by inak mohli byť zlikvidované kvôli bakteriálnej kontaminácii (Liang a kol., 2022).

Táto inovatívna metodika predstavuje významný pokrok v prevencii DNBI. Integráciou antibiotickej liečby do procesu strojovej perfúzie môže byť možné zmierniť riziká prenosu MDR baktérií, najmä vo vysoko rizikových orgánoch, ako sú pľúca, obličky a pečeň, kde je riziko infekcie najvyššie (Schulz a kol., 2015). Táto metóda sa čoraz viac považuje za kľúčový nástroj v boji proti antimikrobiálnej rezistencii v súvislosti s transplantáciou.

NOVÉ TECHNOLOGIE A BUDÚCE SMEROVANIE

Nové molekulárne diagnostické techniky vrátane metagenomiky a proteomiky otvárajú cestu k presnejšej detekcii bakteriálnych infekcií v orgánoch darcov (Cervera a kol., 2011). Tieto metódy majú potenciál rýchlo identifikovať bakteriálnu DNA a poskytnúť lekárom údaje v reálnom čase, čo umožní rýchlejšiu detekciu potenciálneho vzniku DNBI (Zangwill a kol., 2018). Okrem toho by integrácia algoritmov strojového učenia na analýzu údajov o darcoch a príjemcoch mohla výrazne zlepšiť predpovedanie rizika infekcie a pomôcť pri usmerňovaní individualizovaných stratégií profylaxie (Albright a kol., 2020). Keď sa tieto technológie zdokonalia, ich zavedenie do klinickej praxe môže znížiť výskyt a závažnosť DNBI. Budúci výskum strojovej perfúzie v kombinácii s antibiotikami predstavuje zásadný krok vpred v oblasti uchovávania orgánov a prevencie darcom navodených infekcií. Nedávne štúdie naznačujú, že táto metóda by sa mohla stať základom manažmentu darcovských orgánov, najmä v situáciách, keď štandardná antibiotická profylaxia nepostačuje. Liečbou orgánov antibiotikami počas procesu perfúzie bude možné v klinickej praxi výrazne znížiť bakteriálnu záťaž pred transplantáciou, čím sa zvýši pravdepodobnosť úspešnej funkcie štepu a znížia sa potransplantačné komplikácie spôsobené DNBI (Liang a kol., 2022).

Strojová perfúzia pridanými antibiotikami kombinovaná s molekulárnou diagnostikou pre optimalizáciu výberu orgánov a prispôsobenie antibiotickej liečby na základe prítomných špecifických patogénov predstavuje správny smer v prevencii a prípadnej liečbe DNBI (Zangwill a kol., 2018). Strojová perfúzia navyše poskytuje platformu pre budúci výskum podávania ďalších terapeutických látok, ktoré môžu zlepšiť zotavenie orgánov a ďalej zmierniť riziká spojené s bakteriálnou kontamináciou.

ZÁVER

Darcov navodené bakteriálne infekcie predstavujú v oblasti transplantácie orgánov významnú a pretrvávajúcu výzvu. Hoci nedávny pokrok v diagnostických technikách a skríningu darcov zlepšil zisťovanie týchto infekcií, naďalej pretrváva kritická potreba účinnejších preventívnych stratégií a liečebných protokolov. Prijatie molekulárnej diagnostiky a vývoj prístupov personalizovanej medicíny by mohli významne znížiť vplyv DNBI na výsledky transplantácie. Pokračovanie výskumu v tejto oblasti je nevyhnutné na zlepšenie dlhodobej úspešnosti transplantácie orgánov a zníženie počtu potransplantačných komplikácií.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Albright JR, Thomas GR, Holt SJ. The role of emerging technologies in the diagnosis of donor-derived infections. *Transplantation Reviews*. 2020; 34(1):14-25.
- Cervera C, van Delden C, Gavaldà J. Donor-derived infections in solid organ transplantation. *Transplant Infectious Disease*. 2011; 13(6):582-591.
- Fishman JA. Infection in solid-organ transplant recipients. *New England Journal of Medicine*. 2017; 357(25):2601-2614.
- Green M, Ison MG. Donor-derived infections: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*; 2016; 30(10):1157-1165.
- Grossi PA, Fishman JA. Donor-derived infections in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2009; 9(S4):S19-S26.
- Ison MG, Nalesnik MA. An update on donor-derived disease transmission in organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2011; 11(6):1123-1130.
- Kotton CN, Fishman JA. Bacterial infections in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 2005; 5(1):71-77.
- Morris MI, Humar A, Fung J. Donor-derived infections and prevention strategies in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2020; 104(1):38-46.
- Pereira MR, Wehner JH. Multidrug-resistant bacteria in solid organ transplantation: A continuing threat. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41(1):123-126.
- Schulz TR, McDonald A, McCulloch K. Bacterial infections in solid organ transplant recipients: Impact of donor status. *Transplantation Reviews*. 2015; 29(4):230-238.
- Wolfe CR, Rosas SE, Gill JS. The epidemiology of infections in solid organ transplant recipients: A review of current data and strategies for prevention. *Clinical Transplantation*. 2021; 35(3): e14232.
- Zangwill KM, La Hoz RM, Sun HY. Molecular diagnostics for donor-derived infections in solid organ transplantation: A critical appraisal. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; 56(9):e00349-18.
- Liang H, et al. Machine perfusion combined with antibiotics prevents donor-derived infections caused by multidrug-resistant bacteria. *American Journal of Transplantation*. 2022; 22(7):1791–1803.

THE TEMPORAL VARIABILITY OF HALOTOLERANT AND HALOPHILIC MICROBIOTA OF SOLIVAR NEAR PRESOV (SLOVAKIA) SALT BRINE

Adhvaryu S., Kiskova J., Nasalova L., Piknova M., Pristas P.

Department of Microbiology, Institute of Biology and Ecology, Faculty of Science, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Šrobárova 2, 04154 Košice, Slovakia.

ABSTRACT

Halophiles and halotolerant bacteria are found naturally in hypersaline lakes, saline soils, salt marshes, salt pans, and solar salterns. The by-products of them can be used industrially to improve the quality of life of mankind. To serve that purpose, research on halophilic bacteria was conducted in Solivar, near Presov. More than 100 cultivable halotolerant or halophilic heterotrophic isolates from hypersaline salt brine were obtained during the 2020-2022 years and characterised. The bacterial diversity observed in this region during all three years depended on the seasonal change. The low diverse halophilic microbiota represented by Proteobacteria members (mainly *Halomonas*, *Halovibrio*, and *Chromohalobacter* spp.) observed in 2020 and 2021 years was replaced by a more diverse population of halotolerant Bacilli (mainly *Peribacillus*, *Rosellomorea*, and *Bacillus* spp.) observed in 2022.

INTRODUCTION

Terrestrial and extra-terrestrial life have developed diverse mechanisms and succeeded in penetrating all environmental niches (Obruča et al, 2022). Microorganisms capable of thriving and proliferating in extreme environmental conditions are known as thermophiles, psychrophiles, halophiles, acidophiles, alkaliphiles, piezophiles, and xerophilic according to their specific ecological niches. Within this group, halophiles occupy a major class of life forms in saline environments (Dutta & Bandopadhyay, 2022). The group of microorganisms, which require the optimum salt concentration of 0.2 M are classified as halophiles. Slight, moderate, and extreme halophiles have a salt tolerance range of 0.2–0.5 M, 0.5–2.5 M, and 2.5–5.2 M. Whereas, halotolerant microorganisms are non-halophilic with the ability to thrive at a high salt concentration (Obruča et al, 2022). Their natural habitat includes hypersaline lakes, saline soils, salt marshes, salt pans, and solar salterns (Rathod et al, 2023). The effective adaptation of life forms in such adverse environments make them valuable resources and draws researcher's attention in the development of novel biotechnological process and industrial applications. Moderate halophilic bacteria including *Halomonas*, *Marinococcus*, *Virgibacillus*, *Halovibrio*, and *Halobacillus* are known to produce hydrolytic enzymes such as cellulase, protease, amylase, xylanase, lipase, and DNase with potential usage in agriculture, food, leather, detergents, and pharmaceutical industries. Additionally, these bacteria produce biosurfactants, biopolymers with potential application in oil recovery, poly-beta hydroxyalkanoates as biodegradable plastic and exopolysaccharides (Dutta and Bandopadhyay, 2022, Mukhtar et al, 2019). Therefore, to explore the diversity of halophilic and halotolerant microbiota, the study of Solivar salt brine is conducted.

MATERIAL AND METHODS

Sampling and cultivation analysis

The water sample was collected from the brine flowing to the surface from the well of the salt mine (temperature was noted), located at Solivar, near Presov, Slovakia (Solivar, GPS: 48°59'0.706" N, 21°16'59.124" E) in September 2020, September 2021 and May 2022 and streaked on R2A, TSA and CMH media with 5%, 10% and 15% of NaCl respectively. The CMH media is with a slight modification of MH media, having the composition (% w/v) MgCl₂·6H₂O, 0.7; MgSO₄·7H₂O, 0.96; CaCl₂, 0.036; KCl, 0.2; NaHCO₃, 0.006; Peptone, 0.5; and Yeast extract, 0.5. NaCl is added into the media according to the requirement and solidified with Agar, 1.8 (% w/v) when needed (Quesada et al, 1983). After cultivating it for

2-3 days, at laboratory temperature (20-25°C), CFU/ml was measured, and individual colonies were picked and re-streaked using the same medium to obtain a pure culture.

Molecular differentiation using MALDI-TOF and 16S rRNA sequencing

MALDI-TOF mass spectrometry was performed on isolates of all 3 years using Microflex LT MALDI-TOF MS system with FlexControl v.3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). A representative of each MALDI group was selected for identification based on the 16S rRNA gene sequence.

The genomic DNA was extracted using NucleoSpin Microbial DNA Kit (Macherey-Nagel, Germany) and amplified using TaqCore kit/high yield (Jena Bioscience, Germany). PCR amplicons were purified by ethanol precipitation and sequenced by the Sanger sequencing method at SEQme s.r.o sequencing service (Dobříš, Czech Republic).

Obtained 16S rRNA gene sequences were processed using the BioEdit version 7.2.5 software. The assembled sequences were compared against the NCBI Genbank rRNA/ITS database using the BlastN tool. Those sequences were deposited into the GeneBank database under accession numbers from PP695485 to PP695502 and from PP717841 to PP717854.

RESULTS AND DISCUSSION

Solivar was historically the most important salt deposit in eastern Slovakia, used for pumping and cooking salt using brine from the 17th to 19th century and declared a cultural heritage monument in the year 1970. The water temperature of the sampling site was 13.9, 11.6, and 19.1 degree Celsius in the years 2020, 2021, and 2022 respectively. After 72 hours of incubation period at 25°C in the respective media supplemented with 5% NaCl revealed around 200 CFU/ml bacterial colonies in each year.

MALDI dendrogram and 16S rRNA sequencing data depicted a similar type of species presence in the year 2020 and 2021, however, the year 2022 displayed the presence of highly variable species than previous isolation. Halophilic microbiota represented by *Proteobacteria* members (mainly *Halomonas*, *Halovibrio*, and *Chromohalobacter* spp.) observed during the Solivar isolation year 2020 and 2021 (Table 1). The bacterial population were observed during the year 2022 in Solivar were halotolerant *Bacilli* (mainly *Halobacillus*, *Pontibacillus*, *Bacillus*, *Pseudalkibacillus*, *Rosellomorea*, *Peribacillus* and *Priesta* spp.). The Shannon diversity index values for the years 2020, 2021, and 2022 are 1.896, 1.861, and 3.783, respectively. The season showed the most important impact on the observed bacterial diversity of Solivar. The findings of Lopez-Mondejar et al, (2015) support our data as they noted bacterial community composition of mineral soil was particular in the summer compared to all other seasons. The study of Passante et al, (2022) also observed high abundance of *Halomonadaceae* family presence in the winter-time, rather than summer due to low microbial activity in winter compared to summer, in which other members of sediment community also flourished. The outcome of this study shows the presence of highly variable halophilic and halotolerant microbes in the Solivar (Slovakia) showing change due to some probable seasonal effect.

	Bacterial strains (16S affiliation)	Year of Sampling		
		Sept 2020	Sept 2021	May 2022
Number of Isolates	<i>Planococcus spp</i>	1	-	-
	<i>Halomonas taeanensis</i>	-	1	-
	<i>Halomonas radialis</i>	1	-	-
	<i>Halomonas spp</i>	-	4	-
	<i>Halomonas ventosae</i>	3	10	-
	<i>Halovibrio variabilis</i>	16	1	-
	<i>Idiomarina loihiensis</i>	1	-	1
	<i>Marinobacter spp</i>	1	-	-
	<i>Virgibacillus flavescens</i>	-	-	1
	<i>Chromohalobacter japonicus</i>	15	4	
	<i>Bacillus safensis</i>	-	-	6
	<i>Halobacillus alkaliphilus</i>	-	-	1
	<i>Pseudalkalibacillus hwajinpoensis</i>	-	-	3
	<i>Paenisporsarcina quisquiliarum</i>	-	-	1
	<i>Halobacillus sediminis</i>	-	-	4
	<i>Halobacillus salinus</i>	-	-	1
	<i>Thalassobacillus devorans</i>	-	-	1
	<i>Bacillus sterwris</i>	-	-	4
	<i>Palleronia spp</i>	-	-	1
	<i>Pontibacillus spp</i>	-	-	3
	<i>Priestia aryabhatai</i>	-	-	5
<i>Rossellomorea vietnamensis</i>	-	-	3	
<i>Peribacillus frigoritolerans</i>	-	-	5	
<i>Halobacillus sediminis</i>	-	-	2	
<i>Bacillus stercoris</i>	-	-	6	
	Shannon diversity index	1.896	1.861	3.783

Tab.1. Number of isolates with their 16S affiliation detected in brine in the year 2020, 2022, and 2023.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by VVGS-PF-2023-2545 grant from Pavol Jozef Safarik University in Kosice and VEGA-1/0779/21 grant.

REFERENCE

- Obruča S, et al. Polyhydroxyalkanoates synthesis by halophiles and thermophiles: towards sustainable production of microbial bioplastics. *Biotechnology Advances*. 2022; 58:107906
- Dutta B, Bandopadhyay R. Biotechnological potentials of halophilic microorganisms and their impact on mankind. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*. 2022; 11(1):75
- Rathod MG, et al. Halophilic microbiome: Distribution, diversity and applications. *World Journal of Advanced Research and Reviews*. 2023; 17(1):926-933
- Mukhtar S, Malik KA, Mehnaz S. Microbiome of halophytes: Diversity and importance for plant health and productivity. *Microbiol. Biotechnol. Lett*. 2019; 47:1-10
- Quesada E, Ventosa A, Rodriguez-Valera F, Megias L, Ramos-Cormenzana A. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative bacteria from hypersaline soils. *Microbiology*. 1983; 129(8):2649-2657
- López-Mondéjar R, Voříšková J, Větrovský T, Baldrian P. The bacterial community inhabiting temperate deciduous forests is vertically stratified and undergoes seasonal dynamics. *Soil Biology and Biochemistry*. 2015; 87:43-50.
- Passante EK, Dechant LE, Paradis CJ, McLellan SL. Halophilic bacteria in a Lake Michigan drainage basin as potential biological indicators of chloride-impacted freshwaters. *Science of The Total Environment*. 2022; 846:157458.

VPLYV N-3 PUFA NA VYBRANÉ RECEPTORY MYOMETRIA MYŠÍ

Babjáková D.¹, Lecová M.¹, Sopková D.¹, Gancarčíková S.², Rodáková K.¹, Vlčková R.¹

¹Katedra biológie a fyziológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

²Katedra mikrobiológie a imunológie UVLF v Košiciach, Komenského 73, Košice, SR

ABSTRAKT

Je známe, že n-3 polynenasýtené mastné kyseliny (PNMK), a to hlavne kyselina dokozahexaénová (DHA) a kyselina eikozapentaénová (EPA) majú mnoho prínosov pre zdravie, hlavne kvôli svojmu protizápalovému, antihypertenziívnemu, protinádorovému a antioxidačnému účinku. Táto štúdia je zameraná na určenie možného protektívneho účinku n-3 PNMK a to hlavne DHA a EPA na myometrium samíc myší. Štúdia bola vykonávaná na 6-8 týždňových samiciach BALB/c myší (n=12), ktoré boli humánne usmrtené a boli im odobraté rohy maternice (n=24) na kultiváciu a následnú imunohistochemickú analýzu. Maternicové rohy boli kultivované s prídavkom aditív DHA (10 µg/ml), EPA (10 µg/ml) alebo bez prídavku aditív (kontrola). Po 24-hodinovej inkubácii boli rohy materníc odobraté a pripravené na imunohistochemické spracovanie. Imunohistochemickou analýzou bola sledovaná prítomnosť receptorov (HSP, StAR a ERβ) v oblasti myometria maternice myší a ich relatívne množstvo sme vyjadrili prostredníctvom relatívnej optickej denzity (ROD). Expresia HSP v myometriu samíc myší po pridaní DHA bola silnejšia (P < 0,001), ale po pridaní EPA porovnateľná s kontrolnými myšami. Expresia StAR po pridaní oboch n-3 PNMK bola slabšia (P < 0,001) v porovnaní s kontrolnými myšami. ROD ERβ v oblasti myometria v DHA (P < 0,001) a EPA skupine (P < 0,05) bola menšia v porovnaní s kontrolou.

ÚVOD

Kyselina dokozahexaénová a kyselina eikozapentaénová sú mastné kyseliny esenciálne pre cicavčí organizmus. Ich suplementácia počas tehotenstva má priaznivý účinok na neurologický vývoj plodu, zlepšenie reči, pamäti, pozornosti či priaznivo pôsobí na koordináciu pohybov. Suplementácia DHA a EPA môže znížiť riziko predčasného pôrodu, preeklampsie, popôrodnej depresie, majú protizápalové a protektívne účinky (Amza a kol. 2024). Proteín tepelného šoku (HSP) sa syntetizuje vo všetkých organizmoch ako reakcia na zvýšenie teploty. Má relaxačný účinok v oblasti myometria samíc a v čase pôrodu sa v myometriu vyskytuje v menšom množstve (Hehir a kol. 2016). HSP sa môže podieľať na mnohých procesoch ako napríklad kontrola bunkového cyklu, bunková proliferácia, regulácia apoptózy či diferenciácie počas involúcie (Liman 2017). Steroidogénny akútny regulačný proteín (StAR) je mitochondriálny proteín nevyhnutný pre syntézu steroidných hormónov v nadobličkách a pohlavných žľazách (Granot a kol. 2007). Estradiol a progesterón regulujú pohlavný cyklus. Ich produkcia je spočiatku riadená prostredníctvom StAR, ktorý umožňuje translokáciu cholesterolu z vonkajšej na vnútornú membránu mitochondrie (Miller 2016). Účinok estradiolu je sprostredkovaný prostredníctvom dvoch estrogénnych receptorov a to ERα a ERβ (Wróbel a kol. 2003).

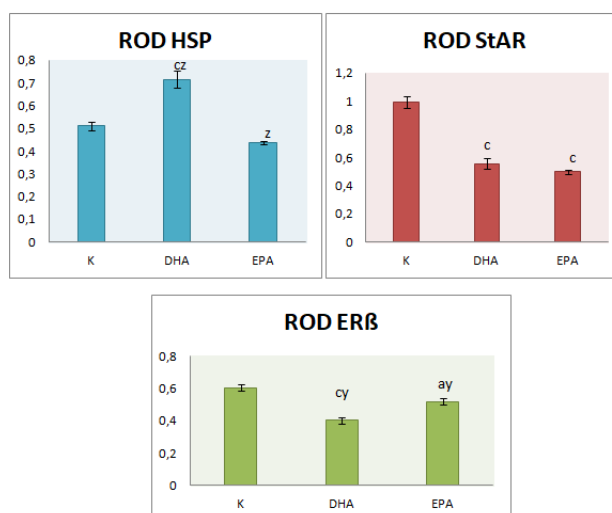
MATERIÁL A METODIKA

Samiciam BALB/c myší (Velaz s.r.o., ČR; n=12; 6- až 8-týždňov veku) boli odobraté rohy materníc (n=24), ktoré do 30 minút od odobratia boli transportované vo fosfátom pufrovanom fyziologickom roztoku (PBS) pri 4 °C na kultiváciu. Rohy maternice boli umiestnené do sterilnej 24-jamkovej platničky (1 roh na jamku) s kultivačným médiom (DMEM/F12 1:1, Sigma; 1 ml) obohateným o 10% fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma-Aldrich) a 1% antibioticko-antimykotického roztoku (ATB-ATM; Sigma-Aldrich). Následne boli vzorky inkubované 24 h pri 37 °C. Na druhý deň bolo kultivačné médium nahradené čerstvým

(DMEM + 10% FBS + 1% ATB-ATM) s aditívami DHA (10 µg/ml), EPA (10 µg/ml) a bez pridania aditív (kontrola; K). Po 24-hod. kultivácii (37 °C) boli rohy materníc vybraté a fixované v 4% paraformaldehyde, histologicky spracované a narezané sánkovým mikrotómom (Leica RM2255 microtome, Leica Nemecko) na poloténkové rezy (3 – 5 µm). Následne maternicové rezy prešli deparafinizáciou, rehydratáciou, väzbové miesta sa odkryli, aktivita endogénnej peroxidázy a nešpecifického viazania bola blokována. Následne boli aplikované primárne protilátky (všetky Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) anti-HSP (1:250), anti-STAR (1:200) a anti-ERβ (1:50). Po uplynutí inkubácie (cez noc pri 4 °C) boli aplikované sekundárne protilátky (goat anti-mouse secondary antibodies; Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV), ready-to-use, Dánsko), inkubácia 2 hodiny. Farebná reakcia bola navodená diaminobenzidínom (Dako REAL™ DAB+ Chromogen, Dako). Kontrastná reakcia bola navodená hematoxylínom a rezy boli zaliate do Pertexu (Histolab Products AB, Švédsko). Zobrazovacou technikou (NIS Elements Br k mikroskopu Nikon Eclipse E200 s digitálnou kamerou ProgResCapture Pro 2.7.7) boli po vysušení preparátov vytvorené mikrofotografie. Intenzita imunoreakcie sa kvantitatívne hodnotila použitím Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Pozitívna hnedá DAB+ reakcia sa hodnotila v sivej škále (grey level, GL) a bola vyjadrená indexom relatívnej optickej denzity (ROD; Smolen 1990). Výsledky boli štatisticky spracované v programe GraphPad Prism 3 (USA) s uvedením priemeru a štandardnej chyby (Mean±SEM). Štatistická významnosť rozdielu je uvedená na úrovni P<0,05, P<0,01, P<0,001.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Imunohistochemickou analýzou materníc myši sme sledovali prítomnosť receptorov (HSP, StAR a ERβ) v oblasti myometria a ich relatívne množstvo sme vyjadrili prostredníctvom relatívnej optickej denzity (ROD, Obr.1). Pozitívna imunoreakcia sa prejavila hnedým zafarbením.



Obr.1. Grafické znázornenie relatívnej optickej denzity HSP, StAR, ERβ po pridani aditív (DHA, EPA) a v kontrolnej skupine v oblasti myometria myši.

a,c – významný rozdiel medzi DHA a EPA v porovnaní s kontrolou ($P < 0,05$, $P < 0,001$); y,z- významný rozdiel medzi skupinami DHA a EPA ($P < 0,01$, $P < 0,001$).

Expresia HSP v myometriu myši v DHA skupine ($P < 0,001$) bola silnejšia a v EPA skupine v porovnaní s kontrolnými myšami nesignifikantná. Porovnanie medzi skupinami (DHA, EPA) bolo na úrovni $P < 0,001$. Expresia StAR v DHA a EPA skupine bola výrazne menšia ($P < 0,001$) v porovnaní s kontrolnými myšami. Rozdiel medzi skupinami DHA a EPA bol nesignifikantný. ROD ERβ v oblasti myometria v DHA ($P < 0,001$) a EPA skupine ($P < 0,05$) bola menšia v porovnaní s kontrolou, ale v EPA skupine bola jeho expresia vyššia ako po

pridání DHA ($P < 0,01$). Islam a kol. (2018) zistili, že liečba primárnych myometriálnych a leiomyómových buniek kyselinou EPA alebo DHA znížila obsah mononenasýtených mastných kyselín (MUFA) a zvýšila obsah PNMK pri oboch typoch buniek. Funkcia StAR je spojená so zvýšenou produkciou steroidov. Strata tejto funkcie má za následok zhoršenú steroidogénu, a tým hormonálnu nerovnováhu, ktorá je spojená s mnohými zdravotnými komplikáciami. V dôsledku toho je dysregulácia syntézy steroidov spojená s patogénu hormonálne závislých malígnych ochorení, vrátane rakoviny mliečnej žľazy (Manna a kol. 2022). Primárnym spúšťáčom rakoviny mliečnej žľazy je 17β -estradiol (E2). Všetky steroidné hormóny sú odvodené od cholesterolu, ich syntéza je ale limitovaná prostredníctvom StAR. Imunoflorescenčná metóda preukázala, že expresia StAR bola vyššia v nádorovo zmenenej mliečnej žľaze myši v porovnaní s nezmeneným tkanivom. Zároveň expresia $ER\alpha$ a $ER\beta$ bola taktiež zvýšená (Manna a kol. 2023). Na inaktiváciu faktora tepelného šoku 1 (HSF1) po aktivácii sú potrebné mechanizmy spätnej väzby, ktoré sú závislé od HSP70. Zvýšená dostupnosť HSP70 je podporovaná produkciou väčšieho množstva HSP70 v génoch, ktoré sú regulované faktorom HSF1 ako reakcia na sprievodnú stimuláciu estrogénom a tepelným šokom. Táto štúdia ponúka lepšie pochopenie medzi tepelným šokom a reakciami steroidov, ktoré sú charakteristické pre neurodegeneratívne poruchy a nádorové ochorenia (Silveira a kol. 2023). Je známe, že HSP sa spája s estrogénovými receptormi a reguluje bunkovú proliferáciu, ktorú tieto receptory sprostredkujú (Dhamad a kol. 2016), avšak sú potrebné ďalšie štúdie na objasnenie tohto mechanizmu.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla za podpory projektov VEGA 1/0680/22, APVV-22-0071 a APVV-20-0114.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Amza M, et al. Docosahexaenoic Acid (DHA) and Eicosapentaenoic Acid (EPA) — Should They Be Mandatory Supplements in Pregnancy?. *Biomedicines*. 2024;12:1471.
- Hehir MP, Morrison JJ. Paeoniflorin, a novel heat-shock protein inducing compound, and human myometrial contractility in vitro. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42:302-6.
- Dhamad AE, et al. Systematic Proteomic Identification of the Heat Shock Proteins (Hsp) that Interact with Estrogen Receptor Alpha ($ER\alpha$) and Biochemical Characterization of the $ER\alpha$ -Hsp70 Interaction. *PLoS One*. 2016;11: e0160312.
- Granot Z et al. Turnover of StAR protein: Roles for the proteasome and mitochondrial proteases. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;265-266:51-58.
- Islam MDS et al. Omega-3 fatty acids modulate the lipid profile, membrane architecture, and gene expression of leiomyoma cells. *J Cell Physiol*. 2018;233:7143-7156.
- Miller WL. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016; 165:18-37.
- Wróbel A et al. Estrogen receptor alpha and beta expression in normal endometrium and myometrium in premenopausal women. *Menopause Review*. 2003;2:12-17.
- Manna et al. Hormonal and genetic regulatory events in breast cancer and its therapeutics: Importance of the steroidogenic acute regulatory protein. *Biomedicines*. 2022; 10:1313.
- Manna et al. Expression and Function of StAR in Cancerous and Non-Cancerous Human and Mouse Breast Tissues: New Insights into Diagnosis and Treatment of Hormone-Sensitive Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24:758.
- Silveira MAD et al. HSP70 mediates a crosstalk between the estrogen and the heat shock response pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2023;299:102872.
- Smolen, A.J. Image Analytic Techniques for Quantification of Immunocytochemical Staining in the Nervous System. *Methods in Neurosciences*. 1990; 208–229.

VPLYV PODÁVANIA NANOČASTÍC ZINKU NA MINERÁLNY A ANTIOXIDAČNÝ STATUS JAHNIAT

Bombárová A.

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

ABSTRAKT

Zinok sa do krmiva hospodárskych zvierat tradične pridáva vo forme anorganických solí, avšak nanočastice zinku majú potenciál zlepšiť biologickú dostupnosť a biovyužitelnosť tohto stopového prvku. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať vplyv rôznych dávok nanočastíc ZnO a anorganického ZnO pridávaných do diéty jahniat na koncentráciu stopových prvkov (Zn, Cu, Fe), metaloproteínov, aktivitu antioxidantných enzýmov a lipidovú peroxidáciu v plazme jahniat na 35. a 70. deň experimentu. Zvieratá boli rozdelené do štyroch experimentálnych skupín, pričom kontrolná skupina dostávala nesuplementovanú diétu, zvieratá v 2. a 3. skupine prijímali diéty obohatené o nanočastice ZnO (40 alebo 80 mg Zn/kg diéty) a posledná skupina dostávala diétu suplementovanú anorganickým ZnO (80 mg Zn/kg diéty). Výsledky ukázali, že podávanie nanočastíc ZnO v množstve 80 mg Zn/kg diéty zvýšilo aktivitu enzýmov závislých od zinku a významne neovplyvnilo zootecnické parametre prežúvavcov. Príjem nanočastíc zinku pridávaných do diéty v dávke do maximálneho v EÚ povoleného celkového obsahu Zn v kompletnom krmive, nemal za následok zmeny v koncentrácii ostatných mikroelementov v plazme a neindukoval oxidačný stres u prežúvavcov. Podávanie krmiva obohateného o zinok zvýšilo hladinu zinku v plazme a zlepšilo antioxidantný status jahniat.

ÚVOD

Zinok je esenciálnym stopovým prvkom ktorý zohráva významnú úlohu v rôznych fyziologických a biochemických procesoch v organizme, predovšetkým ako štrukturálny komponent mnohých metaloenzýmov (Sloup a kol., 2017). Pridávanie správneho množstva Zn do diét hospodárskych zvierat je kľúčové pre optimalizáciu rastu, imunitného systému, reprodukčného zdravia a antioxidantnej ochrany (Swain a kol., 2016). V systéme antioxidantnej ochrany Zn pôsobí ako kofaktor antioxidantných enzýmov, stabilizátor sulfhydrylových skupín a zohráva významnú úlohu v ochrane bunkových membrán pred oxidačným poškodením. Zinok indukuje expresiu metalotioneínu, ktorý má viacero biologických úloh a okrem schopnosti priamo vychytávať voľné radikály, je taktiež zodpovedný za udržiavanie homeostázy zinku v organizme (Marreiro a kol., 2017). Suplementácia krmiva minerálnymi nanočasticami môže vo všeobecnosti zvyšovať aktivitu antioxidantných enzýmov zodpovedných za elimináciu reaktívnych foriem kyslíka, ako je glutatión peroxidáza, superoxid dismutáza, kataláza, zlepšiť celkovú antioxidantnú aktivitu a znížiť hladinu malondialdehydu, čo je ukazovateľ oxidačného stresu (Michalak a kol., 2022). Nanočastice zinku môžu vykazovať vďaka svojim vlastnostiam lepšiu biologickú dostupnosť v porovnaní s tradičnými anorganickými formami zinku. To znamená, že zvieratá môžu lepšie absorbovať a využívať zinok, čo vedie k ich lepšiemu zdravotnému stavu a vyššej produktivite (Hidayat a kol., 2021). Vzhľadom na lepšiu biovyužitelnosť nanočastíc zinku je možné používať menšie dávky Zn na pokrytie nutričných požiadaviek zvierat. To následne môže viesť k nižším nákladom na minerálne aditíva vo výžive zvierat, ale predovšetkým znížiť množstvo zinku vylučovaného do prostredia, čím by sa minimalizovalo riziko kontaminácie pôdy a vodných zdrojov (Swain a kol., 2016).

MATERIÁL A METODIKA

Do experimentu bolo zaradených 28 jahniat (Zošľachtená valaška), pochádzajúcich z registrovaného chovného zariadenia (PD Oľšavica-Brutovce, okres Levoča) vo veku 4

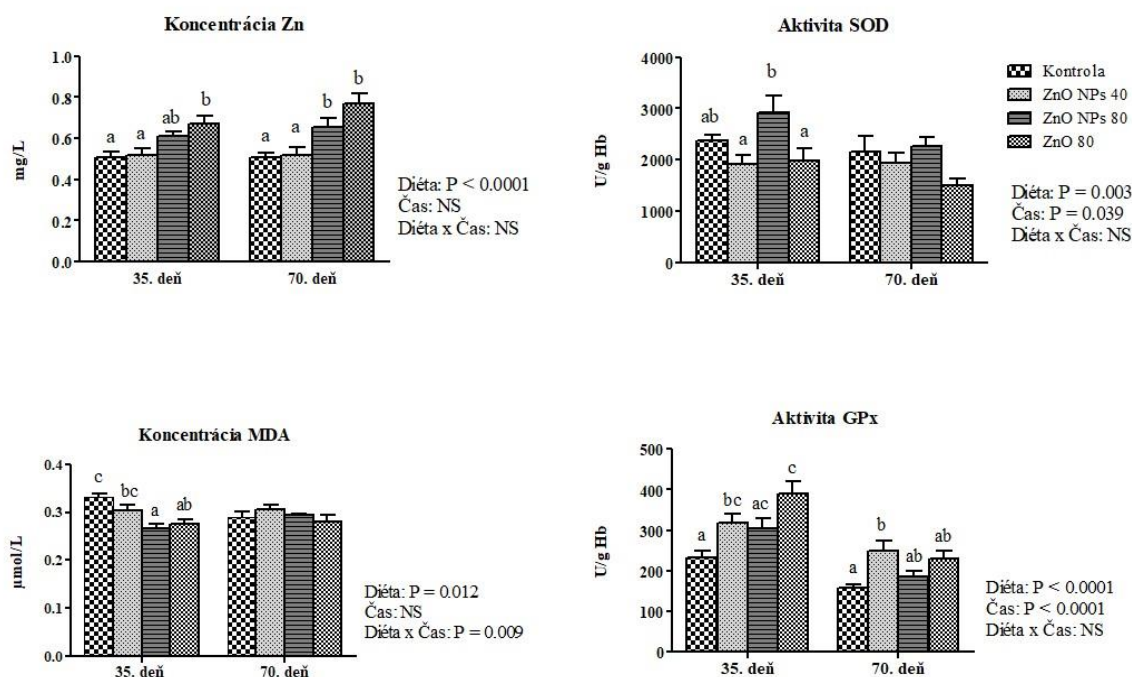
mesiacov. Zvieratá boli ustajnené v spoločných priestoroch s neobmedzeným prísunom vody. Počas adaptačnej periódy boli všetky zvieratá kŕmené bazálnou diétou (BD), zlozenej z 350g jačmeňa + 700g sena na deň. Následne boli náhodne rozdelené do 4 skupín (n=7). Kontrolná skupina, dostávala iba BD bez prídavku aditíva. Jahňatá v druhej (ZnO NPs 40) a tretej (ZnO NPs 80) skupine dostávali BD s prídavkom nanočastíc ZnO (< 30 nm, SkySpring Nanomaterials, Houston, USA) v množstve 40 alebo 80 mg Zn/kg diéty. Zvieratá štvrtej skupiny (ZnO 80) boli kŕmené BD suplementovanou anorganickým ZnO (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) v množstve 80 mg Zn/kg diéty. Vzorky krvi sa odoberali z jugulárnej vény do heparinizovaných skúmaviek na 35. a 70. deň experimentu. V krvnej plazme bola stanovená koncentrácia stopových prvkov Zn, Cu, Fe pomocou atómovej absorpčnej spektrofotometrie (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko). Aktivita superoxid dismutázy (SOD) v erytrocytoch čerstvej krvi, aktivita glutatión peroxidázy (GPx) v krvi, aktivita alkalickéj fosfatázy (ALP) a koncentrácia albumínu (ALB) v plazme boli merané spektrofotometrickými metódami použitím komerčných kitov firmy Randox (UK). Koncentrácia malodialdehydu (MDA) v plazme bola meraná spektrofluorometrickou metódou podľa Jo a Ahn (1998). Počas celej doby trvania experimentu (70 dní) boli monitorované aj zootechnické parametre jahniat. Na štatistické vyhodnotenie výsledkov bola použitá dvojcestná analýza variancie (ANOVA) pre zistenie vplyvu diéty, času prijímania experimentálnych diét alebo ich vzájomnej interakcie. V prípade zistenia signifikantného vplyvu niektorého z uvedených faktorov bol použitý Tukey post-test pre zistenie signifikantných rozdielov medzi skupinami.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky ukázali, že príjem krmiva, priemerné denné váhové prírastky a konverzia krmiva neboli ovplyvnené príjmom experimentálnych diét. Pridávanie zinku do diéty v dávke 80 mg/kg viedlo k zvýšeniu koncentrácie Zn v plazme v porovnaní s kontrolnými jahňatami a tými, ktoré dostávali nižšiu dávku nanočastíc ZnO (Obr.1). Koncentrácia Cu v plazme bola ovplyvnená príjmom diéty ($p < 0,01$), pričom signifikantne vyššie hodnoty boli zistené v skupine dostávajúcej anorganický ZnO v porovnaní s kontrolnou skupinou na konci experimentu. Koncentrácia Fe v plazme nebola ovplyvnená príjmom experimentálnych diét, ale bola ovplyvnená časom ($p < 0,01$), rovnako ako koncentrácia ALB v plazme. Alkalická fosfatáza je metaloenzým závislý od Zn a je považovaný za jeden z indikátorov Zn statusu (Alimohamady a kol., 2019). V našom experimente príjem diét ovplyvnil aktivitu ALP v plazme ($p < 0,05$), pričom vyššie hodnoty boli pozorované u jahniat dostávajúcich diétu obohatenú o nanočastice ZnO. Výsledky naznačujú, že príjem nanočastíc ZnO ako aj anorganického ZnO v dávke 80 mg Zn/kg môže mať prospešné antioxidačné účinky, nakoľko koncentrácia MDA, ako indikátora lipidovej peroxidácie, bola signifikantne znížená v plazme na 35. deň v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr.1). Taktiež aktivita celkovej SOD v erytrocytoch bola ovplyvnená diétou ($p < 0,01$) a časom ($p < 0,05$), pričom najvyššia aktivita bola zaznamenaná u jahniat po 35. dňoch podávania diét suplementovaných nanočasticami ZnO v množstve 80 mg Zn/kg. Vplyv diéty na aktivitu antioxidačných enzýmov sa prejavil aj zvýšenou aktivitou GPx v krvi u zvierat dostávajúcich nanočastice ZnO (40 mg Zn/kg) na 35. aj 70. deň experimentu a taktiež u zvierat dostávajúcich anorganický ZnO (Obr.1). Antioxidačný účinok zinku prostredníctvom GPx sa môže prejavovať dvojakým spôsobom. Jednak tým, že ovplyvňuje expresiu glutamát-cysteín ligázy, ktorá je zapojená do syntézy glutatiónu, ktorý priamo neutralizuje voľné radikály, alebo nepriamo ako kofaktor antioxidačného enzýmu GPx (Marreiro a kol., 2017).

Záverom môžeme konštatovať, že príjem nanočastíc ZnO v dávke do maximálnej povolenej koncentrácie Zn v kompletnom krmive (120 mg Zn/kg krmiva) neovplyvnil koncentráciu mikroelementov (Cu, Fe) v plazme oviec a nespôsobil oxidačný stres u prežúvavcov.

Podávanie nanočastíc ZnO v množstve 80 mg Zn/kg diéty zvýšilo aktivitu enzýmov závislých od zinku (SOD, ALP). Suplementácia krmiva zinkom mala za následok zvýšenie jeho hladiny v plazme a priaznivo ovplyvnila antioxidačný status jahniat.



Obr.1. Koncentrácia Zn a MDA v plazme a aktivita SOD a GPx v krvi jahniat. ^{abc}Rozdielne písmená označujú signifikantný rozdiel ($p < 0,05$) medzi skupinami.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná grantom Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-21-0301, APVV-SK-PL-23-0004 a EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti SR v rámci projektu č. 09I03-03-V02-00020.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Alimohamady R, et al. Effect of Different Sources of Supplemental Zinc on Performance, Nutrient Digestibility, and Antioxidant Enzyme Activities in Lambs. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019; 189:75-84.
- Hidayat C, Sumiati S, Wina E. Supplementation of Dietary Nano Zn-Phytogenic on Performance, Antioxidant Activity, and Population of Intestinal Pathogenic Bacteria in Broiler Chickens. *Trop. Anim. Sci. J.* 2021; 44:90-99.
- Jo C, Ahn DU. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult. Sci.* 1998; 77:475-480.
- Marreiro DN, et al. Zinc and Oxidative Stress: Current Mechanisms. *Antioxidants.* 2017; 6:24-33.
- Michalak I, et al. The effect of metal-containing nanoparticles on the health, performance and production of livestock animals and poultry. *Vet Q.* 2022; 42:68-94.
- Sloup V, et al. Zinc in the animal organism: a review. *Scientia Agriculturae Bohemica.* 2017; 48:13-21.
- Swain PS, et al. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: A review. *Anim Nutr.* 2016; 2:134-141.

ANALÝZA DEDIČNÝCH OČNÝCH OCHORENÍ U PSOV POMOCOU KONVENČNÝCH METÓD PCR

Bučan J., Galdíková M., Halušková J., Schwarzbacherová, V.
Katedra biológie a fyziológie, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Genetickým poruchám psov sa vo vedeckej komunite venuje veľká pozornosť, pretože majú značný vplyv na celkovú pohodu a kvalitu života postihnutých zvierat. Najmä dedičné ochorenia sietnice patria medzi najrozšírenejšie ochorenia ohrozujúce zrak u domácich psov so širokou škálou fenotypov. Progresívna atrofia sietnice a anomália oka kólie sú dva významné príklady dedičných očných ochorení, ktoré boli predmetom rozsiahleho výskumu v populácii psov. Progresívna atrofia sietnice alebo PRA zahŕňa skupinu degeneratívnych porúch postihujúcich fotoreceptory, zatiaľ čo anomália oka kólie (CEA) je dedičné ochorenie postihujúce predovšetkým vývoj cievy a sklery. V našom výskume sme tieto dve ochorenia diagnostikovali pomocou konvenčnej PCR metódy u skupiny predisponovaného plemena dlhosrstých kólií.

ÚVOD

Genetickým poruchám psov sa vo vedeckej komunite venuje veľká pozornosť, pretože majú značný vplyv na celkovú pohodu a kvalitu života postihnutých zvierat. Najmä dedičné ochorenia sietnice patria medzi najrozšírenejšie ochorenia ohrozujúce zrak u domácich psov so širokou škálou fenotypov, ktoré boli podrobne charakterizované prostredníctvom klinických štúdií (Miyadera, 2014). Identifikácia základných genetických príčin týchto porúch bola kľúčovou oblasťou, ktorá umožnila pokrok v našom chápaní vývoja a funkcie oka, ako aj potenciál nových terapií na riešenie dedičnej slepoty (Miyadera, 2014). Progresívna atrofia sietnice a anomália oka kólie sú dva významné príklady dedičných očných ochorení, ktoré boli predmetom rozsiahleho výskumu v populácii psov. Progresívna atrofia sietnice alebo PRA zahŕňa skupinu degeneratívnych porúch postihujúcich fotoreceptory, zatiaľ čo anomália oka kólie je dedičné ochorenie postihujúce predovšetkým vývoj cievy a sklery (Dostal a kol., 2010). Pomocou konvenčných metód PCR sa dosiahol významný pokrok pri objasňovaní genetických základov týchto ochorení, čo otvára cestu k lepším diagnostickým nástrojom a potenciálnym terapeutickým zásahom. Jedným z takýchto prístupov, ktorý bol použitý na identifikáciu príčinných mutácií, ktoré sú základom dedičných ochorení sietnice u psov, je skúmanie kandidátskych génov, najmä tých, o ktorých je známe, že zohrávajú rozhodujúcu úlohu v štruktúre a funkcii fotoreceptorov (Mellersh, 2014).

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky biologického materiálu boli od študovaných jedincov odobrané dvoma spôsobmi. Používala sa buď invazívna metóda odberu vzorky krvi, alebo neinvazívna metóda sterov z bukálnej sliznice jedinca. Krv bola odobratá do sterilných skúmaviek s prídavkom antikoagulačného činidla kyseliny etyléndiamíntetraoctovej (EDTA). Stery bukálnej sliznice, ktoré sa vykonávali najčastejšie, boli vykonané kefkami podľa priloženého návodu výrobcu (Genomia, Česká republika). V prípade že tieto vzorky odoberali samotní majitelia, boli poučení o správnosti postupu odberu a ako zabrániť nežiadúcej kontaminácii potravou. Ster po dobu 5 sekúnd s pravidelnou zmenou smeru pohybu po sliznici bol vykonaný bilaterálne za použitia dvoch kefiiek pre získanie dostatočného množstva epitelových buniek.

Získané vzorky sme označili a sterilne uskladnili. Na izoláciu DNA sme použili komerčný systém ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Wisconsin USA). Aj napriek tomu že tento kit je určený primárne na izoláciu genetickej zložky z leukocytov, po úprave protokolu, hlavne predĺženej lýze, bol využitý aj pri bukálnych steroch. Na vyšetrenie vzoriek

na prítomnosť mutácie génu *NHEJ1* sme použili techniky PCR reakcie podľa Parkera et al. (2007). Na určenie existencie mutácie bola vykonaná tradičná PCR s použitím komerčnej sady primerov (Eurofins Genomics, Nemecko), ktoré boli pridané v koncentrácii 100 pM v objeme 0,625 µl. Reakcia prebiehala v termocykleri, kde po iniciálnej denaturácii pri 95°C (2 min), pokračovalo 35 opakovaní denaturácie pri 95°C (40s), hybridizácie pri 50°C (50s) a elongácie pri 72°C (90s). Reakcia bola ukončená finálnou syntézou pri 72°C (5 min). Rovnaký PCR program bol použitý s primermi pre *PRA-RCD3*. Jediným rozdielom bola hybridizácia primerov, ktorá sa uskutočnila pri teplote 61 °C počas 1 min. Amplikóny sa elektroforeticky separovali v 1,5 % agarózovom géle pri elektrickom napätí 75 V počas 60 - 65 min.

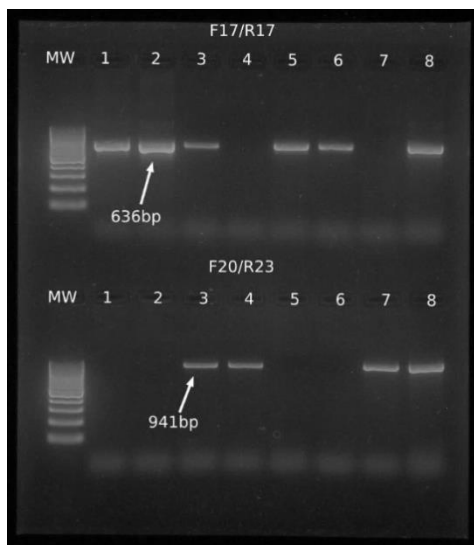
Primer	Sekvencia	Charakteristika	Ochorenie
NHEJ1-F17	5'-TCTCACAGGCAGAAAGCTCA-3'	Nezmenený gén	CEA
NHEJ1-R17	5'-CCATTCATTCCTTTGCCAGT-3'		
NHEJ1-F20	5'-TGGGCTGGTGAACATTTGTA-3'	Mutovaný gén	
NHEJ1-R23	5'-CCTTTTTGTTTGCCCTCAGA-3'		
SPJn-F	5'-TCCCATTCAGGTCCCAGAA-3'	Nezmenený gén	PRA
SPJn-R	5'-TGATGACCTCTGACCTCTG-3'		
SPJm-F	5'-TTCCCATTCAGGTCCCAGAC-3'	Mutovaný gén	
SPJm-R	5'-GATGACCTCTGACCTCTGAT-3'		

Tab. 1. Sekvencie použitých primerov

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Amplikóny získané našou analýzou boli po separácii na agarózovom géli zdokumentované a na ich základe boli určené genotypy vyšetovaných jedincov. Pri použití týchto párov primerov podľa Parkera et al. (2007), sme získali jednoznačné učenie zdravých a chorých jedincov a zároveň aj latentných prenášateľov ochorenia CEA. Keďže sa jedná o monogénne kódované ochorenie, dominante homozygotný stav génu (AA) je charakterizovaný ako zdravý. V prípade recesívne homozygotného stavu (aa) sa u tohto jedinca nachádza mutácia na oboch sesterských chromozómoch, čo má za následok vznik ochorenia. Ak sa tento defekt nachádza iba na jednom chromozóme, hovoríme o latentnom prenášateľovi (Aa), ktorý toto ochorenie môže ďalej rozšíriť na potomstvo aj keď je klinicky zdravý. V našom výskume sme analýze podrobili spolu 22 jedincov patriacich medzi dlhosrsté kólie. Aj napriek predpokladu potvrdenia oboch ochorení na základe ich vysokého výskytu v tomto plemene sa nám podarilo objaviť iba mutácie zodpovedné za vznik CEA. Z týchto vyšetovaných jedincov sme potvrdili výskyt genetickej vady u 10 psov, u ktorých došlo ku amplifikácii iba za použitia primerov F20/R23. V 4 prípadoch sme pozorovali amplikóny iba pri prvom páre stanovených primerov (F17/R17), čo jednoznačne poukazuje na dominantne homozygotný (AA) stav génu *NHEJ1* u zdravých psov. U 8 jedincov sme amplifikáciu zaznamenali pri oboch pároch primerov, čo je charakteristické pre latentných prenášateľov ochorenia (Aa). Psy trpiace týmto ochorením vykazujú širokú škálu fenotypových prejavov, od relatívne miernych až po ťažké prejavy ochorenia. Existujúca literatúra neustále poukazuje na významnú úlohu genetiky pri vzniku anomálie očí kólie, pričom delécia v géne *NHEJ1* je dobre charakterizovaným genetickým faktorom, ktorý je základom tohto ochorenia (Mellersh, 2014, Dostal a kol., 2010). Je dôležité podotknúť, že pre toto ochorenie je charakteristický takzvaný „go normal“ fenomén, kedy aj u chorých jedincov nenachádzame v staršom veku žiadne oftalmologicky detekovateľné vady na sietnici. U nevyšetovaných jedincov preto vieme bez genetického vyšetrenia určiť pozitivitu až po prejavení sa symptómov ochorenia. Je to spôsobené pigmentáciou očného fundu, ktorá zakrýva výskyt možných defektov (Chang a kol. 2010). Naš výskum potvrdil vysoký výskyt tohto ochorenia v populácii dlhosrstých kólií rovnako

ako Yakely a kol. (1972). Z dôvodu značného rozšírenia ochorenia v chove dlhosrstých kólií je nemožné tieto jedince úplne vyradiť z plemenitby a zbaviť sa tak nežiadúcich defektov zraku, pretože by došlo ku zdegenerovaniu tohto plemena. Preto je potrebné genetické a oftalmologické vyšetrenie jedincov a ich riadená plemenitba.



Obr. 1. Elektroforetická separácia amplikónov na agarózovom géle. V prípade vzoriek 1, 2, 5 a 6 došlo k amplifikácii len s primermi F17/R17, pričom vznikli fragmenty s veľkosťou 636 bp, ktoré sú charakteristické pre zdravých jedincov. Vo vzorkách 4 a 7 bola amplifikácia iba s primermi F20/R23, čo potvrdzuje prítomnosť mutácie. Vo vzorkách 3 a 8 prítomnosť fragmentov pri oboch pároch primerov charakterizovala heterozygotný stav jedinca, ktorý je latentným nosičom ochorenia.

POĎAKOVANIE

Podporené Vedeckou grantovou agentúrou Slovenskej republiky (grant č. 1/0166/21) a Kultúrnou a edukačnou grantovou agentúrou Slovenskej republiky (grant č. 008UVLF-4/2023)

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dostál J. et al. Simplified PCR analysis of a mutation in the *NHEJ1* gene causing collie eye anomaly in some dog breeds. In *Czech J. Anim. Sci.* 2010;55(8): 346–350.
- Chang HS. et al. A novel rapid genotyping technique for Collie eye anomaly: SYBR Green–based real-time polymerase chain reaction method applicable to blood and saliva specimens on Flinders Technology Associates filter paper. In *J Vet Diagn Invest* 2010; 22(5):708-15.
- Mellersh CS. The genetics of eye disorders in the dog. In *Canine Genet Epidemiol.* 2014;16(1-3).
- Miyadera K. Inherited retinal diseases in dogs: advances in gene/mutation discovery. In *J. Anim. Gen.* 2014;42:79–89.
- Parker HG, et al. Breed relationships facilitate fine-mapping studies: a 7.8-kb deletion cosegregates with Collie eye anomaly across multiple dog breeds. In *Genome Res.* 2007;17(11):1562-71.
- Yakely WL, et al. Genetic transmission of an ocular fundus anomaly in Collies. In *J Am Vet Med Assoc.* 1968;152(5):457-61.

VPLYV MANAŽMENTU PASTVY NA RASTOVÉ UKAZOVATELE, BACHOROVÚ FERMENTÁCIU A MIKROBIOTU JAHNIAT S ENDOPARAZITMI

Demčáková K.¹, Petrič D.¹, Várady M.², Váradyová Z.¹

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

²Parazitologický ústav, SAV, v.v.i., Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zistiť rastové ukazovatele, bachorovú fermentáciu a mikrobiotu jahniat s endoparazitmi, pasúcich sa na lúčnych porastoch so zmiešanou druhovou diverzitou rastlín obohatených o experimentálne siatu čakanku (*Cichorium intybus*). Šestnásť jahniat bolo rozdelených do dvoch skupín (n = 8/skupina): jahňatá pasúce sa na kontrolnom pozemku s pôvodným lúčnym porastom (CON) a zvieratá pasúce sa na experimentálnom pozemku obohatenom o čakanku (CHIC). Jahňatá boli orálne infikované larvami endoparazita *Haemonchus contortus*. Experimentálne obdobie trvalo 145 dní. Kvantitatívne analýzy pomocou hmotnostnej spektrometrie s ultra-vysokým rozlíšením identifikovali fytochemické zlúčeniny na pasienkoch jahniat CON aj CHIC skupín. Podobná počiatočná hmotnosť jahniat sa od 90. do 145. dňa začala v CHIC skupine signifikantne zvyšovať. Koncentrácia amoniakálneho dusíka bola vyššia (P = 0,007) a koncentrácia kyseliny propiónovej bola nižšia (P = 0,016) v CHIC skupine. Väčšie relatívne zastúpenie amylolytických baktérií *Streptococcus bovis* v CHIC skupine významne zvýšilo mikrobiálnu enzymatickú aktivitu amylázy (P = 0,008) a xylanázy (P = 0,049). Výsledky potvrdili blahodarné účinky bioaktívnych látok čakanky, ktoré zlepšili rastové ukazovatele, ovplyvnili mikrobiálnu fermentáciu v bachore a parazitologický status jahniat. Čakanka je sľubnou alternatívou pre manažment endoparazitárnych infekcií v súlade s princípmi ekologického poľnohospodárstva.

ÚVOD

Pasúce sa prežúvavce sú vystavené neustálemu riziku, že sa nakazia larvami parazitárnych gastrointestinálnych nematódov (GIN). U malých prežúvavcov spôsobuje GIN ochorenie haemonchózu endoparazit *Haemonchus contortus*, ktorého dospelí jedinci žijú prichytení na stene slezu a živia sa krvou hostiteľa. Kontrola endoparazitov sa zvyčajne obmedzuje na opakované použitie antihelmintík v spojení so stratégiami riadenia pastvy. Väčšina prírodných oblastí predstavuje rozmanitosť rastlinných druhov, ktoré sú nutričnými centrami a lekárňami s obrovským množstvom primárnych (živiny) a sekundárnych (farmaceutických) zlúčenín životne dôležitých pre výživu a zdravie prežúvavcov. Bioaktívne látky rastlinného pôvodu (polyfenoly) môžu byť pre prežúvavce prospešné bojom proti GIN a zároveň môžu zlepšiť aj výživu zvierat (Váradyová a kol. 2018). Samoliečba pasúcich sa prežúvavcov reaguje na všeobecnú požiadavku znížiť používanie syntetických chemikálií v poľnohospodárstve a podporovať systémy ekologického poľnohospodárstva (Villalba a kol. 2014). Cieľom práce bolo zistiť, či lúčne porasty so zmiešanou druhovou diverzitou rastlín obohatené o experimentálne zasiatu čakanku môžu priaznivo zmeniť rastové ukazovatele a bachorovú mikrobiálnu fermentáciu jahniat s endoparazitmi.

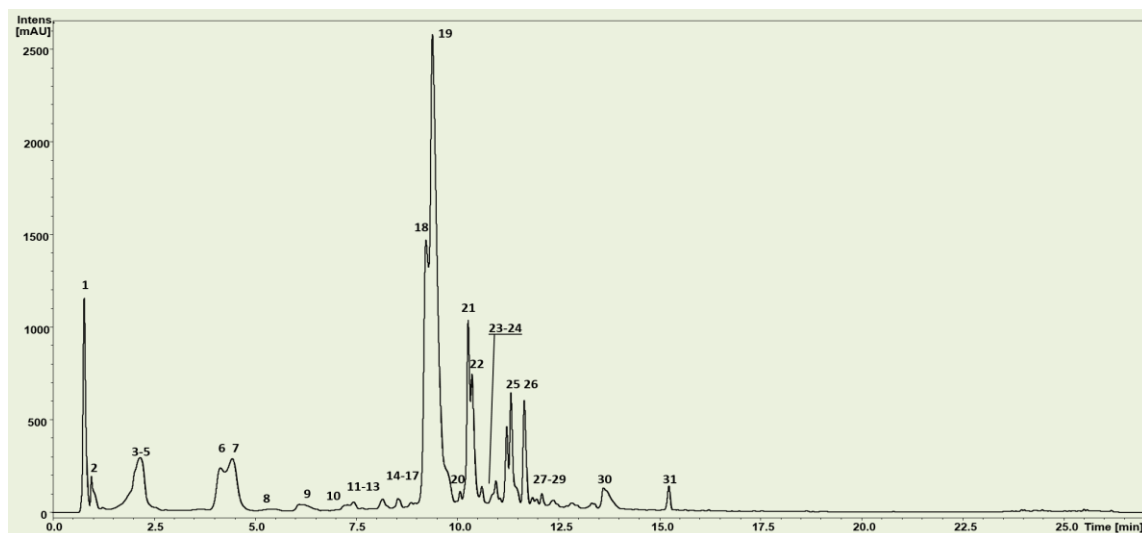
MATERIÁL A METÓDY

Jahňatá (16 ks, plemeno Cigája, vek 3–4 mesiace, váha $13,6 \pm 0,52$ kg) bolo odčervенých albendazolom počas 7-dňového adaptačného obdobia. Boli rozdelené do dvoch skupín (n = 8/skupina): jahňatá pasúce sa na kontrolnej parcele s pôvodným lúčnym porastom (CON) a zvieratá pasúce sa na experimentálnej parcele obohatenej o čakanku (CHIC). Vybrali sme dve parcely o výmere 0,43 ha a rozdelili elektrickým oplotením. Na každú parcelu sme umiestnili vodný žľab a postavili prístrešok. Parcelu CON tvorili výlučne lúčne pasienky so zmiešanou druhovou diverzitou rastlín a 25 % parcely CHIC sme preorali a rekultivovali čakankou (*C. intybus*). Experimentálne parcely neboli nikdy predtým spásané a boli považované za

nezaťažené GIN. Všetky jahňatá boli orálne infikované larvami 3. štádia *H. contortus*. Obe skupiny boli kŕmené aj koncentrátovým krmivom (350 g sušiny/deň/zviera). Jahňatá sme pravidelne vážili a odoberali krv a fečes. Bol sledovaný parazitologický status počas celého experimentu. Po 145 dňoch boli jahňatá humánne usmrtené podľa Nariadenia Rady Európskej komisie (1099/2009). Urobili sme chemické analýzy krmiva (AOAC), kvantitatívne analýzy polyfenolov (UHRMS), analýzy fermentačných parametrov (GC), analýzy špecifických enzymatických aktivít v bachore (Mikulová a kol. 2023), bachorové mikrobiálne analýzy (RT-PCR). Údaje sme analyzovali pomocou nepárového t-testu (GraphPad Prism 9.2.0 (332) 2021; GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Polyfenolové zlúčeniny, okrem tanínov, identifikované v čakanke, patrili hlavne do skupín fenolových kyselín (napr. k. cichorová, k. kávová, k. chinová), flavonoidov (napr. kvercetín, kaempferol, apigenín glukuronid) a kumarínov (eskulin, aglykón) (Obr. 1). Majú hlavne antimikrobiálne, antiparazitické, protizápalové, antioxidantné, imunologické vlastnosti a pravdepodobne sú prospešné aj na zlepšenie rastu jahniat (Campbell a kol. 2021), čo sa potvrdilo aj v našom experimente. Čakanka v CHIC skupine zvýšila denný váhový prírastok jahniat od 90. dňa pokusu oproti CON skupine ($P < 0,05$). Parazitologický status jahniat bol po 35 dní po infekcii ovplyvnený v oboch skupinách, buď priamo pôsobením na rôzne vývojové štádiách parazita, alebo nepriamo zvýšením odolnosti zvierat proti endoparazitom.

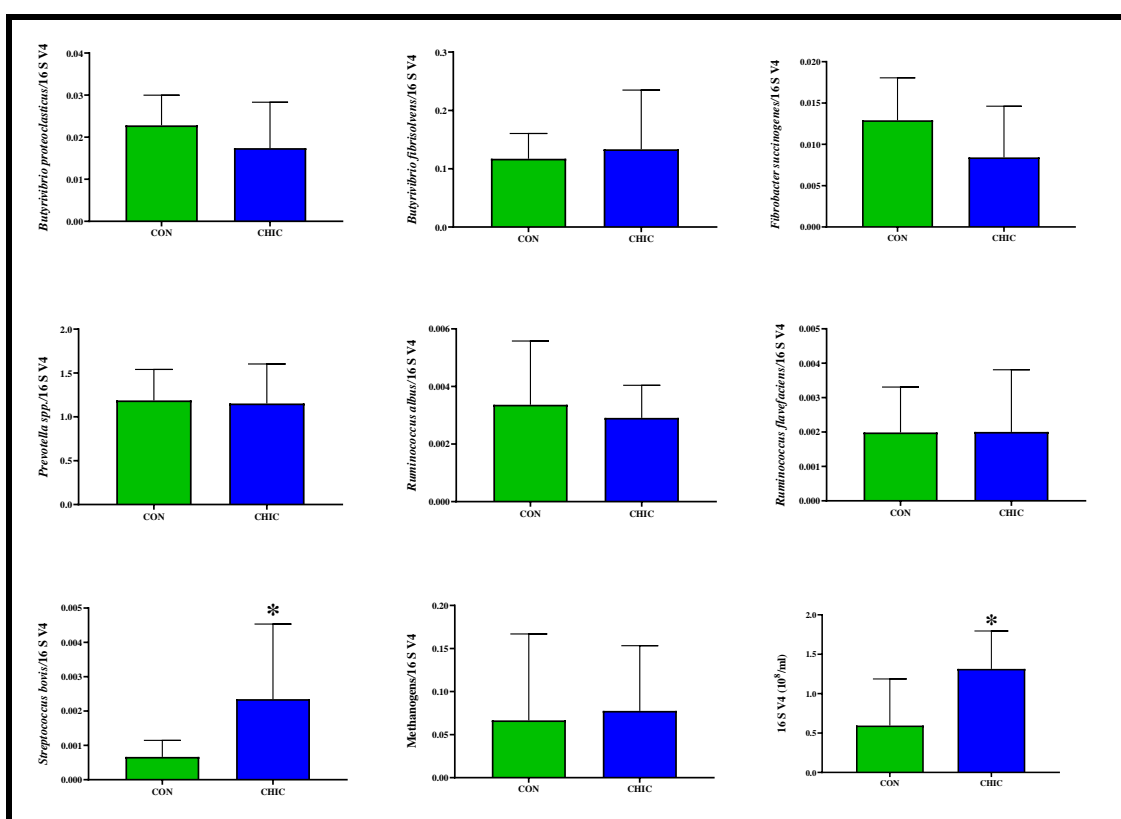


Obr. 1. Chromatogram (UV 254 nm) čakanky (*C. intybus*) s hlavnými fytochemikáliami

Amoniakálny dusík bol vyšší v CHIC ($P = 0,007$, Tab. 1) a jeho koncentrácia poskytovala maximálnu rýchlosť trávenia a definovala optimálny obsah amoniaku v bachore. Tvorba propionátu súťažila s metanogenézou o metabolický vodík v bachore a zrejme mikrobiálna populácia CON skupiny podporovala viac tvorbu propionátu ($P = 0,016$). Enzymatická aktivita amylázy a xylanázy, bola významne vyššia v CHIC skupine ako v CON skupine, čo súviselo aj s posunom relatívneho zastúpenia amylolytických baktérií *Streptococcus bovis* v CHIC skupine (Obr. 2). Záverom, čakanka je sľubnou alternatívou pre manažment endoparazitárnych infekcií v súlade s princípmi ekologického poľnohospodárstva, ktorá si vyžaduje multidisciplinárny prístup vedcov z oblasti parazitológie, fytochémie, živočíšnej výroby, fyziológie trávenia, etológie a iných.

	CON (priemer ± SD)	CHIC (priemer ± SD)	P
NH ₃ -N	170 ± 38,0	234 ± 45,1	0,007
Celkové UMK (mmol/l)	30,6 ± 8,72	28,6 ± 11,9	0,694
K. octová (mol%)	67,7 ± 3,45	70,1 ± 2,15	0,117
K. propionová (mol%)	14,4 ± 2,40	11,7 ± 1,57	0,016
K. maslová (mol%)	13,4 ± 1,70	12,4 ± 2,10	0,326
α-Amyláza (μkat/g proteínu)	0,94 ± 0,787	1,85 ± 0,610	0,008
CM-celulóza (μkat/g proteínu)	0,78 ± 0,596	0,87 ± 0,708	0,699
Xylanáza (μkat/g proteínu)	54,2 ± 13,86	73,6 ± 35,28	0,049

Tab. 1. Fermentačné parametre a špecifická enzymatická aktivita v bachore



Obr. 2. Mikrobiálne populácie bachora jahniat vyjadrené v arbitrárnych jednotkách (AU).

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom APVV 18-0131.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Campbell BJ, et al. Delayed weaning improves the growth of lambs grazing chicory (*Cichorium intybus*) pastures. *Small Rum Res.* 2021;204:106517.
- Mikulová K, et al. Growth performance and ruminal fermentation in lambs with endoparasites and in vitro effect of medicinal plants. *Agriculture* 2023;13:1826.
- Váradyová Z, et al. Effects of herbal nutraceuticals and/or zinc against *Haemonchus contortus* in lambs experimentally infected. *BMC Vet Res.* 2018;14:78.
- Villalba JJ, et al. Ruminant self-medication against gastrointestinal nematodes: evidence, mechanism, and origins. *Parasite* 2014;21:31.

ÉTERICKÉ OLEJE AKO ALTERNATÍVNE ANTIMIKROBIÁLNE LÁTKY V AKVAKULTÚRE

Hudecová P.¹, Hajdučková V.¹, Király J.¹, Koščová J.¹, Horňák P.²

¹Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

²Ústav materiálov a inžinierstva kvality, FMRR, TUKE, Košice

ABSTRAKT

Aeromonas salmonicida je významným rybím patogénom spôsobujúcim vysoké ekonomické straty v chove rýb. Liečba bakteriálnych ochorení pomocou antimikrobiálnych látok vedie k rozvoju antibiotickej rezistencie, a z tohto dôvodu je potrebné hľadať nové alternatívy liečby a prevencie. Cieľom tejto práce bolo zistiť antibakteriálnu aktivitu 8 éterických olejov (EO) voči rybiemu patogénu *Aeromonas salmonicida* subsp. *masoucida*. Antibakteriálna aktivita bola testovaná pomocou diskovo-difúznej metódy a metódy minimálnej inhibičnej koncentrácie voči 12 izolátom, získaných z črevného obsahu pstruhov dúhových. Najsilnejšiu antibakteriálnu aktivitu preukázal oregánový a tymiánový EO, ktorých MIC sa pohybovali v rozmedzí od 0,06 µl/ml do 0,125 µl/ml. Pre zistenie závislosti medzi časom, koncentráciou EO a koncentráciou rybieho patogénu, bola vykonaná krivka prežívania, ktorá preukázala silnú bakteriostatickú až baktericídnu aktivitu v priebehu 24 hod. Poškodenie bakteriálnej štruktúry účinnými éterickými olejmi bolo vizualizované rastrovacím elektrónovým mikroskopom.

ÚVOD

Intenzifikácia akvakultúry môže viesť k zvýšenému výskytu bakteriálnych ochorení v chove rýb a medzi najčastejších pôvodcov patria Gram-negatívne baktérie, najmä *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Yersinia ruckeri* alebo *Vibrio anguillarum*. Využívanie antimikrobiálnych látok na prevenciu a terapiu bakteriálnych ochorení vedie k vzniku a šíreniu antibiotickej rezistencie medzi zvieratami a ľuďmi (Irshath a kol., 2023). Z tohto dôvodu je potrebné hľadať alternatívne možnosti ich náhrady, medzi ktoré patria aj éterické oleje. EO sú charakterizované ako sekundárne metabolity rastlín, ktoré sa vyznačujú silnou antioxidačnou, imunostimulačnou, antivírusovou, antiparazitárnou a antibakteriálnou aktivitou. Vo všeobecnosti sú Gram-pozitívne baktérie na účinky EO citlivejšie kvôli stavbe ich bunkovej steny, avšak mnohé štúdie potvrdzujú signifikantný účinok aj voči Gram-negatívnym baktériám. Ich použitie sa v akvakultúre zvyšuje vďaka ich biodegradačným vlastnostiam, nehromadeniu sa v tkanivách vo forme reziduí a v dôsledku ich chemickej štruktúry sú odolné voči žalúdočnej kyseline, čo zaisťuje ich účinok. Vďaka týmto vlastnostiam predstavujú EO sľubnú alternatívu ku antimikrobiálnym látkam, čím môžu prispieť k spomaleniu šírenia antibiotickej rezistencie (Dawood a kol., 2021, Dawood a kol., 2022).

MATERIÁL A METODIKA

V práci bolo použitých 8 komerčne vyrábaných EO (Calendula a.s., SR), a to čajovníkový, eukalyptový, kosodrevinový, mäťový, oregánový, rozmarínový, tymiánový a borovicový EO. Ich antibakteriálna aktivita bola testovaná pomocou diskovo-difúznej metódy a minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) voči 12 izolátom *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, získaných z črevného obsahu pstruhov dúhových. Bakteriálne inokulá boli pripravené z nočnej kultúry (18 hod.) a upravené na zákal zodpovedajúci hustote $1,5 \times 10^8$ KTJ/ml. Na vykonanie diskovo-difúznej metódy bolo naočkovaných 100 µl inokula na Mueller-Hinton agar (MHA) (Oxoid, UK), s následným naukladaním sterilných papierových diskov o priemere 6 mm a pridaním 10 µl jednotlivých EO. Ako pozitívna kontrola bolo použité antibiotikum ciprofloxacín (5 µg/disk) a ako negatívna kontrola sterilný tryptón-sójový bujón (TSB) (HiMedia, India). Citlivosť voči EO bola vyhodnotená po 24 hod. kultivácii pri teplote 37 °C

meraním priemeru inhibičných zón a jednotlivé výsledky boli hodnotené po 3 opakovaných meraniach štatisticky Tukeyho testom. MIC bola stanovená pomocou mikrotitračných platničiek (Brand, Nemecko), kedy boli bakteriálne inokulá upravené na zákal zodpovedajúci $3,0 \times 10^8$ KTJ/ml. Finálny obsah jamky (200 μ l) obsahoval 100 μ l bakteriálneho inokula a 100 μ l testového oleja, ktorý bol dvojkovo riedený v TSB pre dosiahnutie koncentračného rozpätia od 1,0 μ l/ml do 0,005 μ l/ml, s využitím emulgátora Tween 20 (AppliChem, Nemecko). Pozitívnu kontrolou bolo bakteriálne inokulum a negatívnou kontrolou čisté TSB. Platničky boli inkubované po dobu 24 hod. pri teplote 37 °C za stáleho trepania a inhibícia rastu sa vyhodnotila spektrofotometricky, meraním absorbcie pomocou Biotek Synergy 2 (Merck, Nemecko) pri 600 nm. Na štatistické vyhodnotenie bol použitý softvér Prism 8.3.0 s Dunnett testom. MIC bola definovaná ako najnižšie riedenie bez viditeľného rastu mikroorganizmov. Pomocou krivky prežívania je možné sledovať vzťah medzi časom, koncentráciou EO a koncentráciou baktérie. Pre toto sledovanie boli použité dva najúčinnšie EO. Skúmavky s 5 ml suspenzie s obsahom inokula s koncentráciou $1,5 \times 10^8$ KTJ/ml a EO s koncentráciou 0,03 μ l/ml, 0,06 μ l/ml a 0,125 μ l/ml. Kontrolnú skupinu predstavovala čistá bakteriálna suspenzia. Jednotlivé alikvóty (500 μ l) boli odoberané po 0, 3, 6 a 24 hod. a desiatkovo riedené vo fyziologickom roztoku. Kultivácia bola vykonaná na MHA pri teplote 37 °C, po ktorej bol vyhodnotený počet baktérií v KTJ/ml, uvádzaný v log KTJ/ml. Pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu (JEOL JSM-35 CF, Japonsko), bol vizualizovaný antibakteriálny efekt EO. Inokulum bolo upravené na zákal zodpovedajúci $1,5 \times 10^8$ KTJ/ml a vystavené MIC EO po dobu 18 hodín pri teplote 37 °C. Kontrolnú skupinu tvorila bakteriálna suspenzia bez pridania EO. Po inkubačnej dobe boli baktérie získané centrifugáciou (8000 rpm, 5 min), premyté a dvakrát resuspendované v sterilnom PBS. Bunky boli dehydratované použitím etanolu so zvyšujúcou sa koncentráciou s následnou náhradou etanolu za terciárny butylalkohol. Takto vysušené bunky boli pokryté zlatom a pozorované pod mikroskopom (Liang a kol., 2022).

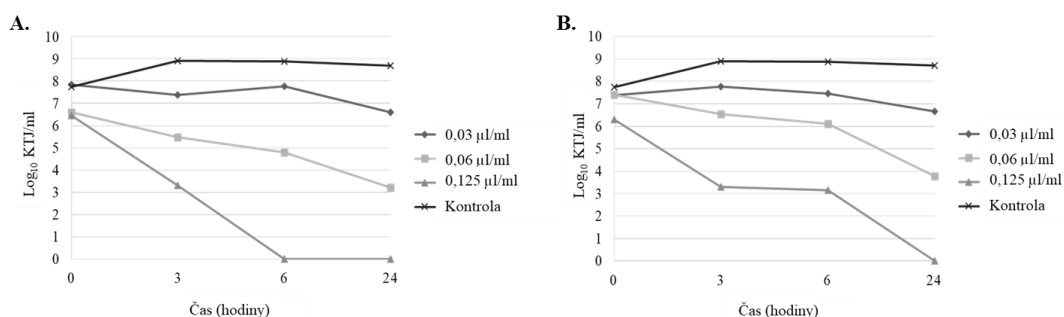
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa Rota a kol. (2008), je antibakteriálna aktivita EO klasifikovaná pomocou diskovo-difúznej metódy ako EO so silnou inhibičnou aktivitou (zóna inhibície < 12 mm), miernou inhibičnou aktivitou (zóna inhibície = 20 – 12 mm) alebo bez inhibičnej aktivity (zóna inhibície \geq 12 mm). Na základe danej klasifikácie, tymiánový, oregánový, čajovníkový a mäťový EO vykazovali najsilnejšiu antibakteriálnu aktivitu voči *A. salmonicida* subsp. *masoucida*, pričom najslabšiu aktivitu preukázal kosodrevinový EO. Štyri EO, tymiánový, oregánový, čajovníkový a mäťový, boli testované pre ich MIC na základe ich najvýznamnejšej antibakteriálnej aktivity potvrdenej diskovo-difúznou metódou. MIC oregánového a tymiánového oleja sa pohybovala v rozpätí 0,06 μ l/ml až 0,125 μ l/ml a pre čajovníkový a mäťový olej od 0,25 μ l/ml až 0,5 μ l/ml (Tab. 1). Pre sledovanie redukcie *A. salmonicida* subsp. *masoucida* v priebehu 24 hod. pôsobením EO v troch rôznych koncentráciách (0,03 μ l/ml, 0,06 μ l/ml a 0,125 μ l/ml), bola vykonaná krivka prežívania. Pre potvrdenie bakteriostatickej aktivity EO je potrebný úbytok o menej ako 3 logaritmicke poriadky, kým pre stanovenie baktericídnej aktivity je to redukcia o 3 a viac logaritmicke poriadkov. Z výsledkov vyplýva, po 24 hod. inkubácii, tymiánový EO dosiahol 1,6 log₁₀ redukciu pri koncentrácii 0,03 μ l/ml, 2,9 log₁₀ redukciu pri koncentrácii 0,06 μ l/ml a 10,0 log₁₀ redukciu pri koncentrácii 0,125 μ l/ml (Obr. 1A). Oregánový EO vykazoval silnú antibakteriálnu aktivitu keďže došlo k 1,5 log₁₀ redukcii pri koncentrácii 0,03 μ l/ml, 2,4 log₁₀ redukcii pri koncentrácii 0,06 μ l/ml a 10,0 log₁₀ redukcii pre koncentráciu 0,125 μ l/ml (Obr. 1B). Pomocou rastrovacieho elektrónového mikroskopu bol vizualizovaný účinok EO na bakteriálnu bunku. Po 18 hod. inkubácii boli sledované štrukturálne zmeny ako zmena vo

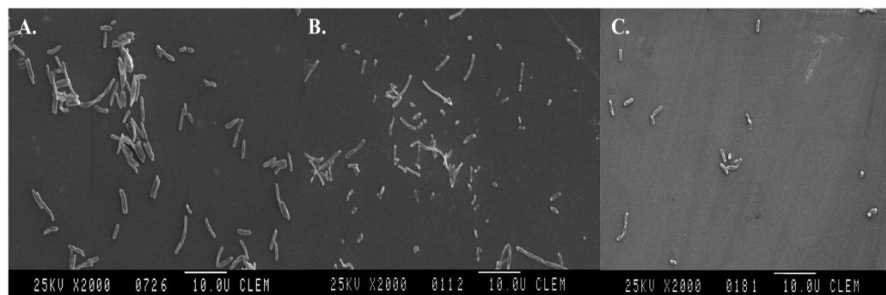
veľkosti a v tvare bunky, ale aj deštrukcia bunkového povrchu, vedúca k ľahkému úniku bunkového obsahu až ku kolapsu bakteriálnej bunky (Obr. 2B., 2C.).

Bakteriálny izolát	Oregánový	Tymiánový	Čajovníkový	Mätový	
<i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>	IZOLÁT 4	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,005	0,25 ± 0,013	0,25 ± 0,007
	IZOLÁT 7	0,06 ± 0,01	0,125 ± 0,001	0,25 ± 0,006	0,25 ± 0,011
	IZOLÁT 24	0,06 ± 0,026	0,125 ± 0,008	0,25 ± 0,003	0,25 ± 0,0
	IZOLÁT 27	0,06 ± 0,002	0,125 ± 0,002	0,25 ± 0,039	0,25 ± 0,049
	IZOLÁT 59	0,125 ± 0,006	0,125 ± 0,008	0,25 ± 0,005	0,5 ± 0,001
	IZOLÁT 63	0,125 ± 0,001	0,125 ± 0,002	0,25 ± 0,002	0,5 ± 0,005
	IZOLÁT 70	0,125 ± 0,002	0,125 ± 0,007	0,25 ± 0,008	0,25 ± 0,004
	IZOLÁT 71	0,125 ± 0,003	0,125 ± 0,007	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,001
	IZOLÁT 73	0,06 ± 0,005	0,125 ± 0,001	0,25 ± 0,005	0,25 ± 0,006
	IZOLÁT 84	0,125 ± 0,004	0,125 ± 0,003	0,5 ± 0,014	0,5 ± 0,003
	IZOLÁT 85	0,125 ± 0,006	0,125 ± 0,006	0,5 ± 0,016	0,5 ± 0,018
IZOLÁT 86	0,125 ± 0,002	0,125 ± 0,002	0,5 ± 0,01	0,5 ± 0,003	

Tab.1. MIC EO voči izolátom *A. salmonicida* subsp. *masoucida*



Obr. 1. Krivka prežívania *A. salmonicida* subsp. *masoucida* so sledovaným účinkom tymiánového (A.) a oregánového EO (B.).



Obr. 2. Vizualizácia antibakteriálnej aktivity EO pomocou SEM. Vizualizácia zmien po 18 hod. inkubácii - kontrolná skupina bez EO (A.), s pridaním tymiánového (B.) a oregánového EO (C.).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0731/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Dawood MA. et al. Antiparasitic and antibacterial functionality of essential oils: An alternative approach for sustainable aquaculture. *Pathogens*. 2021; 10.2: 185.
- Dawood MA. et al. Exploring the roles of dietary herbal essential oils in aquaculture: A review. *Animals*. 2022; 12.7: 823.
- Irshath AA. et al. Bacterial pathogenesis in various fish diseases: recent advances and specific challenges in vaccine development. *Vaccines*. 2023; 11.2: 470.
- Liang D. et al. Preparation, characterization, and biological activity of *Cinnamomum cassia* essential oil nano-emulsion. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2022; 86: 106009.
- Rota M. C. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*. 2008; 19.7: 681-687.

RAAV VECTORS IN GENE THERAPY AND THEIR TESTING ON AN ALTERNATIVE CAM MODEL

Hurníková J.¹, Demčišáková Z.¹, Cucchiarini M.², Petrovová E.¹

¹Department of Morphological Disciplines, UVMP, Kosice, Slovakia

²Center of Experimental Orthopaedics, Saarland University Medical Center, Homburg, Germany

ABSTRACT

Current biomedical research increasingly emphasizes the development of models that bridge the gap between *in vitro* and *in vivo* results, in line with the 3Rs principles. The chorioallantoic membrane (CAM) is an extraembryonic tissue formed by the fusion of the chorion and the vascularized allantoic membrane, serving as an excellent model for angiogenesis and biocompatibility testing. Viral vectors, particularly recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV), are the most effective tools for gene transfer and the leading platform for *in vivo* gene therapy. This study aimed to evaluate rAAV activity on CAM, by visualizing the expression of three different reporter genes carried by these vectors. We identified the vector that allows the most reliable and rapid visualization on CAM, which will be used in future experiments with therapeutic vectors. Specifically, we applied rAAV vectors carrying the reporter genes lacZ, RFP (red fluorescence protein), and GFP (green fluorescence protein) on chick CAM and visualized their activity after 24 hours (ED8). Fluorescent microscopy was used for the RFP and GFP vectors, while a β -galactosidase staining kit was employed for the lacZ vector. The lacZ vector required some modifications for successful visualization and the fluorescence of the RFP vector was hindered by interference from blood cells. Based on our findings, the GFP reporter gene emerged as the most suitable for studying rAAV vector activity on CAM due to its straightforward and reliable visualization.

INTRODUCTION

The chorioallantoic membrane (CAM) is a highly vascularized avian extraembryonic membrane that is used as an *in vivo* model in the study of angiogenesis in relation to cells or tissues. Currently, the use of CAM is already an integrated part of biocompatibility testing of newly created biomaterials included in the field of regenerative medicine and tissue engineering (Demčišáková *et al.*, 2022). CAM serves as a respiratory and excretory organ, and although it is very thin and its matrix is transparent, a very well-formed arteriovenous system is easily accessible and visible (Merckx *et al.*, 2020). Gene therapy is the treatment of a genetic disease by introducing specific genetic materials in a patient to modify the cell functions using gene delivery vehicles called vectors (Bulcha *et al.*, 2021). Gene transfer that involves the delivery of foreign genetic material into target cells via nonviral or viral vectors aims at treating specific disorders by altering gene expression, offering potential therapeutic solutions for diseases with well-characterized genetic causes (Chancellor *et al.*, 2023). Viral vectors serve as delivery systems of genetic information (Shaabani *et al.*, 2022). These are derived from pathogenic viruses from which infectious genes are encoded, removed, and replaced with therapeutic genetic sequences. Today represent recombinant adeno-associated viruses (rAAV) the leading platform for *in vivo* gene therapy (Wang *et al.*, 2019).

MATERIAL AND METHODS

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*; Lohmann brown breed) were delivered from the hatching farm Párovské Háje in a temperature-controlled manner to ensure egg viability and quality. The eggs were incubated horizontally in a forced-draft constant-humidity incubator at 37.5 ± 0.5 °C and 70% relative humidity. At embryonic day (ED) 3, the eggshell was disinfected with 70% ethanol, each egg was cracked, and the content with chicken embryo was carefully transferred into a plastic weighing boat. The embryos were incubated until ED7. The application on the CAM was made on ED7, where 20 μ l of rAAV

vectors (rAAV-RFP, rAAV-lacZ, rAAV-lacZ) were applied within a silicone ring placed on a suitable CAM zone between two large vessels. The vectors used in this study were designed and constructed in collaboration with the Experimental Orthopaedic Centre, Saarland University, Germany. Each type of vector was applied on CAM of 6 chick embryos + 2 embryos were used as a control for lacZ staining. Chick embryos were placed back to the incubator after application. Visualization was made after 24 hours (ED8), using fluorescent microscopy for the RFP (TRITC filter) and GFP (FITC filter) vectors and β -galactosidase staining kit (β -Gal Staining Set, Roche) for the lacZ vector visualization. The samples of the CAM with RFP and GFP vectors within the silicon ring were excised, subsequently examined and documented using the fluorescence microscope Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) and digital camera Olympus DP80 (software cellSenseStandard). The β -galactosidase staining solution was prepared according to protocol instructions and diluted with distilled water in a ratio of 1.8 (H₂O):1 (kit solution) and applied on the zone within the silicone ring in volume of 30 μ l. Embryos were placed in incubator and after one hour the blue coloration in the area of application was observed.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present research, we applied and subsequently visualised the activity of rAAV vectors carrying three different reporter genes (lacZ, RFP, GFP) on chick CAM using the *ex ovo* approach. Visualization of the lacZ rAAV vector was possible after some modifications, as the kit was designed for cell cultures and fixed samples. The staining solution caused hemorrhages and destruction of blood vessels at the place of application. Therefore, we tried to dilute the staining solution with distilled water in different ratios (2:1; 1:1; 1.5:1; 1.8:1) to find the concentration that would not cause hemotoxicity but still be able to visualize the product. We overcame this hurdle by diluting the solution with distilled water in a ratio of 1.8 (H₂O):1 (kit solution). Fluorescence visualization of the rAAV-RFP was not possible due to interference with the blood cells' fluorescence signal present under the same filter. In comparison, rAAV-GFP visualization was successful and clear, without any signal interference. The reporter gene serves as an indicator of successful transduction. Its visualization is important in order to confirm the vector's genome integration to the target cells population and thus to make sure that the therapeutic gene was delivered correctly. Schughrat and Accart, (2003) tested adenoviral vectors with the lacZ reporter gene on the CAM model, but they did not observe any vessel destruction while staining the sample with X-Gal solution. However, they did not apply the solution *in vivo* but first on dissected CAM. This could explain the absence of hemotoxicity. GFP as a reporter gene was used in various virus studies on CAM. Han *et al.*, (2002) studied the pathogenicity of herpesviruses and described GFP gene as a useful marker since it does not require any cofactors or substrates for its detection. Similarly, Al-garib *et al.*, (2003), who tested tissue tropism of Newcastle Disease Virus (NDV) with GFP reporter gene on chicken embryo and CAM, agreed that the major advantage of GFP is that it enabled the visualization of virus replication without any pre-treatment of the tissue. Our study confirmed that the best solution for studying rAAV vector activity on CAM would be a vector carrying the reporter gene GFP, which offers simple and reliable visualization.

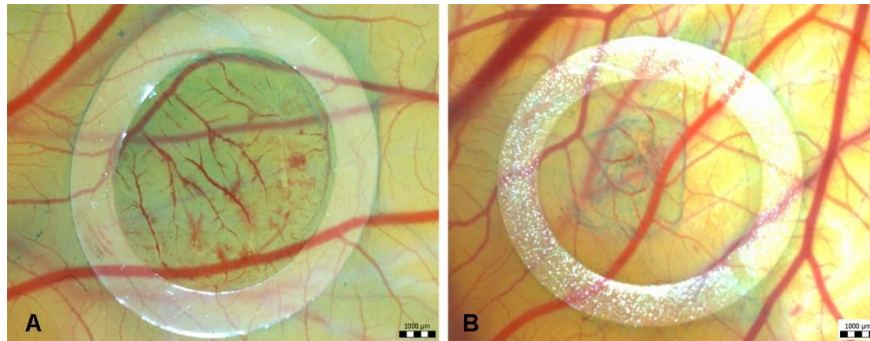


Fig. 1. Comparison of lacZ vector visualization using staining kit without dilution (A) and dilution ratio 1:1.8 without any visible hemotoxicity (B)

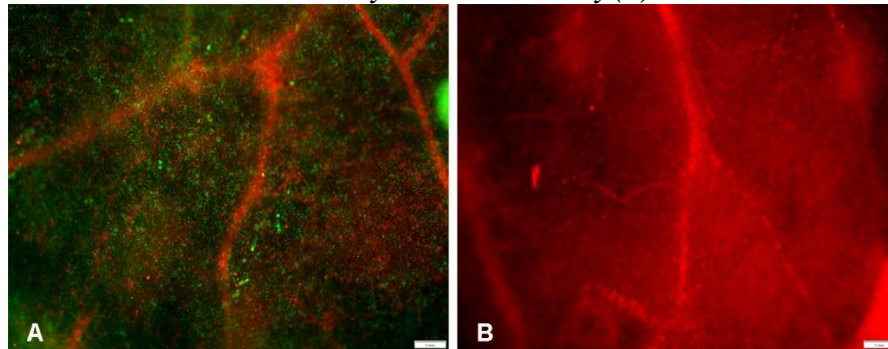


Fig. 2. A - Fluorescence microscopy visualization of GFP vector activity on CAM after 24 hours from application, merged TRITC and FITC photo; B - Fluorescence microscopy visualization of RFP vector on CAM under TRITC filter – impossible to distinguish between RFP and blood cells' signal

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was created with the financial support of IGA-ESGD/01/2024 “Biomaterial controlled rAAV gene transfer tested on an alternative chorioallantoic membrane model” and VEGA 1/0074/24.

REFERENCES

- Al-garib SO, et al. Tissue tropism in the chicken embryo of non-virulent and virulent Newcastle diseases strains that express green fluorescence protein. *Avian Pathology* 2003; 32(6): 591-596
- Bulcha JT, et al. Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther* 2021; 6(1), 53
- Chancellor D, et al. The state of cell and gene therapy in 2023. *Mol Ther* 2023; 31(12), 3376-3388.
- Demcisakova Z, et al. Evaluation of angiogenesis in an acellular porous biomaterial based on polyhydroxybutyrate and chitosan using the chicken ex ovo chorioallantoic membrane model. *Cancers* 2022; 14(17): 4149
- Han MG, et al. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene. *Archives of Virology* 2003; 147: 1017-1031
- Merckx G, et al. Chorioallantoic membrane assay as model for angiogenesis in tissue engineering: Focus on stem cells. *Tissue Engineering Part B Reviews* 2020; 26(6): 519-539
- Shaabani E, et al. Gene therapy to enhance angiogenesis in chronic wounds. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2022; 29: 871-899
- Schughart K., Accart N. Use of Adenovirus Vectors for Functional Gene Analysis in the Chicken Chorioallantoic Membrane. *BioTechniques* 2003; 34: 178-183
- Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews. Drug discovery* 2019; 18(5): 358-378

HORMONÁLNA NEROVNOVÁHA PO TRAUMATICKOM PORANENÍ MIECHY JE SPOJENÁ SO ZMENAMI V EXPRESII ANGIOTENZÍNŮVÝCH RECEPTOROV

Hvozdíková E., Kellerová E., Snopková J., Liptáková V., Pavel J.
Neurobiologický ústav Biomedicínskeho centra SAV, Košice

ABSTRAKT

Traumatické poranenie miechy (TPM) je závažný stav, ktorý vedie k náhlejšej aktivácii neuroendokrinného systému hypotalamus-hypofýza-nadoblička (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA). Správna funkcia systému je v dôsledku primárneho a sekundárneho poškodenia sympatických nervových dráh inervujúcich nadobličku narušená. Narušenie sympatickej inervácie nadobličky môže výrazným spôsobom ovplyvniť expresiu angiotenzínových receptorov (AT1 a AT2), ktoré sa nachádzajú v jednotlivých zložkách tohto systému. Cieľom našej práce bolo skúmanie expresie AT1 a AT2 receptorov v osi HPA, ako aj sledovanie zmien hladiny cirkulujúceho Angiotenzínu II a stresových hormónov počas 28-dňového prežívania po TPM (40g kompresia počas 15 minút) indukovaným vo vyššej (Th1) a nižšej (Th9) časti hrudnej miechy potkana. Po prvých 3 dňoch prežívania bola pozorovaná zvýšená hladina cirkulujúceho Angiotenzínu II, ktorá následne klesala na kontrolné hodnoty. V rámci expresie angiotenzínových receptorov v systéme HPA sme pozorovali dynamické zmeny, ktoré sme korelovali so zmenami plazmatickej hladiny stresových hormónov, vrátane hormónu uvoľňujúceho kortikotropín, adrenokortikotropínu, kortikosterónu, adrenalínu, noradrenalínu a aldosterónu. Z našich výsledkov je zrejmé, že rozsah sympatickej denervácie nadobličiek spôsobený TPM významne ovplyvňuje neurohormonálnu reguláciu a expresiu receptorov Angiotenzínu II v rámci neuroendokrinného systému HPA.

ÚVOD

Os hypotalamus-hypofýza-nadoblička (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA) je hlavný neuroendokrinný systém, ktorý riadi reakciu na stres a reguluje mnohé telesné procesy, vrátane trávenia, imunitných reakcií, nálady a emócií, sexuálnej aktivity a uchovávaní a výdaja energie. TPM však môže negatívnym spôsobom výrazne ovplyvniť optimálne fungovanie tohto systému, a to prostredníctvom narušenia sympatickej inervácie nadobličky. Angiotenzín II je významný stresový hormón, ktorý zohráva dôležitú úlohu v regulácii systému HPA prostredníctvom svojich AT1 a AT2 receptorov. AT1 receptor je hojne exprimovaný v paraventrikulárnom jadre (*paraventricular nucleus*, PVN) hypotalamu, v hypofýze, v kôre a v dreni nadobličiek, ktoré tvoria súčasť systému HPA (Saavedra a kol. 2007). AT2 receptor sa nachádza len v dreni nadobličiek. Angiotenzín II prostredníctvom aktivácie AT1 receptora môže stimulovať sekréciu kortikotropín uvoľňujúceho hormónu (*corticotropin releasing hormone*, CRH) z hypotalamu, ktorý následne uvoľňuje adrenokortikotropný hormón (*adrenocorticotropic hormone*, ACTH) z hypofýzy. Táto kaskáda nakoniec vedie k produkcii kortizolu resp. kortikosterónu v kortexe nadobličiek (Raasch a kol. 2006). Aktivácia týchto receptorov zvyšuje citlivosť systému HPA na stres. Angiotenzín II prostredníctvom regulácie krvného tlaku a rovnováhy tekutín môže aj nepriamo ovplyvniť funkciu osi HPA (Saavedra a kol. 2007). Angiotenzín II v nadobličkách vyvoláva rôzne fyziologické reakcie. Je hlavným regulátorom sekrécie aldosterónu, v dreni zvyšuje uvoľňovanie katecholamínov, má trofické účinky v nadobličkách a stimuluje sekréciu rastových faktorov (Giacchetti a kol. 1996).

Z dostupnej literatúry však nie je jasné, akým spôsobom TPM z dlhodobého hľadiska ovplyvňuje sekréciu Angiotenzínu II, uvoľňovanie príslušných hormónov, expresiu jeho receptorov v jednotlivých komponentoch neuroendokrinného systému HPA a jeho aktiváciu. Taktiež nás zaujímalo, do akej miery rozsah denervácie nadobličky vyvolanej na úrovni vyšších (Th1) a nižších (Th9) hrudných segmentov má vplyv na nami sledované parametre.

MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch sme použili dospelé samice potkanov kmeňa Wistar (vek 3 mesiace, hmotnosť 250-300 g). Kompresia miechy (váha 40g počas 15 minút) bola vykonaná na úrovni vyšších (Th1) resp. nižších (Th9) hrudných segmentov podľa Fedorová a Pavel (2019). Dizajn výskumu bol rozdelený do dvoch experimentálnych častí. V prvej časti, z dôvodu sledovania zmien Angiotenzínu II, sledovaných hormónov v krvi ako aj v expresii oboch angiotenzínových receptorov v období 4 týždňov po TPM sme experimentálne zvieratá rozdelili do 7 skupín: (1) intaktná kontrola (n=5); (2-7) TPM na úrovni Th9 s post-traumatickým prežívaním 1, 3, 7, 14, 21 a 28 dní (n=5/skupina). Na odlíšenie vplyvu chirurgického zákroku bola každá skupina s TPM porovnávaná s príslušnou tzv. sham kontrolou (n=5/skupina).

V druhej časti experimentov sme skúmali vplyv rozsahu denervácie nadobličky spôsobené TPM na už zmienené sledované parametre. Preto experimentálne zvieratá boli rozdelené do 4 skupín: (1) intaktná kontrola (n=5), (2) sham kontrola (n=5), (3) TPM na úrovni Th1 (n=5), (4) TPM na úrovni Th9 (n=5). Zvieratá po zákroku prežívali 3 dni. Zvieratá mali neobmedzený prístup k vode a krmivu, boli držané v klietkach, v prostredí s 12 h svetelným cyklom, kontrolovanou teplotou a vlhkosťou. Všetky experimenty boli schválené Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, a to na základe zákona č. 39/2007 a vyhlášky MPRV SR č. 436/2012.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza expresie angiotenzínových receptorov v osi HPA a hormonálne zmeny

Hladiny nami sledovaných hormónov po TPM na úrovni Th9 sú typické pre nereagujúcu os HPA, kedy aj napriek zvýšenej hladine ACTH nedochádza k zvýšenej hladine kortikosterónu, ktorého hodnoty sú dokonca znížené voči sham kontrolám. Chronicky zvýšená hladina ACTH spôsobuje desenzibilizáciu nadobličkových receptorov pre ACTH a dochádza k poruchám uvoľňovania glukokortikoidov (Allison a Ditor, 2015). Pozorovaná zvýšená hladina CRH počas prvých troch dní prežívania u zvierat po TPM koreluje so zvýšenou expresiou AT1 receptorov v PVN, nakoľko AT1 receptory sú exprimované priamo na CRH neurónoch PVN (Aguilera a kol. 1995), ich aktivácia zvyšuje uvoľňovanie CRH. Pozorované hladiny aldosterónu boli signifikantne zvýšené voči sham kontrolám, a to počas takmer celej doby prežívania. Od 7. dňa po traume, zvýšená hladina aldosterónu nekoreluje s výrazne nižšou koncentráciou cirkulujúceho Angiotenzínu II. V rámci hladín katecholamínov sme pozorovali signifikantné rozdiely v hladinách adrenalínu medzi sham operovanými zvieratami a skupinou zvierat po TPM. Výrazná zvýšená hladina adrenalínu u sham operovaných zvierat oproti skupine zvierat po TPM bola pozorovaná prvé dva týždne po traume, aj keď v skupine zvierat po TPM boli hladiny adrenalínu signifikantne zvýšené oproti intaktnej kontrole. Hladiny noradrenalínu v skupine zvierat po TPM jemne prevyšovali hladiny tohto hormónu u sham operovaných zvierat počas celej doby prežívania.

Analýza zmien sledovaných parametrov po TPM na úrovni vyšších (Th1) a nižších (Th9) torakálnych segmentov

TPM vyvolané na segmentálnej úrovni Th1 a Th9 nám umožnilo sledovať vplyv rôzneho rozsahu sympatickej denervácie nadobličky na systém HPA. Sympatická inervácia nadobličiek po TPM na úrovni Th9 je čiastočne zachovaná, zatiaľ čo na úrovni Th1 je úplne prerušená. Prüss a kol. (2019) vo svojej práci popísali tzv. maladaptívny neuroendokrinný reflex, kedy po vysokoúrovňovom TPM (nad Th5) dochádza k vysokej hladine glukokortikoidov aj napriek zníženej hladine CRH. Tento reflex sme v našich výsledkoch pozorovali aj my, preto predpokladáme, že výrazne zvýšená hladina glukokortikoidov nebola spôsobená zvýšenou hladinou ACTH, ale abnormálnou funkciou sympaticky denervovaných

nadobličiek. Po TPM na Th1 sme pozorovali aj výraznú redukciu expresie angiotenzínových receptorov v rámci osi HPA. Hladiny skúmaných hormónov okrem hladín adrenalínu a kortikosterónu, boli taktiež výrazne znížené v porovnaní so skupinou zvierat po TPM na Th9. Zvýšenú hladinu adrenalínu si vysvetľujeme kompenzačným mechanizmom nadobličiek pri nastolení rovnováhy v stresovej odpovedi, kedy je narušená sympatická inervácia nadobličiek. Naše výsledky naznačili, že rozsah inervácie nadobličky je kritickým faktorom, ktorý má zásadný vplyv na neurohormonálnu reguláciu a expresiu angiotenzínových receptorov v rámci osi HPA. Pochopenie komplexných mechanizmov po TPM, medzi ktoré patrí štúdium neuroendokrinných zmien a zmien v expresii angiotenzínových receptorov v osi HPA môže viesť k vývoju účinnej terapie, zameranej na prevenciu pridružených infekčných komplikácií normalizáciou neurohormonálnej nerovnováhy u pacientov po TPM.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola podporená grantmi APVV-18-0163, APVV-22-0248 a VEGA 2/0123/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aguilera G, et al. Increased Expression of Type 1 Angiotensin II Receptors in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus following Stress and Glucocorticoid Administration. *J Neuroendocrinology*. 1995; 7:10:775-783.
- Allison DJ and Ditor DS. Immune dysfunction and chronic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2015; 53:14-18.
- Fedorova J and Pavel J. An Accurate Method for Histological Determination of Neural Tissue Loss/Sparing after Compression-Induced Spinal Cord Injury with Optimal Reproducibility. *Journal of Neurotrauma*. 2019; 36:18:2665-2675.
- Giacchetti G, et al. Angiotensin II and the adrenal. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;3:119-124.
- Prüss H, et al. Spinal cord injury-induced immunodeficiency is mediated by a sympathetic-neuroendocrine adrenal reflex. *Nat Neuroscience*. 2017; 20:11:1549-1559.
- Raasch W, et al. Angiotensin II Inhibition Reduces Stress Sensitivity of Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis in Spontaneously Hypertensive Rats. *Endocrinology*. 2006; 147:7(1):3539-3546.
- Saavedra JM, et al. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. *Stress*. 2007; 10:2:185-193.

VYUŽITIE MULTIKRITERIÁLNEJ ANALÝZY NA HODNOTENIE RIZIKOVÝCH OBLASTÍ VÝSKYTU ČREVNÝCH ENDOPARAZITOV

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

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

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

ABSTRAKT

Práca je zameraná na sledovanie výskytu črevných endoparazitov (ČE) u ľudí a identifikáciu rizikových oblastí ich výskytu v modelovej lokalite - okres Rožňava. Celkovo sa v období od 11/2022 do 1/2024 vyšetrilo 2503 vzoriek ľudskej stolice a prítomnosť ČE sa potvrdila v takmer 6% vzoriek. Najčastejšie sa v stolici zaznamenali vajíčka helmintov *Ascaris lumbricoides* a cysty protozoa *Giardia duodenalis*. Až 22-krát častejšie boli ČE detegované vo vzorkách od ľudí s rómskou národnosťou a vo vzorkách stolice od ľudí z vidieka (OR-7,23). Okrem toho sa hodnotili aj rizikové faktory, ktoré ovplyvňujú prenos a šírenie ČE v tomto okrese. Štatistickými analýzami sa zistilo, že hustota obyvateľstva, využitie vodovodu, kanalizácie a vzdelanie mali výraznejší vplyv na výskyt ČE. Priestorové analýzy určili centrálnu a juhozápadnú časť okresu za najrizikovejšiu na prenos a šírenie ČE. Účinná ochrana pred prenosom a zníženie rizika infekcie ČE si vyžaduje zavedenie cielených preventívnych opatrení, na čo je potrebné určiť a pochopiť hlavné rizikové faktory a rizikové oblasti.

ÚVOD

Výskyt črevných endoparazitov (ČE) je na Slovensku pomerne nízky, no v určitých oblastiach je ich počet zvýšený. Ide najmä o oblasti obývané marginalizovanými komunitami, ktoré sa vyznačujú preľudnením, častou absenciou zdrojov pitnej vody a kanalizácie, alebo prítomnosťou túlavých a divých zvierat (Papajová a kol., 2021). Podľa Atlasu Rómskych komunít 2019 (Ravasz a kol., 2020) sa najviac takýchto lokalít nachádza v Košickom kraji a v okrese Rožňava. Ide o oblasť etnicky zmiešanú s vyšším počtom Rómov, ktorí často žijú v segregovaných osadách s nižším životným štandardom a hygienou. To negatívne ovplyvňuje zdravotný stav obyvateľov a zvyšuje riziko nákazy ČE, čo môže predstavovať riziko aj pre celú spoločnosť. Cieľom práce bolo nielen zistiť aktuálnu epidemiologickú situáciu, ale určiť aj rizikové faktory a rizikové oblasti spojené s prenosom a šírením ČE v okrese Rožňava. Tieto informácie môžu výrazne prispieť k zníženiu výskytu ČE v týchto komunitách a zlepšiť celkový zdravotný stav obyvateľov.

MATERIÁL A METÓDY

Celkovo bolo vyšetrených 2503 vzoriek ľudskej stolice z 59 lokalít v okrese Rožňava. Vzorky boli odoberané v spolupráci s lekármi, sociálnymi pracovníkmi, rodičmi a dobrovoľníkmi. Respondenti obdržali odberové skúmavky a informovaný súhlas, kde poskytli údaje o veku, pohlaví, mieste bydliska a národnosti. Vzorky stolice boli po odbere skladované bez konzervácie pri 4 °C a vyšetrené do 24 hodín v laboratóriu. Na diagnostiku vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách bol použitý kit Paraprep L (Diamondal - Francúzsko). Výsledky parazitologických vyšetrení boli spracované pomocou RStudio, kde boli vyrátané základné epidemiologické štatistiky (pozitivita, pomer šancí, chí-kvadrát, signifikancia). Korelačnou analýzou sa určovala dôležitosť faktorov - porovnal sa počet pozitívnych vzoriek v jednotlivých lokalitách s údajmi 10 vybraných faktorov. Korelačné koeficienty boli prerátané na percentuálnu hodnotu, pričom za dôležité boli považované faktory prekračujúce hranicu 8%. Nakoniec boli vytvorené databázy importované do ArcGIS pro, kde bola vytvorená mapa priestorovej distribúcie ČE a čiastkové mapy jednotlivých faktorov. Údaje faktorov boli následne rasterizované a reklasifikované na spoločnú mierku od 1 do 5 za pomoci

prírodných zlomov. Výsledné rizikové mapy boli vytvorené za pomoci funkcií váženého prekryvu a rastrovej kalkulačky v ArcGIS pro.

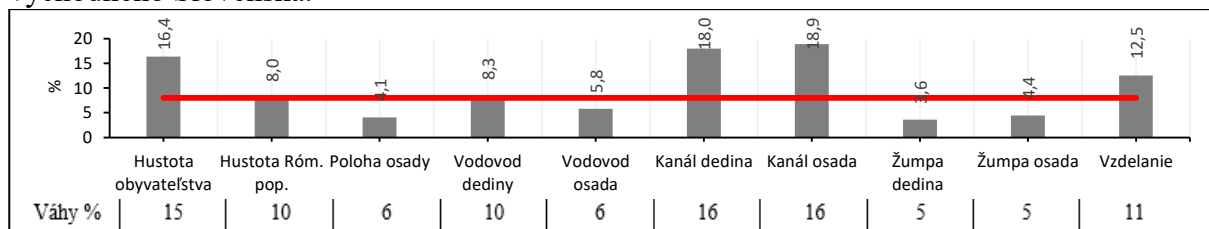
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parazitologickou analýzou sa zistilo, že 5,95% z celkového počtu vzoriek ľudskej stolice bolo pozitívnych na prítomnosť vývinových štádií endoparazitov. Celkovo boli detegované vajíčka *Ascaris lumbricoides* v 117 (4,67%), cysty *Giardia duodenalis* v 28 (1,12%), vajíčka *Trichuris trichiura* v 12 (0,48%) a *Enterobius vermicularis* v 11 (0,44%) vzorkách. Vzorky boli následne rozdelené do niekoľkých skupín podľa národnosti, pohlavia a prostredia. Signifikantne viac pozitívnych vzoriek bolo detegovaných u jednotlivcov rómskej národnosti, kde sa pozitívne vzorky vyskytovali až 22,19-krát častejšie v porovnaní s nerómskou populáciou (Tab. 1). Medzi pohlaviami nebol signifikantný rozdiel v miere infekcie. Avšak vo vidieckom prostredí sa zistila výrazne vyššia pozitivita a vzorky pozitívne na ČE sa vyskytovali 7-krát častejšie v porovnaní s mestským prostredím (Tab. 1). Podobne vysokú prevalenciu endoparazitov u rómskej populácie a na vidieku na východnom Slovensku uvádzajú vo svojej práci aj Papajová a kol. (2021) alebo Ihnacik a kol. (2022). Dokonca Pipiková a kol. (2017) nezistili u majoritnej populácie v stolici žiadne vývinové štádiá endoparazitov.

	Celkovo	Národnosť		Pohlavie		Prostredie	
		Róm	Neróm	Muž	Žena	Dedina	Mesto
Počet vzoriek	2503	848	1655	1318	1185	1286	1217
Pozitívne (%)	5,95	15,92	0,85	6,07	5,82	7,23	4,60
95% CI	5,02 - 6,90	13,52 - 18,55	0,46 - 0,14	4,84 - 7,48	4,55 - 7,31	5,87-8,78	3,49-5,93
OR	-	22,19	0,04	1,04	0,95	1,7	0,58
Chi ²	-	227,5688	-	0,068007	-	7,726678	-
p-value	-	2,02E-51*	-	7,94E-01	-	0,00544*	-

Tab. 1. Výskyt vývinových štádií endoparazitov vo vzorkách stolice obyvateľov okresu Rožňava. (* $p < 0,05$).

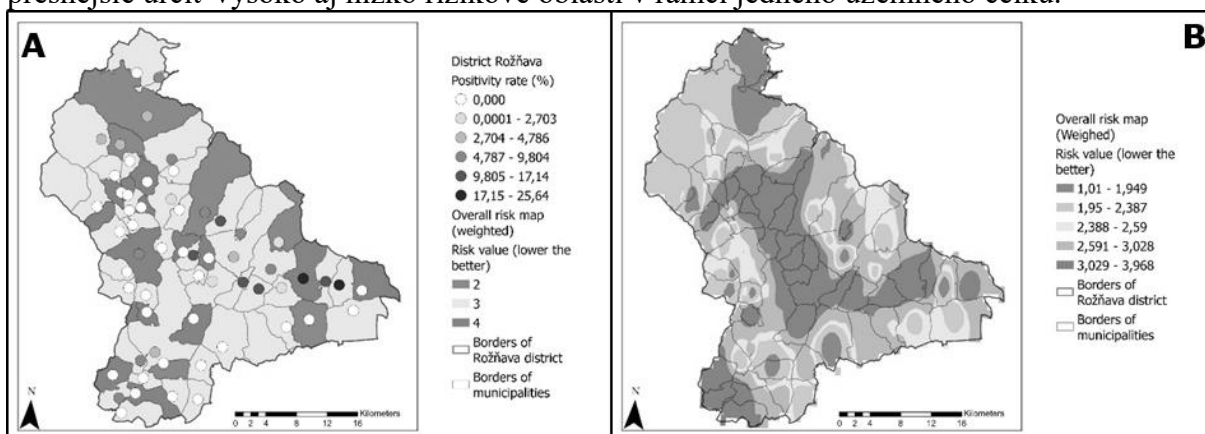
Doterajšie výskumy zaoberajúce sa ČE na Slovensku sa zameriavali najmä na poukázanie zvýšeného výskytu ČE v určitých skupinách obyvateľstva (Pipiková a kol., 2017; Papajová a kol., 2021). Len minimum výskumov sa venuje tomu, čo spôsobuje zvýšený výskyt ČE. V predloženej práci sa venovala pozornosť aj tejto problematike. Z 10 nami vybraných faktorov prekročili práve hustota ľudí, hustota Rómov, využitie vodovodu v obciach, využitie kanalizácie v obciach či osadách a vzdelanostná úroveň úroveň 8% hranice, a preto boli dôležité a mali určitý vplyv na výskyt ČE u ľudí v okrese Rožňava (Graf 1). Podobne aj Ihnacik a kol. (2022) stanovili hustotu rómskeho obyvateľstva a faktory súvisiace s vodou a hygienou za dôležité pri šírení sa ČE u ľudí, zvierat a v pôde vo vybraných lokalitách východného Slovenska.



Graf 1. Percentuálny podiel korelačného koeficientu. Váhy jednotlivých faktorov. Červená čiara znázorňuje hranicu 8%.

Pred tvorbou výsledných rizikových máp bola každému faktoru priradená váha/dôležitosť a následne boli reklasifikované hodnoty faktorov spojené v ArcGIS pro. Z Obr. 1A vyplýva, že v okrese Rožňava prevažuje stredný stupeň rizika šírenia sa ČE u ľudí. Najvyššie riziko šírenia sa ČE je podľa získaných údajov koncentrované v západnej časti okresu. Úrovně rizika

boli priradené celým územným jednotkám bez ohľadu na konkrétnu polohu obcí alebo osád v rámci nich. Osady majú často horšie životné podmienky než dediny a taktiež môžu byť značne vzdialené od hlavnej obce (Ravasz a kol., 2020), čo môže výraznejšie ovplyvňovať dediny mimo územného celku ako tie v rámci toho istého celku. Preto boli získané údaje rozdelené na dediny a osady, pri ktorých sa vybrali také faktory, ktoré bolo možné priradiť k dedinám aj osadám. Išlo o nasledovné faktory: veľkosť populácie (váha 20%), využitie vodovodu a likvidácia odpadových vôd (obe váha 40%). Proces tvorby interpolovaných máp (Obr. 1B) sa riadil rovnakou metodikou ako pri mape na Obr. 1A s tým rozdielom, že sa pracovalo s bodovými údajmi, ktoré boli neskôr interpolované, aby sa vygenerovala súvislá mapa povrchu. Z takto zostavenej mapy vyplýva, že najrizikovejšie oblasti pokrývajú centrálnu časť okresu s výrazne vyšším rizikom v západnom cípe (Obr. 1B). Menšie oblasti so zvýšeným rizikom sú ľahšie rozlíšiteľné od iných oblastí v rôznych regiónoch, čo umožňuje presnejšie určiť vysoko aj nízko rizikové oblasti v rámci jedného územného celku.



Obr. 1. Rizikové mapy prenosu a šírenia ČE v okrese Rožňava

Nielen na Slovensku, ale aj v Európe sa tejto problematike nevenuje dostatočná pozornosť. Získané výsledky však potvrdzujú, že ČE predstavujú aj v súčasnosti závažný problém v modelovej oblasti. Využitím metód rizikového mapovania pri hodnotení šírenia sa ČE nielen u ľudí, ale aj u zvierat a v životnom prostredí sa získajú podrobnejšie informácie o rizikových oblastiach a faktoroch ovplyvňujúcich ich prenos. Takéto zistenia potom môžu poskytnúť cenné informácie na identifikáciu oblastí s najhoršími životnými podmienkami a najvyšším rizikom prenosu ČE, čo umožní prijímať lepšie rozhodnutia a efektívnejšie bojovať proti šíreniu ČE.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ihnacik L, et al. The survey of soil-transmitted helminth species abundance in Slovakia with an emphasis on parameters important for their distribution. *Frontiers in Medicine*. 2022; 9.
- Papajová I, et al. Intestinal parasites in segregated minority communities of Slovakia: results from a cross-sectional survey in children. *Acta Tropica*. 2021; 214.
- Papajová I, Šoltys J. Nematode Infections Spread in Slovakia, an European Temperate Region. *IntechOpen*. 2020.
- Pipiková J, et al. Segregated settlements present an increased risk for the parasite infections spread in Northeastern Slovakia. *Helminthologia*. 2017; 54(3).
- Ravasz Á., Kovács L., Markovič F. Atlas rómskych komunit 2019. Bratislava: VEDA, 2020.

DETEKCIA ZMENY POHYBOVEJ AKTIVITY KRÍVAJÚCICH DOJNÍC POMOCOU AUTOMATIZOVANÉHO MONITOROVACIEHO SYSTÉMU

Ivančová P., Mudroň P.
Klinika prežívavcov, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Detekcia krívania je zvyčajne založená na vizuálnom pozorovaní pohybu kravy. Skoršia detekcia a automatické navrhovanie môže skrátiť čas od začiatku krívania po liečbu, zabrániť vývoju ťažkých prípadov, urýchliť zotavenie, zvýšiť produkciu a zlepšiť welfare zvierat. Cieľom práce bolo vyhodnotiť využiteľnosť systému Heatime v chove dojníc a vyhodnotiť zmeny pohybovej aktivity u krívajúcich dojníc. Údaje boli získavané v ŠPP Zemplínska Teplica v období od novembra 2023 do apríla 2024. Krívanie bolo vyhodnotené pozorovaním počas dojenia a pohybová aktivita jednotlivých krívajúcich dojníc bola získaná z automatizovaného monitorovacieho systému Heatime. Krívajúce dojnice sa vyšetrili vo fixačnej klietke, kde sa určila diagnóza a v prípade potreby vykonala následná terapia. Za dané obdobie bolo vizuálnym pozorovaním zaznamenaných 96 krívajúcich dojníc so stupňom krívania 2 až 4, pričom systém Heatime zaznamenal údaje o pohybovej aktivite u 28 dojníc (29,17%). Výrazné zlepšenie pohybovej aktivity nastalo u 5 dojníc a výrazné rozdiely pohybovej aktivity boli detegované medzi jednotlivými maštalami. Záverom možno konštatovať, že na pohybovú aktivitu dojníc vplývajú rôzne faktory prostredia.

ÚVOD

Krívania v stádach dojníc predstavuje vážny problém, ktorý má zlý vplyv na welfare zvierat, produkciu a ekonomiku fariem. U dojníc sú hlavnou príčinou krívania lézie paznechtov (Garvey, 2022). Krívania u hovädzieho dobytku ovplyvňuje mnoho faktorov, ako sú ustajnenie, podlahy, hygiena, výživa, manažment, veterinárna starostlivosť a úprava paznechtov (Beusker, 2007). Detekcia krívania je rozhodujúca pre riešenie problému, pretože včasná presná detekcia a rýchla liečba môžu zlepšiť zdravie a výsledky produkcie (Gardenier a kol. 2021). Automatizované technológie majú potenciál odhaliť krívanie skôr, ako sa prejaví vizuálne zistiteľné klinické príznaky (Dutton-Regester a kol. 2020). Heatime® je výkonný, ľahko použiteľný PC systém založený na pokročilom monitorovaní stád dojníc. So svojou sofistikovanou možnosťou monitorovania umožňuje celoživotné sledovanie kráv, bohaté údaje, eliminuje dohady a nekonzistentnosti hodnotenia reprodukčného zdravia, výživy, pohody a stavu každej dojnice (Allflex, 2020). Kľúčom systému je schopnosť rádiovkej komunikácie na veľké vzdialenosti s jednou anténou s dosahom niekoľko stoviek metrov. Jednotka transpondéra je umiestnená na krku dojnice. (Dickrell, 2013). Údaje sa vypočítavajú a sumarizujú v 2-hodinových intervaloch (Schirmann a kol. 2009). Pohybová aktivita sa meria na základe akcelerometrov, ktoré každé 2 hodiny bezdrôtovo odosielajú dáta do počítača. Aktivita dojnice sa prevedie do hodnoty indexu, ktorý predstavuje vážený štandard odchýlky od vlastnej bazálnej aktivity. Snímač obsahuje mikrofón, snímač pohybu, mikroprocesor, pamäťovú jednotku a batériu (Strapák a kol. 2020). Systém Heatime je v súčasnosti využívaný hlavne na detekciu ruje, pričom detekcia ruje vychádza z analýzy a hodnotenia pohybovej aktivity a prežívania. Na základe frekvencie pohybovej aktivity a prežívania stanovuje vrchol ruje a najvhodnejší čas inseminácie.

MATERIÁL A METODIKA

Selekcia dojníc sa uskutočňovala počas vizuálneho hodnotenia krívania v čase dojenia v ŠPP Zemplínska Teplica v období od 21.11.2023 do 17.4.2024. Vizuálnym hodnotením sa za dané obdobie identifikovalo 96 krívajúcich dojníc, ktoré boli následne vyšetrené v ortopedickej fixačnej klietke, kde sa určila diagnóza a v prípade potreby vykonala terapia patologických

lézií. V automatizovanom monitorovacom systéme Heatime sa pomocou obojkového čísla vyhľadali dané krívajúce dojnice, pričom systém zaznamenal pohybovú aktivitu len u 28 kráv z 96. Dôvodom nízkeho percenta zaznamenaných dojníc v systéme Heatime oproti manuálnemu vizuálnemu hodnoteniu je nefunkčnosť obojkových štítkov, poprípade iné technické problémy. Tieto dojnice boli ustajnené v 4 rôznych maštaliach (M1-M4), preto uvažujeme o líšiach sa podmienkach (klíma, podstielka a iné). Údaje o pohybovej aktivite boli analyzované v období 7 dní pred detekciou krívania a 7 dní po detekcii a terapii. Výsledky boli spracované štatistickými metódami, t-testom (porovnanie pohybovej aktivity jednotlivých dojníc v 1. a 2. týždni) a metódou ANOVA (porovnanie pohybovej aktivity medzi mašťami v 1. a 2. týždni).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Etiopatogenéza krívania u dojníc je multifaktoriálna. Najčastejšie sú infekčné a neinfekčné faktory spojené s podmienkami ustajnenia. V našej štúdii bolo zaznamenaných 5 prípadov (17,9%) krívania z dôvodu infekčného agensu (*dermatitis digitalis*) a 23 prípadov krívania spojených s neinfekčnými faktormi; z toho bol u 4 dojníc (14,3%) detegovaný Rusterholzov vred a u 19 dojníc (67,8%) boli príčinou krívania iné faktory. Medzi environmentálne predispozičné faktory patrí napríklad zlá hygiena chovu, prostredie vedúce k zraneniu, teplotný stres, mokré podlahy, ročné obdobie, prievan a iné; preto predpokladáme, že krívanie u väčšiny sledovaných dojníc mohlo byť zapríčinené podmienkami v maštaliach. Taneja a kol. 2020 vo svojej štúdii pozorovali dojnice pomocou krokomerov. Ich výsledky naznačujú, že krívanie dokážeme zachytiť 3 dni pred vizuálnym prejavom krívania a vytváranie modelov pre malé skupiny zvierat v stáde, ktoré zdieľajú podobné vlastnosti v rámci stáda, zlepšuje presnosť detekcie krívania na rozdiel od univerzálneho prístupu, čo bolo potvrdené v našej štúdii. V našej štúdii sme sa zamerali na 28 krívajúcich dojníc rozdelených do štyroch rôznych maštali a zistili, že rozdiely medzi jednotlivými mašťami sú výrazné a štatisticky významné ($p \leq 0,05$) v oboch týždňoch (pred aj po vykonanej terapii). Pri t-teste vykonanom medzi jednotlivými mašťami v prvom a druhom týždni sa zistilo, že rozdiely medzi týždňami nie sú štatisticky významné ($p \geq 0,05$) – nenastalo výrazné zlepšenie pohybovej aktivity.

	M1	M2	M3	M4
1	37,764 ($\pm 7,14$)	37,166 ($\pm 4,1$)	37,603 ($\pm 6,44$)	32,978 ($\pm 2,39$)
2	36,499 ($\pm 3,66$)	40,083 ($\pm 8,98$)	36,551 ($\pm 4,52$)	32,104 ($\pm 1,66$)
3	35,291 ($\pm 2,57$)	35,694 ($\pm 2,19$)	36,947 ($\pm 5,36$)	31,749 ($\pm 4,06$)
4	33,229 ($\pm 1,79$)	35,722 ($\pm 3,82$)	37,624 ($\pm 6,09$)	31,770 ($\pm 2,2$)
5	33,979 ($\pm 0,76$)	36,833 ($\pm 5,44$)	37,614 ($\pm 3,99$)	36,604 ($\pm 8,14$)
6	33,978 ($\pm 1,52$)	37,972 ($\pm 4,81$)	35,718 ($\pm 3,79$)	31,999 ($\pm 2,54$)
7	34,52 ($\pm 1,11$)	37,472 ($\pm 4,86$)	37,499 ($\pm 4,68$)	32,416 ($\pm 5,56$)
ANOVA test	$p \leq 0,05$			

Tab.2. Priemerná pohybová aktivita krívajúcich dojníc v jednotlivých maštaliach (M1-M4) po dobu 7 dní (1-7) pred detekciou krívania, so smerodajnou odchýlkou uvedenou v zátvorkách

	M1	M2	M3	M4
1	34,312 (± 2,78)	36,472 (± 3,03)	36,947 (± 3,59)	31,323 (± 3,66)
2	36,999 (± 2,24)	39,221 (± 4,75)	37,406 (± 4,57)	35,297 (± 3,90)
3	33,853 (± 1,17)	35,999 (± 3,24)	36,843 (± 3,33)	36,020 (± 3,99)
4	42,249 (± 11,07)	38,444 (± 3,99)	36,083 (± 3,76)	34,520 (± 6,13)
5	43,291 (± 14,21)	39,721 (± 5,67)	36,374 (± 4,71)	31,249 (± 2,46)
6	34,520 (± 0,52)	40,111 (± 4,03)	36,478 (± 4,69)	30,937 (± 4,23)
7	34,624 (± 1,17)	39,610 (± 3,81)	35,926 (± 4,43)	33,145 (± 3,81)
ANOVA test	$p \leq 0,05$			

Tab. 3. Priemerná pohybová aktivita krívajúcich dojníc v jednotlivých maštaliach (M1-M4) po dobu 7 dní (1-7) po detekcii krívania a ošetrení, so smerodajnou odchýlkou uvedenou v zátvorkách

Signifikantná zmena ($p \leq 0,05$) pohybovej aktivity zaznamenávanej systémom Heatime medzi dvoma pozorovanými týždňami (1. týždeň pred terapiou a 2. týždeň po terapii) bola prítomná u 5 kráv (17,9%). Pohybová aktivita sa počas prvého týždňa po ošetrení patológií výrazne nezvýšila, čo môže byť spôsobené tým, že pri vizuálnej detekcii pred ošetrením bolo u všetkých dojníc (28 kráv) zaznamenané iba mierne krívanie (2. stupeň). Neururerová a kol. 2020 vo svojej štúdií vykonanej pomocou systému Heatime potvrdili, že dojnice postihnuté chorobami paznechtov vykazovali menšiu pohybovú aktivitu počas dní pred terapiou, ako aj po vykonaní terapie. Výraznejšie rozdiely v pohybovej aktivite pred a po ošetrení by sme mohli očakávať v prípade vyššieho stupňa krívania (4 - 5 stupeň).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Garvey, M. Lameness in Dairy Cow Herds: Disease Aetiology, Prevention and Management. Dairy . 2022; 3:199-210
- Beusker, N. Lameness in Cattle – A Literature Review [online]. 2007, Dostupné na internete: <<https://d-nb.info/98788509X/34>>
- Gardenier, J. a kol, Pairwise comparison locomotion scoring for dairy cattle, Journal of Dairy Science. 2021; 104(5): 6185-6193
- Dutton-Regester, KJ. Et al. Lameness in dairy cows: farmer perceptions and automated detection technology. Journal of Dairy Research. 2020; 87(S1):67-71
- Allflex. Allflex Livestock Intelligence Heatime® Pro+, 2020. Dostupné na internete: <https://www.allflex.global/de/wp-content/uploads/sites/2/2021/05/HT-Pro_8_A4_Eng_March-2020_low.pdf>
- Dickrell, J. SCR Expands Its Heatime Systems to Real Time, 2013, Dostupné na internete: <<https://www.dairyherd.com/news/scr-expands-its-heatime-systems-real-time>>
- Schirmann, K. a kol. *Technical note*: Validation of a system for monitoring rumination in dairy cows, 2009, Dostupné na internete: <[https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(09\)71322-0/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(09)71322-0/fulltext)>
- Strapák, P. a kol. Influence of estrus on changes of locomotion activity and rumination time in cattle dams, 2020, Dostupné na internete: <https://afz.fapz.uniag.sk/legacy/journal/index.php/on_line/article/download/871/871-4439-1-PB.pdf>

PRVÉ POTVRDENIE VTÁČÍCH HEMOSPORÍDIÍ V PAKOMÁRIKOV (*CULICOIDES*) NA SLOVENSKU

Janošková N.¹, Schreiberová A.¹, Korytár L.¹, Minichová L.², Bernotienė R.³,
Valavičiūtė-Pocienė K.³, Kazak M.³, Kočišová A.¹

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

² Virologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

³ Nature Research Centre, Vilnius, Litva

ABSTRAKT

Pakomáriky (Diptera: Ceratopogonidae: *Culicoides*) sú významnými vektormi vtáčích parazitov rodu *Haemoproteus*. Cieľom tejto štúdie bolo zistiť druhy pakomárikov, ktoré sa ako potenciálne vektory môžu podieľať pri prenose týchto patogénov v Ornitologickom Stacionári Drienovec. V roku 2022 sme celkovo odchytili 2 286 pakomárikov 18-tich druhov. Z celkového počtu 161 vyšetrených samičiek sme pomocou PCR detegovali *Haemoproteus* sp. v 4 jedincoch *Culicoides* spp., *Culicoides alazanicus* a v dvoch samičkách *Culicoides kibunensis*. V jednej samičke s čerstvou krvou v brušku sme potvrdili prítomnosť *Plasmodium matutinum* a v jednej samičke s natrávenou krvou *Plasmodium* sp. Z 18 vyšetrených poolových vzoriek sme potvrdili *Haemoproteus* sp. v piatich vzorkách *Culicoides segnis*, z toho v dvoch vzorkách *C. segnis* sme zaznamenali koinfekciu dvoch patogénov *Haemoproteus minutus* a *Haemoproteus asymmetricus*.

ÚVOD

Čeľad Ceratopogonidae zahŕňa viac ako 6 270 druhov z toho až 1 368 druhov patrí do rodu *Culicoides* (Borkent a Dominiak 2020). Na Slovensku bolo doposiaľ popísaných 65 druhov (Sarvašová a kol. 2017), ktoré sú považované za kompetentných vektorov pre mnohé druhy vírusov, baktérií a parazitov. Zohrávajú významnú úlohu hlavne pri prenose vtáčích krvných protozoí (*Haemoproteus*, *Leucocytozoon*, *Plasmodium* a *Trypanosoma*), ktoré vyvolávajú ochorenia u domácich a voľne žijúcich vtákov (Valkiūnas a kol. 2005; Svobodová a kol. 2017; Ortiz-Catedral a kol. 2019). Doposiaľ sa len u 15 druhov *Culicoides* spp., potvrdila prítomnosť *Haemoproteus* sp. a iba u 5 druhov sa detegovali sporozoity v slinných žľazách, čo potvrdzuje ich úplnú vektorovú kompetenciu (*C. kibunensis*, *C. pictipennis*, *C. segnis*, *C. punctatus* a *C. reconditus*) (Žiegytė a kol. 2021, 2022; Chagas a kol. 2024). Cieľom tejto práce bolo zistiť prítomnosť DNA hemosporidií molekulárnymi metódami PCR v odchytených druhoch pakomárikov v Ornitologickom stacionári Drienovec na Slovensku.

MATERIÁL A METODIKA

Entomologický výskum sme robili v Ornitologickom stacionári Drienovec, ktorý sa nachádza v Drienovskej mokradi (48°36'27" s. š., 20°57'07" v. d.) na juhovýchode Slovenska (Mtierová a kol. 2020) počas sezóny v roku 2022. Zber pakomárikov sme realizovali na dvoch miestach v blízkosti vodného zdroja (jazierko a lužný les). S odchytom pakomárikov sme začali 4. júna, posledný odchyt sme robili 30. júla. Použili sme UV svetelné lapače CDC Miniature Trap 1212 (John Hook Company), ktoré sme inštalovali do výšky 1,5 až 2 metre nad zemou. Lapače sa spúšťali približne hodinu pred západom slnka a zbierali nasledujúci deň na svitaní. Odchytený hmyz sme pomocou lupy Zeiss-Stemi DV-4 triedili a určovali na základe špecifických morfológických znakov podľa rýchleho diagnostického kľúča (Mathieu a kol. 2012). Na základe fyziologického stavu sme samičky pakomárikov rozdelili do štyroch skupín: *nulliparous*, *parous*, *engorged* a *gravid* (Dyce a kol. 1969). Hlavy a krídla samičiek sme odstránili a urobili z nich trvalé preparáty (Mathieu a kol. 2012), zvyšné časti tiel sme použili na izoláciu DNA. Celková DNA bola izolovaná z hrudníka a bruška samičiek *Culicoides* spp. s čerstvo nacicanou (*engorged*) a natrávenou (*parous*) krvou. Na Slovensku sme extrakciu DNA robili pomocou súpravy DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN,

Nemecko) podľa pokynov výrobcu. V Litve v *Nature Research Centrum* sme extrakciu DNA vykonali amoniakovou metódou s použitím poolových vzoriek (5ks pakomárikov na 1 pool). Molekulárnu analýzu krvných vtáčích parazitov sme urobili pomocou nested PCR s použitím dvoch sád primerov a následným sekvenovaním pozitívnych vzoriek. Získané sekvencie boli porovnávané v databáze NCBI v programe BLAST.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas letnej sezóny v roku 2022 v Ornitologickom stacionári Drienovec sme celkovo odchytili 2 286 kusov pakomárikov a morfológicky aj molekulárne zatriedili do 18 druhov. Na prítomnosť hemosporidií sme vyšetrili 46 nacicáných samičiek a 115 samičiek s čiastočne natrávenou krvou patriacich do 11 druhov.

DNA parazitov *Haemoproteus* sp. bola prítomná v 3 samičkách *Culicoides* (*Culicoides* spp., *C. alazanicus* a *C. kibunensis*). V jednej *engorged* samičke sme potvrdili prítomnosť *Plasmodium matutinum* a v *C. kibunensis* sme súčasne potvrdili koinfekciu 3 druhov patogénov *Parahaemoproteus* sp., *Plasmodium* sp. a *Haemoproteus* sp. (Tabuľka č. 1).

Číslo vzorky	Druh pakomárika	Fyziologický stav pakomárika	Patogén
č. 46	<i>Culicoides</i> spp.	<i>Engorged</i>	<i>Plasmodium matutinum</i> AH0792
č. 64	<i>C. alazanicus</i>	<i>Engorged</i>	<i>Haemoproteus</i> sp. TUPHI01
č. 132	<i>C. kibunensis</i>	<i>Parous</i>	<i>Parahaemoproteus</i> sp. <i>Plasmodium</i> sp. <i>Haemoproteus</i> sp.
č. 192	<i>C. kibunensis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus minutus</i>

Tab. č. 1. Prehľad vyšetrených *Culicoides* spp. a identifikovaných patogénov na Slovensku

V Litve v *Nature Research Centrum* sme vyšetrili 18 poolových vzoriek samičiek s čiastočne natrávenou krvou rovnakého druhu. DNA *Haemoproteus* sp. sme potvrdili v troch vzorkách *C. segnis* a v dvoch vzorkách sme potvrdili DNA dva druhy protozoí *Haemoproteus minutus* a *Haemoproteus asymmetricus* (Tabuľka č. 2).

Číslo vzorky	Druh pakomárika	Fyziologický stav pakomárika	Patogén
č. N1	<i>C. segnis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus</i> sp.
č. N2	<i>C. segnis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus</i> sp.
č. N6	<i>C. segnis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus minutus</i> <i>Haemoproteus asymmetricus</i>
č. N7	<i>C. segnis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus</i> sp.
č. N8	<i>C. segnis</i>	<i>Parous</i>	<i>Haemoproteus minutus</i> <i>Haemoproteus asymmetricus</i>

Tab. č. 2. Prehľad vyšetrených *Culicoides* spp. a identifikovaných patogénov v *Nature Research Centrum* v Litve

V Európe sa vyskytuje až 15 druhov *Culicoides*, ktoré dokážu potenciálne prenášať parazity rodu *Haemoproteus*, čo naznačuje, že pakomáriky sa aj prirodzene živia krvou vtákov a to *C. alazanicus*, *C. circumscriptus*, *C. festivipennis*, *C. impunctatus*, *C. kibunensis*, *C. obsoletus*, *C. pictipennis*, *C. punctatus*, *C. segnis*, *C. scoticus*, *C. paolae*, *C. reconditus*, *C. pallidicornis*, *C. punctatus* a *C. pulicaris* (Veiga a kol. 2018; Bernotienė a kol. 2019; Žiegytė a kol. 2021, 2022; Chagas a kol. 2024). Naše výsledky sme porovnávali s dostupnými údajmi z iných krajín. DNA *Haemoproteus asymmetricus* (hTUPHI01) bol potvrdený v Litve v *C. kibunensis* a *C. segnis* (Žiegytė a kol. 2021; Chagas a kol. 2022), čo je zhodné s našimi výsledkami. *Haemoproteus asymmetricus* prvýkrát opísal Valkiūnas a kol. 2021, ktorý parazituje prevažne u drozda spevavého *Turdus philomelos*. DNA *H. minutus* bola doposiaľ

potvrdená v pakomárikoch *C. segnis*, *C. pictipennis* a *C. kibunensis* (Chagas a kol. 2022), čo sme potvrdili aj našimi výsledkami. Prítomnosť DNA *Plasmodium matutinum* (genetická línia AH0792) sme potvrdili v nacicanej samičke *Culicoides* spp.. Tento druh plazmódia bola potvrdený aj v pakomárikoch *C. festivipennis*, *C. impunctatus*, *C. punctatus* a *C. obsoletus* (Chagas a kol. 2022), avšak prirodzeným vektorom tohto parazita sú komáre z čeľade Culicidae, predpokladáme abortívny vývin parazita v nekompetentnom vektorovi (Nourani a kol. 2020).

Ide o prvú štúdiu na Slovensku, v ktorej sme potvrdili DNA vtáčích krvných protozoí v potenciálnych vektoroch odchytených vo voľnej prírode.

POĎAKOVANIE

Autori sú vďační Ornitologickému stacionáru v Drienovci za umožnenie vykonania vedeckého výskumu v danej lokalite.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bernotienė R, et al. Identification of a new vector species of avian haemoproteids, with a description of methodology for the determination of natural vectors of haemosporidian parasites. *Parasit. Vectors*. 2019; 12: 307.
- Borkent A, Dominiak P. Catalog of the Biting Midges of the World (Diptera: Ceratopogonidae). *Zootaxa* 2020; 4787:001–377.
- Dyce AL. The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*, 1969; 8(1):11-15.
- Chagas CRF, et al. High Abundance of *Haemoproteus* Parasites in *Culicoides* (Diptera, Ceratopogonidae), with a Confirmation of *Culicoides reconditus* as a New Vector of These Avian Blood Parasites. *Insects*, 2024; 15(3): 157.
- Chagas, CRF, et al. What can haemosporidian lineages found in *Culicoides* biting midges tell us about their feeding preferences? *Diversity*. 2022; 14(11):957.
- Mathieu B, et al. Development and validation of IIKC: an interactive identification key for *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) females from the Western Palaearctic region. *Parasites & vectors*. 2012; 5: 1-11.
- Mellor PS, Boorman J, Baylis M. *Culicoides* biting midges: their role as arbovirus vectors. *Annual review of entomology*. 2000; 45(1):307-340.
- Mtierová Z, et al. Local population structure and seasonal variability of *Borrelia garinii* genotypes in *Ixodes ricinus* ticks, Slovakia. *International journal of environmental research and public health*, 2020; 17(10):3607.
- Nourani L, Zakeri S, Djadid ND. Dynamics of prevalence and distribution pattern of avian *Plasmodium* species and its vectors in diverse zoogeographical areas-A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 2020; 81:104244.
- Sarvašová A, et al. Description of *Culicoides (Culicoides) bysta* n. sp., a new member of the Pulicaris group (Diptera: Ceratopogonidae) from Slovakia. *Parasit Vectors*. 2017; 10:279.
- Svobodová M, et al. Biting midges (Ceratopogonidae) as vectors of avian trypanosomes. *Parasites & vectors*, 2017; 10:1-9.
- Valkiūnas G, Iezhova TA. Keys to the avian *Haemoproteus* parasites (Haemosporida, Haemoproteidae). *Malaria Journal*, 2022; 21(1):269.
- Valkiūnas G, et al. What distinguishes malaria parasites from other pigmented haemosporidians?. *Trends in parasitology*, 2005; 21(8):357-358.
- Valkiūnas G, et al. Description of *Haemoproteus asymmetricus* n. sp.(Haemoproteidae), with remarks on predictability of the DNA haplotype networks in haemosporidian parasite taxonomy research. *Acta Tropica*, 2021; 218: 105905.
- Veiga J, et al. *Culicoides paolae* and *C. circumscriptus* as potential vectors of avian haemosporidians in an arid ecosystem. *Parasit. Vectors* 2018; 11:524.
- Žiegytė R, Bernotienė R, Palinauskas, V. *Culicoides segnis* and *Culicoides pictipennis* biting midges (Diptera, Ceratopogonidae), new reported vectors of *Haemoproteus* parasites. *Microorganisms*, 2022; 10(5):898.
- Žiegytė R, et al. *Culicoides* biting midges involved in transmission of haemoproteids. *Parasit. Vectors* 2021; 14, 27.

KOMPARATÍVNE HODNOTENIE VEĽKOSTI SRDCOVEJ SILUETY U PSOV POMOCOU RÖNTGENOVÉHO VYŠETRENIA A POČÍTAČOVEJ TOMOGRAFIE

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

Klinika malých zvierat, UVLF, Košice

ABSTRAKT

Hodnotenie veľkosti srdcovej siluety je kľúčové pre diagnostiku srdcových ochorení. S rastúcou dostupnosťou vyšetrení hrudníka pomocou počítačovej tomografie (CT) by objektívna metóda posudzovania veľkosti srdca priniesla výhody pre veterinárnych lekárov. Presnejšia diagnostika by mohla zlepšiť rozhodovanie o liečbe a manažmente pacientov. Cieľom tejto štúdie bolo porovnať stavcové srdcové skóre (VHS) merané pomocou röntgenografie (RTG) a CT. Do štúdie bolo zahrnutých 43 klinicky zdravých psov, u ktorých bolo vykonané RTG vyšetrenie a z toho 25 psov podstúpilo aj CT vyšetrenie. Priemerná hodnota VHS na RTG bola 10,54, pričom priemerné hodnoty pre samcov boli 10,64 a pre samice 10,46. Pri CT bola priemerná hodnota VHS 10,36, pre samcov 10,39 a pre samice 10,34. Korelačná analýza VHS medzi psami ktoré podstúpili CT aj RTG vyšetrenie ukázala veľmi slabú negatívnu koreláciu ($r = -0,039$). Párový t-test neodhalil štatisticky významný rozdiel medzi VHS z RTG a CT pre celkovú skupinu ($p = 0,11$) a pre samice ($p = 0,67$). Štatisticky významný rozdiel sa potvrdil u samcov ($p = 0,034$).

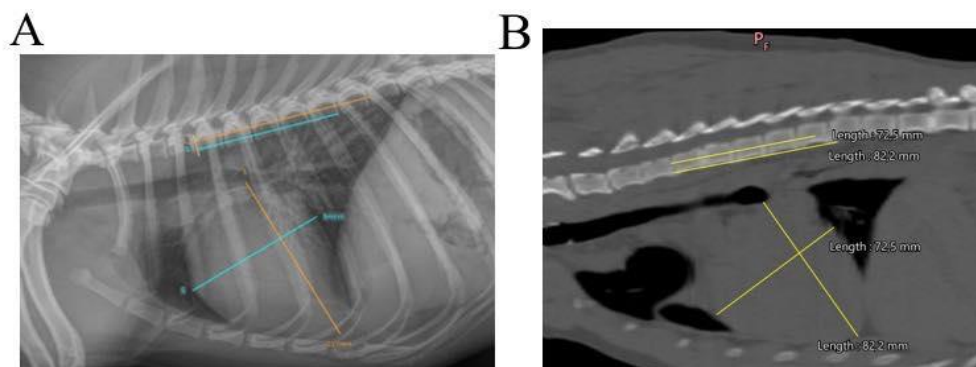
ÚVOD

Rádiografická diagnostika srdcových ochorení u psov je náročná pre veľkú variabilitu veľkosti a tvaru srdcovej siluety, ktorá sa líši v závislosti od plemena, veku a telesnej kondície. Subjektívne hodnotenie môže byť nepresné, najmä u brachycefalických plemien, šteniat a obéznych psov. VHS je objektívna metóda, ktorá prináša štandardizovaný prístup, čo zlepšuje diagnostiku (Lamb a kol., 2000). VHS zaviedli Buchanan a Bucheler v roku 1995 a vypočítajú meraním dlhej osi srdca a krátkej osi na bočnom röntgenovom snímku. Tieto merania sa potom porovnávajú s dĺžkou hrudných stavcov, čím sa získa číselné skóre (Buchanan, Bucheler 1995). Hodnota VHS nad 10,7 je stredne presným ukazovateľom ochorenia srdca (Lamb a kol., 2001) a bola užitočná pri monitorovaní účinkov liečby pri myxomatóznom ochorení mitrálnej chlopne (Woolley a kol., 2007; Kallassy a kol., 2021). VHS je účinná aj pri identifikácii perikardiálneho výpotku (Guglielmini a kol., 2012) a dilatačnej kardiomyopatie (Gugjoo a kol., 2012; Parmar a kol., 2022), hoci výsledky môže ovplyvniť variabilita medzi pozorovateľmi (Hansson a kol., 2005). Štúdie ukázali, že VHS poskytuje výsledky porovnateľné s elektrokardiografickým a echokardiografickým hodnotením veľkosti srdca (Nakayama a kol., 2001). V posledných rokoch sa skúma metóda merania VHS pomocou sagitálnych sekcií na hrudných CT skenoch. Táto technika môže poskytnúť porovnateľné výsledky s röntgenovými snímkami a môže byť použitá bez potreby synchronizácie snímok so srdcovým cyklom (Timperman a kol., 2021).

MATERIÁL A METODIKA

Majitelia podpísali formulár súhlasu, ktorý povoľuje zaradenie psa do štúdie a použitie zozbieraných údajov. Do štúdie boli zapojené psy rovnakého plemena, ktoré boli zdravé – podstúpili klinické vyšetrenie, hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, kardiologické vyšetrenie pomocou elektrokardiografie a echokardiografie skúseným kardiológom. Psy u ktorých sa zistilo akékoľvek ochorenie boli zo štúdie vylúčené. K zaradeniu pacientov do štúdie došlo v období od mája 2023 do augusta 2023. Psy boli na zobrazovanie podrobené celkovej anestézii podľa protokolu stanoveného anesteziológom. Všetky psy boli anestetizované rovnakým postupom, aby sa minimalizoval vplyv sedácie a anestézie na hodnoty VHS. Po indukcii anestézie sa pristúpilo k vykonaniu röntgenového

vyšetrenia pomocou digitálneho rádiografického systému Perform-X F100 (Control-X Medical, Control X Medical Zrt.) Pre každého pacienta boli stanovené vhodné hodnoty mAs a kVp na základe parametrov ktoré boli pred tým stanovené pre rádiografické vyšetrenie. Bolo vykonaných niekoľko snímok hrudnej dutiny. VHS sa prepočítavalo na pravej bočnej snímke metódy definovanej Buchananom a Büchelerom (1995). Niektoré psy podstúpili CT vyšetrenie bezprostredne po röntgenologickom vyšetrení. CT skenovanie bolo vykonané súkromnou firmou, pričom psy boli umiestnené v sternálnej polohe na hrudníku. Snímky boli získané pomocou celkového CT skenu s nasledujúcimi parametrami: 30 mA, 80 kVp, expozičný čas 9 sekúnd, hrúbka rezu 0,8 mm a akvizícia pod konštantným uhlom. Špirálová akvizícia sa tiež vykonala s týmito parametrami: 100 mA, 120 kVp, 42,7-sekundový expozičný čas, hrúbka rezu 0,8 mm, sklon 1,25 a čas rotácie 0,75 sekundy. Manipulácia so snímkami sa vykonávali so softvérom na prezeranie snímok (Weasis). Meranie VHS na CT snímkach hrudníka sa vykonávalo podľa metodiky uvedenej v štúdiu Timperman a kol. (2021), kde VHS merali na CT snímkach rovnako metódy definovanej Buchananom a Büchelerom (1995). Štatistická analýza zahŕňala výpočet priemerných hodnôt VHS z RTG a CT snímok u klinicky zdravých psov a psov rozdelených na samce a samice. Na porovnanie výsledkov RTG a CT sa použila Pearsonova korelačná analýza. Párový t-test bol použitý na porovnanie priemerov VHS z RTG a CT.



Obr. 1. A, Röntgenový snímok hrudník v pravej bočnej polohe a B, jeden sagitálny obraz CT hrudníka toho istého pacienta v sternálnej polohe so stupnicou VHS aplikovanou na oba snímky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

RTG merania VHS ukázali priemernú hodnotu 10,54 u 43 klinicky zdravých psov, u samcov 10,64 (15 psov) a u samíc 10,46 (28 psov). CT merania VHS ukázali hodnotu 10,36 u klinicky zdravých psov (25 psov), 10,39 u samcov (8 psov) a 10,34 u samíc (17 psov). VHS namerané na CT snímkach je menšie ako VHS merané na RTG snímkach. Pri týchto dvoch modalitách existujú rozdiely. RTG snímky pôsobia ako dvojrozmerná reprezentácia trojrozsomernej štruktúry. Pri výbere jedného sagitálneho obrazu na CT nejde o verné zobrazenie celého objemu srdca (Timperman a kol., 2021). Korelačná analýza medzi VHS z RTG a CT ukázala veľmi slabú negatívnu koreláciu s Pearsonovým koeficientom -0,039 pre celkovú skupinu, 0,146 pre samcov a -0,052 pre samice. Párový t-test ukázal, že rozdiel medzi RTG a CT nie je štatisticky významný pre celkovú skupinu ($p = 0,11$) ani pre samice ($p = 0,67$), avšak u samcov bol rozdiel štatisticky významný ($p = 0,034$). Výsledky mohli byť ovplyvnené rozdielnou polohou psa pri RTG a CT snímkach, ako aj neštandardizovaným rezom pre meranie VHS na CT. Tieto faktory potvrdzuje aj štúdia Timperman a kol. (2021). Aj keď je CT moderným zobrazovacím spôsobom, je dôležité zvážiť, či je vhodný na všetky typy diagnostiky.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Buchanan JW, Bücheler J. Vertebral scale system to measure canine heart size in radiographs. *J Am Vet Med Assoc.* 1995; 206.2:194-199.
- Guglielmini C. et al. Accuracy of radiographic vertebral heart score and sphericity index in the detection of pericardial effusion in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2012; 241.8:1048-1055.
- Hansson K. et al. Reader performance in radiographic diagnosis of signs of mitral regurgitation in cavalier King Charles spaniels. *J Small Anim Pract.* 2009; 50:44-53.
- Kallassy A. et al. Vertebral heart scale for the brittany spaniel: Breed-specific range and its correlation with heart disease assessed by clinical and echocardiographic findings. *Vet sci.* 2021; 8.12:300.
- Lamb C. R. et al. Assessment of the value of the vertebral heart scale in the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *Vet Rec.* 2000; 146.24:687-690.
- Lamb C. R. et al. Use of breed-specific ranges for the vertebral heart scale as an aid to the radiographic diagnosis of cardiac disease in dogs. *Vet Rec.* 2001; 148.23:707-711.
- Nakayama H. et al., Correlation of cardiac enlargement as assessed by vertebral heart size and echocardiographic and electrocardiographic findings in dogs with evolving cardiomegaly due to rapid ventricular pacing. *J vet intern med.* 2001; 15.3:217-221.
- Parmar SM. et al. Diagnostic Use of Vertebral Heart Score for Dilated Cardiomyopathy in Dogs. *Indian J Vet Sci Biotechnol.* 2022; 18.2:126-128.
- Timperman L. et al. The vertebral heart scale on CT is correlated to radiographs in dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 202; 62.5:519-524.
- Woolley R. et al. Effects of Treatment Type on Vertebral Heart Size in Dogs With Myxomatous Mitral Valve Disease. *Morb Mortal.* 2007; 6:11.

OVPLYVNIA KLIMATICKÉ ZMENY DRUHOVÚ SKLADBU MACHOVCOV NA SLOVENSKU?

Kaduková M., Schreiberová A., Štrkolcová G.

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

ABSTRAKT

Klimatické zmeny môžu výrazne ovplyvniť frekvenciu výskytu, intenzitu a geografickú distribúciu parazitov. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmanie druhovej skladby machovcov na Slovensku v populácii psov a voľne žijúcich líšok. Naším výskumom sme potvrdili vajíčka parazitov z čeľade Ancylostomatidae v 7,5 % (50/668) prevalencii v skúmanej populácii domácich (628) a útulkových psov (46). Morfometrickým meraním lariev a následnou PCR analýzou sme vo všetkých pozitívnych vzorkách identifikovali druh machovca *Uncinaria stenocephala*. U voľne žijúcich líšok boli vajíčka nájdené u 5 z celkového počtu 6, u 4 z nich bola vykonaná aj parazitologická pitva gastrointestinálnych aparátov, ktorá preukázala prítomnosť dospelých jedincov druhu *U. stenocephala*, potvrdených morfometrickým meraním ako aj metódou PCR. Potvrdenie druhu *U. stenocephala* u líšky predstavuje zároveň aj prvotnú molekulárnu identifikáciu na Slovensku aj v Európe. Výskyt tohto druhu je špecifický práve pre oblasti mierneho pásma, zatiaľ čo výskyt druhov *Ancylostoma* je obmedzený predovšetkým na tropické a subtropické oblasti. V súčasnosti k šíreniu parazitov prispieva najmä globálne otepľovanie, ktoré môžu ovplyvniť rozšírenie parazitov do nových oblastí z ich pôvodnej geografickej lokalizácie, adaptáciu na nových hostiteľov a modifikáciu vývinových cyklov. Klimatické zmeny by tak mohli ovplyvniť výskyt iných druhov machovcov na Slovensku, hlavne druhov rodu *Ancylostoma*, ktoré by mohli predstavovať zdravotné riziko v zvieracej, ale aj v ľudskej populácii.

ÚVOD

Infekcie spôsobené machovcami sú celosvetovo rozšírené v populácii psov, mačiek, voľne žijúcich zvierat a predstavujú riziko pre verejné zdravie. Rody *Ancylostoma* a *Uncinaria* patria do kmeňa Nematelminthes, triedy Nematoda, radu Strongylida a čeľade Ancylostomatidae (Deplazes a kol., 2016). U mäsožravcov sú najviac zastúpené zoonotické druhy *Ancylostoma ceylanicum*, *Ancylostoma caninum* a *Ancylostoma braziliense* s výskytom u psa, líšky a iných Canidae a *Uncinaria stenocephala* s výskytom u psa, mačky, líšky, Canidae a Felidae (Deplazes a kol., 2016; Sykes a kol., 2022).

Uncinaria stenocephala sa zvyčajne prenáša orálne požitím filariformných lariev L3, ktoré sa nachádzajú voľne v pôde alebo môže dôjsť k infekcii aj perkutánne. Machovce infikujúce psy sú príčinou syndrómu *larva migrans cutanea* (CLM) u ľudí. V rámci druhov vyskytujúcich sa u psov len larvy *A. ceylanicum* môžu dokončiť svoj celý vývinový cyklus aj u ľudí, ale zvyčajne bez *larva migrans cutanea* (CLM). Existujú dôkazy o tom, že larvy *A. caninum* sú schopné dokončiť životný cyklus aj u ľudí a spôsobiť eozinofilnú enteritídu na rozdiel od *U. stenocephala*, kde larvy nedosahujú dospelosť (Bowman a kol., 2010; Mackenstedt a kol., 2016).

Výskyt a šírenie machovcov v Európe súvisí aj s extrémnymi prejavmi počasia a sezónnymi zmenami mikro a makroklimy (Okulewicz, 2017). Podľa územnej štúdie Slovenska o zmene klímy sa globálne otepľovanie na našom území môže prejavovať rastom priemerov teploty vzduchu do roku 2075 o 2 až 4 °C (<https://www.shmu.sk/sk/?page=1379>). Garcia-Rodrigo a kol. (2017) poukazujú na to, že globálne otepľovanie a „tropicalization of the European climate“ spojené s vysokými teplotami a vlhkosťou môže podporiť vytvorenie priaznivých podmienok v Európe na šírenie tropických druhov, ako je napríklad *A. caninum* či *A. duodenale* a *A. braziliense*.

MATERIÁL A METODIKA

V období od roku 2023 do júna 2024 sme na Katedre epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia v rámci rutínnej diagnostiky použitím flotačnej metódy vyšetrili 622 vzoriek pochádzajúcich od domácich psov a 46 od útulkových psov. V rámci potvrdenia druhov z čeľade Ancylostomatidae bolo vyšetrených aj 6 vzoriek trusu pochádzajúcich od ulovených, voľne žijúcich líšok. Okrem trusu sme mali k dispozícii aj črevá od 4 líšok, ktoré boli podrobené helmintologickej pitve na potvrdenie prítomnosti jedincov machovcov. Z mikroskopicky pozitívnych vzoriek na prítomnosť vajíčok z tejto čeľade bola vytvorená koprokultúra použitím modifikovanej koprokultivačnej metódy podľa Garcia a Brucknera (Garcia a Bruckner, 2016). Po 7 dňovej inkubácii pri teplote 25 – 28 °C sme larvy rôznych štádií morfológicky identifikovali podľa dostupného kľúča v článku (Gibbs a kol., 1961). Pre presnú identifikáciu druhu boli vzorky trusu s vajíčkami z čeľade Ancylostomatidae a jednotlivými larvami identifikované metódou nested PCR založenej na amplifikácii génu cytochróm c oxidázu podjednotku I (cox1).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Naším výskumom sme z celkového počtu 668 vzoriek flotačnou metódou potvrdili prítomnosť vajíčok z čeľade Ancylostomatidae v 50 vzorkách trusu, čo zodpovedá 7,5 % prevalencii v populácii domácich a útulkových psov. Morfometrickým meraním larválnych štádií L3 boli namerané hodnoty lariev s priemernou dĺžkou v rozmedzí od 0,52 µm do 0,58 µm, čo korešponduje veľkosti lariev L3 druhu *U. stenocephala*. Tretie larválne štádium L3 má podľa Gibbs 1961 veľkosť v rozmedzí 0,50 – 0,58 µm s priemernou dĺžkou 0,53 µm a podľa štúdie Štrkolcová a kol., 2022 je veľkosť 0,55 – 0,58 µm a v priemere 0,57 µm. Pomocou PCR a následného Sangerovho sekvenovania sme v 20 vzorkách identifikovali druh machovca *U. stenocephala*. Z hľadiska všeobecnej geografickej distribúcie *U. stenocephala* bola hlásená najmä v krajinách s miernym podnebím, vrátane USA, severného Mexika, Kanady, Afriky a nedávno bolá hlásená aj z Austrálie (Sykes a kol., 2022). V Spojených štátoch CAPC (The Parasite Prevalence Maps) uvádza 2,9 % prevalenciu machovcov za rok 2021 u viac ako 10 miliónov psov podrobených vyšetreniu trusu za rok (CAPC, 2022; Sykes a kol., 2022). V Európe, najmä v chladnejších oblastiach bola *U. stenocephala* hlásená pomerne často a považuje sa za najrozšírenejšiu ankylostomózu mierneho pásma (Deplazes a kol., 2016; Sykes a kol., 2022). Na Slovensku podľa prieskumu Jarošová a kol., 2021 z rokov 2016 – 2021 bola hlásená prevalencia *U. stenocephala* u psov žijúcich v rôznych životných podmienkach 8,3 %. Štrkolcová a kol., 2022 zaznamenala 14,5 % prevalenciu u psov pochádzajúcich z rómskych osád a 9,6 % prevalenciu z útulkov na Východnom Slovensku.

U líšok sme potvrdili prítomnosť vajíčok z č. Ancylostomatidae metódou flotácie v 5 vzorkách z celkového počtu 6. U 4 z nich sme vykonali pitvu gastrointestinálneho traktu a u jednej z líšok bolo zistených päť dospelých jedincov *U. stenocephala*, ktorých prítomnosť sme potvrdili aj morfometrickým meraním a PCR diagnostikou. V dánskej štúdií Al-Sabi a kol. z roku 2013 sledovali prítomnosť srdcovo - pľúcnych a intestinálnych parazitov u líšok v 2 regiónoch a to v hlavnom meste Kodaň a v Južnom Jutsku. Títo autori už presne druhovo identifikovali, že prevalencia *U. stenocephala* bola potvrdená u 84,3% líšok v Kodani a u 60,4 % líšok v Južnom Jutsku. Identifikácia však bola založená na post mortem analýze (Al-Sabi a kol. 2013). V západnej Austrálii v tom istom roku 2013 vyšetrili 147 vzoriek trusu líšok a *Uncinaria stenocephala* sa vyskytovala v 18,2 % prevalencii (Dybing a kol., 2013). Epidemiologický význam *U. stenocephala* však zostáva do značnej miery nevyriešený vzhľadom na malé množstvo dostupných publikácií. Vzhľadom k tomu sú potrebné ďalšie molekulárne štúdie, ktoré by mohli objasniť možný zoonotický potenciál *U. stenocephala* (Štrkolcová a kol., 2022).

V súčasnosti neexistujú záznamy týkajúce sa výskytu CLM u ľudí spôsobených *U. stenocephala*, ale bolo zaznamenaných niekoľko autochtónnych prípadov CLM spojených s machovcami v Európe. Prvé správy o CLM pochádzajú z Anglicka u 10 – ročného dieťaťa s 3 cm serpiginóznou stopou na priehlavku. Podobný prípad bol zaznamenaný u muža z Francúzska, u ktorého bola pozorované CLM na nohe. Ďalšie 3 správy o CLM pochádzajú z Talianska a v rokoch 2011 – 2019 bolo z Francúzska hlásených 5 autochtónnych prípadov CLM (Patterson a kol., 2003; Galanti a kol., 2002; Del Giudice a kol., 2019). V žiadnom z existujúcich potvrdených prípadov z Európy sa nepotvrdilo, ktorý druh infekciu vyvolal, a to ani morfológicky ani molekulárne, takže vzťah medzi CLM, *U. stenocephala* a inými druhmi rodu *Ancylostoma* si vyžaduje ďalšie expertízy. Tieto pozorovania však môžu zmeniť náš pohľad na nich ako na typické tropické ochorenia s lokalizáciou parazitov výlučne v tropických oblastiach. Tento nárast prípadov CLM v Európe možno pripísať globálnemu otepľovaniu, avšak vzhľadom na nízky počet prípadov hlásených ročne je ťažko nateraz poskytnúť definitívnu odpoveď (Del Giudice a kol., 2019).

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol financovaný z projektu Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, VEGA 1/0709/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Bowmann DD. et al. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larvamigrans. *Trends Parasitol.* 2010; 26(4):162- 167.
- Del giudice P. et al. Autochthonous *cutaneous larva migrans* in France and Europe. *Acta dermat.* 2019; 99(9): 805-808.
- Deplazes P. et al. Parasitology in Veterinary Medicine. The Netherlands. 2016; 650, ISBN 978-90-8686-274-0.
- Galanti B, Fusco FM, Nardiello S. Outbreak of *cutaneous larva migrans* in Naples, southern Italy. *TRSTMH.* 2002; 96(5): 491-492.
- Garcia LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology, 6th edn. 2016, ASM Press, USA
- Garcia-Rodrigo CG, Romero FT, Olivo CZ.. *Cutaneous larva migrans*, welcome to a warmer Europe. *JEADV.* 201731: e33-e35.
- Gibbs HC. Studies on the life cycle and developmental morphology of *Dochmoides stenocephala* (Railliet 1884) (Ancylostomatidae:Nematoda). *Can. J. Zool.* 1961; 39(3):325-348.
- Hawdon JM, Wise KA. *Ancylostoma caninum* and other canine hookworms. *Dog par. Endan. Hum. health.* 2021; 147-193.
- Mackenstedt U, Jenkins D, Romig T. The role of wildlife in the transmission of parasitic zoonoses in peri-urban and urban areas *Int. J. Parasitol.* 2015; 4(1): 71-79.
- Okulewicz A. The impact of global climate change on the spread of parasitic nematodes. *Ann. Parasitol.* 2017; 63(1): 15-20.
- Patterson CRS, Kersey PJW. *Cutaneous larva migrans* acquired in England. *CED.* 2003; 28(6):671-672.
- Sykes JE. *Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat-E-Book.* Elsevier Health Sciences. 2022;
- Štrkolcová G, et al. Occurrence of hookworm and the first molecular and morphometric identification of *Uncinaria stenocephala* in dogs in Central Europe. *Acta Parasit.* 2022; 67(2): 764-772.
- Dybing NA, Fleming PA, Adams PJ. Environmental conditions predict helminth prevalence in red foxes in Western Australia. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2013; 2:165–172. <https://www.shmu.sk/sk/?page=1379>.

FORMATION OF INSULIN AMYLOID AGGREGATION UNDER SPECIFIC EXPERIMENTAL CONDITIONS

Kareem H. A., Bednarikova Z., Gažová Z.
Ústav experimentálnej fyziky SAV, v. v. i., Košice

ABSTRACT

Insulin, a key peptide hormone for regulating blood sugar levels, has a propensity to form amyloid fibrils under certain conditions, complicating its industrial production and therapeutic use. This study investigates the kinetics of insulin fibrillization under different environmental conditions, focusing on how pH, protein concentration, ionic strength, and agitation influence fibril formation, providing deeper insights into the aggregation processes underlying pathological morphologies.

The experimental setup includes 100 mM NaCl-HCl buffer (pH 1.6), elevated temperature (65°C), shaking at 700 rpm, and fluorescence readings at 3 min and 10 min intervals. Insulin concentrations ranged from 10 to 300 μM . Aggregation kinetics and aggregate's properties were assessed using thioflavin T (ThT) fluorescence assay, atomic force microscopy (AFM), and circular dichroism (CD). Results revealed that insulin amyloid formation follows nucleation-dependent fibrillization. It was found that higher insulin concentrations accelerate fibrillization by forming critical nuclei more rapidly, characterized by shorter lag phases. While the secondary structure content of fibrils remained similar across concentrations, increasing insulin concentrations resulted in longer and more numerous fibrils. The 3 min fluorescence reading interval provided more detailed kinetic data compared to the 10 min interval, improving accuracy during the elongation phase. Shaking time significantly influenced both the lag phase and half-time of fibrillization, with the 3 min interval showing longer lag phases and half-times than the 10 min interval. Insulin concentrations exceeding 50 μM consistently produced longer fibrils with high reproducibility, with 75 μM insulin concentration at 3 min shaking being the optimal condition for kinetic studies.

INTRODUCTION

Amyloid fibrils are highly ordered protein aggregates with elongated, non-branching structures and a β -sheet cross- β configuration. They are associated with diseases like Alzheimer's, type II diabetes, and systemic amyloidosis, where protein misfolding and aggregation disrupt cellular functions (Chiti & Dobson, 2017). Despite their structural diversity, amyloid proteins share common fibril properties (Noormägi, 2015). Understanding amyloid formation is challenging due to its complex processes, including nucleation, elongation, fragmentation, and secondary nucleation, all influenced by environmental factors such as pH, temperature, agitation, and protein concentration (Adamcik & Mezzenga, 2018).

Insulin, a peptide hormone for diabetes management, is prone to aggregation under certain conditions, reducing its bioavailability and effectiveness. This poses challenges at injection sites and in industrial production. Insulin, as a globular protein, aggregates due to factors like acidic pH, high temperature, agitation, hydrophobic surfaces, and changes in ionic strength. These conditions cause partial unfolding of insulin, exposing hydrophobic regions that promote amyloid fibril formation through intermolecular interactions (Ow, 2013; Liu 2017). Elevated temperature and low pH are known to accelerate the kinetics of aggregation, while salts stabilize intermediate states, facilitating fibril formation through enhanced hydrophobic interactions and hydrogen bonding (Chatani & Goto, 2005; Chen, 2013).

The pH of the environment significantly impacts insulin fibrillation. Mildly acidic conditions promote rapid fibrillization through secondary nucleation, while neutral pH with added salt slows the process by inhibiting nucleation (Gaspar, 2020). At low pH, electrostatic repulsion prevents oligomer formation, but salt addition reduces this effect, promoting larger

oligomers. While hydrophobic interactions drive amyloid formation, electrostatic forces and protein charge also influence fibrillation rates.

The exact mechanism of insulin amyloid fibril growth remains unclear. This study explores how pH, protein concentration, ionic strength, and agitation affect insulin fibrillation, offering insights into the underlying aggregation processes.

MATERIALS AND METHODS

Human insulin (lyophilized powder, recombinant, expressed in yeast) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The aggregation kinetics of human insulin were investigated using a 96 half-volume well plate design in a ClarioStar plate reader under controlled conditions. Insulin concentrations ranged from 10 to 300 μM in a 100 mM NaCl-HCl buffer (pH 1.6) at 65 °C with shaking at 700 rpm. The Thioflavin T (ThT) fluorescence assay was employed to monitor fibril formation, with fluorescence readings taken at 3-minute and 10-minute intervals to capture aggregation kinetics. Due to insufficient data points at the 10-minute interval, experiments were repeated with the 3-minute interval for improved accuracy. Circular dichroism (CD) spectroscopy was used to assess secondary structural changes, specifically the transition from α -helix to β -sheet structures. Atomic force microscopy (AFM) provided detailed images of fibril morphology, revealing fibril length and abundance across different insulin concentrations. This combination of techniques enabled a comprehensive analysis of amyloid fibril formation, ensuring high reproducibility and detailed characterization of fibril morphology.

RESULTS AND DISCUSSION

The kinetics of insulin fibril formation were examined across a concentration range of 10 to 300 μM under two different shaking intervals (3 min and 10 min). The obtained data showed that the formation of insulin amyloid follows a nucleus-dependent fibrillation characterized by a lag phase, polymerization and a steady-state phase.

At lower insulin concentrations, such as 10 μM , the lag time for fibril formation was significantly longer, indicating slower nucleation rates. For instance, at 10 μM , the lag phase was 154 minutes with a 3-minute shaking interval and 139 minutes with a 10-minute interval. In contrast, higher concentrations, such as 300 μM , showed much shorter lag times, with values of 11 minutes (3-minute interval) and 10 minutes (10-minute interval). Similarly, the half-time of fibril formation decreased as insulin concentration increased, with 300 μM showing a half-time of 77 minutes for the 3-minute interval and 54 minutes for the 10-minute interval. These results suggest that higher insulin concentrations promote more rapid nucleation and fibril elongation, which aligns with the classical nucleation theory.

The effect of shaking intervals was also significant in influencing the observed kinetics. The 3-minute interval provided more data points, particularly during the fibril elongation phase, resulting in slightly longer lag and half-times compared to the 10-minute interval. For example, at 10 μM , the lag time was 154 minutes with the 3-minute interval, compared to 139 minutes for the 10-minute interval.

Fibril morphology analysis via atomic force microscopy (AFM) confirmed the impact of insulin concentration on fibril morphology. Higher insulin concentrations (≥ 50 μM) consistently produced longer and more abundant fibrils, although circular dichroism (CD) measurements showed that the secondary structure content, dominated by β -sheets, remained consistent across all concentrations. This suggests that while fibril length and abundance increased with higher insulin concentrations, the overall structure of the fibrils did not significantly change.

Based on these observations, the optimal conditions for studying insulin fibrillization kinetics were determined to be an insulin concentration of 75 μM with a 3-minute shaking interval (Figure 1). These conditions provided the most reproducible results and the highest accuracy in capturing detailed kinetic data, particularly during the crucial elongation phase of fibril formation.

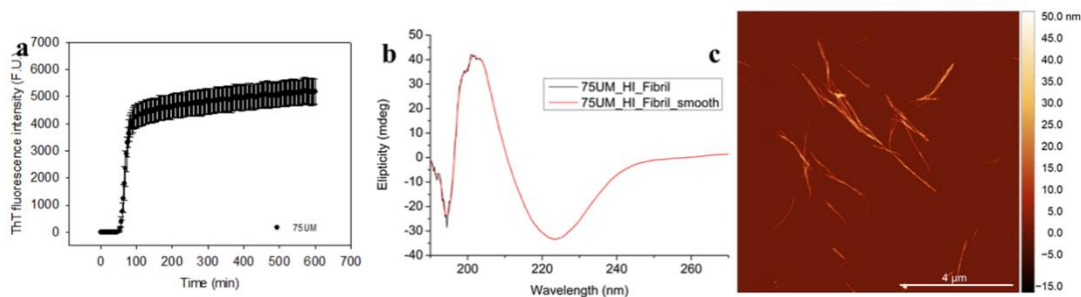


Fig. 1. Amyloid fibrillization of insulin (75 μM) in NaCl buffer with HCl, pH 1.6: (a) kinetics of insulin fibrils formation detected by ThT, (b) CD spectra and (c) AFM image of insulin fibrils after 10 h fibrillization.

The data revealed a strong correlation between insulin concentration and the rate of fibrillization, as well as the influence of shaking intervals on capturing the aggregation process in detail. Higher insulin concentrations accelerate the aggregation process, resulting in shorter lag phases and half-times, and producing longer fibrils. Additionally, a 3-minute shaking interval yields more precise kinetic data, particularly during the elongation phase of fibril growth, compared to a 10-minute interval. The optimal conditions for studying insulin fibrilisation were identified as 75 μM insulin with a 3-minute shaking interval, providing the most reliable and consistent data on fibril formation.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-22-0598; the Science Grant Agency VEGA 2/0176/21 and project from the call Recovery plan R1-00039.

REFERENCES

- Noormägi A, et al. Insulin fibrillization at acidic and physiological pH values is controlled by different molecular mechanisms. *Protein J.* 2015 Dec; 34(6):398-403.
- Chiti F, Dobson, CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: a summary of progress over the last decade. *Annu Rev Biochem.* 2017; 86: 27-68.
- Adamcik J, Mezzenga R. Amyloid polymorphism in the protein folding and aggregation energy landscape. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2018; 57: 8370-8382.

OVPLYVNENIE MIKROBIÓMU A IMUNITY VČIEL MEDONOSNÝCH PO APLIKÁCIÍ HUMÍNOVÝCH LÁTOK

Kollár Moskáľová L.¹, Ratvaj M.¹, Chomová N.¹, Danihlík J.², Mudroňová D.¹

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

²Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc, Česká republika

ABSTRAKT

Cieľom našej práce bolo analyzovať zmeny vybraných imunologicky významných molekúl včiel medonosných po aplikácii prídavku HUMAC® Natur AFM Liquid, ktorý obsahuje humínové látky (HL). Včely boli rozdelené do dvoch skupín, a to na kontrolnú, ktorej bol podávaný cukrový roztok a pokusnú (HL), ktorej bol podávaný cukrový roztok obohatený o prídavok 0,6% HL počas 7 dní. Skúmané boli zmeny relatívnej génovej expresie v čreve pre gény kódujúce antimikrobiálne peptidy (AMP), a to abaecín, apidaecín, hymenoptaecín a defenzín-1, ako aj produkcia vybraných AMP (abaecín, hymenoptaecín, defenzín-1) v hemolymfe pomocou nepriamej ELISA metódy. Pre apidaecín a defenzín-1 sme zaznamenali signifikantné zníženie génovej expresie oproti kontrolnej skupine, čo by mohlo naznačovať schopnosť HL znižovať zastúpenie patogénov z čreve včiel. Pri použití metódy ELISA sme nezaznamenali významné zmeny AMP v hemolymfe včiel, čo by mohlo znamenať pomalšiu odozvu organizmu oproti lokálnemu pôsobeniu HL.

ÚVOD

V Európskej únii je používanie antibiotických látok a ich prípravkov na liečbu alebo prevenciu infekčných ochorení včiel zakázané. Nulová tolerancia reziduí antibiotík vo včelích produktoch, najmä v mede je spojené s vysokými hospodárskymi stratami. Preto sa dnes kladie väčší dôraz na použitie a výskum prírodných látok vo včelárstve (Maruščáková a kol., 2020). HL predstavujú rôznorodú skupinu vysokomolekulových organických materiálov, ktoré sú komplexom zmesi rôznych organických látok, ktorý vznikol v procese premeny zvyškov živých organizmov na organické zlúčeniny (Yang a kol., 2021). HL sú vyhľadávané pre svoje detoxikačné, antioxidantné, antibakteriálne a antivírusové účinky nielen vo veterinárnej, ale aj humánnej medicíne (Mudroňová a kol., 2021).

MATERIÁL A METODIKA

Včely boli držané v laboratórnych podmienkach v nerezových klietkach pri teplote 34 °C. Kontrolná skupina bola kŕmená cukrovým sirupom. Experimentálna skupina bola kŕmená cukrovým sirupom s prídavkom 0,6% HL (HUMAC® Natur AFM Liquid, Humac, SR). Experiment trval 7 dní, pričom včely boli rozdelené do 6 kontrolných a 6 HL skupín.

Testovaný bol vplyv HL na rast probiotických autochtónnych kmeňov *Levilactobacillus brevis* B50 Bioceno1™ (CCM 8618) a *Apilactobacillus kunkeei*. Z kolónií príslušných kmeňov bolo pripravené inokulum v koncentrácii MacFarland 1 (5 ml fyziologického roztoku + bakteriálne kolónie). Inokulum bolo následne naočkované do MRS bujónu (Biolife, Monza) (40 ml MRS bujónu + 0,4 ml inokula) s prídavkom HL (prídavok: 0,4 %, 0,6 %, 0,8 %, 1 %). Kultivácia prebiehala pri stálom trepaní, pri teplote 37 °C, počas 18 h. Po kultivácii boli počty stanovené po desiatkovom riedení štandardnou platňovou metódou na MRS agare (Merck, Darmstadt). Výsledky boli vyhodnocované po 48 hodinovej anaeróbnej kultivácii za použitia vyvíjačov anaeróbného prostredia (AnaeroGen™ 2.5L, Thermo Scientific™).

Analýza AMP podľa ELISA metódy bola spracovaná podľa postupu Botíková, 2022 na Katedre biochémie, Univerzita Palackého v Olomouci. Analýza bola vykonaná zo vzoriek hemolymfy.

Zo vzoriek čriev po odbere bola izolovaná RNA pomocou kitu Omega E-Z Total RNA Kit (Bio-tech), po nej nasledoval prepis izolovanej RNA do cDNA s využitím kitu Quantitect Reverse Transcription Kit. qPCR bola vykonaná s využitím master mix: Luna® Universal.

qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, USA) podľa výrobcom uvedeného protokolu na zariadení Biorad CFX96 (BioRad, USA). Súčasťou každej reakcie bola DNA štandarda a účinnosť reakcie bola $100\% \pm 10\%$. Primery pre reakcie sú uvedené v tabuľke č.1. Relatívna génová expresia bola hodnotená ako $\Delta\Delta Ct$ (\pm sd) pomocou CFX96 Manager softvéru (BioRad, USA), pričom ako referenčné gény boli použité *gapdh*, *rps18* a *rpl13a* (tab. č. 1).

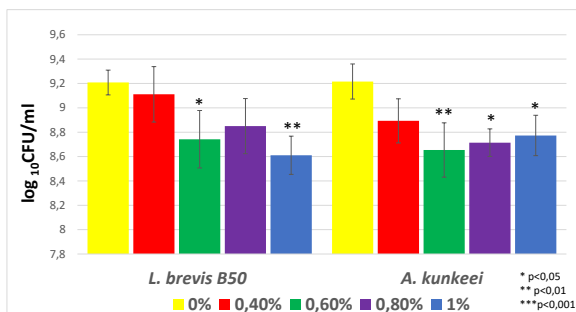
Primer	Forward	Revers	Zdroj:
<i>abaecín</i>	CAGCATTCGCGTATGTACCA	GACCAGGAAACGTTGGAAAC	(Cizelj a kol., 2016)
<i>apidaecín</i>	TTTTGCCTTAGCAATTCTTGTTG	GAAGGTCGAGTAGGCGGATC	(Shi a kol., 2018)
<i>aefenzín - 1</i>	TGTCGGCCTTCTCTTCATGG	TGACCTCCAGCTTTACCCAAA	(Khongphinitbunjong a kol., 2015)
<i>hymenopt.</i>	CTCTTCTGTGCCGTTGCATA	GCGTCTCCTGTCATTCCATT	(Khongphinitbunjong a kol., 2015)
<i>gapdh</i>	GATGCACCCATGTTTGTGTTG	TTTGCAGAAGGTGCATCAAC	(Scharlaken a kol., 2008)
<i>rps18</i>	GATTCCCGATTGGTTTTTGA	CCAATAATGACGCAAACCT	(Scharlaken a kol., 2008)
<i>rpl13a</i>	TGGCCATTTACTTGGTCGTT	GAGCACGGAAATGAAATGGT	(Scharlaken a kol., 2008)

Tab. 1. Primery

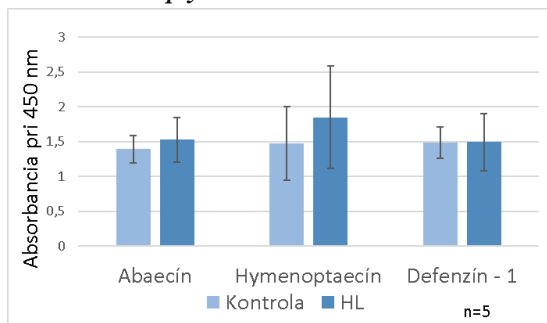
Výsledky boli štatisticky vyhodnocované pomocou nepárového T-testu a one-way (ANOVA) (štatistický softvér GraphPad Prism 8.0). Hodnoty líšiace sa na hladine významnosti $P < 0,05$ boli považované za štatisticky významné (v grafoch označené jednou hviezdikou).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po testovaní rôznych koncentrácií prídavkov HL na rast vybraných prospešných bakteriálnych kmeňov, naše výsledky poukazujú na fakt, že prídavok 0,6% a 1% signifikantne ovplyvnil rast oboch testovaných kmeňov, a to poklesom rastu (obrázok č.1). V prípade *A. kunkeei* sme zaznamenali signifikantný pokles rastu aj pri použití prídavku 0,8%. Môžeme teda konštatovať, že *A. kunkeei* sa javí oproti *L. brevis* B50 BiocenoI™ (CCM 8618) ako



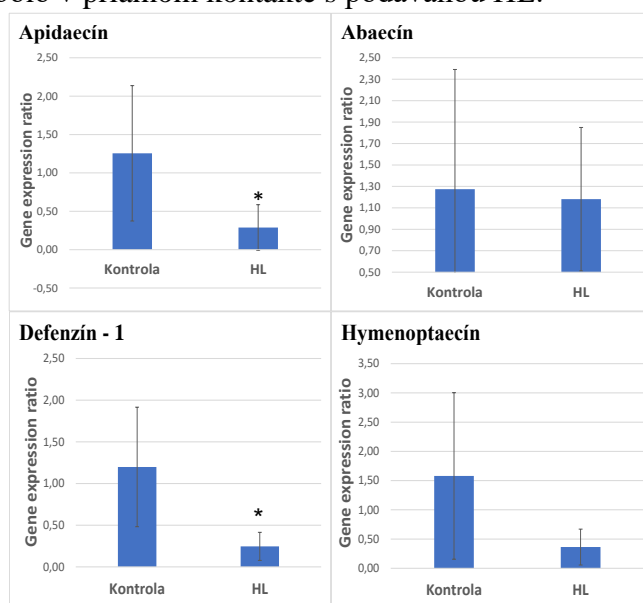
Obr. 1. Vplyv HL na rast laktobacilov



Obr. 2. Absorbancia pre vybrané AMP (ELISA)

pokles v skupine včiel s prídavkom HL (Obr. č. 3). Tento jav mohol nastať najmä v dôsledku potenciálu HL znižovať bakteriálne patogény priamo v čreve včely. Avšak pri použití ELISA (Obr. č. 2) metódy sme nepotvrdili signifikantné zmeny absorbancie týchto AMP v hemolymfe

včiel, čo by mohlo naznačovať, že zvyšný organizmus reaguje pomalšie na zmeny ako samotné črevo, ktoré bolo v priamom kontakte s podávanou HL.



Obr. 3. Zmena génovej expresie pre vybrané gény AMP

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla v rámci riešenia projektu VEGA 1/0454/22

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Botíková, P. Imunochemická detekce a kvantifikace antimikrobiálních peptidů. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci [online]. 2022.
- Cizelj, I. a kol. Prochloraz and coumaphos induce different gene expression patterns in three developmental stages of the Carniolan honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2016; 128: 68-75.
- Khongphinitbunjong, K. a kol. Differential viral levels and immune gene expression in three stocks of *Apis mellifera* induced by different numbers of *Varroa destructor*. *Journal of Insect Physiology*. 2015; 72: 28-34.
- Maruščáková, I.C. a kol. Effect of Application of Probiotic Pollen Suspension on Immune Response and Gut Microbiota of Honey Bees (*Apis mellifera*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020; 12: 929-936.
- Morfin, N. a kol. Honey Bee (*Apis mellifera*) Immunity. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*. 2021; 37.3: 521-533.
- Mudroňová, D. a kol. Effects of dietary supplementation of humic substances on production parameters, immune status and gut microbiota of laying hens. *Agriculture (Switzerland)*. 2021; 11.8: 744.
- Shi, T. a kol. Effects of field-realistic concentrations of carbendazim on survival and physiology in forager honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Science*. 2018; 18.4: 6.
- Scharlaken, Bieke, a kol. Reference gene selection for insect expression studies using quantitative real-time PCR: The head of the honeybee, *Apis mellifera*, after a bacterial challenge. *Journal of insect Science*, 2008, 8.1: 33.
- Yang, F. a kol. Natural and artificial humic substances to manage minerals, ions, water, and soil microorganisms. *Chemical Society Reviews*. 2021; 50.10: 6221-6239.

THE EFFECT OF ADMINISTRATION OF THYMOL IN THE FORM OF GASTRO-RESISTANT PELLETS ON ITS ABSORPTION FROM THE GASTROINTESTINAL TRACT OF RABBITS

Kristofova R.¹, Zitterl-Eglseer K.², Capucchio M. T.^{3,4}, Ippolito D.³, Gai F.⁴, Franc A.⁵, Placha I.¹

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

²Centre of Animal Nutrition and Welfare, University of Veterinary Medicine Vienna, Austria

³Department of Veterinary Sciences, University of Turin, Italy

⁴National Research Council of Italy-Institute of Sciences of Food Production, Italy

⁵Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ABSTRACT

Thymol, as the natural monoterpene phenol, predominantly found in *Thymus vulgaris* L., possesses a wide range of biological activities. Still, no information is available about its metabolic processes in animal organisms. There are some barriers that compounds must pass through during their metabolic path in the organism, which limit their absorption. To ensure the stability of thymol, enhance its bioactivity and modulate its release in the target site of the small intestine, pellets containing thymol were coated with enterosolvent, gastro-resistant film which was prepared with respect to biological and physiological features of the rabbit's gastrointestinal tract (GIT). Pellets were mixed with the basal diet while thymol was present only in the experimental group with a thymol concentration of 250 mg/kg. The rabbits were fed with gastro-resistant form of thymol for 21 days and then withdrawn for 7 days. During thymol administration, the concentration of thymol in all parts of the digestive tract was relatively balanced and significant decrease in plasma was not observed. After withdrawal period significantly lower concentrations in the cecum than in the duodenum showed that thymol was incorporated into caecotrophes and subsequently again ingested and released in small intestine. Histomorphometric analyses showed a tendency to positively influence the villus height to crypt depth ratio. Our results showed that thymol application in stabilised form ensured its more intensive absorption rate in gastrointestinal tract.

INTRODUCTION

The disadvantages of using antibiotics as feed additives for animals have gradually become apparent. Consequently, plant secondary metabolites have received extensive attention as safer and more sustainable options. Thymol as the main compound of *T. vulgaris* has wide-spectrum positive properties and has the potential to replace antibiotics as growth promoters in various animals. However, there are few reports on the effects of thymol on in the rabbit organism (Placha et al. 2022). Given that thymol is a natural lipophilic and to reduce its undesirable absorption in the stomach and modulate its release from feed in the target site of the small intestine, it is essential to explore effective stabilization methods. Developing a gastro-resistant solid self-emulsifying system presents a valuable technology to enhance thymol's penetration into the intestinal mucosa, ensuring its targeted delivery in the small intestine with the highest absorption and increasing its potential therapeutic efficacy. This method has proven to be an effective approach for stabilizing thymol (Macku et al. 2022).

MATERIAL AND METHODS

After weaning at 35 days of age, 24 rabbits of both sexes were randomly divided into a control group fed a basal diet (BD) and an experimental group fed a BD into which coated self-emulsifying pellets of thymol with concentration 250 mg/kg was incorporated for 21 days and then was withdrawn for 7 days. Six rabbits after 21 days (56 days of age) and 28 days (63 days of age) were sacrificed and blood, intestinal wall and faeces were sampled. Samples for thymol analyses were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until

analysis. Detection of thymol in plasma samples, gut content, intestinal wall and faeces was performed using headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography coupled with the mass spectrometry method as described Bacova et al. (2020) and Placha et al. (2019). For histological evaluation intestinal samples of the duodenum and jejunum were excised and flushed with 0.9% saline to remove all the content. The procedures for measuring morphometric indices, including villus height, crypt depth, and their ratio, were conducted as described by Dabbou et al. (2018). Data collected were analysed using the Kolmogorov-Smirnov test for normal and non-normal distribution. The Kruskal-Wallis test with post hoc Dunn's Multiple Comparison test was used to determine the differences between thymol concentration in plasma, intestinal wall and content, and faeces. Thymol effect on morphometric indices was evaluated by 2 way analysis of variance (ANOVA). Results are presented as mean value \pm standard error of mean (SEM). Differences were considered significant at $p < 0.05$. Correlations of thymol concentrations between plasma and intestinal wall, caecal content and faeces were analysed using nonparametric Spearman's Rank Correlation and expressed as Spearman's correlation coefficient (r_s). Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism version 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

In comparison with plasma during thymol administration, its concentrations in all parts of the digestive tract were relatively balanced, only after withdrawn period were significantly higher in comparison with plasma (duodenal wall, $DW=752.7\pm 208.3$ ng/g dry matter (DM), jejunal wall $JW=541.1\pm 168.3$ ng/g DM; colon 572.8 ± 219.5 ng/g DM; caecum 472.3 ± 104.5 ng/g DM, vs plasma 220.2 ± 66.58 ng/ml; $P<0.05$). The correlation between the DW and plasma during both period indicated thymol effective absorption from GIT ($r_s=0.9429$, $P<0.05$). When we compared thymol concentrations in different parts of the intestinal tract with its level in faeces, thymol amount was significantly lower except duodenal wall. A significant negative correlation between cecum and faeces ($r_s= - 0.8857$, $P<0.05$) during thymol addition indicates that the less thymol incorporated into caecotropes, the more is excreted in faeces.

DISCUSSION

We observed intense absorption of thymol from GIT, comparable to the findings of Bacova et al. (2021), where powdered thymol was administered. There are also notable differences in the comparison of these studies' results. In contrast to their findings, which describe significant differences between the concentration in the duodenal wall and the contents of the colon and cecum, we observed a relative balance throughout the entire intestinal tract. We attribute this balance to the stability of the pellets, which ensured gradual release in the small intestine, leading to higher concentrations in the duodenal wall. Another interesting finding compared to Bacova et al. (2021) is that we detected thymol in plasma and throughout the digestive tract even after a withdrawn period, remaining above the detection limit. We attribute this to the higher concentrations of thymol due to the pellets, which continue to circulate in the body even after the withdrawal period, and to cecotrophy, which ensures that they are continuously re-ingested. Based on the thymol analysis and the results of the statistical evaluation we demonstrated the effectiveness of gastro-resistant pellets during its application into the diet, which ensured the release of thymol at the site of its greatest absorption and prevented its degradation due to adverse conditions in the stomach. The absorption of thymol was effective, as confirmed by our results. This conclusion is supported by a positive correlation between thymol concentrations in plasma and the duodenum. Additionally, during thymol administration, the concentrations measured remained relatively balanced, indicating consistent absorption and release throughout its

intake. Also these results showed that thymol was incorporated into cecotrophes and was subsequently again ingested. Thymol administration also resulted in a reduction in crypt depth within the duodenal intestinal wall. This morphological change may be attributed to thymol's effects on intestinal structure, potentially reflecting its role in optimizing the absorptive surface. In conclusion, our results highlight the efficacy and enhanced absorption of thymol achieved through the application in gastro-resistant pellets.

ACKNOWLEDGMENTS

The current experiment was financed with funds from the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Research, Development and Youth of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences (Vega 2/0009/20 and Vega 2/0005/24) and was supported by the Austrian Federal Ministry for Science, Research and Economics, OeAD, Ernst-Mach Grant Action Austria-Slovakia (MPC-2023-01046) and 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, Black soldier fly defatted meal as a dietary protein source for broiler chickens: Effects on growth performance, blood traits, gut morphology and histological features. In *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2018; 9:9:49.
- Macku J, et al. Rational Design of Self-Emulsifying Pellet Formulation of Thymol: Technology Development Guided by Molecular-Level Structure Characterization and Ex-Vivo Testing. *Pharmaceutics*, 2022; 14:1545.
- Oceľová V, et al. Thymol in the intestinal tract of broiler chickens after sustained administration of thyme essential oil in feed. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2018; 103:204-209.
- Placha I, Bacova K, Plachy L. Current Knowledge on the Bioavailability of Thymol as a Feed Additive in Humans and Animals with a Focus on Rabbit Metabolic Processes. *Animals*, 2022; 12:1131.
- Placha I, et al. Effect of thymol on the broiler chicken antioxidative defence system after sustained dietary thyme oil application. *Br. Poult. Sci.* 2019; 60:589-596.

LINEÁRNY PLAZMID ZO *STREPTOMYCES* SP. P17

Lorková Z., Kisková J., Pristaš P.

Katedra mikrobiológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Mnoho baktérií rodu *Streptomyces* obsahuje vo svojich genómoch lineárne plazmidy nesúce gény rezistencie voči antibiotikám, ťažkým kovom či gény podieľajúce sa na biosyntéze sekundárnych metabolitov. V našej práci sme v genóme pravdepodobne nového druhu *Streptomyces* sp. P17 identifikovali plazmidovú sekvenciu s veľkosťou 116 kb. Bioinformatickými analýzami sme identifikovali prítomnosť viacerých génov charakteristických pre prítomnosť plazmidov (*parB*, *mobA*, *mobC*). Na plazmide bol tiež identifikovaný jeden biosyntetický génový klaster obsahujúci gény zapojené do syntézy pravdepodobne novej zlúčeniny zo skupiny lantipeptidov, čo naznačuje jeho možný biotechnologický potenciál.

ÚVOD

Baktérie rodu *Streptomyces* sú Gram-pozitívne filamentujúce baktérie patriace do kmeňa Actinobacteria, vyskytujúce sa prevažne v pôdnom ekosystéme. Ich genómy sú charakteristické veľkými lineárnymi chromozómami s veľkosťou približne 8 – 12 Mb a obsahom GC párov 67 – 78%. Veľkosť genómu odráža prítomnosť vysokého počtu génov zapojených do produkcie sekundárnych metabolitov s významnými biologickými aktivitami, vrátane antimikrobiálnych, antivírusových a protinádorových účinkov. Streptomycéty tak nachádzajú široké uplatnenie najmä v medicíne, napríklad pri výrobe antibiotík (Law a kol., 2018; Lee a kol., 2020).

Mnohé druhy streptomycét obsahujú okrem lineárneho chromozómu aj extrachromozómalnu - plazmidovú DNA, ktorá môže byť cirkulárna alebo lineárna. Lineárne plazmidy môžu dosahovať veľkosť od 12 kb až do 1,8 Mb (Mingyar a kol., 2018), napríklad plazmid pSLA2-L identifikovaný u *Streptomyces rochei* s veľkosťou 210 kb alebo plazmid SCP1 o veľkosti 356 kb identifikovaný u *Streptomyces coelicolor*. Na týchto plazmidoch boli identifikované viaceré gény asociované s biosyntézou sekundárnych metabolitov či s mechanizmami rezistencie voči antibiotikám a ťažkým kovom (Li a kol., 2022). Charakteristickým znakom lineárnych plazmidov sú oblasti s terminálnymi obrátenými repetíciami (TIR) a špecifické terminálne proteíny naviazané na 5'-koncoch DNA. Replikácia týchto plazmidov prebieha podobným mechanizmom ako replikácia lineárnych chromozómov, pričom začína v počiatočnom mieste replikácie a postupuje smerom k teloméram, ktoré zostávajú jednovláknové na 3'-konci, kde sa následne aktivuje DNA syntéza terminálnymi proteínmi slúžiacimi ako primery, aby nedochádzalo ku skracovaniu genetickej informácie na jej koncoch (Mingyar a kol., 2018). V našej štúdii sme bioinformatickými metódami identifikovali plazmidovú sekvenciu v genóme izolátu *Streptomyces* sp. P17, na ktorej sme predikovali biosyntetický klaster naznačujúci biotechnologický potenciál tohto plazmidu.

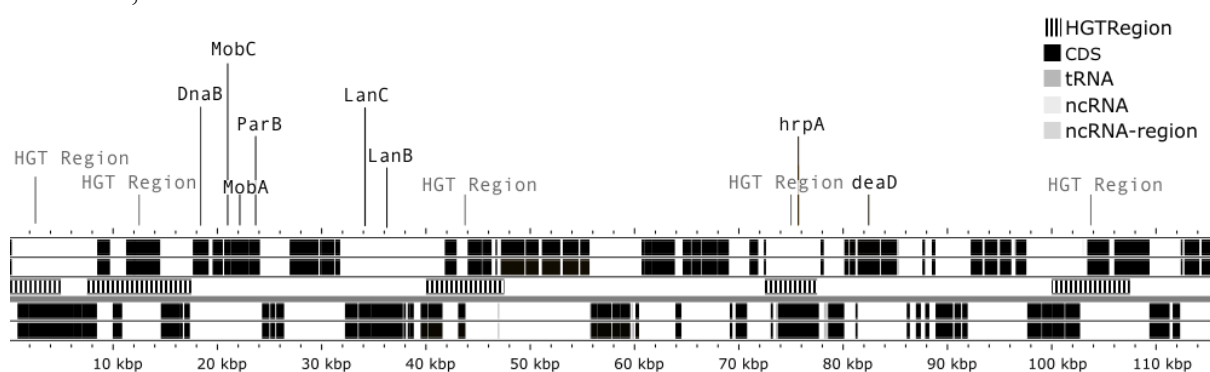
MATERIÁL A METODIKA

Bakteriálny izolát P17 identifikovaný na základe 16S rRNA sekvencie ako *Streptomyces* spp. bol primárne izolovaný z materiálu získaného z banskej haldy v Tarnowskie Góry v Poľsku (50°24'56" N, 18°51'16" E) na Lindenbein selektívnom médiu. Celková DNA izolátu P17 bola izolovaná podľa Pospiech a Neumann (1995). Izolovaná DNA bola podrobená celogenómovému sekvenovaniu firmou Eurofins Genomics Europe Sequencing GmbH (Konstanz, Nemecko) prostredníctvom technológie Illumina NovaSeq 6000 S4 PE150 XP. Anotácia získaných sekvencií bola vykonaná pomocou online dostupných serverov RAST (<https://rast.nmpdr.org>) a Bakta Web (<https://bakta.computational.bio>). Pravdepodobná

plazmidová sekvencia bola porovnaná s verejne dostupnými genómami v GenBank databáze prostredníctvom nástroja BLASTN. Mapa lineárneho plazmidu bola zostavená pomocou programu Proksee (<https://proksee.ca>). Produkcia sekundárnych metabolitov bola predpovedaná pomocou nástrojov antiSMASH 7.0 (<https://antismash.secondarymetabolites.org>).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Porovnanie sekvencie 16S rRNA génu izolátu P17 s GenBank databázou ukázalo najvyššiu podobnosť 98.91% s kmeňom *Streptomyces flavofungini* NBRC 13371 (NR_041125.1). Celogenómovým sekvenovaním izolátu P17 a anotáciou získaných sekvencií bol kontig NODE_22 identifikovaný ako plazmidová sekvencia s veľkosťou 116,112 bp a obsahom GC párov 70.1% (Obr. 1). Napriek tomu, že v databáze GenBank neboli nájdené príbuzné plazmidové sekvencie, prítomnosť typických plazmidových proteínov (napr. replikačný a mobilizačný proteín) v porovnaných genómoch naznačuje, že podobné plazmidy môžu existovať, no zatiaľ neboli izolované.



Obr. 1. Mapa lineárneho plazmidu zo *Streptomyces sp. P17* (HGT Region – oblasť horizontálneho prenosu génov, CDS – kódujúca sekvencia)

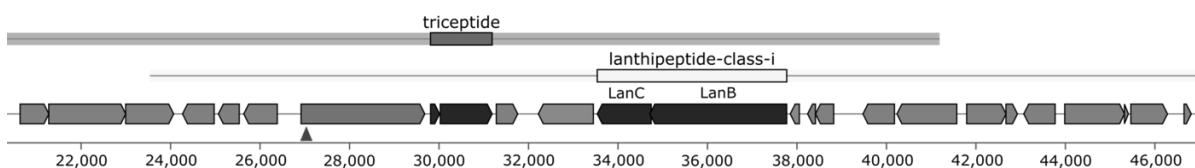
Anotáciou sekvencie plazmidu sme identifikovali gén *parB* podieľajúci sa na replikácii plazmidov. Nukleotidovú sekvenciu proteínu sme pomocou BLAST analýzy našli v 16 genómoch *Streptomyces* spp. Na úrovni aminokyselín sme zaznamenali vyššiu podobnosť ParB proteínu s inými proteínmi v databáze (v 74 kmeňoch *Streptomyces* spp.). Identifikovali sme i gény kódujúce mobilizačné proteíny MobA a MobC, ktoré sú súčasťou relaxozómu podieľajúcom sa na horizontálnom prenose génov. Relaxozóm sa viaže na špecifickú sekvenciu DNA označovanú ako počiatočnú replikácie *oriT*, kde štiepi DNA a vytvára voľný koniec, ktorý môže byť následne prenesený do inej bunky (Zhang a Meyer, 2003).

V blízkosti týchto génov bol identifikovaný gén kódujúci DnaB helikázu podieľajúcu sa na replikácii DNA.

Na koncoch sekvencie sme neidentifikovali prítomnosť charakteristických opakovaní naznačujúcich prítomnosť cirkulárneho plazmidu, avšak taktiež sme nezaznamenali ani typické TIR oblasti lineárnych plazmidov, čo môže byť spôsobené neúplnosťou danej sekvencie.

Na plazmide sme okrem iného identifikovali aj gén pre integrázu, čo naznačuje možnosť plazmidu integrovať sa do chromozómu a tiež toxín-antitoxín systém RelE/ParE, charakteristický pre plazmidy, ktorého hlavnou úlohou je udržiavať a chrániť genetický materiál plazmidu pri replikácii bakteriálnych buniek (Kamruzzaman a kol., 2021). Výsledky bioinformatických analýz na kontigu NODE_22 tak podporujú hypotézu o prítomnosti plazmidu v genóme izolátu P17 s potenciálom pre horizontálny prenos génov, avšak na jeho definitívne potvrdenie sa vyžadujú ďalšie analýzy.

Pomocou programu antiSMASH sme odhalili prítomnosť biosyntetického génového klastra, zodpovedného za produkciu lantipeptidov, pokrývajúci štvrtinu sekvencie plazmidu (Obr. 2). Takéto gény sa väčšinou vyskytujú na chromozómoch, no bolo dokázané, že aj lineárne megaplazmidy sa môžu podieľať na produkcii antibiotík. Na plazmide SCP1 boli identifikované gény zapojené do produkcie methylenomycínu a na plazmide pSLA2-L gény podieľajúce sa na biosyntéze lankacidínu a lankamycínu (Mochizuki a kol., 2003). Na plazmide NODE_22 sme identifikovali dva proteíny súvisiace s biosyntézou lantipeptidov a to „lanthionine synthetase“ a „lantibiotic dehydratase“. Tento klaster nevykazoval homologické sekvencie v MIBiG databáze, čo naznačuje možnosť objavy novej, doteraz nepopísanej zlúčeniny. Vzhľadom na význam streptomycét v produkcii sekundárnych metabolitov môže byť izolát P17 biotechnologicky zaujímavým, avšak pre detailnú charakterizáciu tejto zlúčeniny sú potrebné ďalšie experimenty.



Obr. 2. Biosyntetický génový klaster identifikovaný na plazmide zo *Streptomyces* sp. P17

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaM SR a SAV č. VEGA 1/0779/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Kamruzzaman M, Wu AY, Iredell JR. Biological functions of type II toxin-antitoxin systems in bacteria. *Microorganisms*. 2021; 9:1276.
- Law JWF, et al. Taxonomic and characterization methods of *Streptomyces*: A review. *Prog Microbes Mol Biol*. 2018; 1:a0000009.
- Lee N, et al. Mini review: Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020; 21:1548-1556.
- Li P, et al. Identification and characterisation of a central replication origin of the mega-plasmid pSCATT of *Streptomyces cattleya*. *Microbiol Res* 2022; 257:126975.
- Mingyar E, et al. Unusual features of the linear plasmid pSA3239 from *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Gene*. 2018; 642:313-323.
- Mochizuki S, et al. The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol Microbiol*. 2003; 48:1501-10.
- Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet*. 1995; 11:217-218.
- Zhang S, Meyer R. The relaxosome protein MobC promotes conjugal plasmid mobilization by extending DNA strand separation to the nick site at the origin of transfer. *Mol Microbiol*. 1997; 25:509-16.

SYNERGICKÝ EFEKT KOMBINOVANEJ TERAPIE A JEHO ÚČINKY PRI LIEČBE TRAUMATICKÉHO POŠKODENIA MIECHY

Magurová M., Bačová M., Papcunová Š., Ihnátová L., Lukáčová N., Gálik J.
Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, v.v.i., Košice

ABSTRAKT

Trauma miechy je vážnym problémom, a cieľom našich experimentov bolo skúmať terapie na zlepšenie regenerácie nervového tkaniva. Zamerali sme sa na kombináciu elektrickej stimulácie, rehabilitácie a farmakoterapie. V prvej etape experimentu sme skúmali efekt elektrickej stimulácie v kombinácii s Atorvastatínom, a v druhej etape sme pridali rehabilitáciu. Výsledky ukázali, že elektrická stimulácia v prvej etape podporila zlepšenie motorických funkcií, zatiaľ čo v druhej etape nebol pozorovaný výrazný synergický efekt medzi stimuláciou a rehabilitáciou.

ÚVOD

Traumatické poškodenie miechy (SCI) má závažné následky, vrátane straty senzorických, motorických a autonómnych funkcií a negatívne ovplyvňuje aj duševné zdravie (Eli a kol. 2021). Primárne poškodenie vzniká mechanickým tlakom na miechu a jej okolité štruktúry, zatiaľ čo sekundárne poškodenie je progresívne, a pretrváva týždne až mesiace (Ahuja a kol. 2017, Tanhoffer a kol. 2007). SCI je komplexný súbor udalostí a procesov, a nie je možné ho vyliečiť jedným zásahom. Preto sa pozornosť vedeckej komunity sústreďuje na rôzne terapeutické intervencie na zlepšenie obnovy funkcie neurónov. Je potvrdené, že vo vyvíjajúcej sa centrálnej nervovej sústave existuje prirodzene sa vyskytujúci napät'ový gradient na usmernenie kraniálneho a kaudálneho rastu (Marsh a Beams 1946, Borgens a kol. 1981, Patel a Poo 1982). Pre kompletnú obnovu senzorických aj motorických funkcií (ascendentné a descendentné nervové vlákna) je potrebné, aby poškodené axóny súčasne prerastali kraniálnym a kaudálnym smerom. Na to bol navrhnutý princíp oscilujúceho elektrického poľa, ktorého cieľom bolo podporiť rast axónov cez miesto lézie oboma smermi (McGinnis a Murphy 1992, McCaig 1987, Borgens a kol. 1993). Existuje predpoklad, že účinok elektrickej stimulácie môže byť posilnený rehabilitačným tréningom. Bežecký pás s podporou telesnej hmotnosti sa v klinickej praxi používa už viac ako dve desaťročia. Zistilo sa, že dlhodobá post-traumatická rehabilitácia je účinná v zlepšení motorických funkcií (Mekki a kol. 2018). Ďalšou možnosťou je farmakologická terapia, ktorá zahŕňa neuroprotektívne liečivá s cieľom obmedziť poškodenie neurónov po akútnej SCI, a neuroregeneračnú liečbu, ktorej snahou je podpora regenerácie neurónov. Atorvastatín je liečivo, ktorého účinok bol skúmaný na rôznych ischemicko-reperfúzných a traumatických modeloch SCI. Štúdie preukázali jeho antioxidantnú účinnosť pri znižovaní zápalu, inhibícií apoptózy a demyelinizácie po traume (Pignatelli a kol. 2012, Bimbová a kol. 2018).

MATERIÁL A METODIKA

V prvej fáze experimentu sme použili 32 experimentálnych potkanov (dospelé samice kmeňa Wistar, 250-300g). Chirurgický zákrok bol uskutočnený v celkovej inhalačnej anestézii (isoflurane 2-4% v 1,5-2,0 l/min vzduchu). Na začiatku zákroku boli zvieratám vykonané tri laminektómie. Okrem hlavnej laminektómie, na úrovni 9. hrudníkového stavca (Th9) boli uskutočnené dve parciálne laminektómie pre umiestnenie inertných elektród (Ir/Pt), dva segmenty kraniálne a kaudálne od hlavnej. Prostredníctvom kompresného zariadenia s plastovým impaktorom (hmotnosť 40g po dobu 15 min) bolo zvieratám cez hlavnú laminektómiu navodené traumatické poškodenie miechy. Pre aplikáciu elektrickej stimulácie cez miesto poškodenia bol zvieratám následne subkutánne implantovaný miniatúrny elektrický stimulátor (50 μ A). Pred implantáciou bol stimulátor zaliaty do elektroizolačného

biokompatibilného materiálu (Duosil Express, SHERA). Polarita stimulátora sa menila každých 15 minút, počas doby 6 týždňov (Bačová a kol. 2019). Zvieratá boli náhodne rozdelené do 4 skupín: zvieratá s Th9 kompresiou (SCI) a implantovaným nefunkčným stimulátorom (SCI+nOFS, n=8), zvieratá so SCI a implantovaným funkčným stimulátorom (SCI+OFS, n=8), a dve analogické skupiny, ktorým bola 7 dní po poškodení miechy denne podávaná protizápalová látka Atorvastatín (5 mg/kg, i.p.) (SCI+OFS+ATR, n=8; SCI+nOFS+ATR, n=8). V druhej etape experimentu sme použili 16 experimentálnych potkanov (dospelé samice, kmeň Wistar, 250-300g). Zvieratám bol vykonaný rovnaký chirurgický zákrok ako v prvej etape. Experimentálne zvieratá boli náhodne rozdelené do 4 skupín: zvieratá iba s SCI (SCI, n=4), a tri skupiny zvierat, ktoré po traumatickom poškodení miechy absolvovali rehabilitačný tréning (REH) na bežiacom páse s podporou telesnej hmotnosti a boli buď bez, alebo s implantovaným funkčným alebo nefunkčným stimulátorom (SCI+REH, n=4; SCI+OFS+REH, n=4; SCI+nOFS+REH, n=4). Post-traumatická rehabilitácia prebiehala na bežiacom páse (5 cm/s). S rehabilitáciou sa začalo 7 dní od navodenia kompresie a prebiehala denne až do ukončenia experimentu (20 min/deň, 5x týždenne). Opätovná regenerácia lokomočných funkcií zadných končatín zvierat bola hodnotená pomocou BBB hodnotiacej škály každých 7 (1.etapa) a 5 dní (2.etapa) počas celej periódy prežívania. Pokus bol schválený Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky, č. záznamu 4148/2021-220, dňa 3.5.2021.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe doterajších získaných výsledkov a pozorovaní sme dokázali, že samotná implantácia OF stimulátora nespôsobuje žiadne formy obmedzenia, je to bezpečná metóda, prispievajúca k regenerácii poškodeného tkaniva. Taktiež nebol zaznamenaný zápal ani nekróza tkaniva (Bačová a kol. 2019). BBB test je subjektívnym hodnotením lokomočných funkcií zadných končatín pomocou 21-bodovej hodnotiacej stupnice. Každý bod na stupnici predstavuje určitý stupeň pohybu kĺbov, koordinácie predných a zadných končatín, stability a polohy chvosta (0-žiadny detekovateľný pohyb zadných končatín, 21-pravidelný pohyb zadných končatín) (Basso a kol. 1995, Fehlings a Tator 1995). V prvej etape experimentu, po navodení Th9 kompresie boli experimentálne zvieratá kompletne paraplegické s neurologickým skóre 0. Počas prvých 2 týždňov po SCI nebol medzi experimentálnymi skupinami (SCI+nOFS; SCI+ nOFS+ATR, SCI+OFS, SCI+OFS+ATR) žiadny významný rozdiel. Významné zlepšenie motorických funkcií bolo pozorované medzi 2. a 3. týždňom po SCI v skupinách SCI+OFS a SCI+OFS+ATR v porovnaní so skupinami SCI+nOFS a SCI+nOFS+ATR. V skupine SCI+OFS+ATR bolo zaznamenané zvýšené skóre BBB až do konca obdobia prežívania. Po 6 týždňoch prežívania boli zvieratá s kombinovanou terapiou (SCI+OFS+ATR) schopné robiť pravidelné kroky s prenášaním váhy a častejšie koordinovať pohyby predných a zadných končatín (priemerné skóre BBB: 11,2). V skupine OFS+SCI boli zvieratá schopné pravidelných krokov s prenášaním váhy a zriedkavejšej koordinácie pohybov predných a zadných končatín (priemerné skóre BBB: 10,3). Zvieratá v skupinách SCI+nOFS+ATR a SCI+nOFS boli schopné samostatného státia, kde boli pozorované „zametacie“ pohyby zadných končatín (priemerné skóre BBB: SCI+nOFS+ATR: 9,98; SCI+nOFS: 8,53). V druhej etape experimentu uvádzame doposiaľ získané čiastkové výsledky kombinovanej terapie, ktorá pozostávala z aplikácie elektrickej stimulácie cez miesto poškodenia a post-traumatickej rehabilitácie na bežiacom páse s podporou udržiavania hmotnosti. Pri tomto experimente sme si zvolili hodnotenie BBB skóre každých 5 dní, pretože sme sa zamerali konkrétne na vplyv rehabilitácie pri regenerácii. Opätovne, po navodení SCI boli zvieratá paraplegické so skóre 0. Na rozdiel od prvej fázy, sme zmeny v BBB skóre zaznamenali už po 10 dňoch od SCI. Významné zlepšenie bolo v skupine SCI+REH už po prvom týždni tréningu v porovnaní so skupinami SCI, SCI+OFS+REH a SCI+nOFS+REH.

Zaznamenali sme trend, že skupina SCI+REH (priemerné BBB skóre: 10) mala vyššie hodnoty BBB skóre, v porovnaní s našou sledovanou skupinou SCI+OFS+REH (priemerné BBB skóre: 6,66). Je možné, že rozsiahly chirurgický zásah spojený s implantáciou OF stimulátora ovplyvnil aj následnú post-traumatickú rehabilitáciu, pretože sme zaznamenali nižší progres v regenerácii lokomočných funkcií v oboch skupinách, kde bol zvieratám implantovaný elektrický stimulátor (SCI+nOFS+REH, priemerné BBB skóre: 5,47).

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0098/20, doktograntom 2022-APP0405, grantom APVV-19-0324, návratový grant – Ihnátová

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ahuja CHS, et al. Traumatic spinal cord injury. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 2017; 3: 1-21.
- Bacova M, et al. Epidural oscillating field stimulation as an effective therapeutic approach in combination therapy for spinal cord injury. *J. Neurosci Methods.* 2019; 311: 102-110.
- Basso DM, et al. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma.* 1995; 12: 1-21.
- Bimbova K, et al. A single dose of atorvastatin applied acutely after spinal cord injury suppresses inflammation, apoptosis, and promotes axon outgrowth, which might be essential for favorable functional outcome. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19 (1106): 1-17.
- Borgens RB, et al. Effects of applied electric fields on clinical cases of complete paraplegia in dogs. *J. Restor. Neurol. Neurosci.* 1993; 5: 305-322.
- Borgens RB, et al. Enhanced spinal cord regeneration in lamprey by applied electric fields. *Science.* 1981; 213: 611-617.
- Eli I, et al. Acute Traumatic Spinal Cord Injury. *Neurol Clin.* 2021; 39 (2): 471-488.
- Fehlings MG, et al. The relationships among the severity of spinal cord injury, residual neurological function, axon counts, and counts of retrogradely labeled neurons after experimental spinal cord injury. *Exp. Neurol.* 1995; 132 (2): 220-228.
- Marsh G, et al. In vitro control of growing chick nerve fibres by applied electric currents. *J Cell. Comp. Physiol.* 1946; 27: 139-147.
- McCaig CD, et al. Spinal neurite reabsorption and regrowth in vitro depend on the polarity of an applied electric field. *Development.* 1987; 100 (1): 31-41.
- McGinnis ME, et al. The lack of an effect of applied d.c. electric fields on peripheral nerve regeneration in the guinea pig. *Neuroscience.* 1992; 51 (1): 231-244.
- Mekki, et al. Robotic rehabilitation and spinal cord injury: a narrative review. *Neurotherapeutics.* 2018; 15: 604-617.
- Patel N. et al. Orientation of neurite growth by extracellular electric field. *J. Neurosci.* 1982; 4: 483-496.
- Pignatelli P. et al. Immediate antioxidant and antiplatelet effect of atorvastatin via inhibition of Nox2. *Circulation.* 2012; 126 (1): 92-103.
- Tanhoffer AR, et al. Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats. *J Spinal Cord Med.* 2007; 30: 140-146.

ANALÝZA SATELITNEJ DNA U TROCH DRUHOV HÁČIKOHLAVCOV RODU *ACANTHOCEPHALUS*

Marková A.^{1,2}, Orosová M.¹

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

²Katedra zoológie, UNIBA, Bratislava, Slovensko

ABSTRAKT

V práci sme uskutočnili prvú analýzu satelitnej DNA v genómoch troch zástupcov háčikohlavcov - rodu *Acanthocephalus*. Cieľom bolo charakterizovať, kvantifikovať a identifikovať druhovo špecifické satelitné repetície u *A. anguillae*, *A. lucii* a *A. ranae*, ktoré by mohli slúžiť ako nové cytogenetické markery. Pomocou softvéru RepeatExplorer2 bolo odhalené vysoké množstvo druhovo špecifických repetícií, z ktorých väčšina bola anotovaná ako satelitná DNA. Pomocou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) bolo na chromozómoch úspešne lokalizovaných päť tandemových repetícií u *A. anguillae*, dve u *A. lucii* a šesť u *A. ranae*. Repetície boli zoskupené v klastroch v heterochromatínových oblastiach a intersticiálne. Novo identifikované satelity sa ukázali ako veľmi cenné cytogenetické markery, ktoré umožňujú presnú identifikáciu homologických chromozómových párov.

ÚVOD

Repetitívne sekvencie tvoria významnú časť eukaryotických genómov, pričom dominantnú úlohu zohráva satelitná DNA (satDNA) a transponovateľné elementy (TE). Satelitná DNA je vysoko abundantná repetitívna DNA pozostávajúca z krátkych, násobne sa opakujúcich sekvencií. Zvyčajne sa nachádza v heterochromatínových oblastiach chromozómov, vrátane pericentromerických, subtelomerických a intersticiálnych regiónov, ktoré tvoria kľúčové štruktúry chromozómov ako centroméry a teloméry. Napriek jej spojitosti s týmito kritickými štruktúrami je evolúcia satDNA mimoriadne dynamická a môže sa výrazne líšiť aj medzi blízko príbuznými druhmi. Z tohto dôvodu sú tieto sekvencie často druhovo/rodovo špecifické (Belyayev a kol., 2019).

Háčikohlavce (*Acanthocephala*) predstavujú malú skupinu endoparazitov dobytka, vtákov, a vodných živočíchov. Štúdium charakteru a distribúcie repetitívnych elementov v ich genómoch a na chromozómoch môže byť nápomocné vo fylogenetických štúdiách a pri zostavovaní karyotypu, tzv. pri párovaní homologických chromozómov. V posledných rokoch sa výrazne zvýšil počet štúdií satDNA u rôznych druhov rastlín a živočíchov, predovšetkým vďaka vývoju rýchleho a lacného celo-genómového sekvenovania v kombinácii s bioinformatickými nástrojmi na identifikáciu a charakterizáciu repetitívnych elementov. Jedným z najúspešnejších nástrojov je RepeatExplorer2 (RE) (Novák a kol., 2020), ktorý umožňuje spracovanie sekvenáčnych dát aj s nízkou hĺbkou pokrytia (*low-coverage*), čo z neho robí efektívnu a cenovo dostupnú metódu pre širokú verejnosť. Naša štúdia predstavuje prvú takúto analýzu u troch zástupcov rodu *Acanthocephalus*, *A. anguillae*, *A. lucii* a *A. ranae*. Cieľom bolo identifikovať druhovo a chromozómovo špecifické sekvencie satDNA, ktoré by mohli slúžiť ako nové cytogenetické markery.

MATERIÁL A METODIKA

Jedince *A. anguillae* pochádzali z pleskáčov (*Squalius cephalus*) a *A. lucii* z ostriežov (*Perca fluviatilis*), pričom oba druhy rýb boli odlovené z vodnej nádrže Zemplínska Šírava. Druh *A. ranae* bol získaný zo skokanov (*Pelophylax ridibundus*) z oblasti Veľký Lel. Živé parazity boli najprv inkubované v 0,025 % roztoku kolchicínu, následne vystavené hypotonickému pôsobeniu roztoku 0,075 M KCl, a fixované v zmesi kyseliny octovej a metanolu v pomere 1:3. Chromozómové preparáty boli zhotovené pomocou techniky „horúcej platne“ (Orosová a Špakulová, 2018), odvodnené v alkohole rade (70, 80, 90% etanol, v každom minútu),

vysušené a uskladnené pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do ďalšieho použitia. Optimálna vzorka genómovej DNA (gDNA) z každého druhu, bola sekvenovaná v Novogene (HK) Co, Ltd (Hong Kong, Čína) s nízkou hĺbkou pokrytia. Kvalita sekvenovania bola overená použitím nástroja FastQC a na orezanie sekvencií bol použitý nástroj Trimmomatic. Na náhodnej vzorke 700 000 sekvencií bola spustená komparatívna RE analýza so základnými nastaveniami, a na automatickú anotáciu bola použitá databáza Metazoa verzia 3.0. Na základe RE bolo identifikovaných niekoľko druhovo špecifických satelitných sekvencií, pre ktoré boli v programe Geneious navrhnuté nové primery. Tieto primery sa použili na prípravu fluorescenčných sond pomocou PCR amplifikácie, ktoré boli následne značené biotínom-16-dUTP, alebo digoxigenínom-11-dUTP. Takto pripravené sondy boli mapované na chromozómy pomocou FISH podľa protokolu opísaného v práci Cabral-de-Mello a Marec (2021).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Dostupné údaje o zastúpení repetitívnej DNA v genómoch háčikohlavcov sú veľmi limitované. Existuje len jedna štúdia, ktorá sa okrajovo zaoberá repetitívnym obsahom genómu druhu *Pomphorhynchus laevis* (Mauer a kol., 2020). Táto analýza ukázala, že repetície tvoria významnú časť (63%) genómu parazita, avšak distribúcia týchto sekvencií na chromozómoch študovaná nebola. V našej štúdii komparatívna analýza RE odhalila niekoľko rozdielov medzi študovanými druhmi. Väčšina identifikovaných repetícií bola anotovaná ako satDNA, pričom genóm *A. anguillae* obsahoval najväčšie množstvo satDNA (14% analyzovaných čítaní), nasledovaný druhom *A. lucii* (11%) a najmenej mal druh *A. ranae* (9%). Zvýšený podiel satDNA zistený v našej práci u *A. anguillae* koreluje s výsledkami práce Orosová a kol. (2023), kde analýza pomocou DAPI farbenia odhalila AT-obohatený heterochromatín v centromérach všetkých chromozómov a v pericentromerickej oblasti dlhých ramien chromozómového páru číslo 2. Naopak u druhov *A. lucii* a *A. ranae* boli po DAPI farbení pozorované len veľmi slabé heterochromatínové bloky (Marková a kol., 2024). Jednotlivé druhy sa líšia aj počtom lokusov rDNA na chromozómoch. *Acanthocephalus anguillae* má najväčší počet, konkrétne tri a druhy *A. lucii* a *A. ranae* majú jeden lokus ribozomálnych génov. V našej práci sme najvyšší podiel čítaní anotovaných ako rDNA zaznamenali taktiež u *A. anguillae* (2,15%), u *A. lucii* to bolo len 1,03% a u *A. ranae* 0,92%. Posledný významný medzidruhový rozdiel bol zaznamenaný v prevahe jedného klastru satDNA u *A. anguillae*, ktorý predstavoval až 9 % analyzovaných čítaní. Takáto dominancia pravdepodobne naznačuje nedávny vznik tejto repetície, keďže „starší“ vznik by pravdepodobne viedol ku jej diverzifikácii v dôsledku mutácií, čo by spôsobilo rozdelenie tejto repetície do viacerých klastrov (Shah a kol., 2020). Medzidruhové rozdiely v satDNA naznačujú vysokú diverzitu satelitnej DNA v rode *Acanthocephalus*. Obdobne FISH mapovanie chromozómových markerov (18S a 5S rDNA a gény pre histón H3) odhalilo výrazné rozdiely v ich distribúcií u všetkých doteraz študovaných druhov háčikohlavcov (Bombarová a kol., 2007; Orosová a kol., 2023; Marková a kol., 2024). Je teda evidentné, že evolúcia karyotypu u háčikohlavcov je sprevádzaná častými zmenami v distribúcii cytogenetických markerov, čo indikuje časté chromozómové prestavby. Výrazná diverzita v satDNA u študovaných druhov môže byť jedným z faktorov týchto karyotypových zmien, pretože repetitívna DNA môže slúžiť ako „miesto“ prestavby, ktoré umožňuje chromozómové zmeny bez narušenia integrity kódujúcich sekvencií (Hsu a kol., 1978).

Ďalším cieľom prekladanej práce bola identifikácia najviac abundantných druhovo špecifických satelitných repetícií, ktoré by mohli slúžiť ako nové chromozómové markery. Druhovo špecifická distribúcia môže slúžiť ako výrazná pomoc pri identifikovaní homologických chromozómových párov. Druhy rodu *Acanthocephalus* sú charakteristické veľmi malými chromozómami s podobnou morfológiou, čo značne komplikuje proces ich párovania. Komparatívnou analýzou sme v práci identifikovali vysoké množstvo druhovo

špecifických satDNA repetícií: 29 u *A. anguillae*, 41 u *A. lucii* a 43 u *A. ranae*. Do ďalších analýz sme zahrnuli len tie repetície, ktoré obsahovali minimálne 700 čítaní v klastri, čím sme vyfiltrovali menej významné alebo falošne identifikované repetície. FISH mapovanie bolo úspešné pre päť satelitov u *A. anguillae*, dva u *A. lucii* a šesť u *A. ranae*. U ostatných repetícií buď nebola úspešná ich amplifikácia PCR reakciou, čo naznačuje ich neprítomnosť v genóme, alebo neboli detekované po FISH, pravdepodobne pre malú veľkosť klastrov, pod vizualizačným limitom FISH. Úspešne mapované repetície boli lokalizované v klastroch centro- a pericentromericky, telo- a subtelomericky, alebo interkalárne. Inklúzia týchto nových markerov do procesu karyotypovania sa ukázala ako mimoriadne užitočná pre presnú identifikáciu jednotlivých chromozómových párov. Každý nový marker je špecifický pre konkrétny chromozóm a v kombinácii s už dostupnými markermi (18S rDNA a gén pre histón H3) je možné dosiahnuť presnú identifikáciu chromozómových párov.

Prezentovaná štúdia poskytuje prvý náhľad do satelitných repetícií troch druhov háčikohlavcov. Komparatívnou analýzou repetitívneho obsahu sme nielen stanovili proporciu satDNA u jednotlivých druhov, odhalili medzidruhové rozdiely, ale aj identifikovali vysoké množstvo druhovo špecifických satelitných sekvencií, z ktorých niektoré sa ukázali ako veľmi nápomocné cytogenetické markery. Pre úplné pochopenie štruktúry a funkcie genómov týchto parazitov sú však potrebné ďalšie komplexnejšie štúdie, ktoré budú kľúčové aj pre objasnenie možných scenárov reorganizácie karyotypov v priebehu ich evolúcie.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená Vedeckou Grantovou Agentúrou Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže SR a SAV (VEGA 2/0093/23) a Grantom pre doktorandov SAV (APP0452).

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Belyayev A, et al. Natural history of a satellite DNA family: from the ancestral genome component to species-specific sequences, concerted and non-concerted evolution. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20:1201
- Bombarová M, et al. Divergent location of ribosomal genes in chromosomes of fish thorny-headed worms, *Pomphorhynchus laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* (Acanthocephala). *Genetica.* 2007; 131:141–149
- Cabral-de-Mello DC, Marec F. Universal fluorescence in situ hybridisation (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Mol Genet Genomics.* 2021; 296:513–526
- Hsu TC, et al. Induced Robertsonian fusions and tandem translocations in mammalian cell cultures. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1978; 21:86–98.
- John B. The chromosomes of zooparasites I. *Acanthocephalus ranae* (Acanthocephala: Echinorhynchidae). *Chromosoma.* 1957; 8:730–738
- Marková A, et al. Karyological study of *Acanthocephalus lucii* (Echinorhynchida): The occurrence of B chromosomes in populations from PCB-polluted waters. *Diversity.* 2024; 16:140
- Mauer K, et al. The genome, transcriptome, and proteome of the fish parasite *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *PLoS ONE.* 2021, 15, e0232973
- Novák P, Neumann P, Macas J. Global analysis of repetitive DNA from unassembled sequence reads using RepeatExplorer2. *Nat. Protoc.* 2020; 15:3745–3776
- Orosová M, Špakulová M. Tapeworm chromosomes: Their value in systematics with instructions for cytogenetic study. *Folia Parasit.* 2018; 65:001
- Orosová M, et al. Chromosome analysis and the occurrence of B chromosomes in fish parasite *Acanthocephalus anguillae* (Palaeacanthocephala: Echinorhynchida). *Parasite.* 2023, 30:44
- Shah A, Hoffman JI, Schielzeth H. Comparative analysis of genomic repeat content in Gomphocerine grasshoppers reveals expansion of satellite DNA and helitrons in species with unusually large genomes. *Genome Biol. Evol.* 2020, 12, 1180-1193

MATERIÁL UiO-66-NH₂ POVRCHOVO MODIFIKOVANÝ KYSELINOU LISTOVOU AKO NOSIČ PROTINÁDOROVÉHO LIEČIVA

Migasová A.¹, Huntošová V.², Zelenka T.³, Almáši M.¹

¹ Katedra anorganickej chémie, UPJŠ, Košice

² Katedra biofyziky, UPJŠ, Košice

³ Katedra chémie, Ostravská univerzita, Ostrava

ABSTRAKT

V rámci výskumnej práce bol pripravený mikropórovitý materiál založený na báze metalo-organických sietí, konkrétne UiO-66-NH₂, ktorý bol povrchovo post-synteticky modifikovaný molekulami kyseliny listovej a následne bolo do pórovitých štruktúr pripravených materiálov uzavreté proti nádorové liečivo 5-fluorouracil. Pripravené vzorky boli charakterizované infračervenou spektroskopiou pre potvrdenie úspešnosti syntéz a na štúdium textúrnych vlastností bola využitá metóda adsorpcie/desorpcie didusíka. Následne bola študovaná schopnosť materiálov postupného uvoľňovania liečiva, ktoré bolo uskutočnené v prostrediach s rôznymi hodnotami *pH* simulujúc prostredie žalúdočnej šťavy (*pH* = 2,04), prostredie nádorových buniek (*pH* = 5,5) a intravenózne prostredie (*pH* = 7,4). Nakoniec bola študovaná biologická aktivita pripravených materiálov na gliómových bunkových líniách MG U87 so zameraním sa na proliferáciu nádorových buniek.

ÚVOD

Materiál UiO-66-NH₂ patrí medzi nanočastice a taktiež sa zaraďuje do skupiny materiálov nazývaných metalo-organické siete (MOF). Štruktúra tohto materiálu pozostáva z klastrov Zr₆O₄(OH)₄ prepojených organickým ligandom v podobe kyseliny 2-aminotereftálovej (Katz a kol., 2013). Vďaka svojej trojrozmernej štruktúre sa vyznačuje viacerými vlastnosťami, napríklad tepelná stabilita do 300 - 400 °C, vysoká pórovitosť a veľkosť povrchu (900 až 1200 m²·g⁻¹), chemická stabilita v rôznych rozpúšťadlách a taktiež v prostrediach s nízkymi hodnotami *pH*. Zároveň prítomnosť amínových funkčných skupín na ligande poskytuje príležitosť pre povrchovú funkcionalizáciu materiálu s dosiahnutím požadovaných fyzikálno-chemických vlastností pre rôzne aplikácie, ako sú uskladnenie a separácia plynov, heterogénna katalýza alebo cielený transport liečiv (Timofeev a kol., 2023).

Sľubnú stratégiu pre cielený transport liečiv proti nádorovým ochoreniam predstavuje povrchová modifikácia nanočastíc molekulami kyseliny listovej. Tento prístup využíva prirodzenú afinitu kyseliny listovej k folátovým receptorom, ktoré sa vyskytujú v nadmernom množstve v mnohých typoch rakovinových buniek, a zabezpečuje akumuláciu nanočastíc s uzavretým liečivom v nádorových bunkách, čím sa ochráni zdravé bunky pred poškodením (Narmani a kol., 2019).

MATERIÁL A METODIKA

Všetky použité chemikálie boli zakúpené v SigmaAldrich a boli používané bez ďalšieho dodatočného čistenia. Na syntézu materiálu UiO-66-NH₂ a jeho post-syntetickú modifikáciu bol použitý chlorid zirkoničitý (99,99 %), kyselina 2-aminotereftálová (99 %), kyselina listová (99,5 %), *N*-hydroxysukcínimid (98 %) a *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylamino)propyl)karbodiimid hydrochlorid (99 %). Na štúdium uzatvorenia liečiva do materiálu a jeho uvoľňovania bol použitý 5-fluorouracil (99 %).

Syntéza materiálu UiO-66-NH₂ bola uskutočnená solvotermálnou metódou opísanou autorom Katz a kol. (2013). Vzorka bola extrahovaná Soxhletovou extrakciou použitím metanolu ako rozpúšťadla a termicky aktivovaná zahriatím pri teplote 150 °C.

Povrchová post-syntetická modifikácia voľných -NH₂ skupín základného materiálu molekulami kyseliny listovej bola uskutočnená prostredníctvom amidovej väzby s pomerom molárneho množstva reaktantov UiO-66-NH₂:kyselina listová 2:1. Následne bola vzorka

extrahovaná Soxhletovou extrakciou použitím metanolu ako rozpúšťadla a produkt bol označený ako UiO-66-FA.

Do pórovitej štruktúry pripravených vzoriek UiO-66-NH₂ a UiO-66-FA bolo uzavreté liečivo 5-fluorouracil (5FU) pomocou metódy impregnácie s výslednou koncentráciou 100 mg uzavretého liečiva na 1 g matrice. Pripravené materiály s uzavretým liečivom boli označené ako UiO-66-NH₂+5FU a UiO-66-FA+5FU.

Prvou metódou na charakterizáciu pripravených zlúčenín bola infračervená spektroskopia, ktorá bola meraná ATR technikou v rozsahu vlnočtov 4000 - 400 cm⁻¹ na prístroji Nicolet 6700 od firmy Thermo Scientific.

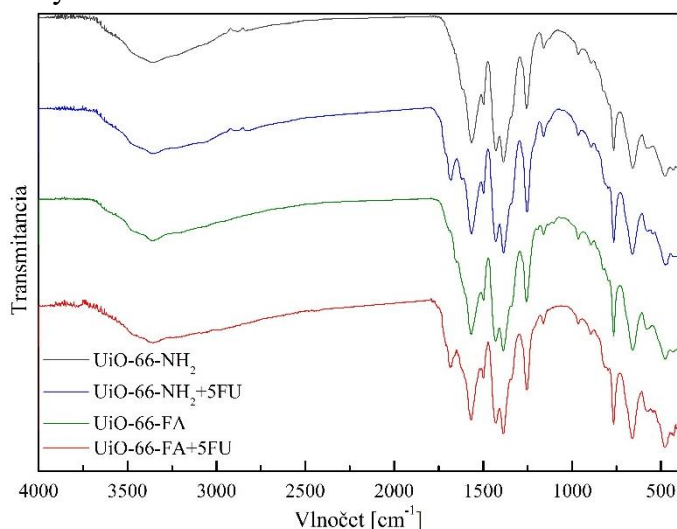
Na štúdium textúrnych vlastností a potvrdenie post-syntetickej modifikácie s uzavretím liečiva do pórovitej štruktúry bola využitá metóda adsorpcie/desorpcie didusíka pri -196 °C s čistotou plynu 99,999 % a meranie bolo uskutočnené v rozsahu relatívnych tlakov od 10^{-5} do 0,995 p/p_0 .

Experimenty na štúdium uvoľňovania liečiva boli realizované pri teplote 37 °C v prostrediach s rôznymi hodnotami *pH*, ktoré simulovali prostredie žalúdočnej kyseliny (*pH* = 2,04), fyziologické prostredie nádorových buniek (*pH* = 5,5) a intravenózne prostredie, respektíve fyziologické prostredie zdravých buniek (*pH* = 7,4), pričom odber vzoriek bol uskutočnený v časových intervaloch 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 a 10 h.

Na štúdium biologickej aktivity bola použitá zavedená bunková línia ľudského glioblastómu (U87 MG). Línia bola kultivovaná v médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) s nízkym obsahom lipidov pri štandardných podmienkach za tmy s prítomnosťou 5 % CO₂, pri teplote 37 °C a 80 % vlhkosti prostredia.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

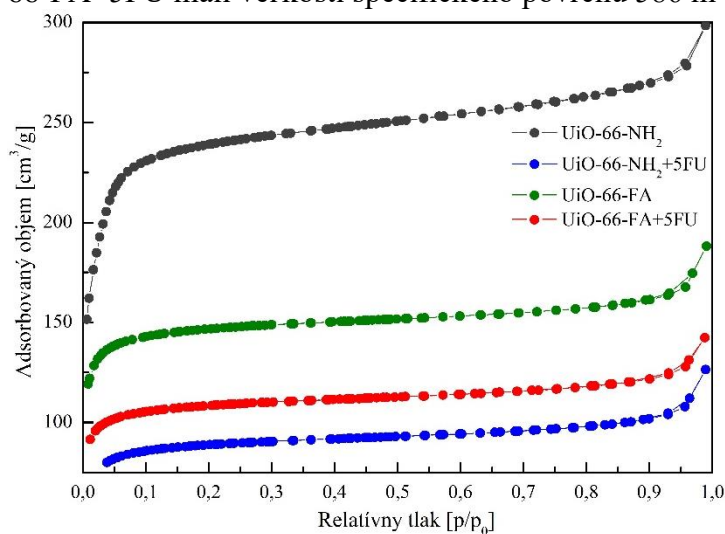
Prvou metódou na charakterizáciu pripravených zlúčenín a potvrdenie úspešností syntéz bola infračervená spektroskopia. Namerané infračervené spektrá zlúčenín sú zobrazené na obrázku 1 s prítomnými charakteristickými funkčnými skupinami v UiO-66-NH₂, UiO-66-FA a liečivom impregnovaných materiáloch.



Obr. 1. Infračervená spektroskopia pripravených materiálov

Merania adsorpcie/desorpcie didusíka boli využité na štúdium textúrnych vlastností, ale výsledky taktiež potvrdili úspešnosť post-syntetickej modifikácie a uzavretie molekúl liečiva do pórovitej štruktúry materiálov. BET izotermy zobrazené na obrázku 2 potvrdzujú prítomnosť mikropórov v pripravených materiáloch. V rozmedzí relatívnych tlakov 0 - 0,1 p/p_0 je možné pozorovať monovrstvovú adsorpciu, pričom v rozsahu 0,1 - 0,9 p/p_0 bolo pozorované plató. V prípade nemodifikovaných vzoriek bola vypočítaná veľkosť špecifického

povrchu $967 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pre UiO-66-NH₂ a $349 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ pre UiO-66-NH₂. Modifikované vzorky UiO-66-FA a UiO-66-FA+5FU mali veľkosti špecifického povrchu $586 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ a $428 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.



Obr. 2. BET izotermy adsorpcie/desorpcie N₂ pripravených matric bez a s uzavretým liečivom 5FU

V rámci štúdia vlastností bola pozornosť venovaná hlavne na schopnosť uvoľňovania liečiva z pripravených materiálov. Maximálne uvoľnené množstvo 5-fluorouracilu po 24 h pre nemodifikovaný materiál UiO-66-NH₂ v prostredí s hodnotou $pH = 2,04$ bolo 79,75 %. V prostredí simulujúcom nádorové bunky ($pH = 5,5$) sa z materiálu UiO-66-NH₂ uvoľnilo 95,29 % liečiva a v prostredí s hodnotou $pH = 7,4$ sa ho uvoľnilo 74,66 %. Z modifikovaného materiálu UiO-66-FA sa v prostredí simulujúcom žalúdočnú kyselinu ($pH = 2,04$) uvoľnilo maximálne 58,46 % liečiva. V prostredí s hodnotou $pH = 5,5$ bola dosiahnutá hodnota 39,18 % 5-fluorouracilu a v simulujúcom intravenóznom prostredí ($pH = 7,4$) sa uvoľnilo 65,09 % liečiva 5FU. Zo získaných dát síce vyplýva, že v prostredí simulujúcom nádorové bunky sa po 24 hodinách uvoľnilo najmenšie množstvo 5-fluorouracilu z modifikovaného materiálu UiO-66-FA, avšak práve to prináša príležitosť na riadené a predĺžené uvoľňovanie liečiva.

Výsledky testov na biologickú aktivitu, ktoré boli zamerané na štúdium proliferácie nádorových buniek preukázali, že nádorové bunky mali významne zníženú životaschopnosť po 72 hodinách od podania materiálu UiO-66-FA+5FU v porovnaní s bunkami, ku ktorým boli podané častice UiO-66-NH₂+5FU a to aj napriek ich nižšej schopnosti uvoľňovania liečiva po 24 hodinách.

POĎAKOVANIE

Výskum bol podporený projektovou schémou: APVV BLT: SK-AT-23-0001.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Katz M, et. al. A facile synthesis of UiO-66, UiO-67 and their derivatives. *Chemical Communications*. 2013; 49: 9449-9451.
- Narmani A, et al. Folic acid functionalized nanoparticles as pharmaceutical carriers in drug delivery systems. *Drug Development Research*. 2019; 80: 404-424.
- Timofeev K L, Kulinich S A, Kharlamova T S, NH₂-Modified UiO-66: Structural Characteristics and Functional Properties. *Molecules*. 2023; 28: 3916.

FOTÓN-UPKOVERZNÉ NANOČASTICE A ICH POTENCIÁL ZVYŠOVAŤ ÚČINNOSŤ FOTODYNAMICKEJ TERAPIE

Olejárová S.¹, Gulyášová T.¹, Huntošová V.^{2,3}

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

²Centrum Interdisciplinárnych Biovied, TIP Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach,

³Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Centrum biovied SAV, v. v. i., SAV, Bratislava

ABSTRAKT

Fotodynamická terapia (PDT) je inovatívna metóda liečby nádorových ochorení, ktorá využíva svetlo, fotosenzibilizátory a molekulárny kyslík na spustenie deštruktívnych fotochemických procesov v nádorových bunkách. Fotosenzibilizátory absorbujú svetlo a uvoľňujú energiu vo forme fluorescencie, čo môže byť využité na diagnostiku, ale aj na produkciu reaktívnych foriem kyslíka, ktoré spôsobujú deštrukciu nádorových buniek. Problémom skorších generácií fotosenzibilizátorov bola ich nízka selektivita a účinnosť. Nové transportné systémy tretej generácie, vrátane biokonjugátov a nanočastíc, umožňujú cieleň transport fotosenzibilizátorov priamo k nádorovým bunkám, čo zvyšuje efektivitu liečby. Fotón-upkonverzné nanočastice, ktoré premieňajú infračervené svetlo na viditeľné, umožňujú aplikáciu PDT aj v hlbšie uložených nádoroch. Tieto pokroky robia z PDT čoraz sľubnejší nástroj v onkologickej liečbe.

ÚVOD

Nádorové ochorenia naďalej ostávajú závažnou témou, ktorej je potrebné sa neustále venovať a zdokonaľovať už zabehnuté prístupy liečby. Jedným z dôvodov je rezistencia nádorových buniek, ktorá sa často vyvinie v bunkách v procese liečby. Nano-veda ponúka inovatívne prístupy ako spoľahlivo doručiť liečivo na miesto určenia, prekonať rezistenciu a obísť tak obranný mechanizmus nádorovej bunky. Vzhľadom na rýchly vývoj v chemických prístupoch je viacero prístupov ako zostrojiť vhodný transportný systém, ktorý by zároveň aktívne vstupoval do procesu liečby.

FOTODYNAMICKÁ TERAPIA

Fotodynamická terapia predstavuje liečebný prístup, ktorým sa vďaka aplikácii svetla, svetlo-citlivej molekuly a molekulárnemu kyslíku spúšťajú fotochemické procesy priamo v poškodenom tkanive (Kessel, 2019). V dôsledku vysokej selektivity je takáto cesta veľakrát minimálne invazívna a ľahko vykonateľná aj v ambulantnom prostredí. Svetlo-citlivá molekula, nazývaná tiež fotosenzibilizátor, absorbuje svetlo danej vlnovej dĺžky s energiou, ktorá ho dostáva do vyššieho excitovaného stavu. V tomto stave molekula neostáva, ale rýchlo relaxuje do základného stavu za súčasnej emisie žiarenia vo forme fluorescencie. Toto svetlo je možné využiť vo fotodiagnostike na identifikáciu onkologických malformácií tkaniva. Následne, zmenou vlnovej dĺžky je možné fotosenzibilizátor vybudíť do tripletového excitovaného stavu, ktorý je nestabilný a dovoľuje interakciu fotosenzibilizátora s molekulárnym kyslíkom. Výsledkom fotoreakcie najčastejšie býva produkcia vysoko reaktívnych kyslíkových foriem, ktoré priamo a deštruktívne ovplyvňujú svoje mikroprostredie a v bunkách spúšťajú signálne dráhy vedúce k bunkovej smrti (Hovan a kol., 2024).

SELEKTIVITA TRANSPORTU FOTOLENZIBILIZÁTORA

Experimentálne a klinické štúdie odhalili nedokonalosti fotosenzibilizátorov prvej a druhej generácie a nastolili potrebu vylepšiť vlastnosti týchto fotodynamicky aktívnych molekúl pre potreby selektívnej a efektívnej fotodynamickéj terapie. Fotosenzibilizátory tretej generácie sa opierajú o vývoj biokonjugátov a transportných systémov, ktoré je možné funkcionalizovať pre aktívny transport do cieľenej bunky a tak zvýšiť terapeutickú koncentráciu prenášaného

liečiva (Josefsen a Boyle, 2008; Mfouo-Tynga a kol., 2021). Spomedzi najspôľahlivejších prístupov cieleného transportu sa javí zapojiť do fotodynamickéj akcie špecifické receptory exprimované na povrchu nádorových buniek. Takto sa do centra pozornosti dostali receptory voči nízkohustotným lipoproteínom, folátové receptory, receptory rastových faktorov a tyrozín kinázové receptory (Aronson a kol., 2021; Huntosova a kol., 2012; Richter a Zhang, 2005; Yamaoka a kol., 2018). Vďaka zabezpečenému aktívnemu transportu a modifikácii povrchu transportnej častice je zvýšená selektivita voči nádorovému tkanivu, obmedzená interakcia fotosenzibilizátora s okolitými sérovými proteínmi, ktorá by mohla viesť k zníženiu jeho terapeutickkej koncentrácie, a vďaka citlivosti na pH prostredia je možné kontrolovať postupné uvoľňovanie liečiva na mieste určenia (Beňová a kol., 2021; Huntosova a kol., 2012; Lenkavska a kol., 2019).

FOTÓN-UPKONVERZNÉ NANOČASTICE

Fotón-upkonverzné nanočastice predstavujú materiál, ktorý je schopný konvertovať svetlo v blízkej infračervenej oblasti na svetlo vo viditeľnej oblasti spektra. Takéto častice pozostávajú z jadra a obalu, ktoré sú podľa potreby dopované iónmi lantanoidov, ktoré zaisťujú, že emisia žiarenia môže byť prispôbená pre daný fotosenzibilizátor (Zheng a kol., 2023). Aktivátormi najčastejšie bývajú ióny Er^{3+} , Tm^{3+} a Nd^{3+} a svetlo citlivými sú v časticiach ióny Yb^{3+} a Nd^{3+} . Nakoľko infračervené svetlo (980 nm) preniká do hlbších vrstiev tkaniva, v protinádorovej terapii je možné aplikovať fotodynamickú terapiu aj v prípadoch, kde sú konvenčné zdroje svetla neúčinné (Li a Chen, 2022). Naviazaním fotosenzibilizátora na upkonverzné nanočastice dostávame silný nástroj nielen pre terapeutické účely, ale aj pre biovizualizáciu a fotodiagnostiku (Wang a kol., 2010). Prehľad doteraz vytvorených konjugátov fotosenzibilizátora s fotón-upkonverznými časticami je uvedený v Tabuľke 1.

Názov nanokonjugátu	Veľkosť (priemer v nm)	fotosenzibilizátor	Excitácia (nm)	Emisia (nm)	Literatúra
$\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Er}$	21,6	metylénová modrá	980	650	(Chen a kol., 2016)
$\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$	26	bengálska ružová	980	540, 650	(Nahorniak a kol., 2022)
$\text{NaErF}_4@\text{NaLuF}_4$	18-33	chlorín e6	800	520-540	(Li a kol., 2018)
$\text{NaYF}_4 : \text{Yb}, \text{Er}$	8	zinočnatý ftalocyanín	980	600, 700	(Jia a kol., 2019)

Tab.1. Prehľad konjugátov fotón-upkonverzných častíc dizajnovaných pre potreby fotodynamickéj terapie nádorových ochorení.

POĎAKOVANIE

Táto práca je podporovaná grantovými schémami Agentúry na podporu výskumu a vývoja projektom APVV-20-0340, bilaterálnym projektom medzi Slovenskom a Rakúskom: SK-AT-23-0001 a štipendiom pre excelentných výskumníkov a výskumníčky R2-R3 ako súčasť Plánu obnovy a odolnosti pre Slovensko s projektovým kódom: 09I03-03-V04-00007.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aronson M R, Medina S H, Mitchell M J. Peptide functionalized liposomes for receptor targeted cancer therapy. *APL Bioeng.* 2021; 5: 011501-11
- Beňová E, Hornebecq V, Zelenák V, Huntošová V, Almáši M, Máčajová M, Bergé-Lefranc D. pH-responsive mesoporous silica drug delivery system, its biocompatibility and co-adsorption/co-release of 5-Fluorouracil and Naproxen. *Appl. Surf. Sci.* 2021; 56: 150011
- Chen C W, Chan Y C, Hsiao M, Liu RS. Plasmon-Enhanced Photodynamic Cancer Therapy by Upconversion Nanoparticles Conjugated with Au Nanorods. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2016; 8: 32108-19
- Hovan A, Pevna V, Huntosova V, Miskovsky P, Bánó G, 2024. Singlet oxygen lifetime changes in dying glioblastoma cells. *Photochem. Photobiol.* 2024; 100: 159-71
- Huntosova V, Buzova D, Petrovajova D, Kasak P, Nadova Z, Jancura D, Sureau F, Miskovsky P. Development

- of a new LDL-based transport system for hydrophobic/amphiphilic drug delivery to cancer cells. *Int. J. Pharm.* 2012; 436: 463-71
- Jia X, Ye H N, Weng H, Huang N, Yu Y, Xue J P. Small molecular target-based multifunctional upconversion nanocomposites for targeted and in-depth photodynamic and chemo-anticancer therapy. *Mater. Sci. Eng. C Mater Biol Appl.* 2019; 104: 109849-57
- Josefsen L B, Boyle RW, 2008. Photodynamic therapy: Novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br. J. Pharmacol.* 2008; 154:1-3
- Kessel D. Photodynamic therapy: A brief history. *J. Clin. Med.* 2019; 8(10):1581-88
- Lenkavská L, Blascakova L, Jurasekova Z, Macajova M, Bilcik B, Cavarga I, Miskovsky P, Huntosova V. Benefits of hypericin transport and delivery by low- and high-density lipoproteins to cancer cells: From in vitro to ex ovo. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019; 25: 214-24.
- Li Q, Li X, Zhang L, Zuo J, Zhang Y, Liu X, Tu L, Xue B, Chang Y, Kong X. An 800 nm driven NaErF4@NaLuF4 upconversion platform for multimodality imaging and photodynamic therapy. *Nanoscale.* 2018; 10:12356-63
- Li Y, Chen G. Upconversion Nanoparticles for Cancer Therapy. *Adv. NanoBiomed Res.* 2022; 2: 2200092
- Li Y, Zhang X, Zhang Y, Zhang Y, He Y, Liu Y, Ju H. Activatable Photodynamic Therapy with Therapeutic Effect Prediction Based on a Self-correction Upconversion Nanoprobe. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2020; 12:19313-23
- Mfouo-Tynga I S, Dias L D, Inada N M, Kurachi C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2021; 34:102091
- Nahorniak M, Pop-Georgievski O, Velychkivska N, Filipová M, Rydvalová E, Gunár K, Matouš P, Kostiv U, Horák D, 2022. Rose Bengal-Modified Upconverting Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation. *Life* 12:1383-97
- Richter M, Zhang H, 2005. Receptor-targeted cancer therapy. *DNA Cell Biol.* 2005; 24: 271-82
- Wang F, Banerjee D, Liu Y, Chen X, Liu X, 2010. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst.* 2010; 135: 1839-54
- Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T. Receptor tyrosine kinase-targeted cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 3491-524
- Zhao N, Wu B, Hu X, Xing D. NIR-triggered high-efficient photodynamic and chemo-cascade therapy using caspase-3 responsive functionalized upconversion nanoparticles. *Biomaterials.* 2017; 141:40-49
- Zheng S, Zhang H, Sheng T, Xiang Y, Wang J, Tang Y, Wu Y, Liu J, Zhu X, Zhang Y. Photoswitchable upconversion nanoparticles with excitation-dependent emission for programmed stepwise NIR phototherapy. *iScience.* 2023; 26:107859-76

PRVÝ DŮKAZ O VÝSKYTE ÁZIJSKÉHO KMEŇA CPV-2B NA SLOVENSKU U OČKOVANÉHO PSA S ÁKUTNÝM FATÁLNYM PRIEBEHOM PARVOVÍRUSOVEJ INFEKČIE: KAZUISTIKA.

Pelegrinová A.¹, Petroušková P.¹, Korytár Ľ.¹, Ondrejková A.¹, Dražovská M.¹,
Vojtek B.¹, Mojžišová J.¹, Kostičák M.¹, Zákutná Ľ.¹, Dolník M.², Mandelík R.¹

¹ *Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, Univerzita veterinárskeho lekárstva
a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovensko*

² *Klinika prežívavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, Košice 041
81, Slovensko*

ABSTRAKT

Táto štúdia poskytuje komplexný popis klinického priebehu fatálnej parvovírusovej infekcie u očkovaného psa, s prvou identifikáciou nového variantu CPV-2 na území Slovenska. Tento variant bol objasnený pomocou molekulárnej analýzy aminokyselín VP2 génu. Pes vykazoval klinické príznaky typické pre CPV-2 infekciu. Po potvrdení infekcie CPV-2 komerčným SNAP testom bola zahájená intenzívna terapia. Pes uhynul do 48 hodín po prijatí. Bol odobratý rektálny výter a CPV-2 bolo vyšetrené pomocou PCR metódy a následne sekvenované. Detegovaný vírus mal príbuznosť s kmeňmi CPV-2c ázijského pôvodu a nebol príbuzný európskym kmeňom CPV-2b. Sekvencia mala genetické znaky typické pre ázijské kmene (VP2: 5Gly, 267Tyr, 324Ile, 370Arg a 440Thr). Fylogenetická analýza klasifikovala tento kmeň ako podobný ázijským kmeňom CPV-2c. Predpokladá sa, že pochádza z ázijského kmeňa podobného CPV-2c, ktorý získal mutáciu 426Asp. S týmto zistením potvrdzujeme prvý dôkaz ázijského kmeňa CPV-2b na území Slovenska.

ÚVOD

Psí parvovírus typu 2 (CPV-2) spôsobuje vysoko nákazlivú akútnu enteritídu spojenú s vysokou morbiditou a mortalitou. Napriek používaniu účinných vakcín sa prípady infekcie CPV-2 vyskytujú aj u očkovaných psov (Tuteja et al. 2022). Hlavné príčiny zlyhania vakcín zahŕňajú interferenciu s materskými protilátkami a nesprávne načasovanie očkovania (Altman et al. 2017). Varianty CPV-2 sa vyskytujú na všetkých kontinentoch v rôznom zastúpení. Súčasné štúdie potvrdzujú aminokyselinové substitúcie v sekvencii VP2 génu (Ala5Gly, Phe267Tyr, Ser297Ala, Tyr324Ile, Gln370Arg, Thr440Ala a Ala514Ser). Tieto unikátne mutácie sú spojené s virulenciou a schopnosťou vírusu uniknúť imunitnému systému. Viaceré štúdie potvrdzujú šírenie a zavedenie kmeňov CPV-2c ázijského pôvodu z Ázie do Európy prostredníctvom importovaných psov, čo predstavuje hrozbu v globálnom šírení vírusu (Mira et al. 2019). Tieto kmene sú charakterizované špecifickým súborom mutácií v štrukturálnych a neštrukturálnych proteínoch a sú fylogeneticky príbuzné (Canuti et al. 2022). Na sledovanie cirkulácie, vývoja a šírenia nových variantov CPV-2 v rôznych geografických oblastiach sú potrebné systematické epizootologické prieskumy (Schirò et al. 2022). Táto štúdia poskytuje podrobný opis klinického priebehu smrteľnej infekcie parvovírusom u očkovaného šteňaťa jazvečíka a hlási prvý objav nového variantu CPV-2 na Slovensku, identifikovaného pomocou molekulárnej analýzy aminokyselín VP2 génu.

MATERIÁL A METODIKA

Pes bol testovaný rýchlo testom CPV/CCV/Giardia Ag (Bionote, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, Kórea). Ako vzorky boli použité dva rektálne výtery. V rámci komplexného vyšetrenia bolo vykonané hematologické a biochemické vyšetrenie krvi, bakteriologická a mykologická kultivácia, sérologické vyšetrenie na detekciu protilátok IgM a IgG. Potvrdenie CPV-2 bolo vykonané molekulárnou detekciou z rektálneho výteru za použitia DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa pokynov výrobcu. Extrahovaná DNA zo vzorky rektálneho výteru bola potvrdená PCR metódou. Diagnostika bola zameraná na 573 bp VP2

fragment CPV-2 pomocou univerzálnej sady primerov a vyhodnotená elektroforézou. Potvrdená vzorka bola následne podrobená amplifikácii celej sekvencie VP2 (1 755 bp) pomocou troch individuálnych PCR reakcií so špecifickými párami primerov. Pozitívne amplicóny očakávanej veľkosti boli vyčistené pomocou Wizard® SV Gel a PCR Clean-Up systému podľa pokynov výrobcu a sekvenované metódou Sanger. Nukleotidová sekvencia VP2 bola preložená do aminokyselinovej (aa) sekvencie, aby sa určil antigénny variant CPV-2 (2a, 2b alebo 2c) na základe aa v pozícii 426 a substitúcií vybraných aminokyselín (5, 267, 297, 324, 370 a 440) pozdĺž proteínu VP2. Analýza bola vykonaná pomocou programu Geneious v9.1.8 (Biomatters, San Diego, CA, USA). Fylogenetické vzťahy analyzovaného kmeňa CPV-2 s inými kmeňmi CPV-2 boli objasnené pomocou softvéru MEGA v11. Pre komplexnejšie hodnotenie bolo stiahnutých 61 sekvencií génu VP2 z GenBank ako referenčné sekvencie na základe genotypu a geografického pôvodu. Fylogenetický strom bol zostavený maximálne pravdepodobnostnou štatistickou metódou pomocou Tamura-3 parametrového modelu (T92) s diskretným Gamma rozdelením (päť rýchlostných kategórií) (G) a invariantnými miestami (I). Na izoláciu CPV zo vzorky stolice bola použitá bunková línia Madin-Darby Canine Kidney (MDCK). Bunková kultúra bola kultivovaná do konfluencie v Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko) obohatenom o 10 % plazmu teľaťa (FBS; Sigma) a 1 % antibioticko-antimykotické riešenie (10 000 U/mL penicilín, 10 mg/mL streptomycín a 25 µg/mL amfotericín B; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Nemecko) pri 37 °C s 5 % CO₂ a 95 % vlhkosťou. Supernatant vírusu bol testovaný na prítomnosť vírusu pomocou PCR s použitím primerov na detekciu CPV-2. Patologické vyšetrenie kadáveru bolo vykonané na Veterinárnom a potravinárskom ústave v Košiciach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V štúdiu popisujeme klinický prípad pôvodu CPV-2b podobného ázijskému typu u očkovaného psa. Podozrenie na parvovírusovú chorobu bolo potvrdené pomocou rýchlo testu; Antigen Rapid test kit CPV/CCV/Giardia Ag, s pozitívnym výsledkom pre CPV/Ag z rektálneho steru. Typickým prejavom CPV-2 infekcie je neutropénia a lymfopénia (Mylonakis et al., 2016). Krvný rozbor odhalil leukopéniu, lymfocytopéniu, znížený MCV a znížený RETIC-HGB. Bakteriologické a mykologické kultúry ukázali negatívny nález. Titre protilátok IgG a IgM patria medzi najčastejšie používané ukazovatele ochrany infekcie (Earle et al., 2021). Vo vzorke séra boli zistené protilátky IgM proti CPV-2 s titrom 1:90, čo potvrdzuje akútnu infekciu CPV-2. Protilátky IgG proti CPV-2 neboli zistené (titer 1:30). Prítomnosť parvovírusovej infekcie bola potvrdená viacerými metodickými postupmi. Okrem konvenčnej PCR metódy bola vykonaná identifikácia špecifických mutácií v proteíne VP2. Na rozdiel od európskych kmeňov CPV-2b, izolát CPV-2b Slovakia/Kosice/47/2022 vykazuje významné zmeny aminokyselín v proteíne VP2, ktoré sú typické pre ázijské kmene CPV-2c (A5G, F267Y, Y324I, Q370R). Nedávno bol popísaný nový klaster kmeňov CPV-2b s genetickými znakmi podobnými CPV-2c, známy ako ázijský CPV-2b (Schirò et al., 2022b). Izoláty CPV-2b získané z Maďarska v roku 2021 (ON733252) (Boros et al., 2022) a z Talianska v roku 2022 (OR463607 a ON677437) zdieľajú rovnaké aminokyselinové charakteristiky na zvyškoch 5, 267, 324, 370 a 440 proteínu VP2 ako 98,6% kmeňov v ázijskom klade CPV-2c. Schirò a kol. navrhli potenciálny pôvod tohto klastra ako výsledok získania substitúcie E426D prostredníctvom konvergentnej evolúcie (Schirò et al., 2022b). Izolát CPV-2b z tejto štúdie, spolu s ázijskými kmeňmi CPV-2b identifikovanými v Taliansku a Maďarsku, sú fylogeneticky príbuzné ázijským kmeňom CPV-2c v tej istej klade. Tento výsledok podporuje pravdepodobnosť pôvodu z cirkulujúcich kmeňov CPV-2c v Európe (Franzo et al., 2023), nemožno vylúčiť, že ázijské kmene CPV-2b môžu mať európsky pôvod. Predchádzajúce štúdie uviedli päť mutačných miest v proteíne VP2 (A5G, F267Y, Y324I a Q370R), ktoré sú spojené s antigénnosťou CPV-2 a rozsahom hostiteľa. Tieto mutácie môžu

mať významný vplyv na rozsah hostiteľa a kapacitu väzby VP2 (Hao et al. 2022). Avšak účinnosť vakcín používaných na prevenciu proti parvovírusu proti mutantom 5G a 370R zostáva neistá. Patologické vyšetrenie odhalilo kongesciu pľúcneho parenchýmu s hemorágiami, petechiálne krvácania na epikarde a žalúdku, hemoragickú enteritídu, krvácania v slezinovom parenchýme a hyperémiu pečene a sleziny. CPE spôsobený izolátom CPV-2b bol pozorovaný štvrtý deň po infekcii, pričom sa prejavil tvorbou plakov a čiastočnou lýzou MDCK monovrstvy. Prítomnosť CPV-2b v bunkovej kultúre bola taktiež potvrdená pomocou PCR.

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 04/2023 „Identifikácia nových kmeňov CPV-2 u klinicky chorých psov”.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Altman KD, Kelman M, Ward MP. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure? *Vet Microbiol.* 2017; 210:8-16.
- Boros Á, et al. Unusual "Asian-origin" 2c to 2b point mutant canine parvovirus (Parvoviridae) and canine astrovirus (Astroviridae) co-infection detected in vaccinated dogs with an outbreak of severe haemorrhagic gastroenteritis with high mortality rate in Hungary. *Vet Res Commun.* 2022; 46(4):1355-1361.
- Canuti M, et al. Co-circulation of five species of dog parvoviruses and canine adenovirus type 1 among gray wolves (*Canis lupus*) in northern Canada. *Transbound Emerg Dis.* 2022; 69(5):e1417-e1433.
- Earle KA, et al. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines. *Vaccine.* 2021; 39(32):4423-4428.
- Franzo G, et al. Not Asian Anymore: Reconstruction of the History, Evolution, and Dispersal of the "Asian" Lineage of CPV-2c. *Viruses.* 2023; 20;15(9):1962.
- Hao X, et al. The Changes in Canine Parvovirus Variants over the Years. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(19):11540.
- Mira F, et al. Spreading of canine parvovirus type 2c mutants of Asian origin in southern Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66(6):2297-2304.
- Mylonakis ME, Kalli I, Rallis TS. Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Vet Med (Auckl).* 2016;7:91-100.
- Schirò G, et al. Identification and Molecular Characterization of a Divergent Asian-like Canine Parvovirus Type 2b (CPV-2b) Strain in Southern Italy. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(19):11240.
- Tuteja D, Banu K, Mondal B. Canine parvovirology - A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2022; 82:101765.

BAKTERIÁLNA MIKROBIOTA MIEST KONCENTRÁCIE VYSOKOHORSKEJ TURISTIKY SO ZAMERANÍM NA VÝSKYT A PATOGENITU *YERSINIA ENTEROCOLITICA* V TRUSE VRCHÁRKY ČERVENKAVEJ (*PRUNELLA COLLARIS*) DETEGOVANEJ POMOCOU RT-PCR

Pitoňáková T^{1,2}., Koščová J.¹

¹ Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF, Košice

² Výskumný ústav vysokohorskej biológie, UNIZA, Žilina

ABSTRAKT

Štúdia sa zaoberá výskytom baktérie *Yersinia enterocolitica* u vrchárky červenkavej (*Prunella collaris*), ktorá obýva alpínske oblasti Západných Karpát. Tento vták je čiastočne sťahovavý a všežravý, pričom sa predpokladá, že môže zohrávať úlohu v šírení *Y. enterocolitica*, ktorá je potencionálne patogénna pre človeka a prenáša sa alimentárnou cestou. Cieľom štúdie je potvrdiť prítomnosť tejto baktérie v truse vrchárky červenkavej a analyzovať jej výskyt v závislosti od frekvencie návštevnosti turistických miest. Vzorky trusu boli odoberané v rôznych turisticky exponovaných lokalitách od augusta 2022 do konca roka 2023 a analyzované metódou real-time PCR na detekciu virulénneho génu *ail*. Celkovo bolo odoberatých 98 vzoriek, pričom 10 % bolo pozitívnych na *Y. enterocolitica*. Najvyšší počet pozitívnych vzoriek bol zaznamenaný v lokalitách s vysokou frekvenciou turistov (55 %), čo naznačuje vplyv ľudskej prítomnosti na správanie vtákov a dostupnosť potravy. Pozitívne výsledky korelovali s obdobím najväčšej turistickej aktivity v letných mesiacoch. Výsledky štúdie potvrdzujú, že vrchárka červenkavá môže prispievať k šíreniu zoonotických baktérií v alpínskom prostredí.

ÚVOD

Vrchárka červenkavá (*Prunella collaris*) je endemický vtáčí druh, ktorý sa vyskytuje v nadmorskej výške od 1750 m n.m až do 2600 m n.m v lokalite Západných Karpát (Janiga a kol., 2019). Je to transmigrujúci a čiastočne sťahovavý vták (v zimnom období) a je všežravý (Janiga 2017). V minulosti bol označený ako vtáčí druh vhodný pre biomonitoring alpínskeho prostredia (Janiga a kol., 2019). Vzhľadom na jeho spôsob života môže predstavovať významnú úlohu v šírení a udržiavaní baktérie *Yersinia enterocolitica* vo vysokých nadmorských výškach. Boli uskutočnené štúdie, ktoré potvrdili výskyt *Y. enterocolitica* u vrchárky červenkavej (Sedlárová 2004, Janiga a kol., 2007). *Y. enterocolitica* je fakultatívne anaeróbna, Gram-negatívna, nesporulujúca a psychrotrofná baktéria z čeľade Enterobacteriaceae (Joutsen 2023). Je saprofytom vonkajšieho prostredia, a tiež je súčasťou črevnej mikrobioty viacerých cicavcov. Patrí k potenciálne patogénnym mikroorganizmom, ktoré môžu spôsobovať ochorenia človeka a zvierat, prenáša sa alimentárnou cestou (Pilipčinec a kol., 2018). Je prítomná v životnom prostredí, vo vodných zdrojoch a pôde (Gupta a kol., 2015) a môže kontaminovať aj rôzne potraviny, ako napríklad mäso, mliečne výrobky a zeleninu. Naša štúdia sa zameriava na konkrétne typy miest, kde boli vzorky odoberané v súvislosti so sezónnou intenzitou návštevnosti turistov a ich následným synantropizovaním okolitej fauny a nadväzuje na štúdiu Novotný a kol. (2007). Miestami koncentrácie turistov sú turisticky dostupné štíty alebo turistické chaty a ubytovne. Častokrát nezodpovedné správanie turistov v okolí takýchto miest spôsobuje hygienické problémy a môže narušovať pôvodný ekosystém. Chránené územia národných parkov majú zavedené návštevne poriadky, ktoré však turisti často neovládajú a neprispôsobujú im svoje správanie. Zvyšky jedál, odpadky a fekálie, ktoré v týchto územiach zostávajú, sú ťažko riešiteľným problémom a ekosystém sa s ním musí vysporiadať sám. Pôvodná avifauna si privykla na ľahko dostupnú ľudskú potravu, alebo sa prispôsobila konzumácii flóry, ktorá nie je pôvodná a začala rásť v okolí „toaliet“ pri chatách. Cieľom práce je preukázať výskyt *Y. enterocolitica* ako potenciálne patogénnej enterobaktérie u vybraného vtáčieho druhu v alpínskom

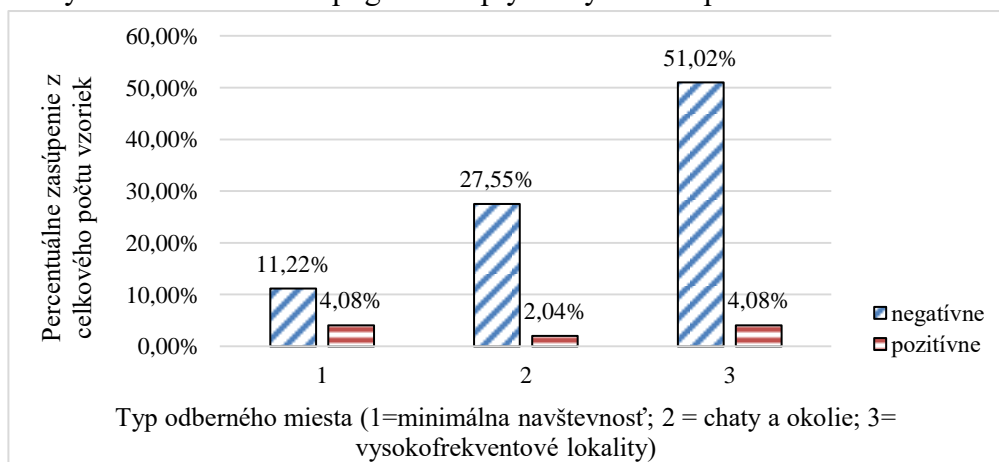
vegetačnom stupni a jej kolobeh v životnom prostredí vzhľadom k tomu, že u človeka môže spôsobovať yersiniózu, ktorá patrí k zoonotickým, alimentárne prenášaným ochoreniam.

MATERIÁL A METODIKA

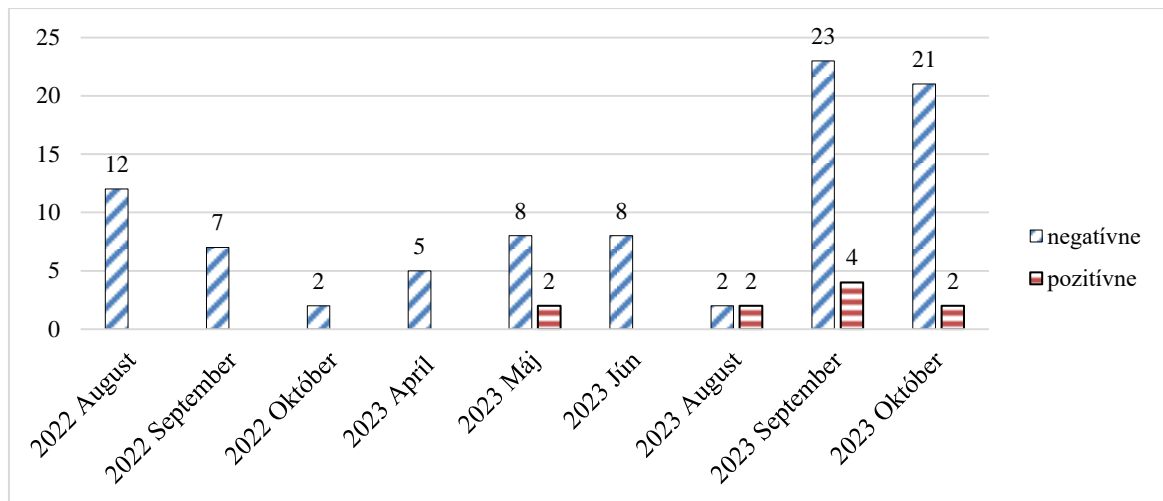
Vzorky trusu *Prunella collaris* boli odoberané od augusta 2022 do konca roka 2023. Počty sa v jednotlivých mesiacoch líšili, v závislosti od výjazdov do terénu a výskytu sledovaného druhu. Lokality boli rozdelené do troch kategórií podľa frekvencie návštevnosti od minimálne navštevovaných lokalít (1) cez chaty a okolie (2) po vysoko frekventované miesta (3). Odoberané vzorky trusu boli laboratórne spracované, naočkovaní sa do tryptón-sójového bujónu a ponechali sa pri 24 °C počas 48 hodín. Na identifikáciu bola použitá metóda real-time PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA) s použitím pozitívnej kontroly (referenčný kmeň *Yersinia enterocolitica* CCM 5671, Masarykova univerzita, Brno). Z pomnoženej kultúry sa odobrala reprezentatívna vzorka 1 ml do sterilnej 1,5 ml Eppendorf skúmavky. Následne bol vyizolovaný templát DNA pomocou PBS roztoku (pH = 7,4) a tepelnej denaturácie. Výsledná DNA bola rozsuspendovaná v 100 µl STE pufru. Supernatant sa prepipetoval do čistej mikroskúmavky a pomocou nanospektrofometra bola zaznamenaná koncentrácia DNA. Metóda je špecifikovaná v STN P CEN ISO/TS 18867, kde sa deteguje gén *ail* (*attachment and invasion locus*) asociovaný s virulenciou *Yersinia enterocolitica*. Po vytvorení reakčného mixu, kde boli okrem základných komponentov (TaqMan RT-PCR Master mix) pre real-time PCR pridané aj primery F-real 10A a R-real 9A, bola vzorka vyhodnotená na základe amplifikačnej krivky. V každej PCR platničke, naplnenej vzorkami, sa nachádzala tiež pozitívna a negatívna kontrola. Teplotný profil reakcie bol 2 min/50 °C; 10 min/95 °C; 45-krát 15 s/95 °C a 60s/60 °C.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkový počet odoberatých vzoriek bol ku koncu roka 2023 v počte 98 ks. Z toho bolo v type odberného miesta 1 (minimálna návštevnosť) odoberatých 15 ks, v type 2 odberného miesta (chaty a okolie) bolo odoberatých 29 ks a v type odberného miesta 3 (vysoko frekventované lokality) bol celkový počet 54 ks. Pozitívne vzorky predstavujú 10 % z celkového počtu. Graf č. 1 uvádza percentuálne zastúpenie odberov a výsledkov real-time PCR v jednotlivých lokalitách. Graf potvrdzuje, že úspešnosť odberu vzoriek je najvyššia v odbernom mieste typu 3 (55 %), čo poukazuje na fakt, že vtáky sú naučené existovať v ľudskej prítomnosti, a tiež si privykli na ľahšie dostupnú potravu. K podobným záverom dospeli aj Novotný a kol. (2007), so záchytným yersinií 65 % v antropogénne ovplyvnených biotopoch.



Graf 1 Počet vzoriek v jednotlivých typoch odberných miest zo skúmaného obdobia (%)



Graf 1 Počet vzoriek odobratých v mesačných intervaloch a pozitívna detekcia *Y. enterocolitica*

V grafe č. 2 je zobrazená časová os od začiatku odberov v auguste 2022 po koniec roka 2023 v mesačných intervaloch. Pozitívne výsledky sú len z roku 2023 v máji, auguste, septembri a októbri. Z výsledkov usudzujeme, že pozitívne výsledky nadväzujú na obdobie vrcholu turistickej sezóny. V auguste a v septembri je ustálené letné počasie, preto najviac turistov volí tento termín. Tento jav opäť zaznamenala štúdia Novotného a kol. (2007), kedy bol potvrdený vyšší výskyt *Y. enterocolitica* v lete, čo sa spája s hniezdením a jednoduchším prenosom baktérie medzi jedincami.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Fernandes R, (ed.). Microbiology handbook: dairy products. Royal Society of Chemistry, 2009.
- Gupta V, et al. Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2015; 34: 641-650.
- Janiga M, et al. Patterns of prevalence among bacterial communities of alpine accentors (*Prunella collaris*) in the Tatra Mountains. J. Ornithol. 2007; 148: 135–143.
- Janiga M. Biology of alpine accentor IX. Overview of the breeding distribution of the Alpine Accentor (*Prunella collaris*) in the West Carpathians. Oecolog. Mon. 2017.
- Joutsen S. Ail-positive yersiniain wild animals and the food chain. 2023.
- Janiga M, Haas M. Alpine accentors as monitors of atmospheric long-range lead and mercury pollution in alpine environments. Environ. Sci. Pollut. Res. 2019;26: 2445-2454.
- Novotný M, et al. High incidence of *Yersinia enterocolitica* (Enterobacteriaceae) in Alpine Accentors (*Prunella collaris*) of the Tatra Mountains. Acta Ornithologica, 2007; 42(2), 137-143.
- Pilipčinec E., et al. Špeciálna bakteriológia. Gram-negatívne baktérie. UVLF. Edičné stredisko a predajňa literatúry UVLF v Košiciach. Prvé vydanie. 2018. Košice. ISBN 978-80-8077-571-1
- Sedlárová A. Microbial flora of digestive tract of *Prunella collaris*. MS Thesis, Pedagogic faculty CU, Ružomberok. 2004.

ÚLOHA ČREVNÉHO MIKROBIÓMU V PATOGENÉZE UL CERÓZNEJ KOLITÍDY

Ryniková M.¹, Adamková P.¹, Gancarčíková S.², Lauko S.², Hajdučková V.², Janičko M.³,
Demečková V.¹

¹Katedra fyziológie živočíchov, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice

²Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

³II. Interná klinika Lekárskej fakulty Univerzity Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach a Univerzitná nemocnica
Louisa Pasteura v Košiciach

ABSTRAKT

Ulcerózna kolitída (UC) je chronické zápalové ochorenie čriev s narastajúcou incidenciou, spojené s dysbiózou črevného mikrobiómu. Cieľom tejto štúdie bolo preskúmať vplyv dysbiotického mikrobiómu (UC FMT) na rozvoj UC a porovnať jeho účinky s dextrán sulfátom sodným (DSS) v predklinickom modeli. Výsledky ukázali, že DSS spôsobuje ťažšiu formu kolitídy s rýchlejšim nástupom ako UC FMT. Oba spôsoby navodenia, vrátane kombinovaného spôsobu (DSS + UC FMT) nevyvolávajú zmeny v hematologických parametroch, ale líšia sa imunologickou odpoveďou. UC FMT má negatívny vplyv na expresiu génov tesných spojení, čím pravdepodobne oslabuje črevnú epitelovú bariéru. Výsledky tejto štúdie ukazujú, že DSS má signifikantný vplyv na zníženie alfa diverzity mikrobiómu. Štúdia prináša cenné poznatky o vplyve dysbiotického mikrobiómu a jeho pravdepodobnej úlohe v patogenéze UC.

ÚVOD

Ulcerózna kolitída (UC) je chronické zápalové ochorenie čriev, ktorého incidencia stále stúpa, a to predovšetkým v rozvojových krajinách (ročne +14,9%) (Du and Ha 2020). Klinicky sa UC prezentuje najmä hnačkami, bolesťami brucha, krvácaním z rekta a prítomnosťou krvi v stolici (Ho et al. 2020). Napriek intenzívnemu výskumu je etiológia UC stále pomerne málo objasnená. V súčasnosti sa predpokladá, že UC vzniká v dôsledku interakcie faktorov prostredia (napr. životný štýl, strava, stres), črevného mikrobiómu a imunity jedinca s genetickou predispozíciou (Glassner et al. 2020; Ho et al. 2020). Jedným z kľúčových znakov UC, ktorý je prítomný u väčšiny pacientov, je dysbióza, teda porušenie rovnováhy a zmena zloženia črevného mikrobiómu. Na základe dostupných dôkazov sa predpokladá, že črevná dysbióza by mohla byť spúšťačím faktorom v patogenéze UC (Glassner et al. 2020; Shen et al. 2018). Študované sú najmä vzťahy črevnej mikrobioty, črevnej epitelovej bariéry a imunitných buniek, pretože sú nevyhnutné na zachovanie homeostázy (Kayama et al. 2020). Cieľom našej štúdie bolo preskúmať, do akej miery môže dysbiotický mikrobióm prispievať k rozvoju UC a porovnať jeho vplyv s vplyvom dextrán sulfátu sodného (DSS), ktorého schopnosť vyvolať akútnu aj chronickú kolitídu bola potvrdená v zvieracích modeloch (Eichele and Kharbanda 2017).

MATERIÁL A METODIKA

V experimente, ktorý bol odsúhlasený ŠVPS SR pod č. r. 4073/18 - 221/3, boli použité SPF (bez špecifických patogénov) myši kmeňa BALB/c (♀, n = 96; Velaz, Praha, Česká republika). Počas celého experimentu boli zvieratá chované v gnotobiotických izolátoroch pre hľadavce THF 3315 (EHRET Labor-und Pharmatechnik GmbH Co.&KG, Emmendingen, Nemecko) a Single-tier CBC (CBC, Ltd., Madison, WI, USA). Všetky zvieratá podstúpili antibiotickú liečbu (*p.o.* amoxicilín/kyselina klavulánová a *s.c.* ciprofloxacín; 5 dní), po ktorej boli považované za pseudo *germ-free* (PGF). Následne boli myši rozdelené do troch skupín na základe spôsobu navodenia UC (5 dní): navodenie pomocou 5% roztoku DSS (DSS skupina, n = 24); navodenie pomocou FMT od darcu s UC (FMT skupina, n = 36); navodenie pomocou 5% roztoku DSS a simultánneho podávania UC FMT (DSS-FMT skupina, n = 36). Biologický materiál od pacienta s klinicky diagnostikovanou akútnou ulceróznou kolitídou

bol získaný v rámci výskumného projektu č. 14/2018/OVaV schválený Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach. Usmrteniu zvierat cervikálnou dislokáciou predchádzal odber krvi z retro-orbitálneho sínusu na hematologickú analýzu (BC-2008 VET, Mindray, Shenzhen, China). Hrubé črevo, Peyerove plaky (PP) a slezina boli spracované na bunkovú suspenziu a analyzované pomocou prietokového cytometra BD FACSCanto (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA). Časť tkaniva hrubého čreva bola použitá na získanie celkovej tkanivovej RNA. V priebehu experimentu bolo pravidelne zaznamenávané klinické skóre (konzistencia trusu, krvácanie z rekta a straty hmotnosti), na základe ktorého bol vypočítaný index aktivity ochorenia (DAI). V stanovených časových bodoch boli odobraté vzorky trusu, z ktorých bola izolovaná mikrobiálna DNA. 16S sekvenovanie, metagenomickú analýzu mikrobiálnej DNA a transkriptomickú analýzu tkanivovej RNA zabezpečila firma Novogene (Cambridge, UK). Dáta z ostatných analýz boli štatisticky spracované pomocou programu GraphPad Prism 9 (San Diego, CA, USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe analýzy klinického skóre sme zaznamenali významné rozdiely v klinickej forme UC medzi sledovanými skupinami. Podľa dosiahnutého DAI sme rozdelili klinickú formu UC na ľahkú ($DAI \leq 5$), strednú ($5,5 \leq DAI \leq 10$) a ťažkú ($10,5 \leq DAI$). Podávanie UC FMT vyvolalo len ľahkú formu kolitídy ($DAI_{max} = 2,5$). V skupinách DSS a DSS-FMT sme pozorovali stredne závažnú formu UC. V skupine DSS sme pozorovali signifikantne vyššie DAI skóre ako v skupine DSS-FMT ($p < 0,01$) a rýchlejší nástup stredne ťažkej formy kolitídy (tretí deň indukcie; v skupine DSS-FMT piaty deň indukcie). V skupine DSS-FMT simultánne podanie UC-FMT zmiernilo klinické príznaky pravdepodobne obohatením mikrobiómu, ktorý tvorí súčasť črevnej epitelovej bariéry a mechanicky sa podieľa na jej ochrane pred poškodením. Štúdie preukázali, že *germ-free* zvieratá mali po podaní DSS výraznejšie straty hmotnosti a krvácanie z rekta ako konvenčné zvieratá (Hernández-Chirlaque et al. 2016).

Medzi experimentálnymi skupinami sme nezaznamenali žiaden signifikantný rozdiel v sledovaných hematologických parametroch, rovnako ani po indukcii oproti dňu 0 (intaktné zvieratá – INT) (okrem mierneho zvýšenia počtu krvných doštičiek v skupine FMT oproti skupine DSS; $p < 0,05$).

Imunologickú odpoveď sme vyhodnocovali na základe porovnania zastúpenia jednotlivých populácií imunitných buniek v sekundárnych lymfatických orgánoch. Signifikantný nárast CD45+ populácie vo všetkých skupinách ($p < 0,0001$) sme zaznamenali len v sliznici čreva, pričom nárast bol najvyšší v skupine FMT. Podávanie UC FMT pravdepodobne viedlo k výraznej protilátkovej odpovedi, keďže v skupinách FMT a DSS-FMT sme zistili výrazný nárast populácie B-lymfocytov (B-ly) v slezine aj v PP ($p < 0,0001$). Populácia T-lymfocytov (T-ly) sa nezmenila v skupine FMT ani v jednom zo sledovaných sekundárnych lymfatických orgánov. Kým v skupine DSS-FMT sme sledovali nárast len v čreve ($p < 0,05$), v skupine DSS sa populácia zväčšila len v slezine ($p < 0,05$). Po indukovaní UC sme vo všetkých skupinách sledovali zvýšenie populácie neutrofilov ($p < 0,01$) a zníženie populácie makrofágov ($p < 0,05$) v tkanive hrubého čreva, čo je v súlade s predchádzajúcimi štúdiami (Hoffmann et al. 2018; Jones et al. 2018).

Podávanie UC FMT malo negatívny vplyv na črevnú epitelovú bariéru, keďže v skupinách FMT a DSS-FMT sme na základe analýzy diferenciálne exprimovaných génov zistili zníženie expresie génov *Cldn3*, *Cldn8*, *Tjp2*, *Tjp3* a *Ocln*. Štúdie potvrdzujú, že mikrobióm môže mať vplyv na zníženie expresie proteínov tesných spojení, čím narušuje integritu črevnej epitelovej bariéry (Muccioli et al. 2010). V skupine DSS sa po indukcii UC naopak zvýšila expresia génov *Cldn3*, *Cldn8*, *Cldn14*, *Tjp3*, *Ocln* a *F11r*.

Podávanie DSS malo negatívny vplyv na indexy druhovej diverzity ACE a chao1, ktoré sa znížili v skupinách DSS a DSS-FMT oproti INT ($p < 0,01$). Indukcia UC prostredníctvom UC FMT nevyvolala v skupine FMT signifikantné zmeny ACE a chao1, ale na druhej strane sme pozorovali zvýšenie indexov shannon a simpson ($p < 0,01$). Tieto výsledky je možné vysvetliť negatívnym vplyvom DSS na druhovú diverzitu a faktom, že intaktné zvieratá boli pseudo *germ-free*, teda podávanie FMT, nehl'adiac na jeho pôvod, očakávané viedlo k zvýšeniu diverzity mikrobiómu (Munyaka et al. 2016). Rôzne spôsoby indukcie UC vyvolali odlišné zmeny beta diverzity. Najmenej rozdielov sme pozorovali medzi skupinami DSS a DSS-FMT, ktoré sa líšili len v zastúpení čeľadi *Lachnospiraceae* a *Bacteroidaceae* ($p < 0,05$). Štúdia prináša cenné poznatky o úlohe mikrobiómu v patogenéze UC. Naše výsledky naznačujú, že dysbiotický mikrobióm narúša črevnú epitelovú bariéru a vyvoláva zápalovú imunitnú odpoveď, čo by mohlo byť spúšťačím mechanizmom UC.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola financovaná z grantového projektu VEGA 1/0015/21 a APVV- 22-0031.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Du L, Ha C. Epidemiology and Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *Gastroenterol Clin North Am.* 2020 Dec;49(4):643-654. doi: 10.1016/j.gtc.2020.07.005.
- Porter RJ, Kalla R, Ho GT. Ulcerative colitis: Recent advances in the understanding of disease pathogenesis. *F1000Res.* 2020 Apr 24;9:F1000 Faculty Rev-294. doi: 10.12688/f1000research.20805.1.
- Glassner KL, Abraham BP, Quigley EMM. The microbiome and inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol.* 2020 Jan;145(1):16-27. doi: 10.1016/j.jaci.2019.11.003.
- Kayama H, Okumura R, Takeda K. Interaction Between the Microbiota, Epithelia, and Immune Cells in the Intestine. *Annu Rev Immunol.* 2020 Apr 26;38:23-48. doi: 10.1146/annurev-immunol-070119-115104.
- Shen ZH, Zhu CX, Quan YS, Yang ZY, Wu S, Luo WW, Tan B, Wang XY. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol.* 2018 Jan 7;24(1):5-14. doi: 10.3748/wjg.v24.i1.5.
- Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2017 Sep 7;23(33):6016-6029. doi: 10.3748/wjg.v23.i33.6016.
- Hoffmann M, Schwertassek U, Seydel A, Weber K, Falk W, Hauschildt S, Lehmann J. A refined and translationally relevant model of chronic DSS colitis in BALB/c mice. *Lab Anim.* 2018 Jun;52(3):240-252. doi: 10.1177/0023677217742681.
- Hernández-Chirlaque C, Aranda CJ, Ocón B, Capitán-Cañadas F, Ortega-González M, Carrero JJ, Suárez MD, Zarzuelo A, Sánchez de Medina F, Martínez-Augustín O. Germ-free and Antibiotic-treated Mice are Highly Susceptible to Epithelial Injury in DSS Colitis. *J Crohns Colitis.* 2016 Nov;10(11):1324-1335. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw096.
- Jones GR, Bain CC, Fenton TM, Kelly A, Brown SL, Ivens AC, Travis MA, Cook PC, MacDonald AS. Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis. *Front Immunol.* 2018 Nov 27;9:2764. doi: 10.3389/fimmu.2018.02764.
- Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, Cani PD. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Mol Syst Biol.* 2010 Jul;6:392. doi: 10.1038/msb.2010.46.
- Munyaka PM, Rabbi MF, Khafipour E, Ghia JE. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice. *J Basic Microbiol.* 2016 Sep;56(9):986-98. doi: 10.1002/jobm.201500726.
- Vestergaard MV, Allin KH, Eriksen C, Zakerska-Banaszak O, Arasaradnam RP, Alam MT, Kristiansen K, Brix S, Jess T. Gut microbiota signatures in inflammatory bowel disease. *United European Gastroenterol J.* 2024 Feb;12(1):22-33. doi: 10.1002/ueg2.12485.
- Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, De Biasio F, Russo A, Cella E, Reddel S, Calabrese E, Biancone L, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M, Putignani L, Guarino MPL. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Front Microbiol.* 2019 Jul 17;10:1655. doi: 10.3389/fmicb.2019.01655.

ANGIOGÉNNY POTENCIÁL BIOMATERIÁLOV URČENÝCH PRE REGENERAČNÚ MEDICÍNU

Tirpáková Z.¹, Luptáková L.¹, Petrovová E.², Musílková J.³, Bačáková L.³

¹*Katedra biológie a fyziológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice*

²*Katedra morfológických disciplín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice*

³*Oddelenie biomateriálov a tkanivového inžinierstva, Fyziologický ústav Akadémie vied Českej republiky*

ABSTRAKT

Chorioalantoická membrána (CAM) kuracieho embrya predstavuje alternatívny model využívaný na testovanie angiogénneho potenciálu. Predkladaná štúdia sa zameriava na pozorovanie rozdielov v miere angiogenézy pri testovaní biomateriálov zložených z polylaktidu a polycaprolaktónu s odlišnými koncentraciami *Klucel* hydroxypropyl celulózy (10, 25, 50% w/w) v prítomnosti a neprítomnosti buniek v materiáli za účelom preskúmania ich schopnosti vaskularizácie. Biomateriály alebo komplexy bunka- biomateriál boli aplikované na CAM na 7. embryonálny deň (ED). Zmeny vaskulárneho indexu boli pozorované po 96h od aplikácie. Kolonizácia buniek a vznikajúce cievne systémy boli analyzované prostredníctvom konfokálnej mikroskopie. Testovaný biomateriál preukázal biokompatibilitu so živým tkanivom.

ÚVOD

Chorioalantoická membrána (CAM) kuracieho embrya je vysoko vaskularizovaná extraembryonálna membrána, ktorá zabezpečuje funkciu dýchania, kalciového transportu a acido-bázickej homeostázy (Ribatti, 2023). Kuracie embryo je imunodeficientné až do neskorších štádií vývinu, čo umožňuje aj transplantáciu medzidruhových tkanív (Chu a kol., 2022). CAM model je cenným nástrojom pre štúdium vrastania a distribúcie ciev a konštruktov používaných pre účely regeneračnej medicíny a pozorovanie zmien angiogenézy, ktorá ovplyvňuje priebeh hojenia rán, ako aj reakciu na mimotelový objekt (Aleem a kol., 2019; Ribatti a kol., 2020). CAM kuracieho embrya bola využitá na identifikovanie angiogénneho potenciálu inovatívnych biomateriálov určených pre regeneračnú medicínu.

MATERIÁL A METÓDY

Ex ovo CAM model

Oplozené kuracie vajíčka (*Gallus gallus domesticus*; Párovské Háje, Nitra, Slovensko) boli očistené 30% etanolom a v horizontálnej polohe vložené do inkubátora s konštantnou teplotou $37,5 \pm 0,5$ °C a 60% relatívnou vlhkosťou. Na 3. deň embryonálneho vývinu (ED3) boli vajíčka vydezinfikované 70% alkoholom a každé vajce bolo vyklopené do plastovej navažovačky. Embryá boli ďalej kultivované pri teplote $37,5 \pm 0,5$ °C a 70% relatívnej vlhkosti.

Biomateriál

Používané biomateriály pozostávali z kombinácie polylaktidu (PLA) a polykaprolaktonu (PCL) s odlišnými koncentraciami vo vode rozpustného derivátu celulózy *Klucel* hydroxypropyl celulózy (10, 25, 50% w/w) použitého v procese výroby, čo predstavuje rozdiely medzi biomateriálovými skupinami – 10, 25, 50.

Kultivácia buniek

Mezenchymové kmeňové bunky (MSCs) boli kultivované v kultivačnom médiu EGM-2 (Lonza) pri 37°C a 5% CO₂. Bunky boli nasadené na biomateriály 3 dni pred aplikáciou na

CAM. Biomateriály bez buniek boli 3 dni pred aplikáciou namočené v médiu EGM-2. Implantácia vzoriek prebehla na ED7 aplikáciou biomateriálu, prípadne komplexu bunka-biomateriál na CAM.

Vaskulárny index

Zmeny na CAM boli zachytené stereomikroskopom (Olympus SZ61; Olympus, Tokyo, Japonsko) a digitálnou kamerou PROMICAM 3-3CP (software QuickPHOTO MICRO 3.2, Praha, Česká republika). Fotografie boli ďalej analyzované programom IKOSA. Vyhodnocované boli parametre ciev a to celková oblasť ciev, celková dĺžka, priemerná hrúbka ciev a vetvenie.

Konfokálna mikroskopia

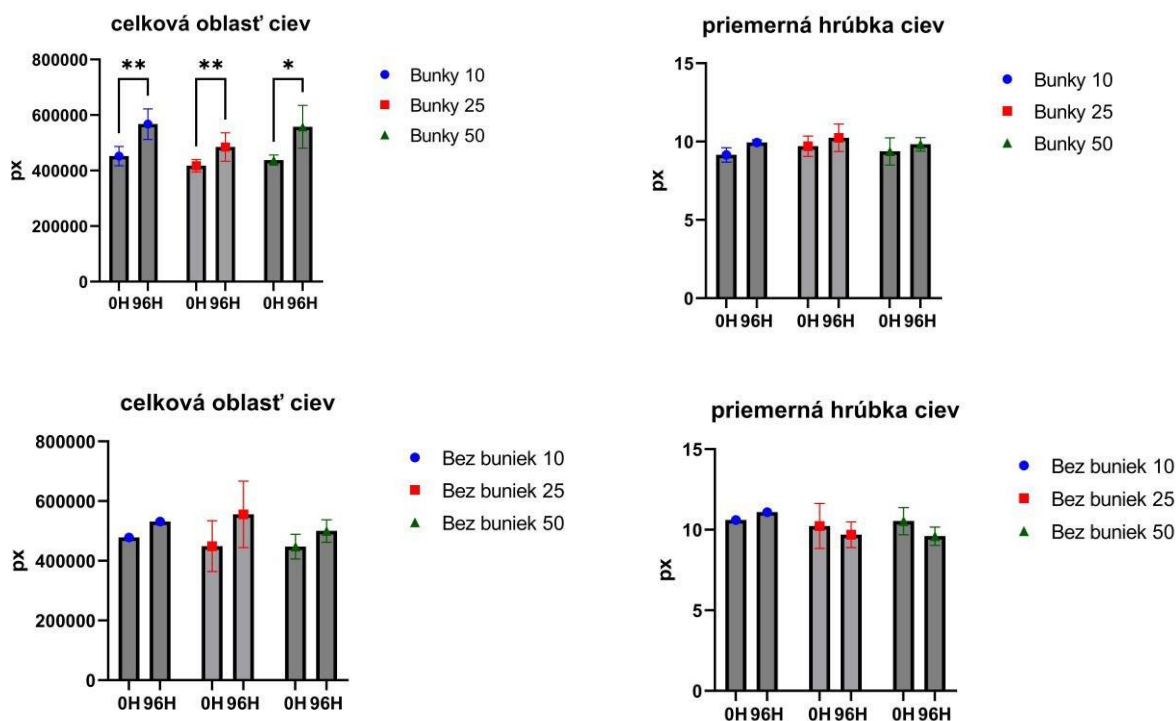
Vzorky boli vystrihnuté z CAM na ED4 alebo ED7. Implantáty boli následne zafixované v 4% paraformaldehyde. Kolonizácie buniek a vznikajúcich cievnych systémov bola vizualizovaná fluorescenčným farbením – faloidín a DAPI a detekovaná prostredníctvom konfokálnej mikroskopie (Andor Dragonfly 503).

Štatistické hodnotenie

Výsledky boli štatisticky vyhodnotené obojsmernou ANOVA za využitia programu GraphPad Prism 9.3.1 (GraphPad Software, LLC, San Diego, CA, USA).

VÝSLEDKY

Štatisticky významné zmeny boli pozorované v celkovej oblasti ciev v prítomnosti buniek. Napriek zvýšenému počtu ciev, priemerná hrúbka ciev sa v prítomnosti buniek nezmenila.



Obr. 1. Porovnanie celkovej oblasti ciev a priemernej hrúbky ciev v prítomnosti biomateriálu a komplexu biomateriál-bunka.

DISKUSIA

Model CAM kuracieho embrya predstavuje relatívne rýchly, lacný a efektívny model pre štúdium pro- angiogénnych a anti-angiogénnych faktorov (Kennedy a kol., 2021). Metóda CAM *ex ovo* môže byť efektívne využitá na predbežný skrining biomateriálov určených na klinické použitie (Kohli a kol., 2020). Výsledky naznačujú, že prítomnosť buniek v biomateriáli po 96h prispela k tvorbe hrubších ciev, čo je dôvodom pre nezmenené priemerné hrúbky ciev, napriek zvýšenej celkovej oblasti ciev. Predpokladáme, že neprítomnosť buniek vedie skôr tvorbe tenších ciev. Materiál preukázal biokompatibilitu s tkanivom a schopnosť integrácie.

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol podporený grantom Ministerstva zdravotníctva Českej Republiky (projekt No. NU20- 08-00208), projektom OP JAK No CZ.02.01.01/00/22_008/0004562, MŠMT v kooperácii s EU, projektom Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-20-0073 a projektom grantovej agentúry VEGA 1/0373/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane patient-derived xenograft (PDX) model, *Pathol Res Pract.* 2023; 243:154367.
- Chu PY, et al. Applications of the Chick Chorioallantoic Membrane as an Alternative Model for Cancer Studies, *Cells Tissues Organs.* 2022; 211:222-237.
- Aleem AR, et al. Amino acids loaded chitosan/collagen based new membranes stimulate angiogenesis in chorioallantoic membrane assay, *Int J Biol Macromol.* 2019; 140:401-406.
- Ribatti D, Annese T, Tamma R. The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials, *Microvasc Res.* 2020; 131: 104026.
- Kennedy DC, et al. Microvascular Experimentation in the Chick Chorioallantoic Membrane as a Model for Screening Angiogenic Agents including from Gene- Modified Cells, *Int J Mol Sci.* 2021; 23
- Kohli N, et al. Pre-screening the intrinsic angiogenic capacity of biomaterials in an optimised *ex ovo* chorioallantoic membrane model, *J Tissue Eng,* 2020; 11:2041731420901621.

VÝSKYT GÉNOV REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ A VIRULENTNÝCH FAKTOROV U STAFYLOKOKOV ANIMÁLNEHO PÔVODU

Zábolyová N.¹, Lauková A.¹, Troscianczyk A.², Pogány Simonová M.¹

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

²Prírodovedecká univerzita v Lubline, Fakulta veterinárskej medicíny, Oddelenie veterinárnej mikrobiológie, Lublin, Poľsko

ABSTRAKT

V rámci boja proti narastajúcej kríze antibiotickej rezistencie (AR) sme v minulom roku pomocou diskovej difúznej metódy otestovali citlivosť animálnych stafylokokových kmeňov voči meticilínu a jemu príbuzným antibiotikám (oxacilín, cefoxitín) a vytvorili súbor meticilín-rezistentných stafylokokov (MRS). V nadväznosti na tieto výsledky pre lepšie pochopenie mechanizmov vzniku tejto rezistencie bolo našim cieľom detegovať gény kódujúce AR u MRS, a u kmeňov *S. aureus* (MRSA), aj prítomnosť génov pre faktory virulencie pomocou PCR. Najvyššia prevalencia bola zaznamenaná v prípade génov *mecC* (detegovaný u 6 kmeňov MRS), *blaZ* (u 5 kmeňov) a *mecA* a *vanB* (u 4 kmeňov). Naopak, gény *ermB*, *cat(pC223)* a *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia* neboli detegované u žiadneho z testovaných kmeňov. Najvyšší počet génov spojených s AR bol zaznamenaný u kmeňov *S. warneri* R28/13 (*mecA*, *mecC*, *blaZ*, *msrA*, *vanB*), *S. aureus* R33/4 (*mecA*, *mecC*, *blaZ*, *ermC*) a *S. succinus* BD4-1 (*mecA*, *mecC*, *tetM*, *ermA*). Tieto výsledky poukazujú na variabilitu genetických mechanizmov rezistencie u jednotlivých kmeňov a zvýrazňujú potrebu ďalšieho výskumu na lepšie pochopenie a zvládnutie šírenia AR.

ÚVOD

Neustále vzrastajúca AR bola v roku 2019 Svetovou zdravotníckou organizáciou zaradená medzi desať najväčších hrozieb pre globálne zdravie. K získanej rezistencii dochádza, keď prirodzene vnímavé baktérie získajú gény kódujúce mechanizmus rezistencie prostredníctvom mutácie alebo prenosu genetického materiálu z iných baktérií rovnakého alebo iného druhu (Macgowan a Macnaughton, 2017). Zvýšenú pozornosť treba venovať najmä rezistencii na meticilín (MR), bez ohľadu na skutočnosť, že sa v zdravotníctve aktívne nepoužíva, pretože práve MRSA spôsobil v roku 2019 viac ako 100000 úmrtí (Murray a kol., 2022). Kmene MRSA obsahujú gén *mecA*, ktorý je prítomný na stafylokokovom kazetovom chromozóme *mec* (SCC*mec*) a kóduje proteíny viažuce penicilín 2a (PBP2a), čím vytvára nielen rezistenciu na meticilín, ale aj na ostatné širokospektrálne β-laktámové antibiotiká. Novší genetický determinant, *mecC*, vznikol mutáciami v *mecA* géne (Alghamdi a kol., 2023). Rovnako nebezpečná vankomycínová rezistencia bola detegovaná 30 rokov od prvého klinického použitia vankomycínu u rôznych druhov enterokokov, ako aj u kmeňov *S. aureus* (VRSA). VRSA môžu obsahovať rôzne gény rezistencie na vankomycín, ako sú gény *vanA* a *vanB*, ktoré môžu byť získané prostredníctvom plazmidu od enterokokov (Stogios a Savchenko, 2020). Široké spektrum stafylokokových infekcií je okrem vysokej schopnosti stafylokokov získavať AR podmienené aj prítomnosťou faktorov virulencie, ktoré napomáhajú baktériám rýchlejšie prilnúť na povrch (Haddad a kol., 2018). Preto našim cieľom bolo otestovať prítomnosť génov AR aj vybraných virulentných faktorov u MRS animálneho pôvodu.

METODIKA

V predchádzajúcom roku sme vytvorili súbor MRS (118), pričom 81 kmeňov bolo vybraných na detailnú PCR identifikáciu génov kódujúcich AR. Testovali sme prítomnosť génov kódujúcich rezistenciu na penicilín, oxacilín a meticilín (*mecA*; Oliveira a de Lencastre, 2002; *mecC*; Garcia-Alvarez a kol., 2011), β-laktamázy a makrolidy (*blaZ*, *msrA*; Martineau, 2000), erytromycín a klindamycín (*ermA*, *ermC*; Strommenger, 2003), tetracyklín (*tetK*, *tetL*, *tetM*; Aarestrup a kol., 2000), chloramfenikol (*cat(pC221)*, *cat(pC194)*, *cat(pC223)*; Schnellmann,

2006), aminoglykozidy (*aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia; van de Klundert a Vliegenthart, 2003), vankomycín (*vanA*, *vanB*; Depardieu a kol. 2004). MRSA kmene boli otestované aj na prítomnosť génov faktorov virulence: enterotoxíny (*seA*, *seB*, *seC*, *seD*, *seE*, *tsst*; Becker a kol., 1998), exfoliatívny toxín (*siet*; Lautz a kol. 2006), Panton-Valentine leukocidin faktor (*lukE-D*, *PVL*), hemolýziny α a β (*hla*, *hly*; Jarraud a kol., 2002). DNA z testovaných kmeňov MRS bola izolovaná a následne použitá v PCR reakcii (Techgene KRD; Techne, Veľká Británia). PCR produkty boli analyzované elektroforézou na 1% agarózovom géli. Vizualizácia sa uskutočnila pomocou GelDoc Go Imaging System (Bio-Rad Lab., USA).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najviac zastúpené boli gény *mecC* (u 7,4 % testovaných kmeňov), *blaZ* (6,2 %), *mecA*, *msrA* a *vanB* (5,0 %) a *ermC* (3,7 %). Gény *tetK* a *tetM* sa vyskytovali u 2,5 % kmeňov, *vanA*, *tefL*, *ermA*, *cat(pC221)* a *cat(pC194)* len u 1,2 % MRS. Gény *cat(pC223)* a *aac(6')-Ie-aph(2'')*-Ia neboli detegované ani v jednom prípade. Detailnejšie výsledky sú uvedené v tabuľke 1.

Gény	<i>S. equorum</i> (12)	<i>S. warneri</i> (10)	<i>S. vitulinus</i> (9)	<i>S. succinus</i> (9)	<i>S. aureus</i> (9)	<i>S. xylosus</i> (8)	<i>S. hominis</i> (7)	<i>S. pasteurii</i> (3)	<i>S. condimentii</i> (2)	<i>S. haemolyticus</i> (2)	<i>S. colnii</i> (2)	<i>S. sciuri</i> (2)	<i>S. epidermidis</i> (2)	<i>S. simulans</i> (1)	<i>S. capitis</i> (1)	<i>S. spp.</i> (1)
<i>mecC</i>		1	2	1	1	1										
<i>mecA</i>		1		1	1	1										
<i>blaZ</i>		1	1		3											
<i>ermA</i>				1												
<i>ermC</i>	1				1											1
<i>msrA</i>		2						1			1					
<i>tetK</i>						1					1					
<i>tefL</i>												1				
<i>tetM</i>				1						1						
<i>cat (pC221)</i>														1		
<i>cat (pC194)</i>									1							
<i>cat (pC223)</i>																
<i>aac(6')-Ie-aph(2'')</i> -Ia																
<i>vanA</i>								1								
<i>vanB</i>		1		2				1								

Tab.1. Zastúpenie génov

Fenotypické testovanie je rýchlou a praktickou metódou na stanovenie AR, ale nemusí vždy presne odrážať prítomnosť genetických markerov rezistencie. Naše výsledky tiež potvrdzujú nízku prevalenciu génov kódujúcich MR, keďže u fenotypicky pozitívnych MRS sme detegovali gén *mecC* iba v necelých 8,0 % prípadov, *mecA* u 5,0 % a *blaZ* len u 6,2 % testovaných kmeňov, na rozdiel od iných štúdií (Aires de Souza, 2017). Kým rezistencia na vankomycín bola fenotypovo zaznamenaná až u 81,5 % kmeňov a 13,5 % kmeňov sa považovalo za intermediárne rezistentné, gény kódujúce rezistenciu na vankomycín boli detegované len u niekoľkých kmeňov (5,0 % pre *vanB* a 1,2 % pre *vanA*); je to výrazne nižší výskyt génov *vanA* a *vanB* u stafylokokov animálneho pôvodu ako to uvádzajú iné štúdie (Al-Amery a kol., 2019). Táto disproporcja medzi fenotypovým a genotypovým prejavom môže naznačovať, že u fenotypovo rezistentných kmeňov sa rezistencia môže prejavovať inými mechanizmami, ktoré nesúvisia priamo s prítomnosťou génov rezistencie, resp. mohla fenotypizácia zachytiť dočasnú alebo neúplnú expresiu rezistencie. Rovnaký prípad pravdepodobne nastal aj v prípade génu *hla* (potvrdené len u 2 kmeňov MRSA), kým na agare

s 5 % obsahom baranej krvi bola zaznamenaná až v 50,0 % prípadoch. Gény *LukE-D* sa detegovali len u 3 kmeňov. Získané výsledky však poukazujú na fakt, že animálne kmene MRS môžu byť potenciálnym rizikom a rezervoárom meticilínovej rezistencie pre ľudí.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektami Doktgrant APP0464 a VEGA 2/0005/21.

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aarestrup FM, et al. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. *Vet Microbiol.* 2000, 74:353-364.
- Aires De Sousa M, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clin Microbiol Inf.* 2017; 23(6):373-80.
- Al-Amery K, et al. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from camel meat and slaughterhouse workers in Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2019;8:129.
- Alghamdi A.B, et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Saudi J Biol Sci.* 2023; 30(4):103604.
- Becker K, et al. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(9):2548-2553.
- Depardieu F, et al. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5857-60.
- Garcia-Alvarez L, et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11:595-603.
- Haddad O, et al. Comparative study of virulence factors among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *BMC Infect Dis.* 2018; 18(560):1-8.
- Jarraud S, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infection Immunity* 2002; 70(2):631-41.
- Lautz S, et al. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. *J Vet Med Series B.* 2006; 53(9):434-8.
- Macgowan A, Macnaughton E, Antibiotic resistance. *Medicine.* 2017; 45(10):622-28.
- Martineau F, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44:231-8.
- Murray CJL, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet.* 2022; 399(10325):629-55.
- Oliveira DC, de Lencastre H. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:2155-61.
- Schnellmann C, et al. Presence of new *mecA* and *mph(C)* variants conferring antibiotic resistance in *Staphylococcus* spp. isolated from the skin of horses before and after clinic admission. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:4444-54.
- Stogios P, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Prot Sci.* 2020; 29(3): 654-69.
- Strommenger B, et al. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of 9 clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4089-94.
- van de Klundert JAM, Vliegenthart JS, PCR detection of genes for aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persing DH et al., *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*, 1993, 547-552. Am Soc Microbiol. Washington D.C.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2024
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XIX. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2024

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 978-80-974246-6-4

ISBN 978-80-974246-6-4