ÚSTAV FYZIOLÓGIE HOSPODÁRSKYCH ZVIERAT

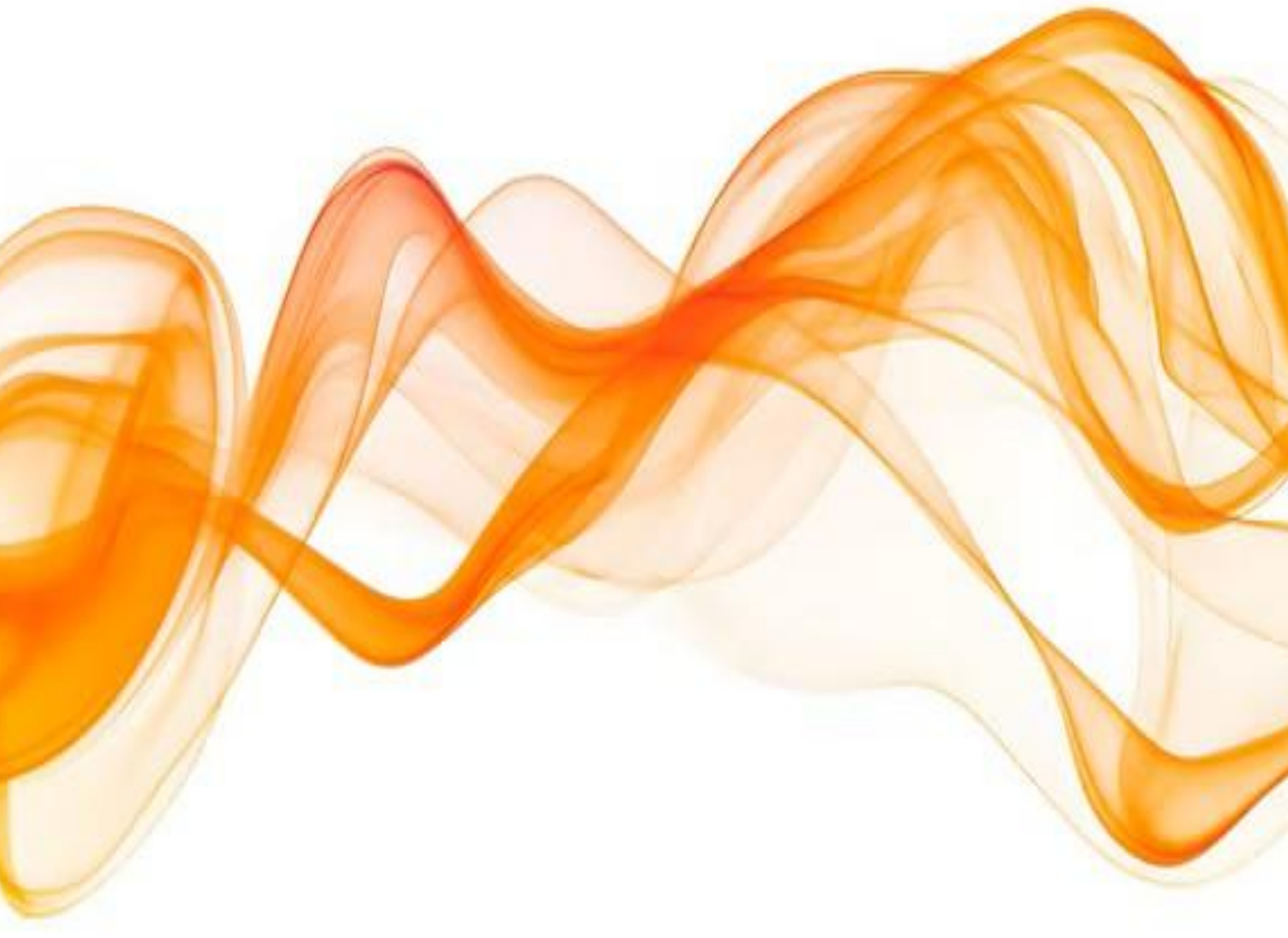
CENTRUM BIOVIED SLOVENSKÁ AKADÉMIA VIED

VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2026

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu

XXI. ročník

Košice, 12. a 13. november 2026



VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2026

Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu

XXI. ročník

Košice, 12. a 13. november 2026

Zborník príspevkov prihlásených na Seminár doktorandov venovaný pamiatke akademika Boďu
12. a 13. november 2026
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:
MVDr. Monika Drážovská, PhD.
RNDr. Petra Schusterová, PhD.

Organizačný a programový výbor:
MVDr. Dušan Fabian, DrSc., ÚFHZ CBv SAV
doc. MVDr. Jana Koščová, PhD., UVLF v Košiciach
RNDr. Veronika Kovaříková, PhD., ÚFHZ CBv SAV

Neprešlo jazykovou úpravou





ÚSTAV
FYZIOLÓGIE
HOSPODÁRSKYCH
ZVIERAT



CENTRUM
BIOVIED
SLOVENSKÁ
AKADÉMIA VIED



OBSAH

VPLYV OBOHATENIA DIÉTY MÚČKOU Z ĽANIČNÍKA SIATEHO NA REPRODUKČNÉ PARAMETRE SAMÍC MYŠÍ VO VYŠŠOM VEKU
Andráš M., Babeľová J., Šefčíková Z., Špirková A., Kovaříková V., Pisko J., Čikoš Š., Fabian D. 9
HYBRIDNÉ HYDROGÉLY: FUNKČNÉ MATERIÁLY PRE BIOMEDICÍNSKE APLIKÁCIE
Bíró T., Šipošová K., Humenik M.....12
POHLAVIE DARCU AKO MOŽNÝ FAKTOR BEHAVIORÁLNEJ ODPOVEDE NA TRANSPLANTÁCIU ČREVNEJ MIKROBIOTY V MODELI PAS
Bojčuková V., Ryniková M., Demečková V., Gašperíková G., Gancarčíková S., Lauko S. 15
TKANIVOVO ŠPECIFICKÉ ZMENY V KONCENTRÁCII MIKROELEMENTOV A METALOPROTEÍNOV U JAHNIAT PRIJÍMAJÚCICH RÔZNE DÁVKY NANOČASTÍC ZnO
Bombárová A., Takácsová M., Čobanová K. 18
CHARAKTERIZÁCIA PRIMÁRNEJ KULTÚRY Z NÁDORU MLIEČNEJ ŽĽAZY PSA
Čobejová S., Nosálová N., Huniadi M., Kešeľáková A., Kalinaj B., Čížková D.....21
ZMENY KONCENTRÁCIE GLP-1 V PLAZME PRASIATOK POČAS SKORÉHO POSTNATÁLNEHO OBDOBIA
Čulka Ľ., Novotný J., Lešková L., Krepelková Z. 24
VÝSKYT A NOSIČSTVO VANKOMYCÍN-REZISTENTNÝCH ENTEROKOKOV U PACIENTOV S *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFEKCIOU
Droppová L., Čurová K., Slebodníková R. 27
VPLYV METABOLIZMU KYSELINY HYALURÓNOVEJ NA RECEPTIVITU ENDOMETRIA A IMPLANTÁCIU EMBRYA
Fabianová N., Kriváková E. Rabajdová M. ……..…….....30
MULTIOMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA TRANSPLANTÁTOV POHLAVNE ŠPECIFICKEJ FEKÁLNEJ MIKROBIOTY OD ZDRAVÝCH DETÍ A DETÍ S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA
Farkašová S., Gancarčíková S., Demečková V., Ryniková M.,Lauko S., Spišáková D., Šmajda Rodáková K. , Strompfová V. , Petrovová E., Sashova Tomova A., Rašková B., Ostatníková D. 33
HLODAVCE AKO POTENCIÁLNY PRAMEŇ ZOONOTICKÝCH PROTOZOÍ
Fedorková B., Štrkolcová G., Schreiberová A., Halán M., Petroušková P. 36
PREVALENCIA *BABESIA, RICKETTSIA* A *ANAPLASMA* U KLIEŠŤOV *DERMACENTOR* SP. NA VYBRANÝCH LOKALITÁCH SLOVENSKA
Fencáková E., Majláth I., Peťko B., Janík J., Majláthová V. 39
CYTOGENETICKÁ ANALÝZA MONOZOICKEJ PÁSOMNICE *KHAWIA JAPONENSIS*
Gašparovičová R., Orosová M., Fečová Z.. 42
TAXONOMICKÁ ANALÝZA BAKTERIÁLNEJ MIKROBIOTY KOŽE KLINICKY ZDRAVÝCH KONÍ POMOCOU MALDI-TOF SPEKTROMETRIE A *16S rRNA* SEKVENOVANIA
Gondoľová D., Štempelová L., Strompfová V. 45
VYUŽITIE KOMBINOVANÝCH INTERAKCIÍ BIOGÉNNYCH NANOČASTÍC A ÉTERICKÉHO OLEJA *SALVIA ROSMARINUS* NA POTENCIÁCIU ÚČINKU AMPICILÍNU VOČI MULTIREZISTENTNÉMU *STAPHYLOCOCCUS EQUORUM*
Hisirová S., Hudecová P., Hajdučková V., Dančová N., Mačák L., Koščová J., Király J.....48
HODNOTENIE ANTIOXIDAČNÉHO STATUSU U KONÍ NA ZÁKLADE VYBRANÝCH BIOMARKEROV
Hoppejová T., Zigo F., Récky A., Tvrdá A. 51
VPLYV WI-FI ŽIARENIA NA VÝVOJ MESONEFROS U 9-DŇOVÉHO KURACIEHO EMBRYA
Hudáková P., Almášiová V.....54

ANALÝZA REFRAKČNÝCH CHÝB U PSOV
Imrichová A., Trbolová A., Balicka A., Zwolska Z. 57
VZŤAH KONCENTRÁCIE SÉROVÉHO HAPTOGLOBÍNU V NEONATÁLNOM OBDOBÍ K NÁSLEDNÉMU VÝSKYTU OMFALITÍDY U TELIAT
Ješík J., Mudroň P., Tóthová C., Oršuľaková V. 60
IZOLÁCIA A FENOTYPOVÁ CHARAKTERIZÁCIA PRIMÁRNYCH CHONDROCYTOV PRE 2D MODELOVÉ SYSTÉMY V *IN VITRO* PODMIENKACH
Kalinaj B., Kolibárová K., Nosálová N., Huniadi M., Čížková D. 63
PRÍPRAVA ALOGÉNNEHO DEMINERALIZOVANÉHO KOSTNÉHO MATRIXU PSA A HODNOTENIE JEHO CYTOKOMPATIBILITY XTT TESTOM
Kolibárová K., Kalinaj B., Čížková D., Trbolová A., Hluchý M.....66
INTERAKCIE STRIEBORNÝCH KOMPLEXOV S BIOMOLEKULAMI A ICH BIOLOGICKÝ POTENCIÁL
Kollárová L., Sabolová D..... 69
FAKTORY PROSTREDIA A ICH ÚLOHA PRI VÝSKYTE A DRUHOVOM ZLOŽENÍ RODU *EIMERIA* U BROJLEROVÝCH KURČIAT VO VEĽKOCHOVOCH. Kováčová K., Blahút S, Syrota Y., Hurníková Z.....72
ÚLOHA HYPOXIE, ANGIOGENÉZY A MITOCHONDRIÁLNEJ REGULÁCIE V PATOLOGICKÝCH MODELOCH ENDOMETRIA
Kováčová G., Tóthová I., Artimovič P., Mareková M., Rabajdová M.....75
HODNOTENIE VASKULÁRNYCH ÚČINKOV JEDU HADA DRUHU *NAJA ARABICA* POMOCOU MODELU CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY KURACIEHO EMBRYA
Krúpa A. ,Petrilla V., Polláková M., Petrovová E., Sopková D., Legáth J.....78
NUTRIČNÉ STRATÉGIE ZNIŽOVANIA EMISIÍ SKLENÍKOVÝCH PLYNOV A KONTROLY ENDOPARAZITÓZ U MALÝCH PREŽÚVAVCOV
Leško M., Petrič D., Váradyová Z. 81
HODNOTENIE KOGNITÍVNYCH FUNKCIÍ U PSOV PLEMIEN SEKCIE RETRÍVER POMOCOU BEHAVIORÁLNYCH TESTOV
Mezníková S., Konečný M., Kottferová J.....84
HISTIDÍNOM MODIFIKOVANÝ UIO-66(ZR)-NH_2 AKO NOSIČ PRE KOMBINOVANÚ CHEMO-FOTODYNAMICKÚ TERAPIU 5-FLUOROURACILOM A METYLÉNOVOU MODROU
Migasová A., Tomková S., Zelenka T., Zelenková G., Huntošová V., Almáši M.....87
SLEDOVANIE DYNAMIKY ZMIEN V BIELKOVINOVOM PROFILE KRVNÉHO SÉRA A VYBRANÝCH ZÁPALOVÝCH PARAMETROV POČAS TERAPIE HNAČKY TELIAT
Oršuľaková V., Ješík. J. , Tóthová C.....90
EXPRESIA VYBRANÝCH ACETYLCHOLÍNOVÝCH NIKOTÍNOVÝCH RECEPTOROV V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH
Rušinová L., Špirková, A. Kovaříková, V., Šefčíková, Z. , Pisko, J.,Babeľová J., Fabian, D., Čikoš, Š. 93
ICHTYOPARAZITOLOGICKÝ PRIESKUM V POVODÍ RIEKY DUNAJ SO ZAMERANÍM NA ZOONOTICKÉ DRUHY HELMINTOV
Salonová S., Barčák D. , Kiššová A., Orosová M., Oros M.....96
GENOTOXICKÉ A CYTOTOXICKÉ PÔSOBENIE MIKONAZOLU NA BOVINNÉ LYMFOCYTY
Sedláková S., Schwarzbacherová V., Galdíková M., Halušková J., ...99
PREDBEŽNÉ HODNOTENIE VPLYVU DOPLNKOVEJ VÝŽIVY NA NOZEMATÓZU VČELSTIEV
Szabó I., Sabo R., Staroň M. Sabová L., Sabolová B., Sučik M. 102
VPLYV PREINKUBÁCIE VAJEC NA EXPRESIU ADIPONEKTÍNU V RÔZNYCH ORGÁNOCH KURACIEHO EMBRYA
Štefancová S., Pokorná B., Petrovová E., Luptáková L. 105
EKTOPARAZITY Z ČEĽADE OVADOVITÝCH (DIPTERA: TABANIDAE)
Švirlochová K. M., Víchová B., Oboňa J., Csanády A., Manko P., Tkoč M., Dvořák L., Stanko M., Vargová L., Blažeková V., Zubriková D. 108

TRANSKRIPTOMICKÁ ANALÝZA PERIFÉRNEJ KRVI PO VZDIALENOM POSTKONDICIONOVANÍ
Urbanová A., Berecká J., Kecerová Z., Mucha R. 111
VYUŽITIE KURACIEHO MODELU *EX VIVO* NA HODNOTENIE SLIZNIČNEJ IMUNITNEJ ODPOVEDE NA RÔZNE KONCENTRÁCIE *SAMONELLA ENTERITIDIS*
Vinclérová V., Kiššová Z., Karaffová V. 114
VYUŽITIE REGENERAČNEJ MEDICÍNY PRI TERAPII POŠKODENÉHO TKANIVA U PSOV S CHOROBAMI CHRBTICE A MIECHY V KLINICKEJ PRAXI
Zelezník P., Kuricová M.....117

VPLYV OBOHATENIA DIÉTY MÚČKOU Z ĽANIČNÍKA SIATEHO NA REPRODUKČNÉ PARAMETRE SAMÍC MYŠÍ VO VYŠŠOM VEKU

András M.[1,2], Babeľová J.[1], Šefčíková Z.[1], Špirková A.[1], Kovaříková V.[1], Pisko J.[1], Čikoš Š.[1], Fabian D.[1]

[1]*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Slovenská akadémia vied, Šoltésovej 4-6, Košice*

[2]*Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice*

ABSTRAKT

Vyšší vek matky predstavuje dôležitý obmedzujúci faktor v reprodukcii cicavcov často spájaný s nižším počtom oocytov, slabšou mitochondriálnou aktivitou, a zníženou schopnosťou embryogenézy. Predpokladá sa, že omega-3 mastné kyseliny pôsobia proti vekovo podmieneným zhoršeniam posilnením antioxidačnej kapacity mitochondrií.

Cieľom tohto experimentu bolo overiť, či 4-týždňová suplementácia krmiva múčkou z ľaničníka siateho (*Camelina sativa*), ktorý je ekonomicky rentabilný zdroj potravy s vysokým obsahom kyseliny alfa-linolénovej, môže zmierniť pokles reprodukčných schopností podmienených vekom. Samiciam myší keňa CD-1 vo veku 6 mesiacov sme podávali štandardné krmivo s prímesou alebo bez prímesy ľaničníkovej múčky (200 mg ALA/kg telesnej hmotnosti, *ad libitum*, 4 týždne). Na začiatku a na konci experimentu sme merali telesnú hmotnosť a množstvo telesného tuku pomocou analyzátora celotelovej magnetickej rezonancie Echo MRI-700. Po synchronizácii ovulácie a párení sme na štvrtý deň gravidity izolovali embryá, ktoré sme podrobili stereomikroskopickému hodnoteniu. Fluorescenčnou analýzou sme hodnotili kvalitu získaných blastocýst. Hodnotili sme tiež hladiny estradiolu a progesterónu v krvnom sére.

V experimentálnej skupine sme zaznamenali vyššiu telesnú hmotnosť a vyššie množstvo telesného tuku v porovnaní s kontrolnou skupinou. Hladiny estradiolu ani progesterónu nevykazovali štatisticky významné rozdiely medzi skupinami ($P>0,05$). Suplementácia múčky z ľaničníka nemala vplyv na distribúciu embryonálnych štádií medzi skupinami ($P>0,05$). Blastocysty získané z experimentálnych samíc obsahovali nižší celkový počet blastomér ($P<0,0001$). U blastocýst, pri ktorých sme našli aspoň jednu apoptotickú bunku sa apoptotický index medzi skupinami významne nelíšil ($P>0,05$). Vzhľadom na fakt, že tento experiment predstavuje prvú replikáciu, nie je možné vyvodiť žiadne definitívne závery o vplyve obohatenia stravy ľaničníkovou múčkou na starnutie. Na potvrdenie týchto predbežných zistení sú potrebné ďalšie, rozsiahlejšie experimenty.

ÚVOD

Starnutie je u cicavcov kľúčovým ukazovateľom reprodukcie. Vysoký vek matky negatívne ovplyvňuje kvalitu a kvantitu oocytov, embryonálny vývin a priebeh gravidity nielen u žien, ale aj u hospodárskych a spoločenských zvierat (Cimadomo a kol., 2018). Oocyty, ktoré sa ovulujú v neskoršom veku, obsahujú menej mitochondrií, čo znižuje produkciu ATP a zvyšuje oxidačný stres (Wang a kol., 2025). Zdokumentovaná je tiež asociácia s nižšou mierou oplodnenia, častejšími genetickými abnormalitami a zníženou hormonálnou citlivosťou reprodukčných tkanív (Ye a kol., 2023). Embryonálny vývin je priamo závislý od mitochondriálnej aktivity a vyžaduje si veľké množstvo energie. Vyšší vek matky/samice má preto potenciál spomaliť bunkový cyklus, oneskoriť ryhovanie a narušiť blastuláciu (Grøndahl a kol.., 2017). S vekom klesá aj hormonálna sekrécia, ktorá môže oslabiť endometrium (Plant a kol., 2020). Otázka vplyvu veku na reprodukčné poruchy je relevantná hlavne v chove dobytka. Väčšina reprodukčných zlyhaní v chovoch sa však vyskytuje skôr, než sa vek stane možnou hlavnou príčinou vyraďovania zvierat. De Souza a kol. (2023) zistili, že reprodukčné zlyhania predstavovali takmer štvrtinu všetkých dôvodov vyraďovania spomedzi 3 miliónov dojníc, čo prevyšovalo počet vyradení z dôvodu nízkej produkcie mlieka alebo zdravotných problémov. Podobný trend bol zaznamenaný aj u ošípaných (Engblom a kol., 2007). Ani úspešná inseminácia však nezaručuje graviditu, a jej miera zvyčajne dosahuje 40 až 50 % (Diskin a kol., 2016). K väčšine strát dochádza ešte pred implantáciou embryí do steny maternice (Wiltbank a kol., 2016). Jednou možnou príčinou je

dysfunkcia žltého telieska, ktorá vedie ku väčšine strát embryí u hovädzieho dobytka (Domingues a kol., 2023). N-3 mastné kyseliny dokážu zvýšiť antioxidačnú kapacitu mitochondrií o 50 až 70% (Xiao a kol., 2022), čo predstavuje možný spôsob, ako zabrániť ich úbytku súvisiacemu s vekom. Na rozdiel od n-6 mastných kyselín potláčajú syntézu prostaglandínu F2α, ktorý spôsobuje regresiu žltého telieska (Gulliver a kol., 2012). Strava bohatá n-3 mastné kyseliny by teda mohla pomôcť kompenzovať vplyv starnutia na plodnosť. Doplňanie stravy veľkým množstvom purifikovaných n-3 mastých kyselín je nákladné. Lacnejšou alternatívou preto môže byť vedľajší produkt extrakcie oleja z ľaničníka siateho (*Camelina sativa*). Ľaničník je dnes na Slovensku málo rozšírenou olejnatou plodinou, má však druhý najvyšší obsah kyseliny alfa-linolénovej (ALA) spomedzi všetkých olejnín hneď po ľane (Abramović a kol., 2005), ktoré si zachováva aj po lisovaní (Juodka a kol., 2023). Vyžaduje si tiež menej hnojív, má kratšie vegetačné obdobie a znáša sucho a mrazy lepšie ako väčšina podobných plodín, čo je dôvodom, prečo sa pestuje ako medziplodina v Poľsku a západnej Európe (Bujnovský a kol., 2020).

MATERIÁL A METODIKA

Experimenty boli vykonané v nadväznosti na štúdiu na myšiach v post-pubertálnom veku (Babeľová 2025). Do prezentovaného experimentu boli zaradené myši vo veku 6 mesiacov, tzn. v čase po dosiahnutí reprodukčného vrcholu, no zároveň pred nástupom obdobia nezvratnej neplodnosti. Samice myší (outbredný kmeň CD-1) boli rozdelené do dvoch skupín: experimentálnej a kontrolnej. Myši v experimentálnej skupine boli kŕmené štandardnou stravou doplnenou o ľaničníkovú múčku v dávke 200 mg ALA/kg telesnej hmotnosti. Myši v kontrolnej skupine dostávali štandardnú laboratórnu stravu bez prímesi. Obidve skupiny boli kŕmené *ad libitum* počas štyroch týždňov. Na začiatku a na konci tohto obdobia sa stanovil celkový telesný tuk pomocou celotelovej magnetickej rezonancie Echo MRI-700. Po štyroch týždňoch sa ovulácia synchronizovala pomocou Whittenovho efektu, pri ktorom sú samice vystavené podstielke od samcov, po čom nasledovalo párenie. Prítomnosť vaginálnej zátky označovalo prvý deň gravidity. Oplodnené samice boli utratené na štvrtý deň gravidity. Samiciam myší bola odobratá krv na sérovú analýzu koncentrácií estradiolu a progesterónu. Embryá sa získali prepláchnutím vajcovodov a rohov maternice médiom FHM+BSA. Následne boli vyšetrené stereomikroskopicky (určenie počtov a dosiahnutého štádia vývinu) a fixované v 1% roztoku PFA na ďalšiu analýzu. V mikroplatničkách boli fixované embryá podrobené fluorescenčnému farbeniu pomocou Hoechst 33342 na vizualizáciu celkového počtu jadier, imunohistochemickej analýze zloženej na použití protilátky proti CDX2 na rozlíšenie trofoektodermu od embryoblastu, a TUNEL farbeniu na detekciu apoptických buniek. Po ukončení kombinovaného farbenia boli embryá analyzované prostredníctvom fluorescenčného mikroskopu s cieľom určiť celkový počet buniek, pomer buniek trofoektodermu a embryoblastu, a frekvenciu apoptózy. Získané dáta boli analyzované v programe Graphpad Prism 11.1.0. Vzhľadom na časovú náročnosť bol experiment zatiaľ vykonaný iba v jednom opakovaní.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Štatistická analýza ukázala, že u samíc v kontrolnej skupine sa po zaradení do experimentu a mesačnom skrmovaní štandardnej diéty znížila telesná hmotnosť, zatiaľ čo u samíc z experimentálnej skupiny kŕmenej obohatenou diétou došlo k zvýšeniu telesnej hmotnosti (-1,80±0,60 g vs. 1,37±0,57 g; $P<0,001$). Podobný charakter sme zaznamenali aj v množstve telesného tuku (meraného v gramoch aj v % telesnej hmotnosti). V kontrolnej skupine sme zaznamenali úbytok množstva telesného tuku v porovnaní s experimentálnou skupinou (medián -3,17%, IQR: -5,53 až 0.37 vs. 0,63%, IQR: -0,98 až 2,37; $P<0,001$). Naše výsledky sú v rozpore so zisteniami štúdie od Wakefield a kol. (2007), ktorá využila podobný dizajn experimentu (myši kŕmené 30 dní diétou obohatenou o EPA a DHA). V tejto štúdii neboli zaznamenané významné zmeny v telesnej hmotnosti ani v množstve telesného tuku. Naopak, Tejera a kol. (2016) zaznamenali, že u myší (kmeň C57BL/6) kŕmených 10 týždňov ľaničníkovým olejom obohateným o EPA spôsobila diéta zvýšenie telesnej hmotnosti. Tieto zistenia sú v súlade s

našimi výsledkami. Na rozdiel od niektorých štúdií (napr. Al-Safi a kol. 2016), ktoré uvádzajú, že príjem n-3 mastných kyselín napomáha zvýšiť sekréciu progesterónu a estradiolu, ukazujú naše výsledky štatisticky nevýznamný trend v opačnom smere pri oboch parametroch (P>0,05). Analýza kategorickej distribúcie vývinových štádií u izolovaných embryí nepreukázala významné rozdiely medzi skupinami. Izoláty z oboch skupín predstavovali prevažne neskoršie embryonálne štádiá ako moruly a blastocysty (CTRL 98,51% vs. EXP 95,74%; P>0,05). Tieto výsledky korelujú z predchádzajúcimi experimentami na postpubertálnych samiciach kŕmených diétou s prídavkom múčky z ľaničníka po dobu 2 týždňov (Babeľová a kol., 2025-abstrakt). Embryá, ktoré dosiahli štádium blastocysty v kontrolnej skupine, mali štatisticky významne vyšší počet blastomér v porovnaní s blastocystami z experimentálnej skupiny (medián 59,00, IQR: 53,00 až 62,00 vs. 50,50, IQR: 41,50 až 56,00; P<0,0001). Podobne ako Babeľová a kol. (2025-abstrakt) u blastocýst pochádzajúcich z experimentálnej skupiny samíc kŕmených diétou s prídavkom múčky z ľaničníka sme zaznamenali mierne zníženú incidenciu apoptotických buniek (CTRL 2,78±0,34 vs. EXP 2,40±0,25; P>0,05). Výsledky však neboli štatisticky významné.

POĎAKOVANIE: Táto štúdia bola financovaná z grantového projektu APVV 22-0071.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ABRAMOVIČ, H. a ABRAM, V. Physico-Chemical Properties, Composition and Oxidative Stability of Camelina sativa Oil. *Food Technology and Biotechnology*. 2005, 43(1), 63-70. Dostupné z: https://hrcak.srce.hr/110424

AL-SAFI, Z. A. a kol. Omega-3 Fatty Acid Supplementation Lowers Serum FSH in Normal Weight But Not Obese Women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016, 101(1), 324-333. Dostupné z: doi:10.1210/jc.2015-2913

BABEĽOVÁ, J. a kol. The effect of diet supplementation by Camelina Cake on mouse preimplantation development in vivo – preliminary results. *Animal Biotechnology 2025: Winter School. Programme and Abstracts. Nitra: Slovak* University of Agriculture in Nitra, 2025, s. 42. ISBN 978-80-552-2829-7. Dostupné z: *https://doi.org/10.15414/2025.9788055228303*

BUJNOVSKÝ, R. a kol. Spring Camelina sativa – Perspective cultivation as biofuel feedstock in Slovakia. *Industrial Crops and Products*. 2020, 154, 112634. Dostupné z: doi:10.1016/j.indcrop.2020.112634

CIMADOMO, D. a kol.. Impact of maternal age on oocyte and embryo competence. *Frontiers in Endocrinology*. 2018, 9, 327. Dostupné z: doi:10.3389/fendo.2018.00327

DE SOUZA, T. C. a kol. A comprehensive characterization of longevity and culling reasons in Canadian Holstein cattle based on various systematic factors. *Translational Animal Science*. 2023, 7(1), txad102. Dostupné z: doi:10.1093/tas/txad102

DISKIN, M. G. a kol. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reproduction, Fertility and Development*. 2016, 28(2), 83-93. Dostupné z: doi:10.1071/RD15366

DOMINGUES, R. R. a kol. Is pregnancy loss initiated by embryonic death or luteal regression? Profiles of pregnancy-associated glycoproteins during elevated progesterone and pregnancy loss. *JDS Communications*. 2023, 4(2), 149-154. Dostupné z: doi:10.3168/jdsc.2022-0282

ENGBLOM, L. a kol. Factors affecting length of productive life in Swedish commercial sows. *Journal of Animal Science*. 2008, 86(2), 432-441. Dostupné z: doi:10.2527/jas.2007-0310

GRØNDAHL, M. L. a kol. Effect of women's age on embryo morphology, cleavage rate and competence—A multicenter cohort study. *PLOS ONE*. 2017, 12(4), e0172456. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0172456

GULLIVER, C. E. a kol. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Animal Reproduction Science*. 2012, 131(1-2), 9-22. Dostupné z: doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.002

JUODKA, R. a kol. Effects of dietary hempseed or camelina cakes on fatty acid composition of quail meat. *Life*. 2023, 14(1), 53. Dostupné z: doi:10.3390/life14010053

PLANT, M. a kol. Advanced maternal age impacts physiologic adaptations to pregnancy in vervet monkeys. *GeroScience*. 2020, 42(6), 1649-1661. Dostupné z: doi:10.1007/s11357-020-00219-8

TEJERA, N. a kol. A Transgenic Camelina sativa Seed Oil Effectively Replaces Fish Oil as a Dietary Source of Eicosapentaenoic Acid in Mice. *The Journal of Nutrition*. 2016, 146(2), 227-235. Dostupné z: doi:10.3945/jn.115.223941

WAKEFIELD, S. L. a kol. Maternal supply of omega-3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2008, 294(2), E425-E434. Dostupné z: doi:10.1152/ajpendo.00409.2007

WANG, T. a kol. Mitochondrial dysfunction in oocytes: implications for fertility and aging. *Journal of Ovarian Research*. 2025, 18(1), 186. Dostupné z: doi:10.1186/s13048-025-01764-6

WILTBANK, M. C. a kol. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 2016, 86(1), 239-253. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.037

XIAO, B. a kol. Eicosapentaenoic acid (EPA) exhibits antioxidant activity via mitochondrial modulation. *Food Chemistry*. 2022, 373(Pt A), 131389. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2021.131389

YE, X. a kol. The updated understanding of advanced maternal age. *Fundamental Research*. 2023, 4(6), 1719-1728. Dostupné z: doi:10.1016/j.fmre.2023.09.013

HYBRIDNÉ HYDROGÉLY: FUNKČNÉ MATERIÁLY PRE BIOMEDICÍNSKE APLIKÁCIE

Bíró T.[1], Šipošová K.[1], Humenik M.[2]
[1]*Oddelenie biofyziky, Ústav experimentálnej fyziky, SAV, v.v.i., Košice, Slovensko*
[2]*Katedra biomateriálov, Fakulta technických vied, Univerzita Bayreuth, Bayreuth, Nemecko*

ABSTRAKT
Samo-usporiadanie proteínov do amyloidných fibríl umožňuje pripraviť hydrogély s definovanou fibrilárnou architektúrou a potenciálom pre biomedicínske aplikácie, pričom kombináciou odlišných proteínových zložiek možno vytvárať hybridné siete s vlastnosťami riadenými vzájomnou interakciou fibrilárnych komponentov. V tejto práci bol pripravený hybridný interpenetrujúci hydrogél z amyloidných fibríl lyzozýmu a natívneho rekombinantného pavúčieho proteínu eADF4(C16), s cieľom preskúmať vplyv ich vzájomného pomeru na viskoelastické vlastnosti siete a posúdiť potenciál eADF4(C16) fibrilizovať v prítomnosti lyzozýmových fibríl a pôsobiť tak ako sieťovací prvok. Hydrogély boli pripravené kombináciou vopred vytvorených lyzozýmových fibríl s natívnym eADF4(C16) v rôznych pomeroch pri celkovej koncentrácii proteínov 20 mg/mL a po 24-hodinovej inkubácii boli charakterizované amplitúdovými oscilačnými testami a meraním viskozity v závislosti od šmykovej rýchlosti. Vo všetkých vzorkách prevažovala elastická zložka správania ($G' > G''$), čo potvrdilo vznik stabilnej gélovej siete. Hybridné systémy dosahovali vyššie hodnoty elastického modulu než jednozložkový eADF4(C16) hydrogél a vykazovali aj vyššiu stabilitu siete, čo potvrdzuje, že eADF4(C16) v prítomnosti lyzozýmových fibríl fibrilizuje a pôsobí v hybridnej sieti ako sieťovací prvok. Všetky systémy zároveň vykazovali pseudoplastické správanie, výhodné z hľadiska spracovateľnosti a potenciálneho využitia v biotlači.

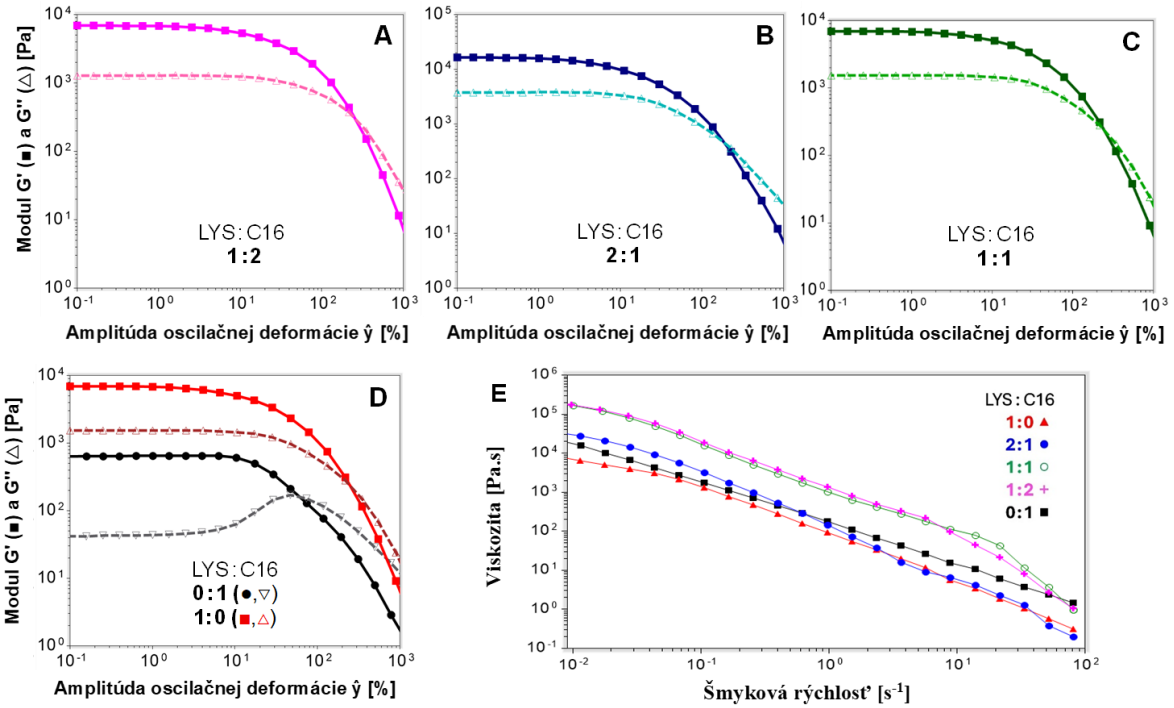
ÚVOD
Jedným z najexcelentnejších prekurzorov na produkciu hydrogélov sú jednoznačne proteíny. Hydrogélové systémy na báze týchto esenciálnych biomolekúl si zachovávajú charakteristické vlastnosti polymérnych materiálov, no zároveň, ich výnimočnosť pramení práve z diverzity biologických funkcií a vnútornej architektúry samotných proteínov. V oblasti tkanivového inžinierstva, transportných systémov liečiv a biosenzoriky nachádzajú široké uplatnenie najmä hydrogély z amyloidných proteínov s bohatým obsahom β-skladaného listu, ktoré im prepožičiavajú vysokú stabilitu, nízku imunogenicitu, biodegradovateľnosť a biomimetické vlastnosti (Wang a kol., 2024; Sánchez-Cid a kol., 2022). Vďaka možnosti chemickej funkcionalizácie amyloidných hydrogélov ich možno tiež modifikovať širokým spektrom molekúl a polymérnych reťazcov, čo otvára priestor pre ich využitie v biomedicínskych aplikáciách. Práve schopnosť fibrilárnej morfológie hydrogélu uľahčovať proces zosieťovania a spájania s inými polymérmi (Mao a kol., 2025; Knowles a kol., 2016) sme využili na prípravu hybridných interpenetrovaných hydrogélov na báze lyzozýmu a rekombinantného pavúčieho proteínu eADF4(C16). Takto vytvorené materiály kombinujú dlhé a pevné lyzozýmové vlákna s kratšími a zvlnenými vláknami pavúčieho proteínu, ktoré majú potenciál vyplniť medzery medzi vláknami lyzozýmu a fungovať ako sieťovacie („cross-link“) činidlo.

MATERIÁL A METODIKA
Lyzozým (lyofilizovaný z vaječného bielka; L6876, Sigma-Aldrich, Nemecko) bol rozpustený v 50 mM roztoku glycín-HCl (Sigma-Aldrich, Nemecko) s pH 2,2 pri laboratórnej teplote. Tvorba amyloidných vlákien bola indukovaná inkubáciou vo vodnom kúpeli pri teplote 65 °C za kontinuálneho miešania pomocou magnetického miešadla pri rýchlosti 1000–1200 ot./min počas 5–6 hodín. Rekombinantný pavúčí proteín eADF4(C16) (Universität Bayreuth, Nemecko) bol rozpustený v 6 M guanidíniumtiokyanáte (GuaSCN; Carl Roth, Nemecko),

inkubovaný pri laboratórnej teplote počas 1 hodiny a následne dialyzovaný oproti 5 mM roztoku Tris-HCl (TRIS; Carl Roth, Nemecko) s pH 8,0 počas 24 hodín. Počas dialýzy bol tlmivý roztok vymenený 3-4krát. Následne bol roztok centrifugovaný ultracentrifúgou Optima MAX-XP (Beckman Coulter, USA) pri rýchlosti 55 000 ot./min počas 30 minút pri teplote 4 °C. Hybridné hydrogély boli pripravené kombináciou vopred vytvorených lyzozýmových fibríl, 100 mM KPi a natívneho rekombinantného proteínu eADF4(C16) v rôznych pomeroch lyzozýmovej a eADF4(C16) zložky (1:0, 2:1, 1:1, 1:2 a 0:1). Najskôr boli pripravené lyzozýmové fibrily, ku ktorým bol následne pridaný KPi (fosfátový tlmivý roztok obsahujúci draslík podľa Humenik, 2014; zložený z KH_2PO_4 a K_2HPO_4, Carl Roth, Nemecko) s pH 6,0. Ako posledný bol do zmesi pridaný natívny rekombinantný proteín eADF4(C16). Celková koncentrácia proteínov bola vo všetkých vzorkách zachovaná na úrovni 20 mg/mL. Takto pripravené zmesi boli následne inkubované počas 24 hodín, pričom v prítomnosti lyzozýmových fibríl dochádzalo k fibrilizácii eADF4(C16) a k postupnému vytvoreniu hybridnej fibrilárnej siete. Reologické vlastnosti takto vytvorených hybridných hydrogélov boli merané reometrom Discovery HR-2 (TA Instruments, New Castle, DE, USA) v meracom systéme pozostávajúcom z paralelných platní s priemerom 25 mm a meracou medzerou nastavenou na 200 μm pri teplote 25 °C. Moduly G′ a G″ boli zaznamenané pri konštantnej uhlovej frekvencii (ω) 10 rad/s so zvyšovaním amplitúdy oscilačnej deformácie od 0,001 % do 1000 %. Viskozita bola meraná v závislosti od zmeny šmykovej rýchlosti v rozmedzí od 0,01 s^{-1} do 100 s^{-1}. Získané závislosti boli analyzované v softvéri TRIOS 5.11.0.31.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom práce bolo vytvoriť hybridný dvojzložkový interpenetrujúci hydrogél kombináciou dvoch proteínov s významným aplikačným potenciálom. Hybridná sieť bola pripravená pridaním rekombinantného pavúčieho proteínu eADF4(C16) ako poslednej zložky k vopred pripraveným lyzozýmovým fibrilám v prítomnosti 100 mM fosfátových iónov, ktoré podporujú proces fibrilizácie eADF4(C16) (Hovanová a kol., 2023). Takto pripravené vzorky boli následne podrobené reologickej analýze s cieľom charakterizovať ich viskoelastické vlastnosti a správanie pri pôsobení oscilačnej deformácie. Zo závislosti elastického (G′) a stratového modulu (G″) od rastúcej amplitúdy oscilačnej deformácie vyplýva, že vo všetkých analyzovaných vzorkách prevažuje elastická zložka správania (G′ > G″), čo je charakteristické pre vznik gélovej štruktúry a potvrdzuje prítomnosť hydrogélovej siete vo vzorkách (Obr. 1A-D). V prípade hybridných hydrogélových systémov možno pozorovať vyššie hodnoty elastického modulu (G′) v porovnaní s jednozložkovými hydrogélmi, čo indikuje ich vyššiu mechanickú tuhosť. Významným zistením však je, že hoci jednozložkový hydrogél eADF4(C16) dosahoval najnižšie hodnoty elastického modulu, jeho interpenetrácia s lyzozýmovými fibrilami viedla pri hybridných variantoch k výraznému zlepšeniu elastických vlastností výslednej hydrogélovej siete. Vyššiu stabilitu siete hybridných hydrogélov potvrdzuje aj posun bodu prechodu G′ a G″ k vyšším hodnotám deformačnej amplitúdy. Týmto výsledkom sa podporila hypotéza, že proteín eADF4(C16) môže plniť funkciu sieťovacieho činidla v hybridnej hydrogélovej sieti. Meranie závislosti viskozity od rastúcej šmykovej rýchlosti potvrdilo pseudoplastické správanie a ne-newtonovský charakter jednozložkových aj hybridných hydrogélov, keďže ich viskozita klesala so zvyšujúcou sa šmykovou rýchlosťou (Obr. 1E). Tento typ správania je významný z hľadiska spracovateľnosti materiálu a jeho potenciálnej injektovateľnosti, napríklad pri aplikáciách v biotlači (Chen a kol., 2017).



Obr. 1. Amplitúdový oscilačný test (A,B,C,D) a rýchlostná rampa (E) hybridných a jednozložkových hydrogélov pri teplote 25 °C.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená grantami APVV 23-0013, APVV SK-TW24-0005 a SAS-NSTC-JRP-2024-03 Supra-Sight.

POUŽITÁ LITERATÚRA

HOVANOVÁ, V. a kol. Only kosmotrope anions trigger fibrillization of the recombinant core spidroin eADF4(C16) from Araneus diadematus. *Protein Science*. 2023, roč. 32, č. 12, s. e4832. ISSN 0961-8368.

HUMENIK, M. a SCHEIBEL, T. Nanomaterial Building Blocks Based on Spider Silk-Oligonucleotide Conjugates. *ACS Nano*. 2014, roč. 8, č. 2, s. 1342-1349. ISSN 1936-0851.

CHEN, M. H. a kol. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2017, roč. 3, č. 12, s. 3146-3160. ISSN 2373-9878.

KNOWLES, T. P. a MEZZENGA, R. Amyloid Fibrils as Building Blocks for Natural and Artificial Functional Materials. *Advanced Materials*. 2016, roč. 28, č. 31, s. 6546-6561. ISSN 0935-9648.

MAO, X. a kol. Nano-fibrous biopolymers as building blocks for gel networks: Interactions, characterization, and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2025, roč. 338, s. 103398. ISSN 0001-8686.

SÁNCHEZ-CID, P. a kol. Novel Trends in Hydrogel Development for Biomedical Applications: A Review. *Polymers*. 2022, roč. 14, č. 15, s. 3023. ISSN 2073-4360.

WANG, X. a kol. Protein Hydrogels For Biomedical Applications. *Biosurface and Biotribology*. 2024, roč. 10, č. 3, s. 106-131. ISSN 2405-4518.

POHLAVIE DARCU AKO MOŽNÝ FAKTOR BEHAVIORÁLNEJ ODPOVEDE NA TRANSPLANTÁCIU ČREVNEJ MIKROBIOTY V MODELI PAS

Bojčuková V.[1], Ryniková M.[1], Demečková V.[1], Gašperíková G.[1], Gancarčíková S.[2], Lauko S.[2]
[1]*Katedra fyziológie živočíchov, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice*
[2]*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach*

ABSTRAKT
Zloženie črevnej mikrobioty vykazuje rozdiely medzi pohlaviami, pohlavie darcu sa však v štúdiách skúmajúcich úlohu črevnej mikrobioty pri poruchách autistického spektra (PAS) zohľadňuje len obmedzene. Cieľom práce bolo exploratívne porovnať behaviorálny profil myší v dvoch nezávislých experimentoch s fekálnym mikrobiálnym transplantátom (FMT) od darcov s PAS rozdielneho pohlavia. Samice myší BALB/c boli po antibiotickej dekontaminácii rozdelené do skupín s FMT od detí s PAS, FMT od neurotypických (NT) detí a kontrolnej skupiny (K), ktorej bol podávaný fyziologický roztok. V prvom experimente pochádzali oba typy transplantátov od dievčat a v druhom od chlapcov. Behaviorálny profil bol hodnotený pomocou testu zahrabávania guličiek a testu recipročnej interakcie. V teste zahrabávania guličiek bol štatisticky významný rozdiel medzi skupinami zaznamenaný iba v experimente s FMT od mužských darcov, pričom skupina NT vykazovala nižšie hodnoty v porovnaní s kontrolou. V ostatných nesociálnych ani sociálnych parametroch neboli medzi skupinami zistené štatisticky významné rozdiely. Výsledky poukazujú na vysokú interindividuálnu variabilitu behaviorálnej odpovede na FMT a naznačujú, že pohlavie darcu môže predstavovať jeden zo zdrojov variability. Vzhľadom na exploratívny charakter porovnania dvoch nezávislých experimentov však jeho úlohu nemožno jednoznačne potvrdiť a je potrebné ju overiť priamym porovnaním oboch pohlaví v rámci jedného experimentálneho dizajnu.

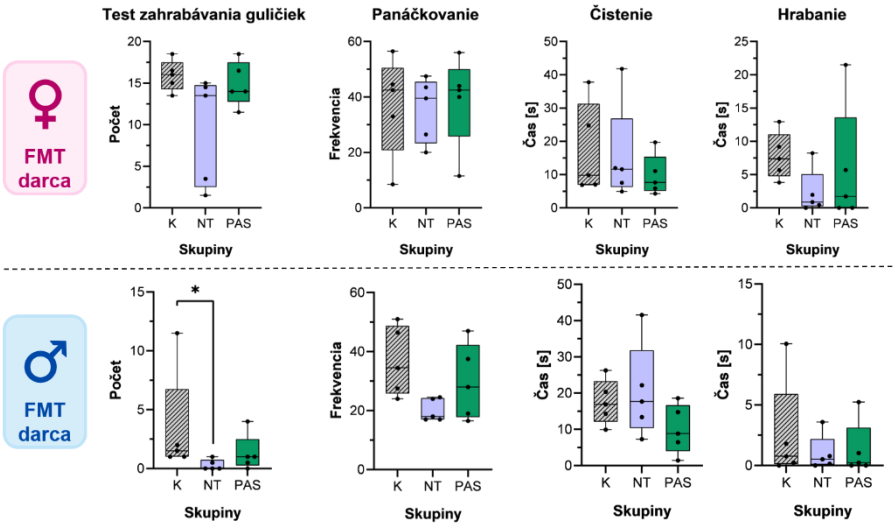
ÚVOD
Poruchy autistického spektra patria medzi neurovývinové ochorenia, pre ktoré je typická narušená sociálna interakcia a repetitívne správanie (Hodges a kol., 2020). Tieto behaviorálne prejavy možno hodnotiť aj u experimentálnych zvierat. U jedincov s PAS sa opakovane opisujú odlišnosti v zložení črevnej mikrobioty, čo podporilo záujem o jej možný vzťah k behaviorálnym prejavom spájaným s PAS. Štúdie ukázali, že kolonizácia myší mikrobiotou od jedincov s PAS môže viesť k zmenám správania relevantným pre PAS (Sharon a kol., 2019; Gao a kol., 2026). Zloženie črevnej mikrobioty sa pritom líši medzi pohlaviami a v zvieracom modeli PAS bolo preukázané, že transplantát od darcov mužského pohlavia znižoval sociabilitu príjemcov, zatiaľ čo od darkýň takýto efekt nemal (Salia a kol., 2024). Napriek tomu sa pohlavie darcu zohľadňuje len zriedka. Úloha pohlavia darcu pri prenose behaviorálnych účinkov FMT preto zostáva nedostatočne objasnená. Cieľom práce bolo exploratívne porovnať behaviorálny profil myší po FMT v dvoch nezávisle realizovaných experimentoch, v ktorých sa líšilo pohlavie darcov transplantátov.

MATERIÁL A METODIKA
Štúdia pozostávala z dvoch nezávislých experimentov líšiacich sa pohlavím darcov FMT: ♀ (ženskí darcovia) a ♂ (mužskí darcovia). Oba experimenty boli realizované na samiciach myší kmeňa BALB/c (♀: n = 80; ♂: n = 84; Velaz s.r.o., ČR). Na navodenie pseudo-germ-free (PGF) stavu podstúpili zvieratá 5-dňovú antibiotickú dekontamináciu (Amoksiklav + Ciprinol), po ktorej nasledovalo 10-dňové obdobie rekonvalescencie. V každom experimente boli zvieratá rozdelené do troch skupín: kontrolnej (K; ♀: n = 29, ♂: n = 31), ktorej bol podávaný fyziologický roztok; NT (♀: n = 29, ♂: n = 30), ktorej bol podávaný FMT od neurotypických detí; a PAS (♀: n = 22, ♂: n = 23), ktorej bol podávaný FMT od detí s PAS. FMT, resp. fyziologický roztok, bol podávaný počas 3 dní, po ktorých nasledovalo 5-dňové

obdobie rekonvalescencie. Behaviorálny profil bol v každej skupine hodnotený na piatich náhodne vybraných zvieratách pomocou testu zahrabávania guličiek, zameraného na repetitívne správanie, a testu recipročnej interakcie, zameraného na sociálne a nesociálne správanie. Testovanie bolo zaznamenávané kamerou a behaviorálne prejavy boli následne manuálne anotované pomocou aplikácie vytvorenej v jazyku Python (Ryniková, 2025). Rozdiely medzi skupinami K, NT a PAS boli analyzované osobitne v každom experimente pomocou Kruskalovho–Wallisovho testu s následným Dunnovým testom viacnásobných porovnaní. Za štatisticky významné boli považované rozdiely pri $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

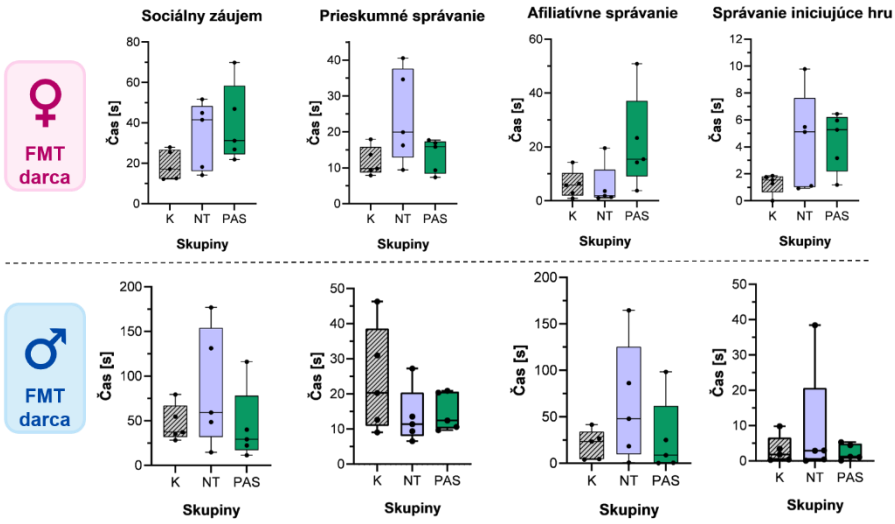
V teste zahrabávania guličiek vykazovala skupina NT v oboch experimentoch nižšie hodnoty v porovnaní s kontrolnou skupinou (Obr. 1). V experimente s FMT od mužských darcov bol medzi skupinami zistený štatisticky významný rozdiel (Kruskalov–Wallisov test, $p = 0,024$), pričom následný Dunnov test potvrdil rozdiel medzi skupinami K a NT ($p_{adj} = 0,026$). V experimente s FMT od ženských darcov rozdiel medzi skupinami štatisticky významný nebol ($p = 0,151$). Skupina PAS sa od kontrolnej skupiny štatisticky významne nelíšila ani v jednom experimente. V experimente s FMT od mužských darcov boli zároveň nižšie hodnoty zahrabávania guličiek pozorované vo všetkých skupinách vrátane kontroly. Keďže kontrolným zvieratám nebol podávaný FMT, tento celkový posun nemožno jednoznačne pripísať pohlaviu darcu. Vyššie hodnoty v kontrolných skupinách môžu súvisieť s antibiotickou dekontamináciou a následným PGF stavom zvierat, zatiaľ čo kolonizácia FMT mohla repetitívne správanie čiastočne modulovať.



Obr. 1. Porovnanie výsledkov nesociálnej časti behaviorálnej analýzy po FMT od darcov ženského (♀) a mužského (♂) pohlavia. Dáta sú zobrazené ako jednotlivé hodnoty, medián a interkvartilové rozpätie (IQR). Štatistická významnosť je označená *p < 0,05. K – kontrolná skupina; NT – skupina s FMT od neurotypických detí; PAS – skupina s FMT od detí s PAS.

V ostatných nesociálnych parametroch hodnotených počas testu recipročnej interakcie – panáčkovaní, čistení a hrabaní – neboli medzi skupinami zistené štatisticky významné rozdiely (Obr. 1). Aj v týchto parametroch bola zreteľná vysoká interindividuálna variabilita behaviorálnej odpovede, ktorá mohla prispieť k absencii štatisticky významných rozdielov medzi skupinami. Štatisticky významné rozdiely neboli zaznamenané ani v hodnotených parametroch sociálneho správania (Obr. 2). Deskriptívne však skupina PAS po FMT od ženských darcov vykazovala vyššie hodnoty sociálneho záujmu, afiliatívneho správania a správania iniciujúceho hru v porovnaní s kontrolnou skupinou. Po FMT od mužských darcov boli tieto hodnoty v skupine PAS približne na úrovni kontroly. Vzhľadom na vysokú

variabilitu individuálnych odpovedí a absenciu štatistickej významnosti je však potrebné tieto rozdiely interpretovať iba ako trendy. Hoci predchádzajúce práce poukazujú na možnú úlohu pohlavia darcu v behaviorálnej odpovedi na transplantáciu črevnej mikrobioty (Salia a kol., 2024), naše výsledky takýto vzťah jednoznačne nepotvrdili.



Obr. 2. Porovnanie výsledkov sociálnej časti behaviorálnej analýzy po FMT od darcov ženského (♀) a mužského (♂) pohlavia. Test recipročnej interakcie – sociálne správanie. Dáta sú zobrazené ako jednotlivé hodnoty, medián a interkvartilové rozpätie (IQR). K – kontrolná skupina; NT – skupina s FMT od neurotypických detí; PAS – skupina s FMT od detí s PAS.

Pri interpretácii týchto výsledkov je však potrebné zohľadniť limity experimentálneho dizajnu. Realizácia FMT experimentov s antibioticky indukovaným PGF modelom v podmienkach gnotobiotických izolátorov je kapacitne a technicky náročná. Počet zvierat, ktoré možno súčasne udržiavať v kontrolovaných podmienkach izolátorov, je preto obmedzený. Z tohto dôvodu nebolo možné realizovať experimenty s FMT od darcov oboch pohlaví v rovnakom experimentálnom cykle, a ich porovnanie má preto exploratívny charakter. Ďalším limitujúcim faktorom bol rozsah behaviorálneho fenotypovania, ktoré bolo realizované na piatich náhodne vybraných zvieratách z každej skupiny. Videozáznam behaviorálnych testov a jeho následná manuálna anotácia predstavujú značnú dátovú a časovú náročnosť, čo limitovalo počet analyzovaných zvierat a tým aj štatistickú silu analýzy. Získané výsledky preto neumožňujú potvrdiť samostatný vplyv pohlavia darcu na behaviorálnu odpoveď po FMT, ani jeho možnú úlohu jednoznačne vylúčiť. Túto otázku bude potrebné overiť v cielene navrhnutom experimente umožňujúcom priame porovnanie transplantátov od darcov oboch pohlaví za rovnakých experimentálnych podmienok.

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola financovaná z grantov APVV-20/0114 a VEGA 1/0139/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

GAO, Y. a kol. Behavioral and biological alterations following transplantation of ASD-associated gut microbiota in mice. PeerJ. 2026, roč. 14, art. no. e20951. ISSN 2167-8359.

HODGES, H. a kol. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. Translational Pediatrics. 2020, roč. 9, č. Suppl 1, s. S55-S65. ISSN 2224-4336.

RYNIKOVÁ, M. Mouse-behavior-scoring [software]. 2025. Dostupné na: https://github.com/Maria-Maira-Airam/Mouse-behavior-scoring

SALIA, S. a kol. Gut microbiota transfer from the preclinical maternal immune activation model of autism is sufficient to induce sex-specific alterations in immune response and behavioural outcomes. Brain, Behavior, and Immunity. 2024, roč. 123, s. 813-823. ISSN 0889-1591.

SHARON, G. a kol. Human Gut Microbiota from Autism Spectrum Disorder Promote Behavioral Symptoms in Mice. Cell. 2019, roč. 177, č. 6, s. 1600-1618.e17. ISSN 0092-8674.

TKANIVOVO ŠPECIFICKÉ ZMENY V KONCENTRÁCII MIKROELEMENTOV A METALOPROTEÍNOV U JAHNIAT PRIJÍMAJÚCICH RÔZNE DÁVKY NANOČASTÍC ZnO

Bombárová A., Takácsová M., Čobanová K.
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum biovied SAV, v. v. i., Šoltésovej 4-6, Košice

ABSTRAKT
Cieľom práce bolo posúdiť zmeny v distribúcii mikroelementov a vybraných Zn-dependentných metaloproteínov v tkanivách jahniat dostávajúcich nanočastice ZnO v rôznych dávkach alebo anorganický ZnO. Jahňatá vo veku 4 mesiacov (Zošľachtená valaška) boli po adaptačnom období rozdelené do štyroch experimentálnych skupín (n = 7): 1) kontrolná skupina bez prídavku Zn; 2) skupina ZnO NPs 40 (diéta suplementovaná nanočasticami ZnO v dávke 40 mg Zn/kg); 3) skupina ZnO NPs 80 (diéta suplementovaná nanočasticami ZnO v dávke 80 mg Zn/kg); 4) skupina ZnO 80 (diéta suplementovaná anorganickým ZnO v dávke 80 mg Zn/kg). Po 70 dňoch boli odobraté vzorky tkanív (pečeň, obličky, pankreas, sliznica tenkého čreva), trus a bachorový obsah na analýzy koncentrácie Zn, Cu, Fe a Mn. V tkanivách bola stanovená koncentrácia metalotioneínu (MT) a aktivita špecifickej Cu/Zn superoxiddismutázy (Cu/Zn SOD). Suplementácia diét zinkom mala za následok zvýšenie koncentrácie Zn v pečeni a obličkách, a taktiež bola zvýšená jeho koncentrácia v truse. Z hľadiska biodostupnosti Zn bola v skupinách dostávajúcich nanočastice ZnO zistená signifikantne vyššia koncentrácia rozpustného zinku v bachorovom obsahu. V porovnaní s anorganickým zdrojom zinku bolo podávanie nanočastíc ZnO spojené so zvýšenou aktivitou Cu/Zn SOD a vyššou koncentráciou metalotioneínu v pečeni, obličke a sliznici jejuna. Získané výsledky naznačujú, že ZnO NPs podávané v dávke 40 mg Zn/kg diéty by mohli predstavovať potenciálnu alternatívu k vyšším dávkam konvenčných anorganických zdrojov zinku používaných vo výžive hospodárskych zvierat.

ÚVOD
Zinok sa podieľa na mnohých štruktúrnych, katalytických a regulačných procesoch v organizme hospodárskych zvierat. Miera jeho využitia závisí nielen od prijatého množstva, ale aj od chemickej formy, ktorá ovplyvňuje absorpciu, transport a distribúciu Zn v organizme (Byrne a Murphy, 2022). Vzhľadom na svoje špecifické vlastnosti sa nanočastice Zn javia ako perspektívne minerálne aditíva na suplementáciu krmiva hospodárskych zvierat. Malá veľkosť, veľký špecifický povrch a reaktivita nanočastíc môžu ovplyvňovať rozpustnosť zinku, uvoľňovanie Zn^{2+} a interakcie s biologickým prostredím. Správanie minerálnych nanočastíc v organizme závisí aj od ich agregácie, povrchových vlastností, stability a podmienok v tráviacom trakte (Yang a kol., 2025). Po absorpcii je bunková homeostáza zinku riadená transportnými proteínmi a MT, ktoré regulujú jeho vnútrobunkovú distribúciu, ukladanie a následné uvoľňovanie (Zhou a kol., 2026). Distribúcia Zn medzi tkanivami môže závisieť od jeho formy a dávky, dĺžky podávania aj fyziologického stavu zvieraťa. Významné sú taktiež interakcie zinku s ďalšími mikroelementmi, nakoľko viaceré z nich využívajú spoločné transportné mechanizmy (Byrne a Murphy, 2022). Posúdenie účinkov ZnO NPs si preto vyžaduje sledovanie absorpcie, distribúcie a depozície Zn v tkanivách ako aj sledovanie jeho biovyužiteľnosti pri použití rôznych dávok v krmive zvierat.

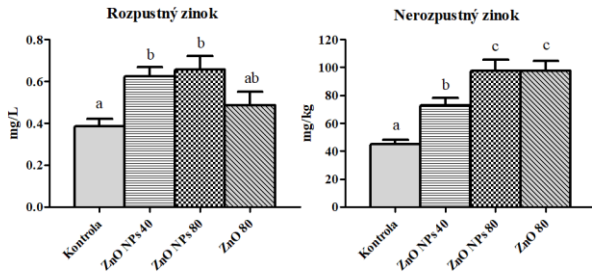
MATERIÁL A METODIKA
Všetky postupy so zvieratami boli realizované v súlade s platnou legislatívou a schválené etickou komisiou organizácie a ŠVPS (č. 1046/2023). Experiment sa uskutočnil na štvormesačných samcoch plemena Zošľachtená valaška (28 jahniat). Zvieratá prijímali bazálnu diétu pozostávajúcu z 350 g mletého jačmeňa a 700 g lúčneho sena denne. Jahňatá boli po adaptácii náhodne rozdelené do štyroch skupín (n = 7). Kontrolná skupina prijímala

iba bazálnu diétu. Ďalšie skupiny dostávali prídavok 40 alebo 80 mg Zn/kg diéty vo forme komerčných ZnO NPs (SkySpring Nanomaterials, Houston, USA) alebo 80 mg Zn/kg diéty vo forme konvenčného ZnO (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Vzorky trusu sa odoberali na 35. a 70. deň experimentu. Po ukončení experimentu na 70. deň boli zvieratá humánne usmrtené a následne sme odobrali vzorky bachorového obsahu a tkanív (pečeň, oblička, pankreas a sliznica duodéna, jejuna a ilea) na plánované analýzy. Koncentrácie mikroelementov (Zn, Cu, Fe, Mn) v diétach, tkanivách, truse a bachorovom obsahu sme stanovili atómovou absorpčnou spektrometriou (AAS, Shimadzu AA-7000, Kyoto, Japonsko). Koncentrácia MT bola meraná kvantitatívnou ELISA metódou (MyBioSource, Inc., USA) a aktivita celkovej a Cu/Zn SOD spektrofotometrickou metódou (Marklund a Marklund, 1974). Štatistické vyhodnotenie výsledkov bolo uskutočnené prostredníctvom jednofaktorovej alebo dvojfaktorovej analýzy variancie (ANOVA) s následným Tukeyho post hoc testom.

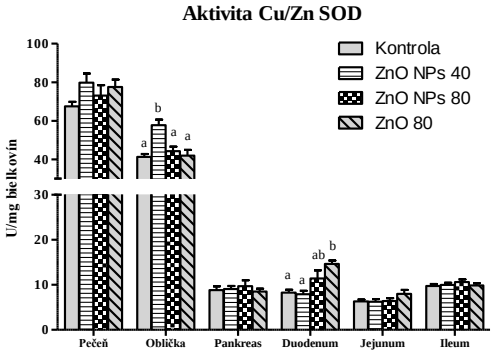
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Biologická dostupnosť zinku u prežúvavcov je primárne limitovaná jeho rozpustnosťou v bachore. V tomto prostredí dochádza k interakciám tohto mikroelementu s bachorovou mikrobiótou a komponentmi krmiva, čo priamo ovplyvňuje jeho následnú absorpciu v tenkom čreve (Vigh a kol., 2023). Koncentrácia nerozpustného zinku v sedimente bachorového obsahu (viazaného na nestrávené krmivo a mikrobiálnu biomasu) bola vo všetkých suplementovaných skupinách signifikantne vyššia v porovnaní s kontrolnou skupinou, pričom najvyššie hodnoty sa zaznamenali pri suplementácii diét vyššou dávkou Zn (Obr. 1.). Zároveň zistené signifikantne vyššie koncentrácie rozpustného zinku v supernatante z bachorového obsahu v skupinách obohatených o ZnO NPs indikovali zvýšenú dostupnosť Zn pre absorpciu v gastrointestinálnom trakte. Gatti a kol. (2026) pri priamom porovnaní nanočasticového a konvenčného ZnO opisujú prevažne podobnú kinetiku a distribúciu, čo naznačuje porovnateľnú biologickú dostupnosť oboch foriem. Naše výsledky poukazujú na to, že u jahniat prijímajúcich krmivo doplnené o zinok, bez ohľadu na jeho formu, sa zistila štatisticky významne vyššia koncentrácia Zn v pečeni ($P < 0,05$) aj v obličkách ($P < 0,05$) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Suplementácia diét ZnO neovplyvnila koncentráciu medi a mangánu v sledovaných tkanivách, neboli zistené signifikantné hodnoty medzi skupinami. O biovyužiteľnosti zinku vypovedá expresia metalotioneínu (MT), ktorého koncentrácia je priamo úmerná dostupnosti tohto minerálu v tkanivách (Lokesha a kol., 2025). V našej štúdii sa u jahniat suplementovaných nanočasticami ZnO preukázala štatisticky významne vyššia koncentrácia MT v pečeni, obličkách a sliznici jejuna v porovnaní s kontrolnou skupinou. Tieto zmeny potvrdzujú, že nanočasticová forma efektívne stimuluje bunkovú odpoveď na prísun zinku a koncentrácia metalotioneínu sa javí ako spoľahlivý podporný ukazovateľ jeho využitia v tkanivách. Novšie výskumy dokumentujú, že podávanie nanočastíc ZnO môže zvýšiť aktivitu kľúčových antioxidačných enzýmov, najmä SOD, a to aj bez zmeny celkovej koncentrácie zinku v krvnom sére (Pinchao a kol., 2026). Výsledky nášho experimentu tieto poznatky potvrdzujú, keďže suplementácia nižšou dávkou nanočastíc ZnO viedla k signifikantnému nárastu aktivity celkovej aj Cu/Zn SOD v obličkách jahniat v porovnaní s ostatnými skupinami ($P < 0,001$; obrázok 2). Zvýšenie aktivity oboch izoforiem SOD sme zaznamenali aj v sliznici duodéna, avšak pri podávaní anorganickej formy zinku ($P < 0,01$). Získané výsledky naznačujú, že ZnO NPs podávané v dávke 40 mg Zn/kg diéty vyvolávajú fyziologickú a tkanivovú odpoveď porovnateľnú s konvenčným anorganickým ZnO aplikovaným v dvojnásobnej dávke (80 mg Zn/kg diéty). Suplementácia diét zinkom, ako aj doba jej podávania, ovplyvnili koncentráciu zinku v truse, pričom na 35. deň experimentu došlo k jej zvýšeniu vo všetkých suplementovaných skupinách. Na konci experimentu (70. deň) sa však koncentrácia zinku u zvierat prijímajúcich nanočastice Zn signifikantne nelíšila od nesuplementovanej kontrolnej skupiny. Zloženie diéty zároveň neovplyvnilo vylučovanie

železa, medi ani mangánu trusom. Zníženie suplementovanej dávky zinku v kŕmnej dávke môže viesť k poklesu jeho fekálnej exkrécie, a tým k obmedzeniu environmentálnej záťaže. Nanočastice ZnO sa tak javia ako efektívna alternatíva v porovnaní s konvenčnou anorganickou formou zinku v živočíšnej výžive.



Obr.1. Koncentrácia rozpustného a nerozpustného zinku v bachorovom obsahu .



Obr.2. Aktivita špecifickej Cu/Zn SOD v tkanivách jahniat.

[ab]Rozdielné písmená označujú signifikantný rozdiel (p<0,05) medzi skupinami

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

BYRNE, L. a MURPHY, R. A. Relative bioavailability of trace minerals in production animal nutrition: A review. *Anim.* 2022, vol. 12, no. 15, article no. 1981. ISSN 2076-2615.

GATTI, B. S. a kol.. Kinetics of ^{65}Zn in sheep supplemented with micro- and nanoparticles of zinc oxide. Biol. *Trace Elem. Res.* 2026, vol. 204, no. 2, p. 812–819. ISSN 1559-0720.

LOKESHA, E. a kol.. High dietary zinc promotes its optimal absorption through modulation of key transporter genes, SOD1, and HSP70 expression in heat-stressed rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 2025, vol. 203, no. 7, p. 3779–3792. ISSN 1559-0720.

MARKLUND, S. a MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974, vol. 47, no. 3, p. 469–474. ISSN 0014-2956.

PINCHAO, W. H. P. a kol.. Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation in Santa Inês ewes during the transition period. *Trop. Anim. Health Prod.* 2026, vol. 58, no. 5, p. 341. ISSN 1573-7438.

VIGH, A. a kol.. Rumen solubility of copper, manganese and zinc and the potential link between the source and rumen function: A systematic review. *Agri.* 2023, vol. 13, no. 12, p. 2198. ISSN 2077-0472.

YANG, J. a kol.. Zinc oxide nanoparticles as next-generation feed additives: Bridging antimicrobial efficacy, growth promotion, and sustainable strategies in animal nutrition. *Nanomaterials.* 2025, vol. 15, no. 13, p. 1030. ISSN 2079-4991.

ZHOU, Y. a kol.. SLC30 (ZnT) and SLC39 (ZIP) zinc transporter families: From gatekeepers of zinc homeostasis to promoters of tumorigenesis and targets for clinical therapy. *Front. Immunol.* 2026, vol. 16, p. 1750534. ISSN 1664-322.

CHARAKTERIZÁCIA PRIMÁRNEJ KULTÚRY Z NÁDORU MLIEČNEJ ŽĽAZY PSA

Čobejová S., Nosálová N., Huniadi M., Kešeľáková A., Kalinaj B., Čížková D.
Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Nádorové ochorenia mliečnej žľazy sa u súk vyskytujú veľmi často a vzhľadom na svoju biologickú heterogenitu predstavujú významný model v oblasti nádorovej biológie. Cieľom tejto štúdie bolo izolovať a etablovať primárnu bunkovú kultúru z nádoru mliečnej žľazy psa a vykonať základnú charakterizáciu v podmienkach *in vitro*. Po izolácii boli bunky kultivované a hodnotené z hľadiska morfologických vlastností a proliferácie. Expresia vybraných bunkových markerov bola stanovená imunocytochemickou analýzou s použitím protilátok proti Ki-67, MUC-1 a vimentínu. Izolované bunky adherovali ku kultivačnému povrchu, proliferovfali v *in vitro* podmienkach a vykazovali expresiu sledovaných markerov. Získaná primárna bunková kultúra predstavuje perspektívny *in vitro* model na ďalšie skúmanie biologických vlastností nádorových buniek mliečnej žľazy psa, ako aj na testovanie a hodnotenie potenciálnych terapeutických možností.

ÚVOD

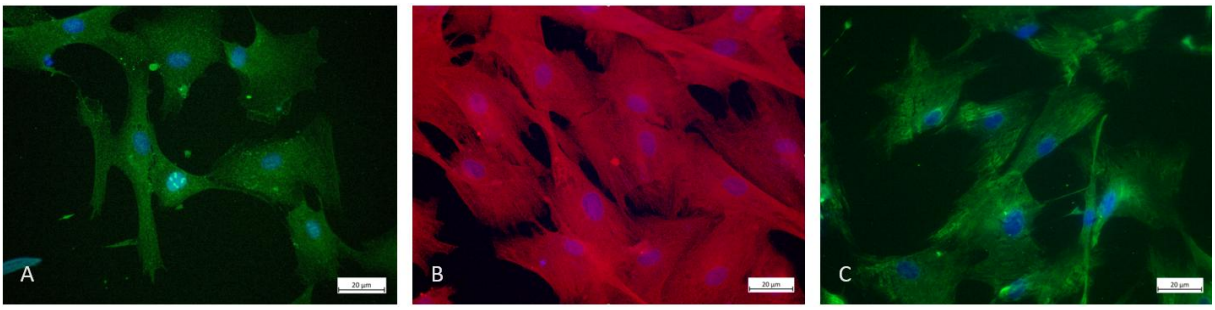
Nádory mliečnej žľazy patria medzi najčastejšie neoplázie u súk a predstavujú významný problém vo veterinárnej onkológii. Ich biologická heterogenita, variabilita histopatologických vlastností a rozdielna expresia molekulárnych markerov vytvárajú potrebu využívania vhodných experimentálnych modelov na štúdium nádorovej biológie (Abdelmegeed a Mohammed, 2018; Gray a kol., 2020). Spontánne sa vyskytujúce nádory mliečnej žľazy u psov vykazujú viaceré biologické a molekulárne podobnosti s nádormi prsníka u žien, a preto predstavujú významný model v komparatívnej a translačnej onkológii (Gray a kol., 2020; Kwon a kol., 2024). Významným nástrojom pri štúdiu nádorových buniek sú primárne bunkové kultúry získané priamo z nádorového tkaniva, ktoré predstavujú vhodný *in vitro* model na sledovanie bunkového správania a biologických vlastností nádorových buniek v kontrolovaných podmienkach (Nosálová a kol., 2024). Súčasťou charakterizácie získaných buniek je imunocytochemická analýza, ktorá umožňuje detegovať expresiu špecifických markerov a bližšie určiť ich fenotyp. Pri nádoroch mliečnej žľazy možno sledovať napríklad expresiu Ki-67, MUC-1 a vimentínu, ktoré poskytujú informácie o proliferačnej aktivite, vybraných biologických vlastnostiach a mezenchymálnom charaktere buniek (Klopfleisch, 2016; Kwon a kol., 2024). Imunocytochemická charakterizácia tak umožňuje komplexnejšie posúdenie získaného bunkového modelu a overenie jeho vhodnosti na ďalšie experimentálne štúdium nádorov mliečnej žľazy u psov (Nosálová a kol., 2024).

MATERIÁL A METODIKA

Nádorové tkanivo mliečnej žľazy bolo získané v celkovej anestézii za dodržania aseptických podmienok. Bezprostredne po excízii bolo tkanivo vložené do fosfátového pufra (PBS; Sigma, USA) s prídavkom 0,02 % gentamycínu (50 mg/ml; Sigma, USA) a následne transportované na laboratórne spracovanie. Získaný materiál bol rozdelený na dve časti, pričom jedna časť bola určená na histopatologické vyšetrenie a druhá na izoláciu primárnej bunkovej kultúry. Samotná izolácia buniek bola realizovaná v laminárnom biologickom bezpečnostnom boxe triedy II (Herasafe, Class II Biological Safety Cabinet, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) za aseptických podmienok. Tkanivo bolo najskôr mechanicky rozdelené na menšie fragmenty a následne podrobené enzymatickej disociácii v roztoku pozostávajúcom zo 4,5 ml Earlovho vyváženého soľného roztoku, 0,5 ml 1 % kolagenázy typu IV (Gibco, USA), 0,1 ml 2 % antibioticko-antimykotického roztoku (ATB/ATM; penicilín 10 000 U/ml, streptomycín 10 000 µg/ml a amfotericín B 25 µg/ml; Sigma, USA) a 0,01 ml gentamycínu

(Sigma, USA). Enzymatická digescia prebiehala počas 1 hodiny pri teplote 37 °C. Po ukončení enzymatického štiepenia bola aktivita kolagenázy zastavená pridaním fetálneho bovinného séra (FBS; Sigma, USA) v pomere 1 : 1 k objemu tráviaceho roztoku. Vzniknutá bunková suspenzia bola následne prefiltrovaná cez bunkové sitko s veľkosťou pórov 100 µm a následne centrifugovaná pri 1200 ot./min počas 7 minút. Po odstránení supernatantu bol získaný bunkový sediment resuspendovaný v 1 ml kultivačného média. Na kultiváciu bolo použité médium Dulbecco's Modified Eagle Medium s vysokým obsahom glukózy (DMEM-HG; Sigma, USA), suplementované 10 % FBS, 2 % ATB/ATM, 0,1 % gentamycínu a 1 % L-glutamínu. Bunková suspenzia bola následne prenesená do kultivačných fliaš T25 a inkubovaná pri teplote 37 °C vo zvlhčenej atmosfére s obsahom 5 % CO_2. Kultúry boli pravidelne sledované až do dosiahnutia požadovaného stupňa konfluencie a následne boli bunky využité na ďalšiu charakterizáciu. Na charakterizáciu získanej primárnej bunkovej kultúry bola využitá imunocytochemická analýza. Okrúhle krycie sklíčka s priemerom 12 mm boli očistené 70 % etanolom, sterilizované UV žiarením a umiestnené do 24-jamkových kultivačných platní. Na každé sklíčko bolo nasadených približne $1,5 \times 10^4$ buniek v konečnom objeme 500 µl kultivačného média. Bunky boli kultivované do dosiahnutia požadovanej konfluencie. Po kultivácii boli bunky premyté PBS a fixované 4 % paraformaldehydom 20 minút pri izbovej teplote. Následne boli premyté PBS a blokované 10 % normálnym kozím sérom v PBS s 0,2 % Triton X-100 počas jednej hodiny pri izbovej teplote. Následne boli bunky inkubované s primárnymi protilátkami Ki-67 (1:300), MUC-1 (1:200) a vimentínom (1:250), pripravených v PBS s 0,2 % Triton X-100. Preparáty boli ponechané s primárnymi protilátkami 24 hodín pri 4 °C, následne boli premyté PBS a hodinu inkubované s príslušnými fluorescenčne značenými sekundárnymi protilátkami (Ki67 - Alexa FlourTM 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L), MUC1 - Alexa FlourTM 594 Goat anti-Mouse IgG (H+L), vimentín - Alexa FlourTM 488 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (Invitrogen, USA)), pri izbovej teplote v tme. Na vizualizáciu bunkových jadier bolo použité fluorescenčné farbivo DAPI. Po inkubácii boli preparáty trikrát premyté PBS počas piatich minút, prekryté krycím sklíčkom a upevnené pomocou montovacieho média Vectashield (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a analyzované fluorescenčným mikroskopom Zeiss AxioVision-APOTOM..

VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obr. 1. Imunocytochemické detekcia expresie Ki-67 (A), MUC-1 (B), a vimentínu (C) v bunkách primárnej kultúry nádoru mliečnej žľazy.

Imunocytochemická analýza primárnej bunkovej kultúry izolovanej z karcinosarkómu mliečnej žľazy psa preukázala pozitívnu expresiu všetkých sledovaných markerov Ki-67, MUC1 a vimentínu. Pri hodnotení fluorescenčnou mikroskopiou bola pri Ki-67 (Obr. 1.A) detegovaná pozitívna fluorescencia v jadrách buniek, čo poukazovalo na prítomnosť proliferujúcich buniek a zvýšenú proliferačnú aktivitu bunkovej populácie. Marker MUC1 (Obr. 1.B) vykazoval pozitívnu fluorescenciu v cytoplazme buniek, čo potvrdilo epiteliálne

charakteristiky nádorových buniek. Pozitívna expresia vimentínu (obrázok 1.C) zároveň poukazovala na prítomnosť mezenchymálneho fenotypu v analyzovanej bunkovej populácii. Získané výsledky imunocytochemickej analýzy primárnej bunkovej kultúry z karcinosarkómu mliečnej žľazy psa korešpondujú s publikovanými údajmi o expresii sledovaných markerov. Autori Petroušková a kol., 2025 pri primárnych kultúrach odvodených z karcinosarkómu mliečnej žľazy psa preukázali vysokú expresiu MUC1 a výraznú proliferatívnu aktivitu stanovenú pomocou Ki-67, čo zodpovedá aj našim pozorovaniam. Nosalová a kol. uvádzajú, že zvýšená expresia MUC1 pri nádoroch mliečnej žľazy psa súvisí s invazivitou nádoru a prítomnosťou metastáz, zatiaľ čo vysoká expresia Ki-67 koreluje s vyšším stupňom malignity, metastatickým potenciálom a nepriaznivou prognózou. Pozitivita vimentínu pozorovaná v našej kultúre je v súlade s jeho expresiou v malígnych nádoroch mliečnej žľazy psa, kde môže poukazovať na prítomnosť mezenchymálnych charakteristík nádorových buniek (Yoshida a kol., 2014). Expresia vimentínu bola potvrdená aj pri psích mamárnych sarkómoch, pričom jeho pozitivita bola pozorovaná vo všetkých analyzovaných prípadoch (Dolka a kol., 2013). Súčasná pozitivita MUC1, Ki-67 a vimentínu tak podporuje zachovanie epiteliálnych a mezenchymálnych charakteristík, ako aj výraznej proliferačnej aktivity v bunkovej kultúre odvodenej z karcinosarkómu.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantovým projektom: APVV-24-0026, VEGA 1/0600/26.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ABDELMEGEED, S. M.; MOHAMMED, S. Canine mammary tumors as a model for human disease. *Oncology Letters*. 2018, roč. 15, č. 6, s. 8195–8205. DOI: 10.3892/ol.2018.8411.

DOLKA, I.; SAPIERZYŃSKI, R.; KRÓL, M. Retrospective study and immunohistochemical analysis of canine mammary sarcomas. *BMC Veterinary Research*. 2013, roč. 9, č. 248. DOI: 10.1186/1746-6148-9-248.

GRAY, M a kol. Naturally-Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2020, roč. 10, č. 617. DOI: 10.3389/fonc.2020.00617.

KLOPFLEISCH, R. (ed.). Veterinary Oncology: A Short Textbook. *Berlin: Springer*, 2016. ISBN 978-3-319-41124-8.

KWON, J. Y. a kol. Canine as a Comparative and Translational Model for Human Mammary Tumor. *Journal of Breast Cancer*. 2023, roč. 26, č. 1, s. 1–13. DOI: 10.4048/jbc.2023.26.e4.

NOSÁLOVÁ, N. a kol. Canine Mammary Tumors: Classification, Biomarkers, Traditional and Personalized Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024, roč. 25, č. 5, 2891. DOI: 10.3390/ijms25052891.

PETROUŠKOVÁ, P. a kol. Establishment of primary cell cultures from canine mammary gland malignant tumours: a preliminary study. *Journal of Veterinary Research*. 2025, roč. 69, č. 1, s. 159–168. DOI: 10.2478/jvetres-2025-0007.

YOSHIDA, K. a kol. The Relationship between Clinicopathological Features and Expression of Epithelial and Mesenchymal Markers in Spontaneous Canine Mammary Gland Tumors. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014, roč. 76, č. 10, s. 1321–1327. DOI: 10.1292/jvms.14-0104.

ZMENY KONCENTRÁCIE GLP-1 V PLAZME PRASIATOK POČAS SKORÉHO POSTNATÁLNEHO OBDOBIA

Čulka Ľ.[1], Novotný J.[1], Lešková L.[2], Krepelková Z.[1]
[1] *Klinika ošípaných, UVLF v Košiciach*
[2] *Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF v Košiciach*

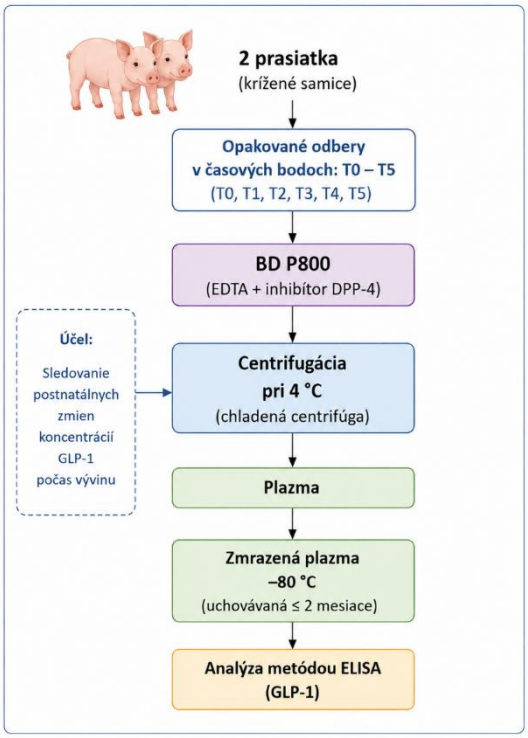
ABSTRAKT
Glukagónu podobný peptid 1 (GLP-1) je inkretínový hormón, ktorý zohráva kľúčovú úlohu v regulácii metabolizmu glukózy prostredníctvom stimulácie sekrécie inzulínu po príjme potravy. Cieľom tejto pilotnej štúdie bolo sledovať zmeny plazmatických koncentrácií GLP-1 u dvoch krížených prasiatok (Pietrain × Duroc × Landrace) počas prvých štyroch týždňov života a zhodnotiť ich súvislosť s postnatálnym vývojom a zavedením enterálnej výživy. Krv bola odoberaná v šiestich časových bodoch (T0 – pred prvým príjmom kolostra, až T5 – 3 dni po odstave) do skúmaviek s obsahom inhibítora DPP-4, plazma bola centrifugovaná pri 4 °C a koncentrácie GLP-1 boli stanovené metódou ELISA. Obe prasiatka vykazovali nízke koncentrácie GLP-1 pri T0, s následným nárastom po zahájení enterálnej výživy. Ďalší priebeh sa medzi zvieratami líšil – u jedného prasiatka boli koncentrácie GLP-1 konzistentne vyššie počas celého sledovaného obdobia s maximom pri T3, zatiaľ čo u druhého prasiatka boli zaznamenané miernejšie výkyvy. Získané výsledky poukazujú na zmeny plazmatických koncentrácií GLP-1 počas skorého postnatálneho obdobia a naznačujú možnú súvislosť s prechodom na enterálnu výživu. Vzhľadom na pilotný charakter štúdie a nízky počet zvierat je potrebné tieto pozorovania potvrdiť na väčšom súbore prasiatok.

ÚVOD
Glukagónu podobný peptid 1 (GLP-1) a glukózo-dependentný inzulinotropný polypeptid (GIP) sú hlavnými predstaviteľmi inkretínových hormónov. Uvoľňujú sa z čreva po príjme potravy a regulujú glukózovú homeostázu stimuláciou sekrécie inzulínu a tlmením sekrécie glukagónu, glukózo-dependentným spôsobom. GLP-1 navyše spomaľuje vyprázdňovanie žalúdka a znižuje príjem potravy pôsobením na centrálny nervový systém, čo z neho robí významný cieľ farmakologického výskumu v liečbe obezity a *diabetes mellitus* 2. typu. Za fyziologických podmienok je GLP-1 rýchlo inaktivovaný najmä enzýmom dipeptidyl-peptidáza 4 (DPP-4) štiepením N-konca na neaktívny metabolit GLP-1(9–36), čím sa zabezpečuje krátke trvanie jeho účinku (Deacon a kol. 1995; Deacon 2004).
U novonarodených zvierat prechádza tráviaci a endokrinný systém výraznými zmenami súvisiacimi so zavedením enterálnej výživy, čo môže ovplyvniť aj sekréciu inkretínových hormónov. Cieľom tejto štúdie bolo sledovať zmeny plazmatických koncentrácií GLP-1 u prasiatok počas skorého postnatálneho obdobia a zhodnotiť ich súvislosť so zavedením enterálnej výživy.

MATERIÁL A METODIKA
Do štúdie boli zaradené dve krížené prasiatka (Pietrain × Duroc × Landrace; samice), sledované počas prvých štyroch týždňov života po narodení. Prasiatka boli súčasťou širšej pilotnej štúdie zameranej na optimalizáciu preanalytických podmienok stanovenia GLP-1 v plazme ošípaných (Čulka a kol. 2026). V predkladanej práci je samostatne prezentované a diskutované longitudinálne sledovanie zmien koncentrácií GLP-1 u prasiatok počas skorého postnatálneho obdobia. Krv bola odoberaná v šiestich časových bodoch: T0 – pred prvým príjmom kolostra, T1 – 7. deň života, T2 – 14. deň života, T3 – 21. deň života, T4 – deň odstavu (28. deň veku) a T5 – 3 dni po odstave. Od 7. dňa veku dostávali prasiatka komerčnú granulovanú štartovaciu kŕmnu zmes, po odstave prešli na komerčnú štartovaciu diétu. Zvieratá boli chované na Klinike ošípaných UVLF v Košiciach za štandardných chovateľských podmienok s voľným prístupom k vode, do odstavu spolu s prasnicou.

Krv bola odoberaná zo *sinus ophthalmicus* do skúmaviek BD P800 (BD, USA) obsahujúcich EDTA spolu s inhibítorom DPP-4. Tento typ skúmaviek bol zvolený vzhľadom na známu rýchlu enzymatickú degradáciu GLP-1 pôsobením DPP-4 (Deacon a kol. 1995; Deacon 2004), pričom prídavok DPP-4 inhibítora do odberovej skúmavky zvyšuje stabilitu GLP-1 počas preanalytickej fázy (Yi a kol. 2015). Vzorky boli do 5 minút po odbere centrifugované 15 minút pri 1000 × g pri 4 °C. Plazma bola zmrazená pri –80 °C a uskladnená maximálne 2 mesiace pred analýzou.

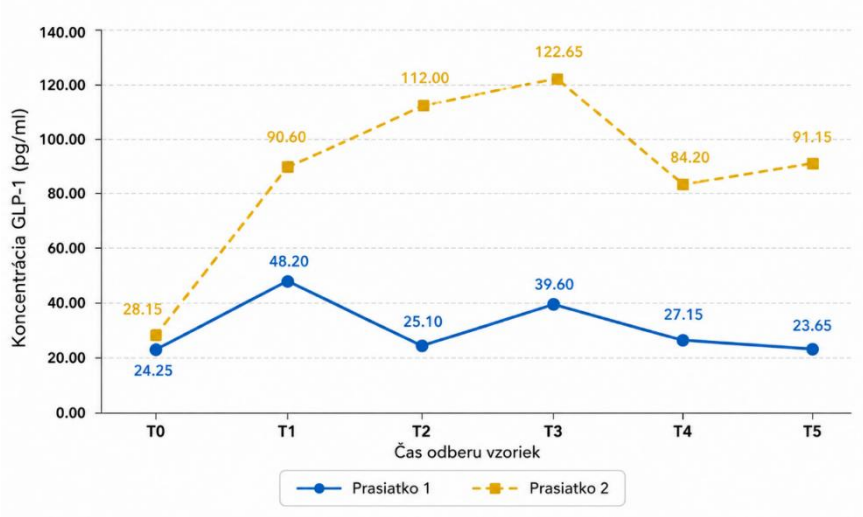
Koncentrácie GLP-1 boli stanovené súpravou Pig GLP-1 ELISA Kit (Cusabio Biotech, Čína) podľa protokolu výrobcu, každá vzorka v duplikáte (citlivosť < 3,9 pg/ml, rozsah 15,6–1000 pg/ml, intra-assay CV < 8 %, inter-assay CV < 10 %). Štúdiu schválila Etická komisia UVLF v Košiciach (č. EKVP/2026-4), v súlade so smernicou 2010/63/EÚ. Celkovo bolo analyzovaných 12 vzoriek plazmy (2 prasiatka × 6 časových bodov; obr. 1).



Obr. 1. Schéma experimentálneho dizajnu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

U oboch prasiatok bola pozorovaná výrazná interindividuálna variabilita koncentrácií GLP-1 počas sledovaného obdobia (graf 1). Obe zvieratá vykazovali nízke hodnoty pri T0, pred prvým príjmom kolostra, s následným nárastom po zahájení enterálnej výživy. Ďalší priebeh sa však medzi zvieratami líšil – u prasiatka 2 boli koncentrácie GLP-1 konzistentne vyššie než u prasiatka 1 pri všetkých nasledujúcich odberoch, s maximom pri T3, zatiaľ čo prasiatko 1 vykazovalo miernejšie kolísanie počas sledovaného obdobia.



Graf 1. Zmeny koncentrácie GLP-1 u prasiatok (T0–T5).

Zvýšenie koncentrácií GLP-1 zaznamenané po T0, výraznejšie najmä u prasiatka 2, môže súvisieť s aktiváciou inkretínového systému po zavedení enterálnej výživy. Príjem živín stimuluje sekréciu GLP-1 z enteroendokrinných L-buniek (Baggio, Drucker 2007). Podobné zmeny plazmatických koncentrácií GLP-1 v súvislosti s príjmom mlieka a odstavením u prasiatok opísali aj Knapper a kol. (1995).

Vzhľadom na nízky počet sledovaných zvierat je potrebné považovať tieto zistenia za predbežné pozorovania, ktoré si vyžadujú potvrdenie na väčšom súbore prasiatok.

ZÁVER

Pilotné sledovanie poukázalo na interindividuálne rozdiely v koncentráciách GLP-1 u prasiatok počas skorého postnatálneho obdobia. Zistené zmeny naznačujú možnú súvislosť s postnatálnym vývojom a prechodom na enterálnu výživu. Vzhľadom na nízky počet zvierat je potrebné výsledky overiť na väčšom súbore zvierat.

POĎAKOVANIE

Táto práca je podporovaná z grantu VEGA 1/0040/24: Výskum prevalencie, etiologických a predispozičných faktorov gastrických ulceratívnych zmien u ošípaných.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BAGGIO, L.L., DRUCKER, D.J. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology.* 2007, roč. 132, č. 6, s. 2131-2157. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054.

ČULKA, Ľ. a kol. Impact of preanalytical sample handling on GLP-1 measurement in porcine plasma: A pilot ELISA-based study. Veterinární medicína. 2026, in press.

DEACON, C.F. Circulation and degradation of GIP and GLP-1. *Hormone and Metabolic Research.* 2004, roč. 36, č. 11-12, s. 761-765. doi: 10.1055/s-2004-826160.

DEACON, C.F. a kol. Both subcutaneously and intravenously administered glucagon-like peptide I are rapidly degraded from the NH2-terminus in type II diabetic patients and in healthy subjects. *Diabetes.* 1995, roč. 44, č. 9, s. 1126-1131. doi: 10.2337/diab.44.9.1126.

KNAPPER, J.M. a kol. Plasma and intestinal concentrations of GIP and GLP-1 (7-36) amide during suckling and after weaning in pigs. *Hormone and Metabolic Research.* 1995, roč. 27, č. 11, s. 485-490. doi: 10.1055/s-2007-980008.

YI, J. a kol. Degradation and stabilization of peptide hormones in human blood specimens. *PLoS ONE.* 2015, roč. 10, č. 7, e0134427. doi: 10.1371/journal.pone.0134427.

VÝSKYT A NOSIČSTVO VANKOMYCÍN-REZISTENTNÝCH ENTEROKOKOV U PACIENTOV S *CLOSTRIDIOIDES DIFFICILE* INFEKCIOU

Droppová L., Čurová K.[1], Slebodníková R.
Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, LF UPJŠ, Košice

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo vyhodnotiť výskyt vankomycín rezistentných enterokokov (VRE) u pacientov s prítomnou infekciou spôsobenou *C. difficile* a stanoviť prítomnosť génu rezistencie *vanA*. Do štúdie bolo zaradených 187 vzoriek stolíc od pacientov hospitalizovaných v Univerzitnej nemocnici L. Pasteura v Košiciach v rokoch 2025-2026. Vzorky boli kultivované na selektívnom agare s prídavkom vankomycínu. Izolované kmene boli identifikované pomocou MALDI-TOF MS. Citlivosť na vankomycín bola hodnotená stanovením minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) pomocou E-testu a výsledky boli hodnotené podľa klinických breakpointov EUCAST. Pri všetkých izolátoch bola po izolácii genómovej DNA vykonaná PCR analýza zameraná na detekciu génu *vanA*. Prítomnosť enterokokov bola kultivačne potvrdená v 88 zo 187 vzoriek (47,1 %), z ktorých bolo získaných 103 izolátov. Najčastejším identifikovaným druhom bol *Enterococcus faecium* (n = 63). Na základe testovania MIC bola rezistencia na vankomycín zaznamenaná pri 60 izolátoch (59 izolátov s MIC > 256 μg/ml a 1 izolát s MIC > 12 μg/ml). Gén *vanA* bol potvrdený pri 58 izolátoch (57 izolátov s MIC > 256 μg/ml a 1 izolát s MIC 12 μg/ml). Rezistencia enterokokov na vankomycín v našom súbore pacientov, pri ktorých bola potvrdená prítomnosť génu *vanA*, predstavuje celkovo 31 %.

ÚVOD

Vankomycín-rezistentné enterokoky (VRE) boli prvýkrát zaznamenané koncom 20. storočia a postupne sa rozšírili po celom svete (Gilmore a kol. 2024). Najčastejšie sa vyskytujú práve v zdravotníckych zariadeniach, kde predstavujú významnú príčinu nozokomiálnych infekcií a v súčasnosti sú zaradené aj do skupiny ESKAPE. Z klinického hľadiska majú najväčší význam *E. faecium* a *E. faecalis*, ktoré patria medzi významných pôvodcov nozokomiálnych infekcií. Problémom je hlavne ich schopnosť získavať rezistenciu na antibiotiká. Významná je rezistencia na vankomycín, ktorá výrazne obmedzuje možnosti liečby enterokokových infekcií (Mubarak a kol. 2024). Rezistencia na vankomycín sa v klinickej praxi častejšie spája s druhom *E. faecium.* Aj z tohto dôvodu zaradila Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) vankomycín rezistentný *E. faecium* medzi bakteriálne patogény s vysokou prioritou. Z viacerých známych génov spojených s rezistenciou na vankomycín majú najväčší klinický význam gény *vanA* a *vanB*. Ich výskyt sa môže líšiť medzi jednotlivými krajinami a regiónmi v závislosti od epidemiologickej situácie (Mareković a kol. 2024).

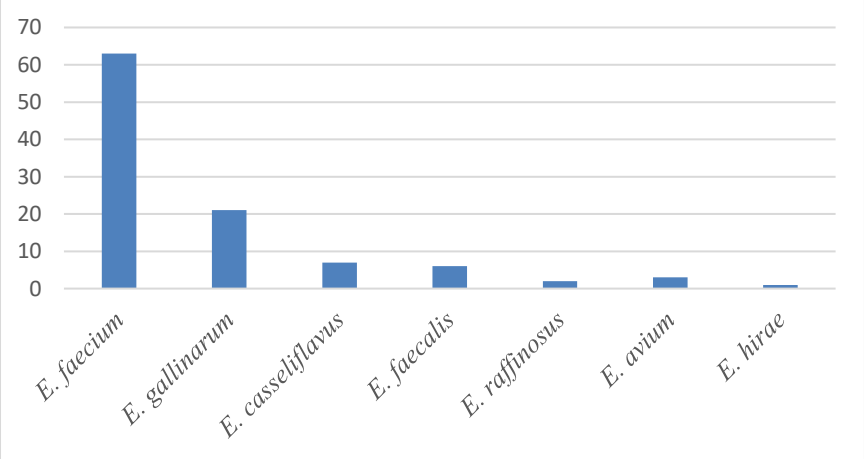
MATERIÁL A METODIKA

Do práce bolo zaradených 187 vzoriek stolice od pacientov hospitalizovaných v Univerzitnej nemocnici L. Pasteura (UNLP) v Košiciach v období rokov 2025 – 2026, u ktorých bola potvrdená infekcia spôsobená *Clostridioides difficile*. Vzorky boli vyšetrované v laboratóriu klinickej mikrobiológie UNLP pomocou imunochromatografického (ICH) testu, ktorým bola detekovaná glutamátdehydrogenáza (GDH) a toxíny A a B. Vzorky stolíc boli naočkované na selektívny enterokokový agar (*Enterococcosel agar*) s prídavkom vankomycínu v koncentrácii 6 μg/ml a následne inkubované pri teplote 37 °C počas 48 hodín. Po inkubácii boli kolónie s odlišnou morfológiou preočkované na krvný agar (KA) s cieľom získať čisté bakteriálne kultúry vhodné na ďalšiu identifikáciu. Druhová identifikácia izolovaných bakteriálnych izolátov bola vykonaná pomocou hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight) (Bruker Daltonics).

U enterokokov bola stanovená minimálna inhibičná koncentrácia vankomycínu pomocou E-testu. Bakteriálna suspenzia s hustotou 0,5 McFarland bola naočkovaná na Mueller–Hinton agar, následne bol aplikovaný E-test s vankomycínom. Po inkubácii pri 37 °C počas 18-20 hodín boli hodnoty MIC odčítané a interpretované podľa aktuálnych klinických breakpointov EUCAST (verzia 16.1). U vybraných izolátov bola pre PCR analýzu vyizolovaná genomická DNA použitím izolačného kitu GRISP (GRS Genomic DNA kit). Na detekciu génu *vanA* boli použité primery *vanA_F* (5′-TGGCAGCTACGTTTACCTATCC-3′) a *vanA_R* (5′-AGCCTGATTTGGTCCACCT-3′). PCR reakcia prebiehala v termocykléri Biometra (Biometra TOne 96 G, 230 V, Analytik Jena, Jena, Germany). K amplifikácii bol použitý PCR program, ktorý pozostával z úvodnej denaturácie pri 95 °C/3 min, následne 30 cyklov 95 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/20 s a 10 cyklov 95 °C/30 s, 61 °C/30 s, 72 °C/20 s. Finálna elongácia prebiehala pri 72 °C počas 10 min. Na separáciu PCR produktov bol použitý 1,5 % agarózový gél s fluorescenčným farbivom ECO Safe (Uniscience), na vizualizáciu a analýzu fotodokumentačný systém Gel Doc™ EZ (BIO-RAD) so softvérom Image Lab (BIO-RAD).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

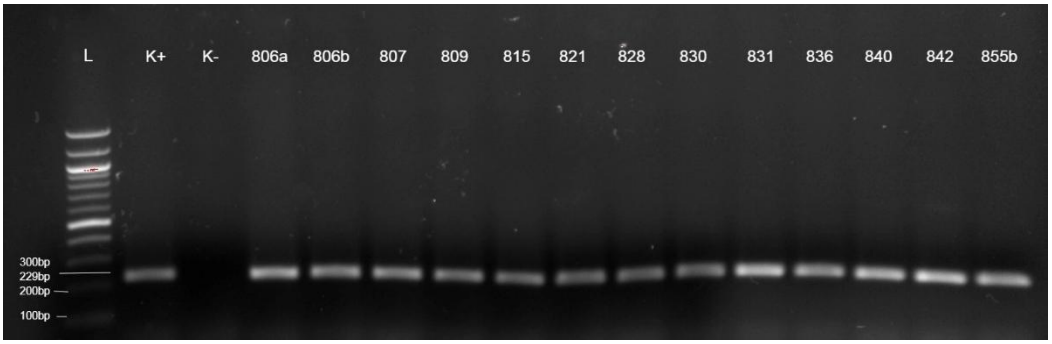
V súbore 187 vzoriek stolíc bola prítomnosť enterokokov kultivačne potvrdená v 88 vzorkách. Z pozitívnych vzoriek bolo pomocou MALDI-TOF potvrdených celkovo 103 izolátov. Najčastejším zastúpeným druhom bol *Enterococcus faecium* (n = 63), nasledovaný druhom *Enterococcus gallinarum* (n = 21). V menšom počte boli zastúpené druhy *Enterococcus casseliflavus* (n = 7), *Enterococcus faecalis* (n = 6), *Enterococcus avium* (n = 3), *Enterococcus raffinosus* (n = 2) a *Enterococcus hirae* (n = 1). Druhové zastúpenie izolovaných enterokokov znázorňuje graf č. 1.



Graf 1. Druhové zastúpenie enterokokov v sledovanom súbore 103 izolátov.

Citlivosť na vankomycín bola hodnotená pomocou E-testu. Hodnota MIC > 256 µg/ml bola zistená celkovo u 59 izolátov, z ktorých 57 patrilo k druhu *E. faecium* a dva k druhu *E. raffinosus*. Hodnota MIC = 12 µg/ml bola zistená u jedného izolátu *E. faecium*. U druhov *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* nebola citlivosť na vankomycín testovaná, keďže tieto druhy sa vyznačujú prirodzenou nízkou úrovňou rezistencie na vankomycín. Prítomnosť génu *vanA* bola analyzovaná u všetkých rezistentných izolátov. Z 59 izolátov s MIC > 256 µg/ml bol gén *vanA* potvrdený u 57 izolátov. Okrem toho bol gén *vanA* bol zároveň detegovaný aj u jedného izolátu *E. faecium* s hodnotou MIC 12 µg/ml. Celkovo tak bola prítomnosť génu *vanA* potvrdená u 58 izolátov, čo po prepočte na celý súbor pacientov predstavuje 31,01 %. Tento výsledok poukazuje na významné zastúpenie VRE nesúcich gén *vanA* medzi sledovanými pacientmi a na možnú vysokú mieru kolonizácie pacientov s infekciou *C. difficile*. Podobné vysoké zastúpenie *E. faecium* medzi enterokokovými izolátmi bolo zaznamenané aj v štúdii

Moosavian a kol. (2018), v ktorej boli vyšetrované rektálne výtery od pacientov z jednotky intenzívnej starostlivosti (JIS) v Iráne s cieľom detegovať prítomnosť enterokokov a génov rezistencie. Najčastejšie izolovaným druhom bol *E. faecium*, ktorý predstavoval 54,3 % všetkých izolátov. V našom súbore zastúpenie tohto druhu predstavovalo 71,5 %. Autori zároveň zaznamenali vysoký výskyt génu *vanA* medzi izolátmi rezistentnými alebo čiastočne citlivými na vankomycín, na úrovni 91,6 %. Tieto výsledky sú porovnateľné s našimi výsledkami, keďže sme *vanA* potvrdili pri 58 zo 60 izolátov (96,7%). Yan a kol. (2025) v svojej štúdii detekovali prítomnosť *van* génov a *vanA* vykazoval najväčšie zastúpenie (40,9 %) zo všetkých vyšetrovaných *van* génov u enterokokových izolátov. Zaujímavým zistením bolo pre nás potvrdenie génu *vanA* u *E. faecium*, ktorý v testovaní citlivosti vykazoval hodnotu MIC 12 µg/ml. Nesúlad medzi prítomnosťou génu *vanA* a úrovňou fenotypovej rezistencie bol opísaná aj v štúdii Naas a kol. (2005). Autori opisujú možný heterogénny typ *vanA* rezistencie, ktorá sa nazýva aj „*vanD*-like“ fenotyp a je asociovaný s *vanA* genotypom. Môže ísť o prípad, kde dochádza ku zmenám v štruktúre alebo expresii génového klastra *vanA*, napr. ak sa neprenesie celý *vanA* klaster, ale iba jeho časť. Toto zistenie je dôležité aj z klinického hľadiska, keďže vankomycín patrí medzi liečivá, ktoré sa používajú pri terapii infekcií spôsobených *C. difficile.*



Obr. 1. Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov génu vanA (229 bp). Dráhy: 1 – DNA marker (100 bp, Invitrogen), 2 – pozitívna kontrola, 3 – negatívna kontrola, 4 – 16 klinické kmene Enterococcus spp.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky VEGA 1/0529/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

GILMORE MS, a kol. The enterococcal pangenome and adaptive potential. Trends in Microbiology. 2024. DOI: 10.1016/j.tim.2023.12.006.

MAREKOVIĆ I, a kol. Vancomycin-Resistant Enterococci: Current Challenges and Future Prospects. Pathogens. 2024; 13(11):966. DOI: 10.3390/pathogens13110966.

MOOSAVIAN M, a kol. Molecular detection of *vanA* and *vanB* genes among vancomycin-resistant enterococci in ICU-hospitalized patients in Ahvaz in southwest of Iran. Infection and Drug Resistance. 2018; 11:2269–2275. DOI: 10.2147/IDR.S177886.

MUBARAK AG, a kol. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from fish, vegetables, and humans. Scientific Reports. 2024; 14:21741.

NAAS T, a kol. First Nosocomial Outbreak of Vancomycin-Resistant *Enterococcus* faecium Expressing a *VanD*-Like Phenotype Associated with a *vanA* Genotype. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43(8):3642–3649. DOI: 10.1128/JCM.43.8.3642-3649.2005.

YAN R, a kol. Deciphering vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*: gene distribution, sequence typing, and global phylogenetic analysis. Frontiers in Microbiology. 2025; 16. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1578903.

VPLYV METABOLIZMU KYSELINY HYALURÓNOVEJ NA RECEPTIVITU ENDOMETRIA A IMPLANTÁCIU EMBRYA

Fabianová N., Kriváková E. Rabajdová M.
Ústav lekárskej a klinickej biochémie, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach

ABSTRAKT

Úspešná implantácia embrya závisí od funkčnej receptivity endometria a interakcie blastocysty s luminálnym epitelom, ktorej významnou súčasťou je glykokalyx obsahujúci kyselinu hyalurónovú (HA). Cieľom práce bolo objasniť úlohu HA, jej metabolizmu a molekulovej hmotnosti pri regulácii funkčnej receptivity endometriálneho epitelu. Experimentálna časť bola realizovaná na *in vitro* modeli buniek Ishikawa, pričom nereceptívny fenotyp bol indukovaný 17β-estradiolom alebo lipopolysacharidom. Funkčná receptivita bola hodnotená adhéziou trofoblastových sféroidov JAR. Analyzovala sa expresia markerov receptivity a génov metabolizmu a signalizácie HA, prítomnosť HA na povrchu buniek a vplyv exogénnej HA s rôznou molekulovou hmotnosťou. Experimentálne výsledky doplnila reanalýza verejne dostupných transkriptomických dát endometria pacientok s opakovaným zlyhaním implantácie (RIF). Nereceptívny fenotyp bol spojený so zníženou adhéziou sféroidov a poklesom expresie viacerých génov metabolizmu HA. Exogénna HA ovplyvňovala adhéziu v závislosti od molekulovej hmotnosti, pričom najvýraznejší účinok vykazovala nízkomolekulová HA a vybrané oligosacharidy. V endometriu pacientok s RIF bola pozorovaná znížená expresia viacerých génov súvisiacich s metabolizmom a organizáciou HA. Výsledky podporujú význam HA ako dynamického regulátora endometriálnej receptivity a skorých interakcií medzi embryom a endometriom.

ÚVOD

Úspešná implantácia embrya je komplexný proces podmienený kvalitou embrya, jeho časovou synchronizáciou s endometriom a funkčnou pripravenosťou endometriálneho epitelu. Počas krátkeho obdobia označovaného ako implantačné okno, ktoré sa nachádza v strednej sekrečnej fáze menštruačného cyklu, prechádza luminálny epitel endometria molekulovými a štruktúrnymi zmenami vedúcimi k získaniu receptívneho fenotypu (Ruiz-Alonso a kol., 2021). Porucha týchto procesov môže viesť k zlyhaniu implantácie a predstavuje významný problém najmä u pacientok s opakovaným zlyhaním implantácie. Prvý kontakt blastocysty s endometriom prebieha na apikálnom povrchu luminálneho epitelu, ktorý je pokrytý glykokalyxom. Táto dynamická pericelulárna vrstva ovplyvňuje hydratáciu a mechanické vlastnosti bunkového povrchu, dostupnosť receptorov a bunkovú adhéziu. Jednou z jej významných zložiek je HA, nesulfátovaný glykozaminoglykán tvorený opakujúcimi sa jednotkami kyseliny glukurónovej a N-acetylglukozamínu. Biologické vlastnosti HA závisia nielen od jej množstva, ale aj od molekulovej hmotnosti, dynamiky syntézy a degradácie a interakcie s receptormi, najmä CD44 (Jiang a kol., 2011; Triggs-Raine a Natowicz, 2015). Distribúcia HA v endometriu sa počas menštruačného cyklu dynamicky mení a jej zvýšená prítomnosť bola opísaná v období súvisiacom s implantáciou (Afify a kol., 2006). Zmeny syntézy, degradácie alebo organizácie HA preto môžu ovplyvňovať vlastnosti endometriálneho glykokalyxu a následne počiatočnú interakciu medzi embryom a endometriom. Cieľom práce bolo charakterizovať zmeny metabolizmu HA v modeloch nereceptívneho endometriálneho epitelu a posúdiť vplyv molekulovej hmotnosti HA na funkčnú receptivitu. Experimentálne výsledky boli následne porovnané s transkriptomickým profilom endometria pacientok s RIF.

MATERIÁL A METODIKA

Ako model receptívneho endometriálneho epitelu boli použité hormonálne responzívne bunky Ishikawa kultivované do konfluentnej monovrstvy. Nereceptívny fenotyp bol indukovaný 24-hodinovým pôsobením 17β-estradiolu (1–100 nmol/l) alebo lipopolysacharidu z *Escherichia coli* (50–200 ng/ml), reprezentujúcimi alterovanú estrogénovú signalizáciu alebo zápal. Na moduláciu endogénnej HA bola použitá hyaluronidáza zo *Streptomyces* SpHyl (260 U/ml) a inhibítor syntézy HA 4-metylumbeliferón (500 μmol/l). Účinok molekulovej hmotnosti HA bol hodnotený po aplikácii exogénnej HA s molekulovou hmotnosťou 1,5 MDa, 290 kDa a 33 kDa a HA oligosacharidov s 8, 12 a 16 podjednotkami v koncentrácii 0,1 mg/ml. Funkčná receptivita bola stanovená pomocou adhézneho testu trofoblastových sféroidov pripravených z buniek JAR metódou visiacej kvapky. Relatívna génová expresia markerov receptivity a génov metabolizmu a signalizácie HA bola analyzovaná metódou RT-qPCR. Prítomnosť HA na povrchu buniek bola detegovaná pomocou biotinylovaného HA-väzbového proteínu a konfokálnej mikroskopie. Experimentálne výsledky boli doplnené reanalýzou verejne dostupných transkriptomických dát, v ktorých boli porovnávané fertilné kontroly (n = 16) a pacientky s RIF (n = 19) v strednej sekrečnej fáze menštruačného cyklu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Nereceptívne modely a metabolizmus HA. Alterovaná estrogénová signalizácia aj zápalové pôsobenie znižovali adhéziu JAR sféroidov k monovrstve Ishikawa buniek. V oboch modeloch sa zároveň opakoval pokles expresie HAS3, HYAL2, TMEM2 a CD44, čo poukazuje na spoločné narušenie syntézy, degradácie aj receptorom sprostredkovanej signalizácie HA. Povrchový signál HA však nebol v oboch modeloch totožný. Po pôsobení estradiolu sa významne nemenil, zatiaľ čo po lipopolysacharide sa zvyšoval. Zníženú receptivitu preto nemožno vysvetliť iba množstvom HA na povrchu buniek. Význam môže mať aj jej molekulová hmotnosť, priestorová organizácia a väzba na proteíny glykokalyxu, čo je v súlade s veľkostne závislými biologickými účinkami HA (Jiang a kol., 2011).

Modulácia endogénnej HA. Degradácia HA pomocou SpHyl zvýšila funkčnú adhéziu trofoblastových sféroidov, hoci expresia ITGB3 významne klesla a pri LIF bol pozorovaný klesajúci trend. Inhibícia syntézy HA pomocou 4-metylumbeliferónu funkčnú receptivitu významne nezmenila, ale znížila expresiu CD44 a ITGB3. Obidva zásahy zároveň prevažne tlmili expresiu génov súvisiacich s metabolizmom HA. Nesúlad medzi funkčným adhéznym testom a expresiou jednotlivých markerov môže byť diskutovaný ako spätná regulácia génovej expresie po zvýšení funkčnej receptivity. Výsledky naznačujú, že zmeny organizácie HA-dependentného glykokalyxu môžu ovplyvňovať dostupnosť adhéznych molekúl a tým aj funkčný stav povrchu endometriálneho epitelu.

Vplyv molekulovej hmotnosti exogénnej HA. Pridanie HA menilo adhéziu sféroidov v závislosti od jej molekulovej hmotnosti. Vysokomolekulová HA a najkratší testovaný oligosacharid oHA8 zvyšovali receptivitu iba mierne, zatiaľ čo stredne molekulová HA vykazovala výraznejší účinok. Štatisticky významné zvýšenie adhézie bolo pozorované pri nízkomolekulovej HA a oligosacharidoch oHA12 a oHA16. Tieto výsledky ukazujú, že biologický účinok HA na skorú adhéziu trofoblastu závisí od veľkosti molekuly.

Napriek zvýšenej funkčnej adhézii nebola pozorovaná zodpovedajúca aktivácia klasických markerov receptivity. Nízkomolekulová HA a dlhšie oligosacharidy znižovali expresiu viacerých sledovaných génov, najmä LIF, pričom v niektorých podmienkach bol zaznamenaný aj pokles HOXA10 alebo ITGB3. Funkčný účinok HA teda nemožno vysvetliť jednoduchým zvýšením expresie tradičných markerov receptivity. Výsledky skôr podporujú význam rýchlych zmien povrchových interakcií a organizácie glykokalyxu pri prvom

kontakte trofoblastu s endometriálnym epitelom. Klinické štúdie prenosových médií obohatených o HA takisto poukazujú na jej potenciál podporiť implantáciu, hoci mechanizmus účinku a optimálna molekulová forma zostávajú otvorené (Heymann a kol., 2022).

Metabolizmus HA pri opakovanom zlyhaní implantácie. V transkriptomických dátach endometria zo strednej sekrečnej fázy bol v skupine RIF HA-génový profil prevažne utlmený. Medzi najvýraznejšie znížené gény patrili HAS3, CEMIP, HYAL2, CEMIP2 a CD44, ako aj TSG6 a ITIH4, ktoré sa podieľajú na organizácii HA v extracelulárnej matrix. HMMR sa menil minimálne a ITIH5 mierne stúpal. Analýza hlavných komponentov ukázala čiastočné oddelenie fertilných kontrol a pacientok s RIF, ale aj prekrytie skupín. HA-génový profil preto predstavuje jednu zložku komplexného fenotypu RIF a nie samostatný univerzálny diagnostický znak.

Experimentálne a transkriptomické výsledky spoločne prepájajú metabolickú aktivitu buniek, vlastnosti pericelulárnej HA vrstvy a receptorovú signalizáciu. Vysokomolekulová HA vytvára hydratovanú sieť, zatiaľ čo kratšie fragmenty môžu meniť dostupnosť receptorov. Rýchly obrat HA zabezpečovaný syntázami a degradačnými enzýmami umožňuje glykokalyxu reagovať na hormonálne a zápalové podnety (Triggs-Raine a Natowicz, 2015). Pri narušení tejto dynamiky preto môže mať endometrium relatívne zachované množstvo HA, ale zmenené molekulové zloženie alebo organizáciu.

Použité modely majú svoje limity. Nádorové bunkové línie Ishikawa a JAR nezachytávajú úplnú architektúru endometria ani vlastnosti prirodzenej blastocysty a transkriptomická reanalýza poukazuje na asociáciu, nie na príčinný vzťah. Práca však prepája funkčný adhézny test, expresnú analýzu, mikroskopiu a pacientske transkriptomické dáta a podporuje ďalšie skúmanie úlohy metabolizmu HA a endometriálneho glykokalyxu pri poruchách implantácie.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektmi VEGA 1/0747/24 a NFP401101F893 (FEMHA).

POUŽITÁ LITERATÚRA

AFIFY, A. M., CRAIG, S. a PAULINO, A. F. G. Temporal variation in the distribution of hyaluronic acid, CD44s, and CD44v6 in the human endometrium across the menstrual cycle. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* 2006, roč. 14, č. 3, s. 328–333. ISSN 1541-2016.

HEYMANN, D., a kol. The effect of hyaluronic acid in embryo transfer media in donor oocyte cycles and autologous oocyte cycles: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction.* 2022, roč. 37, č. 7, s. 1451–1469. ISSN 0268-1161.

JIANG, D., LIANG, J. a NOBLE, P. W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological Reviews.* 2011, roč. 91, č. 1, s. 221–264. ISSN 0031-9333.

RUIZ-ALONSO, M., a kol. Endometrial Receptivity Analysis (ERA): data versus opinions. *Human Reproduction Open.* 2021, roč. 2021, č. 2, hoab011. ISSN 2399-3529.

TRIGGS-RAINE, B. a NATOWICZ, M. R. Biology of hyaluronan: insights from genetic disorders of hyaluronan metabolism. *World Journal of Biological Chemistry.* 2015, roč. 6, č. 3, s. 110–120. ISSN 1949-8454.

MULTIOMICKÁ CHARAKTERIZÁCIA TRANSPLANTÁTOV POHLAVNE ŠPECIFICKEJ FEKÁLNEJ MIKROBIOTY OD ZDRAVÝCH DETÍ A DETÍ S PORUCHOU AUTISTICKÉHO SPEKTRA

Farkašová S.[1], Gancarčíková S.[1] , Demečková V. [2], Ryniková M. [2], Lauko S.[1], Spišáková D.[1], Šmajda Rodáková K. [3], Strompfová V. [4], Petrovová E. [5], Sashova Tomova A.[6], Rašková B.[6], Ostatníková D.[6]

[1]Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach

[2]Katedra fyziológie živočíchov, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ v Košiciach, 040 01 Košice, SR

[3]Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

[4]Centrum biovied Slovenskej akadémie vied, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, 040 01 Košice, SR

[5]Katedra morfologických disciplín, UVLF v Košiciach

[6]Fyziologický ústav Lekárskej fakulty, UK, 813 72 Bratislava, SR

ABSTRAKT

Poruchy autistického spektra (PAS) predstavujú skupinu neurovývinových porúch, pri ktorých sú opakovane opisované zmeny črevného mikrobiálneho ekosystému. Cieľom štúdie bolo komplexne porovnať bakteriálnu mikrobiotu, mykobióm a metabolomický profil transplantátov fekálnej mikrobioty od dievčat s PAS a neurotypických dievčat. Napriek relatívne podobnému taxonomickému zloženiu a spoločnému jadru bakteriálnej mikrobioty sa transplantáty výraznejšie odlišovali v zložení mykobiómu, najmä zvýšeným zastúpením rodu *Candida* pri PAS. Najvýraznejšiu diferenciáciu preukázala metabolomická analýza, ktorá jednoznačne separovala obe skupiny a poukázala na rozdiely v metabolickej aktivite mikrobioty. Výsledky podporujú prítomnosť funkčnej dysbiózy črevného mikrobiálneho ekosystému pri PAS, ktorá nemusí byť sprevádzaná výraznými zmenami bakteriálneho taxonomického zloženia.

ÚVOD

Porucha autistického spektra (PAS) je multifaktoriálna, vysoko hereditárna neurovývinová porucha charakterizovaná narušením sociálnej interakcie a komunikácie, stereotypným správaním, obmedzenými záujmami a selektivitou v príjme potravy (Angrand a kol., 2022). Napriek opakovane opisovanej dysbióze nebol doposiaľ identifikovaný jednoznačný mikrobiálny profil charakteristický pre PAS (Yang a kol., 2020; Zebrowska a kol., 2021; Angrand a kol., 2022). Cieľom štúdie bolo komplexne charakterizovať a porovnať taxonomické zloženie bakteriálnej mikrobioty, črevný mykobióm a metabolomický profil transplantátov fekálnej mikrobioty získaných od dievčat s PAS a neurotypických donoriek, s dôrazom na identifikáciu rozdielov v štruktúre a funkčnom metabolickom potenciáli črevného mikrobiálneho ekosystému.

MATERIÁL A METODIKA

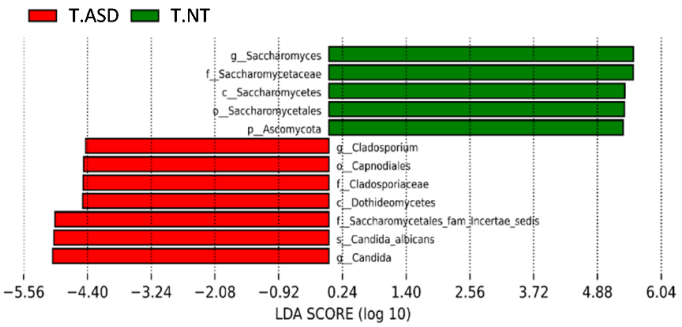
Odber biologického materiálu od zdravých detí a detí s PAS bol v rámci výskumného projektu č. 14/2018/OVaV schválený Etickou komisiou Univerzitnej nemocnice Bratislava a Lekárskej fakulty (LF) Univerzity Komenského (UK) v Bratislave, Nemocnica Staré Mesto. Psychologické a psychiatrické vyšetrenia boli realizované v Akademickom centre výskumu autizmu pri Fyziologickom ústave LF UK v Bratislave. Do výberu vhodných darcov FMT boli zaradené dievčatá s diagnostikovanou poruchou autistického spektra. Diagnóza PAS bola stanovená pomocou štandardizovaných diagnostických nástrojov považovaných za zlatý štandard, konkrétne (ADOS-2) (Lord a kol. 2012) a (ADI-R) (Lord a kol. 1997), pričom porovnávacie skóre bolo vyššie ako 7. Neurotypické, teda zdravé dievčatá boli z bežnej populácie. Priemerný vek dievčat s PAS bol 5,05 ± 0,9 roka a neurotypických dievčat 4,67 ± 0,54 roka, pričom medzi skupinami nebol zistený štatisticky významný rozdiel. Bakteriálny profil vzoriek FMT bol analyzovaný pomocou sekvenovania novej generácie (NGS) so zacielením na oblasť V3–V4 génu 16S rRNA. Prípravu knižníc, sekvenovanie a primárne

bioinformatické spracovanie realizovala spoločnosť Novogene (Mníchov, Nemecko). Fekálny metabolóm bol analyzovaný pomocou necielenej LC-MS metabolomiky, ktorú realizovala spoločnosť BMKGENE (Münster, Nemecko). Diferenciálne metabolity boli identifikované na základe kritérií VIP > 1,0 a $p < 0,05$ a ich biologický význam bol interpretovaný pomocou analýzy metabolických dráh KEGG.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

NGS analýza FMT získaných od dievčat s PAS (T.ASD, n=4) a neurotypických dievčat (T.NT, n=4) preukázala rozdiely v mikrobiálnom zložení na viacerých taxonomických úrovniach. Na úrovni kmeňov dominovali v oboch transplantátoch Firmicutes, pričom celkové zastúpenie Firmicutes a Bacteroidota bolo relatívne porovnateľné (T.NT: 70,83 % a 23,87 %; T.ASD: 64,58 % a 30,08 %). V transplantátoch T.ASD teda nebol pozorovaný zvýšený pomer Firmicutes/Bacteroidota, ktorý bol v niektorých štúdiách opisovaný u detí s PAS ako potenciálny ukazovateľ črevnej dysbiózy. Metaanalytické údaje však poukazujú na značnú variabilitu tohto pomeru medzi jednotlivými štúdiami a kohortami (Lewandowska-Pietruszka a kol. 2023). Na úrovni čeľadí sa T.ASD vyznačoval vyšším relatívnym zastúpením Lachnospiraceae (35,50 %) a Ruminococcaceae (18,82 %), čo je v súlade s predchádzajúcimi zisteniami poukazujúcimi na zmenené zastúpenie týchto taxónov a možné zmeny fermentačnej a metabolickej aktivity mikrobioty pri PAS. Na úrovni rodov boli v oboch transplantátoch dominantne zastúpené *Bacteroides, Faecalibacterium, Lactobacillus* a *Lachnospiraceae* NK4A136 group. LEfSe analýza identifikovala štatisticky významný rozdiel v zastúpení rodu *Lactobacillus*, ktorý bol vyššie zastúpený v T.NT. Tento výsledok je v kontraste so zisteniami Tomovej a kol. (2015), ktorí zaznamenali zvýšené zastúpenie *Lactobacillus* u detí s PAS. Celkovo teda oba transplantáty vykazovali podobné jadrové zloženie bakteriálnej mikrobioty, pričom rozdiely medzi T.NT a T.ASD sa prejavili najmä na úrovni relatívneho zastúpenia vybraných čeľadí a rodov.

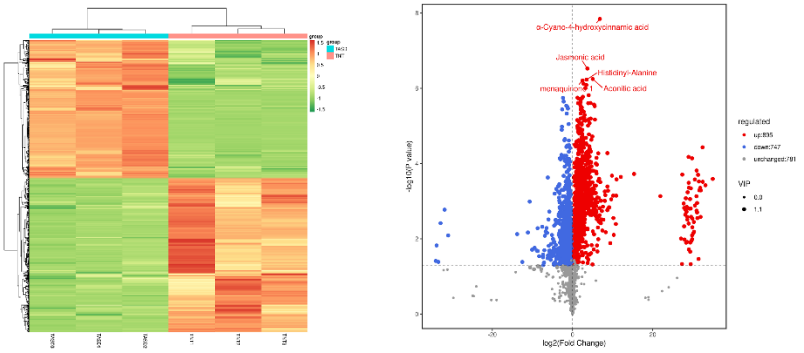
LDA analýza črevného mykobiómu (Obr.1) preukázala štatisticky významné rozdiely medzi transplantátmi T.NT a T.ASD. V T.NT bolo zaznamenané vyššie relatívne zastúpenie rodu *Saccharomyces* a príbuzných taxónov, ktoré sú považované za nepatogénne zložky črevného mykobiómu a spájajú sa so stabilnejšou štruktúrou fungálnej komunity a udržiavaním integrity črevnej bariéry. Naopak, T.ASD sa vyznačoval zvýšeným zastúpením rodu *Cladosporium* a druhov rodu *Candida*, vrátane *Candida albicans*.



Obr. 1. Histogram skóre lineárnej diskriminačnej analýzy (LDA) črevného mykobiómu. Znázornené sú taxóny s rozdielnym zastúpením na viacerých taxonomických úrovniach medzi transplantátmi T.ASD (červená) a T.NT (zelená), ktoré spĺňali prah významnosti LDA $\log_{10} > 2$.

Zvýšené zastúpenie *C. albicans* sa spája s narušením mikrobiálnej homeostázy čreva, zápalovou odpoveďou, poškodením integrity črevnej bariéry a zvýšenou intestinálnou permeabilitou (Coker a kol. 2019). Analýza mykobiómu poukázala na výraznejšie rozdiely medzi transplantátmi než analýza bakteriálnej mikrobioty, pričom hlavným rozlišovacím znakom FMT pochádzajúceho od donoriek s PAS bolo zvýšené zastúpenie rodu *Candida*.

Heatmapa metabolomického profilu založená na hierarchickom klastrovaní (Obr.2) preukázala jednoznačnú separáciu T.NT a T.ASD a dva hlavné klastre metabolitov s opačným zastúpením, čo poukazuje na systematické rozdiely v metabolickej aktivite oboch transplantátov.



Obr. 2. Heatmapa štandardizovaného zastúpenia metabolitov (z-skóre).
Zobrazené sú metabolomické profily transplantátov T.NT a T.ASD, pričom každý transplantát je zastúpený tromi technickými replikátmi (T.NT1–T.NT3 a T.ASD1–T.ASD3).
Obr. 3. Volcano plot diferenciálneho zastúpenia metabolitov medzi transplantátmi T.NT a T.ASD.
Os x predstavuje log_2(T.NT/T.ASD) fold change a os y $-log_{10}$(p-value). Červené body označujú metabolity významne zvýšené v T.NT, modré v T.ASD a sivé nevýznamné zmeny. Za signifikantne zmenené sa považovali metabolity pri p < 0,05 a |log_2(T.NT/T.ASD)|

Výrazná diferenciácia zároveň naznačuje, že metabolomické profilovanie môže zachytiť funkčné rozdiely mikrobioty citlivejšie než samotná analýza taxonomického zloženia. Volcano analýza (**Obr.3**) potvrdila odlišný metabolický profil T.NT a T.ASD. V T.NT boli vo vyššom zastúpení α-kyano-4-hydroxyškoricová kyselina, kyselina jazmónová a histidinyl-alanín, súvisiacimi najmä s metabolizmom fenolových zlúčenín, substrátov rastlinného pôvodu a aminokyselín. Naopak, T.ASD sa vyznačoval vyšším zastúpením kyseliny akonitovej a menachinónu (vitamínu K2), čo môže súvisieť so zmenami energetického metabolizmu a mikrobiálnou metabolickou kapacitou. Napriek relatívne podobnému bakteriálnemu zloženiu boli medzi FMT od dievčat s PAS a neurotypických dievčat preukázané výrazné rozdiely v mykobióme a metabolickom profile, podporujúce prítomnosť funkčnej dysbiózy črevného mikrobiálneho ekosystému pri PAS.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola uskutočnená vďaka podpore projektov APVV-20-0114 a VEGA 1/0139/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

Angrand L, a kol. Inflammation and autophagy: A convergent point between autism spectrum disorder (ASD)-related genetic and environmental factors: Focus on aluminum adjuvants. Toxics 2022; 10: 518.

Yang J, a kol. Effects of gut microbial-based treatments on gut microbiota, behavioral symptoms, and gastrointestinal symptoms in children with autism spectrum disorder: A systematic review. Psychiatry Res. 2020; 293: 113471.

Zebrowska P, a kol. Future directions in reducing gastrointestinal disorders in children with ASD using fecal microbiota transplantation. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021; 11: 630052.

Lord C, a kol. Autism Diagnostic Observation Schedule; Western Psychological Services: Torrance, CA, USA, 2012.

Lord C. a kol. Diagnosing autism: Analyses of data from the Autism Diagnostic Interview. J. Autism Dev. Disord. 1997; 27: 501–517.

Lewandowska-Pietruszka Z, Figlerowicz M. and Mazur-Melewska K. Microbiota in autism spectrum disorder: A systematic review. Int. J. Mol. Sci. 2023; 24: 16660.

Tomova A, a kol. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. Physiol. Behav. 2015; 138: 179–187.

Coker O.O, a kol. Enteric fungal microbiota dysbiosis and ecological alterations in colorectal cancer. Gut 2019, 68: 654–662.

HLODAVCE AKO POTENCIÁLNY PRAMEŇ ZOONOTICKÝCH PROTOZOÍ

Fedorková B., Štrkolcová G., Schreiberová A., Halán M., Petroušková P.
Katedra epizootológie, parazitológie a ochrany spoločného zdravia, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Giardia duodenalis a *Cryptosporidium* spp. sú črevné protozoa vyvolávajúce hnačkovité ochorenia u rôznych hostiteľských skupín vrátane človeka. Malé hlodavce chované ako domáce zvieratá sú v úzkom kontakte s ľuďmi a môžu byť rezervoárom týchto zoonotických patogénov. Z dostupných publikácií bola v tejto hostiteľskej skupine zistená prevalencia *Cryptosporidium* spp. 27,0 % a 21,8 % pre *G. duodenalis.* V tejto štúdii bolo vyšetrených 84 vzoriek hlodavcov z chovproduktov z miest Košice a Prešov. Mikroskopicky boli potvrdené cysty rodu *Giardia* v 4 vzorkách potkanov a v 6 vzorkách z činčíl. V 1 vzorke z potklanov bola úspešná amplifikácia *gdh* génu a preukázala sa v nej prítomnosť *G. duodenalais* asembláž G. V 4 izolátoch z mikroskopicky pozitívnych vzoriek činčíl sa molekulárnou analýzou *tpi* a *gdh* génov potvrdila prítomnosť zoonotickej *G. duodenalais* asembláž B. Komerčným ELISA kitom bol koproantigén pre *Cryptosporidium* spp. prítomný len v 1 vzorke avšak molekulárna analýza preukázala rod *Cryptosporidium* v 11 zo 40 vyizolovaných vzoriek. V 3 vzorkách bol potvrdený zoonotický druh *C. parvum* a v ostatných druhy špecifické pre hlodavce *C. wrairi* a *C. tyzzeri,* ktoré však boli potvrdené aj u ľudí s kryptosporidiózou. V súčasnosti nemáme dostatok informácií o zoonotických protozoách cirkulujúcich v tejto hostiteľskej skupine aj napriek rizikám, ktoré predstavujú.

ÚVOD

Rody *Giardia* a *Cryptosporidium* sú intestinálne protozoa parazitujúce u voľne žijúcich, hospodárskych a spoločenských zvierat ako aj ľudí (Xiao a Fayer, 2008). Priamy vývinový cyklus a rezistentné infekčné štádiá umožňujú týmto patogénom jednoduché šírenie medzi potenciálnymi hostiteľmi (Thompson a Ash, 2016). *Giardia* spp. a *Cryptosporidium* spp. sa šíria oro-fekálnou cestou priamym kontaktom s infikovaným jedincom alebo ako vodou a potravinami prenosný patogén. Tieto protozoa patria medzi najčastejšie črevné parazity ľudí (Ryan a kol., 2021). Významnými rizikovými faktormi sú nízka úroveň hygieny alebo kontakt so zvieratami (Li a kol., 2023). Infekcie môžu prebiehať asymptomaticky alebo vyvolávajú vodnaté hnačky, malabsorpciu a zaostávanie v raste. Popisované sú aj postinfekčné komplikácie ako funkčná dyspepsia, syndróm dráždivého čreva, prípadne môžu spôsobovať extraintesitnálne syndrómy (Certad a kol., 2017; Miko a kol., 2025).

V Európe bolo u hlodavcov identifikovaných 15 druhov a 16 genotypov *Cryptosporidium* spp., pričom najčastejšie boli infikované potkany, myši a činčily. Prevalencia *Cryptosporidium* spp. u domácich hlodavcov je 27,0 %. Opakovane u nich boli identifikované zoonotické druhy ako *C. parvum*, *C. muris*, *C. andersoni*, a *C. ubiquitum* (Zhang a kol., 2022).

Prevalencia *G. duodenalis* u doma chovaných hlodavcov je 21,8 %. Pre hlodavce je v rámci druhového komplexu *G. duodenalis* špecifická asembláž G avšak u domácich hlodavcov boli najčastejšie detegované zoonotické asembláže A a B alebo zmiešané infekcie s týmito asemblážami (74,88 %) (Li a kol., 2023). Okrem nich boli u hlodavcov potvrdené aj asembláže špecifické pre psy C a D a asembláž E špecifická pre kopytníky (Cai a kol., 2021).

V rámci Európy nemáme dostatok dostupných informácii o prevalencii a genotypoch zoonotických protozoí cirkulujúcich v populácii domácich hlodavcov. Tieto jedince sú v úzkom kontakte s ľuďmi a sú často infikované práve zoonotickými druhmi a genotypmi črevných protozoí (Li a kol., 2023; Zhang a kol., 2022) a teda predstavujú významnú rolu pri ich zoonotickom prenose.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky trusu hlodavcov boli odobraté z 5 chovproduktov v mestách Prešov a Košice. Mikroskopicky vyšetrených bolo celkovo 17 králikov, 16 morčiat, 13 činčíl, 11 osmak degu, 4 pieskomily, 12 zmesných vzoriek z 28 potkanov, 9 zmesných vzoriek z 22 škrečkov a zmesné vzorky myší z 2 predajní. Na koprologické vyšetrenie bola použitá flotačná metóda za použitia Brezovho flotačného roztoku (šp. hm. 1,30) a na detekciu cýst *Giardia* spp. bol použitý Faustov flotačný roztok (33% roztok $ZnSO_4$).

Na prítomnosť koproantigénu *Cryptosporidum* spp. boli vyšetrené všetky vzorky komerčným kitom AccuDiag™ Cryptosporidium 2 nd Generation (Fecal) ELISA Kit podľa pokynov výrobcu.

Zo 40 vzoriek bola izolovaná DNA pomocou súpravy *Quick*- DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (ZymoResearch, USA) podľa pokynov výrobcu. Na molekulárnu detekciu *Cryptosporidim* spp. bola vykonaná nested PCR so špecifickým primermi na amplifikáciu génu *gp60* podľa Glaberman a kol. (2002). Na molekulárnu analýzu *Giardia* spp. boli v rámci nested PCR použité primery amplifikujúce gény kódujúce glutamát dehydrogenázu (*gdh*) podľa Cacciò a kol. (2008) a triózafosfátizomerázu (*tpi*) podľa Sulaiman a kol. (2003). PCR produkty boli vyhodnotené elektroforézou na 1% agarózovom géli. Pozitívne PCR produkty boli zaslané na purifikáciu a sekvenáciu do laboratória Microsynth.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V 6 z 13 vzoriek činčíl a v 4 z 12 zmesných vzoriek potkanov sa mikroskopicky potvrdila prítomnosť cýst rodu *Giardia*. Molekulárnou analýzou sa v 4 izolátoch z činčíl preukázala na oboch lokusoch (*tpi* a *gdh*) prítomnosť zoonotickej *G. duodenalis* asebmbláž B. Práve táto asembláž je najčastejším pôvodcom giardiózy u ľudí (Certad a kol., 2017) a dominuje aj medzi činčilami a ostatnými doma chovanými hlodavcami (Zikmundová a kol. 2024; Tuska-Szalay a kol., 2025). Z izolátov z potkanov bola úspešná amlifikácia DNA len v 1 vzorke na lokuse *gdh.* Tu sa potvrdila prítomnosť *G. duodenalis* asembláž G, ktorá je špecifická pre túto hostiteľskú skupinu a nepredpokladá sa u nej zoonotický potenciál (Cacciò a kol., 2018). Pomocou nested PCR amplifikáciou génu *gp60* sa v tejto vzorke zistila koinfekcia so zoonotickým druhom *Cryptosporidium parvum*.

Na skríning *Cryptosporidium* spp. sme použili komerčný ELISA kit. Z 84 vyšetrených vzoriek sa len v jednej potvrdila prítomnosť koproantigénu *Cryptosporidium* spp. (absorbancia 0,161 OD (optical density)). Táto diagnostická metóda sa však nepreukázala ako dostatočne citlivá u hlodavcov, nakoľko zo 40 vybraných vzoriek sa v 11 molekulárnou analýzou potvrdila prítomnosť rodu *Cryptosporidium* aj napriek tomu, že v ELISA teste bola ich absorbancia nižšia ako 0,08 OD a teda boli vyhodnotené ako negatívne.

Molekulárnou analýzou *gp60* génu sa u 1 potkana a 2 osmak degu potvrdil druh *C. parvum*, ktorý je najčastejším pôvodcom humánnej kryptosporidiózy (Ryan a kol., 2025). U morčaťa bola zistená infekcia *C. wrairi* a u myší *C. tyzzeri* ktoré sú adaptované na hlodavce, avšak boli evidované prípady, kedy boli tieto druhy detegované u imonokompetetntných pacientov s kryptosporidiózou (Rašková a kol., 2013; Hernández-Castro a kol., 2022).

Výskum potvrdil výskyt črevných protozoí so zoonoticým potenciálom u domácich hlodavcov v chovproduktoch. Dostupnosť týchto zvierat, ich úzky kontakt s ľuďmi, asymptomatický priebeh vyššie spomínaných parazitozoonóz a pravidelné vylučovanie rezistentných infekčných štádií protozoárnych patogénov (Zikmundová a kol., 2024) predstavuje významné zoonotické riziká spojené s chovom týchto zvierat.

Pre rozšírenie informácií o cirkulujúcich kmeňoch medzi domácimi hlodavcami ďalší výskum zahrnie aj chovprodukty v iných mestách a jedince od chovateľov malých hlodavcov.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore Internej Grantovej Agentúry IGA UVLF č. 03/2026.

POUŽITÁ LITERATÚRA

CACCIO, Simone Mario, a kol. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International journal for parasitology*, 2008, 38.13: 1523-1531.

CACCIO, Simone M.; LALLE, Marco; SVÄRD, Staffan G. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 66: 335-345.

CAI, Weilong, a kol. Zoonotic giardiasis: an update. *Parasitology Research*, 2021, 120.12: 4199-4218.

CERTAD, Gabriela, a kol. Pathogenic mechanisms of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Trends in Parasitology*, 2017, 33.7: 561-576.

GLABERMAN, Scott, a kol.. Three drinking-water–associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, 8.6: 631.

HERNÁNDEZ-CASTRO, Carolina, a kol. First report of rodent-adapted *Cryptosporidium wrairi* in an immunocompetent child, Spain. *Parasitology research*, 2022, 121.10: 3007-3011.

LI, Junqiang, a kol.. Role of rodents in the zoonotic transmission of giardiasis. *One Health*, 2023, 16: 100500.

MIKO, Shanna, a kol.. Postinfectious syndromes and long-term sequelae after *giardia* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 2025, 31.Suppl 2: S45.

RAŠKOVÁ, Veronika, a kol. Human cryptosporidiosis caused by *Cryptosporidium tyzzeri* and *C. parvum* isolates presumably transmitted from wild mice. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51.1: 360-362.

RYAN, Una M., a kol.. Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia*–a 50 year perspective (1971–2021). *International journal for parasitology*, 2021, 51.13-14: 1099-1119.

SULAIMAN, Irshad M., a kol. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging infectious diseases*, 2003, 9.11: 1444.

THOMPSON, R. C. A.; ASH, A. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 40: 315-323.

TUSKA-SZALAY, Barbara, a kol. Pet and wild rodents as hosts of *Giardia duodenalis* in Central Europe, Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2025, 73.1: 49-55.

XIAO, Lihua; FAYER, Ronald. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International journal for parasitology*, 2008, 38.11: 1239-1255.

ZHANG, Kaihui, a kol. Public health and ecological significance of rodents in *Cryptosporidium* infections. *One Health*, 2022, 14: 100364.

ZIKMUNDOVÁ, Veronika, a kol. Pet chinchillas (*Chinchilla lanigera*): source of zoonotic *Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium ubiquitum* and microsporidia of the genera *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon*. *Veterinary Parasitology*, 2024, 331: 110275.

PREVALENCIA *BABESIA, RICKETTSIA* A *ANAPLASMA* U KLIEŠŤOV *DERMACENTOR* SP. NA VYBRANÝCH LOKALITÁCH SLOVENSKA

Fencáková E., Majláth I., Peťko B., Janík J., Majláthová V.
Katedra fyziológie živočíchov, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

ABSTRAKT

Slovensko je domovom približne 22 druhov kliešťov, z toho 6 patrí medzi medicínsky významné druhy. Po kliešťovi *Ixodes ricinus* sú druhy *Dermacentor marginatus* a *D. reticulatus* najčastejšími vektormi celého spektra patogénov, čím sú považované za hrozbu pre ľudí aj zvieratá. Cieľom tejto práce bolo zhodnotenie prevalencie vybraných druhov patogénov v kliešťoch rodu *Dermacentor* na lokalitách s typickým výskytom tohto druhu na Slovensku a následné porovnanie s dostupnými dátami pre dané oblasti. Celkovo bolo zozbieraných a vyšetrených 217 kliešťov z 3 lokalít na juhozápadnom Slovensku a 2 lokalít na východnom Slovensku. Molekulárnymi metódami sa v kliešťoch *D. reticulatus* potvrdila prítomnosť *Anaplasma* sp. (23/115; 20%) *Babesia* sp. (21/208; 10,1%) a *Rickettsia* sp. (9/137; 6,57%). Atypicky vysoká prevalencia rodu *Anaplasma* spp. u *D. reticulatus* na východe Slovenska, až 20%, môže indikovať vzostup nového vektora pre túto baktériu.

ÚVOD

Kliešte *Dermacentor marginatus* a *D. reticulatus* patria po druhu *Ixodes ricinus* medzi najčastejšie sa vyskytujúce druhy kliešťov na Slovensku. Obývajú prevažne nižšie položené oblasti, lúky a pasienky, *D. reticulatus* preferuje viac aluviálne územia (Rubel a kol., 2016; Stanko a kol., 2022). Expanzívna povaha týchto kliešťov sa ukazuje v posledných rokoch byť čoraz viac prominentná aj v oblastiach, kde bol doteraz ich výskyt sporadický, prípadne nebol doteraz zaznamenaný (Bullová a kol., 2009; Karbowiak, 2014). To im umožňuje rozšíriť druhový repertoár hostiteľov, ktorí sa v daných oblastiach vyskytujú. Zároveň je ich význam z hľadiska epizootológie nezanedbateľný, keďže práve druhy rodu *Dermacentor* možno zaradiť medzi kľúčové vektory zoonotických patogénov, postihujúcich najmä psy a voľne žijúce cicavce (Stanko a kol., 2022). Medzi pôvodcov veterinárne a medicínsky signifikantných ochorení prenášaných kliešťami *Dermacentor* spp. na území Slovenskej republiky patria vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV), baktérie *Anaplasma phagocytophilum, Rickettsia slovaca, R. raoultii, Borrelia burgdorferi, Coxiella burnetii, Francisella tularensis* a jednobunkové piroplazmy *Babesia canis* (Stanko a kol., 2022). Výskyt *A. phagocytophilum, B. canis* a *Rickettsia* spp. je pravidelne hlásený rovnako na západe aj východe krajiny (Turna a kol., 2022; Cellengová a kol., 2024).

MATERIÁL A METODIKA

Zber materiálu prebiehal na lokalitách Košická Belá, Košice v októbri 2025 a Komárno – Nová Osada, Komárno – železničná stanica a Kameničná v apríli 2026. Kliešte boli z okolitej vegetácie zbierané metódou vlajkovania pomocou bielej látky s rozmerom zhruba 1×1m. Takto zachytené kliešte boli na mieste fixované v skúmavke s 70 % etanolom. V laboratóriu boli kliešte morfologicky identifikované s pomocou diagnostického kľúča (Estrada-Peña a kol., 2017). Celkovo bolo nájdených 208 jedincov *D. reticulatus* (Košice: 10; Košická Belá: 105; Komárno – železničná stanica: 3; Komárno – Nová Osada: 87; lokalita Kameničná: 3) a 9 jedincov *D. marginatus* (Košická Belá: 2; Komárno – Nová Osada: 7). Na izoláciu DNA sa použili celé kliešte, s pomocou izolačného kitu NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Nemecko). PCR analýza prebehla s využitím niekoľkých primerov, každý so špecifickým génom ako cieľom pre amplifikáciu. Na detekciu rodu *Babesia* bol použitý PCR protokol cielený na *18S rRNA* gén, na detekciu rodov *Anaplasma* a *Rickettsia* sa použili protokoly s cieľom amplifikovať gén pre *16S rRNA*. Produkty PCR reakcie boli následne

vizualizované s pomocou gélovej elektroforézy na 1,5% agarózovom géli. Pozitívne vzorky boli pre presnejšie zaradenie do fylogenetického stromu zaslané na sekvenovanie do komerčného laboratória.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V lokalite Košická Belá bolo zozbieraných 105 kliešťov druhu *D. reticulatus* a 2 kliešte *D. marginatus,* v lokalite Košice sa zozbieralo 10 kliešťov *D. reticulatus*. Molekulárnymi metódami boli všetky kliešte vyšetrené na prítomnosť patogénov z rodu *Anaplasma, Babesia* a *Rickettsia*. Z celkového počtu 117 kliešťov bolo na *Anaplasma* spp. pozitívnych 19,66% vzoriek (Koš. Belá 19,63%, Košice 20%), na *Babesia* spp. bolo pozitívnych 14,53% vzoriek (Koš. Belá 11,21%, Košice 50%) a na *Rickettsia* spp. bolo pozitívnych 5,13% vzoriek (Koš. Belá 5,61%, Košice 0%). Koinfekcia *Babesia* – *Anaplasma* sa potvrdila u 6,84% vzoriek (8/117), koinfekcia *Babesia* – *Rickettsia* v 1,71% vzoriek (2/117) a koinfekcia *Rickettsia* – *Anaplasma* v 1,71% vzoriek (2/117). Všetky pozitívne vzorky pochádzali z *D. reticulatus*. V lokalite Košice sa výskyt *Rickettsia* spp. nepotvrdil. Sekvenovaním bola *Babesia* sp. bližšie špecifikovaná ako *B. canis canis*. Predchádzajúce štúdie potvrdili prirodzený výskyt *Babesia canis* na východnom Slovensku v psoch aj číhajúcich kliešťoch. V štúdii z roku 2011 prevalencia tejto piroplazmy v *D. reticulatus* dosahovala 14,7% (Kubelová a kol., 2011; Turna a kol., 2022). Novšia štúdia, zameraná na oblasť strednej Európy zistila prevalenciu *Babesia* spp. v *D. reticulatus* 18,6%, zároveň však dodáva, že hodnoty prevalencie pre Česko a Slovensko sú vzhľadom na vypočítanú hodnotu prevalencie celého súboru nižšie (Ghodrati a kol., 2025). Tá istá štúdia uvádza prevalenciu rodu *Anaplasma* na Slovensku 14,8%, väčšina pozitívnych vzoriek však pochádza z *I. ricinus*, kdežto *D. reticulatus* vykazoval iba 0,9%-nú prevalenciu. Ďalšia štúdia nenašla *A. phagocytophilum* v žiadnom z vyšetrených kliešťov rodu *Dermacentor* (Bona a kol., 2021). Nami zistená vysoká hodnota prevalencie v kliešťoch *Dermacentor* na východnom Slovensku preto môže byť predmetom ďalších štúdií a nemala by byť prehliadaná.

V lokalite Komárno – žel. st., Komárno – Nová Osada a Kameničná bolo zozbieraných spolu 93 kliešťov druhu *D. reticulatus* (KN – žel. st.: 3, Nová Osada: 87; Kameničná: 3) a 7 kliešťov *D. marginatus* (Nová Osada). Na prítomnosť *Babesia* sp. bolo vyšetrených 100 kliešťov s prevalenciou 4% (Nová Osada 4/94; 4,26%), na prítomnosť *Rickettsia* sp. bolo vyšetrených 22 kliešťov s prevalenciou 13,64% (KN – žel. st. 0/3; 0%; Nová Osada 3/19; 15,79%). Koinfekcia *Babesia* – *Rickettsia* sa nepotvrdila u žiadnej vzorky. Výskyt rodu *Babesia* na západnom Slovensku je v porovnaní s východnou časťou republiky nižší, hodnota prevalencie fluktuuje na hodnote približne 1-1,8% (Duh a kol., 2006; Švehlová a kol., 2014).

Rickettsia sp. v *D. reticulatus* na východnom aj západnom Slovensku vykazovala nižšiu mieru prevalencie ako v štúdiách z roku 2017 a 2021, kde oba druhy rodu *Dermacentor* vykazovali podobné hodnoty prevalencie, a to 21,4% a 23,72% (Minichová a kol., 2017; Ouarti a kol., 2021). Rôzne druhy Rickettsia však môžu dosahovať odlišné hodnoty miery prevalencie, a preto je vhodné na dôkladnejšiu analýzu výsledkov bližšie špecifikovanie druhu sekvenovaním produktu PCR (Špitalská a kol., 2014).

POĎAKOVANIE

Tento projekt bol financovaný z projektu Vedeckej grantovej Agentúry Ministerstva školstva SR a Slovenskej akadémie vied VEGA 1/0762/25 a Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-23-0320.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BONA, M. a kol. Impact of climate factors on the seasonal activity of ticks and temporal dynamics of tick-borne pathogens in an area with a large tick species diversity in Slovakia, Central Europe. *Biologia*. 2021, roč. 77, č. 6, s. 1619–1631. DOI:10.1007/s11756-021-00902-x

BULLOVÁ, E. a kol. Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. *Veterinary Parasitology*. 2009, roč. 165, č. 3–4, s. 357–360. DOI:10.1016/j.vetpar.2009.07.023

CELLENGOVÁ, Z. a kol. Slovakia's Urban Tick Ecosystem: Exploring hosts, pathogens, and public health in Košice (Eastern Slovakia). *Scientia Agriculturae Bohemica*. 2024, roč. 31, č. 1, s. 14–21. DOI:10.7160/sab.2024.550102

DUH, D. a kol. Molecular detection of Babesia canis in Dermacentor reticulatus ticks collected in Slovakia. *Biologia*. 2006, roč. 61, č. 2, s. 231–233. DOI:10.2478/s11756-006-0035-7

ESTRADA-PEÑA, A. a kol. *Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification*. 2017. B.m.: Springer. ISBN 978-3-319-63760-0

GHODRATI, S. a kol. Diversity of ticks and tick-borne pathogens in ticks removed from dogs and cats: a focus on Poland, Czech Republic, Slovakia, Hungary, and Romania. *Parasites & Vectors*. 2025, roč. 18, č. 1, s. 290. DOI:10.1186/s13071-025-06852-6

KARBOWIAK, Grzegorz. The occurrence of the *Dermacentor reticulatus* tick-its expansion to new areas and possible causes. *Annals of parasitology*, 2014, 60.1.

KUBELOVÁ, M. a kol. West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. *Veterinary Parasitology*. 2011, roč. 180, č. 3–4, s. 191–196. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.03.033

MINICHOVÁ, L. a kol. Molecular evidence of *Rickettsia* spp. in ixodid ticks and rodents in suburban, natural and rural habitats in Slovakia. *Parasites & Vectors*. 2017, roč. 10, č. 1, s. 158. DOI: 10.1186/s13071-017-2094-8

OUARTI, B. a kol. Detection of *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis inermis* ticks in Slovakia. *Biologia*. 2021, roč. 77, č. 6, s. 1611–1617. DOI:10.1007/s11756-021-00789-8

RUBEL, F. a kol. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016, roč. 7, č. 1, s. 224–233. DOI:10.1016/j.ttbdis.2015.10.015

STANKO, M. a kol. Ticks and their epidemiological role in Slovakia: from the past till present. *Biologia*. 2022, roč. 77, č. 6, s. 1575–1610. DOI:10.1007/s11756-021-00845-3

ŠPITALSKÁ, E. *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. *Experimental and Applied Acarology*. 2012, roč. 57, č. 2, s. 189–197. DOI:10.1007/s10493-012-9539-8

ŠVEHLOVÁ, A. a kol. Sympatric occurrence of Ixodes ricinus, Dermacentor reticulatus and Haemaphysalis concinna ticks and Rickettsia and Babesia species in Slovakia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014, roč. 5, č. 5, s. 600–605. DOI:10.1016/j.ttbdis.2014.04.010

TURNA, H. a kol. Clinical and Hematologic Findings in Babesia canis Infection in Eastern Slovakia. *Acta Parasitologica*. 2022, roč. 67, č. 3, s. 1329–1334. DOI:10.1007/s11686-022-00584-8

CYTOGENETICKÁ ANALÝZA MONOZOICKEJ PÁSOMNICE *KHAWIA JAPONENSIS*

Gašparovičová, R.[1,2], Orosová M.[1], Fečová Z.[1]
[1]*Parazitologický ústav, SAV, v. v. i., Košice, Slovensko*
[2]*Katedra zoológie, Univerzita Komenského v Bratislave, Slovensko*

ABSTRAKT

V práci sme sa zamerali na detailnú karyologickú analýzu a repeatome analýzu pásomnice *Khawia japonensis* (Cestoda, Caryophyllidea). Po prvýkrát bol zostavený karyotyp: 2n = 16, n = 5m + 3a. Metódou FISH bol detegovaný počet lokusov a umiestnenie ribozomálnych génov na chromozómoch (*18S rDNA*) a farbením dusičnanom strieborným potvrdená aktivita génových klastrov pre ribozomálnu RNA. Analýzou 2 046 935 sekvenačných čítaní v prostredí RepeatExplorer2 (RE) bolo identifikovaných 119 479 klastrov, pričom dominantnú zložku genómu tvorili LINE (32,44 %) a Penelope retrotranspozóny (9,39 %); satelitná DNA predstavovala 10,1 % genómu. Na základe výsledkov z RE, bolo na FISH mapovanie vybraných 20 satelitov, z nich šesť bolo úspešne lokalizovaných na rôznych chromozómoch. Výsledky poskytujú prvú charakterizáciu repetitívnej zložky genómu *K. japonensis* a rozširujú súbor potenciálnych chromozómových markerov využiteľných na štúdium vnútrodruhovej variability a karyotypovej diferenciácie.

ÚVOD

Pásomnice radu Caryophyllidea sú z pohľadu cytogenetiky len málo študované. Karyotyp je v súčasnosti známy len u 25 (~19 %) druhov a molekulárno-cytogenetické údaje sú dostupné iba pre sedem z nich (Marková a Orosová, 2025). Možnosti komparatívnej analýzy chromozómov sú veľmi limitované malým počtom dostupných markerov. Jediným doposiaľ používaným chromozómovým markerom sú gény rRNA, ktoré sú však u všetkých skúmaných druhov lokalizované v jednom lokuse, v pericentromerickej oblasti malého metacentrického chromozómu (Orosová a kol., 2022). Perspektívnym zdrojom ďalších chromozómových markerov je repetitívna DNA, ktorej zastúpenie a chromozómová distribúcia môžu výrazne variovať medzi populáciami, ale aj medzi príbuznými druhmi a odrážať tak procesy chromozómovej diferenciácie a evolúcie (Garrido-Ramos, 2017). Významnú časť repetitívnej DNA tvoria satelitná DNA (satDNA) a transponovateľné elementy (TE). Satelitná DNA je charakteristická tandemovým usporiadaním, pričom jej chromozómová distribúcia je značne variabilná. Je lokalizovaná v heterochromatínových aj euchromatínových oblastiach, od rozsiahlych repetitívnych blokov až po krátke, dispergované oblasti na chromozómoch (Šatović-Vukšić a Plohl, 2023). Jej rýchla evolúcia môže viesť k výrazným rozdielom v sekvenciách, počte kópií a organizácii medzi príbuznými taxónmi (Plohl a kol., 2012). Transponovateľné elementy, DNA transpozóny a retrotranspozóny, predstavujú mobilnú zložku genómu, ktorá môže prostredníctvom amplifikácie a redistribúcie ovplyvňovať jeho štruktúru a evolúciu (Biscotti a kol., 2015).

Charakterizáciu repetitívnej DNA umožňuje tzv. „repeatome“ analýza založená na grafovom klastrovaní sekvenačných dát s nízkou hĺbkou pokrytia. Nástroje RepeatExplorer2 a TAREAN umožňujú *de novo* identifikovať a kvantifikovať repetitívne sekvencie aj bez referenčného genómu (Novák a kol., 2020). Vybrané repetície možno následne experimentálne overiť a lokalizovať pomocou FISH na chromozómoch a tak identifikovať nové cytogenetické markery (Zhang a kol., 2023).

Cieľom práce bolo definovať karyotyp pásomnice *K. japonensis*, analyzovať repetitívnu zložku genómu a identifikovať sekvencie, ktoré by mohli slúžiť ako potenciálne chromozómové markery.

MATERIÁL A METODIKA

Živé jedince *K. japonensis* boli získané z kapra obyčajného (*Cyprinus carpio*) z Hrhovských rybníkov (N48.59613, E20.74867). Pre cytogenetickú analýzu boli jedince inkubované v 0,025 % kolchicíne 1 h, v hypotonickom roztoku 0,075 M KCl 4 h a fixované v zmesi kyseliny octovej a metanolu (1:3) počas 30 min. Materiál určený na molekulárnu analýzu bol fixovaný v 100 % etanole. Fixovaný materiál bol uchovávaný pri -20 °C. Chromozómové preparáty boli pripravené technikou „hot plate" podľa postupu v práci Orosová a Špakulová (2018). Pripravené preparáty boli farbené po dobu 25 min v 5% roztoku Giemsa-Romanowski (pH 6,8), opláchnuté prúdom destilovanej vody a voľne osušené pri izbovej teplote. Genomickú DNA sme extrahovali pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Nemecko) podľa protokolu výrobcu. Izolovaná gDNA bola sekvenovaná s nízkou hĺbkou pokrytia na platforme Illumina HiSeq (Novogene, Čína). Repetitívne sekvencie boli analyzované pomocou RepeatExplorer2. Pre identifikované druhovo špecifické satDNA sekvencie boli navrhnuté špecifické primery. Purifikované PCR produkty boli značené s digoxigenín-11-dUTP alebo biotín-16-dUTP. Metóda FISH bola realizovaná podľa protokolu v práci Orosová a kol. (2010).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Karyotyp *K. japonensis* pozostáva z ôsmich párov chromozómov s diploidným počtom 2n = 16 (n = 5m + 3a). Všetky doposiaľ analyzované druhy rodu *Khawia* majú zhodný diploidný počet chromozómov 2n = 16, pričom ich karyotyp pozostáva iba z dvoch typov chromozómov – metacentrických a akrocentrických (Orosová a kol., 2019). Najvýraznejšou črtou karyotypov druhov rodu *Khawia* je prvý chromozómový pár, ktorý je výrazne väčší ako ostatné a u všetkých doteraz študovaných druhov si zachováva metacentrickú morfológiu. Molekulárno-fylogenetické analýzy rodu *Khawia* poukázali na blízku príbuznosť *K. japonensis* s druhmi *K. abbottinae, K. rossittensis* a *K. parva* (Xi a kol., 2018), pričom tieto vzťahy podporujú aj dostupné cytogenetické údaje. Napriek vysokej podobnosti sa karyotypy jednotlivých druhov líšia polohou centroméry niektorých chromozómových párov, čo poukazuje na význam pericentrických inverzií pri karyotypovej diferenciácii. Z evolučného hľadiska sa vyšší podiel dvojramenných chromozómov u *K. japonensis* a *K. abbottinae* považuje za odvodený stav v porovnaní s prevažne akrocentrickým, ancestrálnym karyotypom *K. sinensis* a *K. saurogobii*.

Hybridizácia s *18S rDNA* sondou odhalila jeden klaster ribozomálnych génov v blízkosti centroméry na krátkom ramene chromozómu č. 5 (5p cen). Výsledky práce podporili hypotézu, že ancestrálny stav u Caryophyllidea je jeden intersticiálny klaster rDNA (Orosová a kol. 2022).

Analýza 2 046 935 sekvenačných čítaní v prostredí RepeatExplorer2, s dôrazom na identifikáciu druhovo špecifických satelitných repetícií (satDNA), identifikovala 119 479 klastrov. Najväčšiu časť tvorili LINE (32,44 %) a Penelope retrotranspozóny (9,39 %), zatiaľ čo satDNA predstavovala 10,1 % genómu. V práci sme identifikovali 34 „high confidence" (HC) a 78 „low confidence" (LC) satDNA repetícií. Všetky HC satDNA a neklasifikované LC sekvencie boli manuálne posudzované na základe topológie grafov a sekvenačnej homológie. Na overenie klasifikácie boli klastre reanotované pomocou GIRI/RepBase a porovnané

so sekvenačnými databázami pomocou BLAST. LC sekvencie s komplexnou topológiou, ktoré RE klasifikoval ako TE, najmä elementy typu Penelope a Ty3/Gypsy, boli vylúčené z analýz. Po detailnom vyhodnotení bolo identifikovaných 43 odlišných satDNA rodín s dĺžkou monomérov 86–3093 bp. Na základe počtu priradených čítaní v repetíciách, ich percentuálneho podielu v genóme a konsenzuálnych sekvencií sme na FISH mapovanie vybrali 20 satelitov, z nich šesť bolo úspešne lokalizovaných na chromozómoch (KjapSat199-

281, KjapSat214-1711, KjapSat29-603, KjapSat209-113, KjapSat161-2113, KjapSat205-797). Pri ďalších 14 testovaných repetíciách bola neúspešná buď amplifikácia PCR alebo detekcia FISH signálu, čo môže súvisieť s príliš nízkou abundanciou v genóme a veľkosťou klastrov pod detekčným limitom FISH. Repetícia KjapSat161-2113 bola anotovaná ako U1 snDNA (malá jadrová DNA) a repetícia KjapSat161-2113 ako U2 snDNA. Hybridizačné signály snDNA U1 boli pozorované na chromozóme č. 6 a snDNA U2 na chromozóme č. 7. Pilotná repeatome analýza bola uskutočnená u pásomnice *Caryophyllaeus laticeps*, kde automatická anotácia nástroja RE odhalila, tak ako aj u *K. japonensis*, ako najpočetnejšiu skupinu repetitívnych sekvencií TE (Marková a Orosová, 2025). Zároveň boli u *C. laticeps* novo identifikované a lokalizované gény pre U1 snDNA a gény malej podjednotky ribozómu 5S rDNA. Novoidentifikovaný marker U1 snDNA predstavuje veľmi dôležitý nástroj pre následné komparatívne karyologické štúdie pásomníc radu Caryophyllidea.

Naša práca priniesla prvé informácie o repeatome druhu *K. japonesis*. Identifikovali sme šesť nových chromozóm-špecifických markerov, ktoré v kombinácii s už zavedenými markermi vytvoria základ pre ďalšie komparatívne analýzy v rámci rodu *Khawia*. Tieto nové satelitné repetície sa zároveň ukázali ako veľmi cenné na presnú identifikáciu homologických chromozómových párov.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 2/0093/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BISCOTTI MA, OLMO E, HESLOP-HARRISON JS. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.* 2015; 23:415–420.

GARRIDO-RAMOS MA. Satellite DNA: An Evolving Topic. *Genes.* 2017; 8:230.

MARKOVÁ A, OROSOVÁ M. Discovery of new chromosomal markers through repeatome analysis of *Caryophyllaeus laticeps* (Caryophyllidea). *Parasitol Res.* 2025; 124:84.

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, MAREC F, OROS M, XI BW, SCHOLZ T. A chromosome study and localization of 18S rDNA in *Khawia saurogobii* (Cestoda: Caryophyllidea). *Parasitol Res.* 2010; 106:587–593.

OROSOVÁ M, MARKOVÁ A, MAREC F, BARČÁK D, BRÁZOVÁ T, OROS M. New cytogenetic data on *Caryophyllaeus laticeps* and *Paracaryophyllaeus gotoi*, parasites of evolutionary interest. *Parasitology.* 2022; 149:1094–1105.

OROSOVÁ M, PROVAZNÍKOVÁ I, XI BW, OROS M. Chromosomal study of *Khawia abbottinae* (Cestoda: Caryophyllidea): karyotype and localization of telomeric and ribosomal sequences after fluorescence in situ hybridization (FISH). *Parasitol Res.* 2019; 118:2789–2800.

OROSOVÁ M, ŠPAKULOVÁ, M. Tapeworm chromosomes: their value in systematics with instructions for cytogenetic study. *Folia Parasitologica*. 2018; 65:001.

PLOHL M, MEŠTROVIĆ N, MRAVINAc B. Satellite DNA evolution. *Genome Dyn.* 2012; 7:126–152.

ŠATOVIĆ-VUKŠIĆ E, PLOHL M. Satellite DNAs—From Localized to Highly Dispersed Genome Components. Genes. 2023; 14:742.

XI BW, OROS M, CHEN K, SCHOLZ T, XIE J (2018) A new monozoic tapeworm, *Parabreviscolex niepini* n. g., n. sp. (Cestoda: Caryophyllidea), from schizothoracine fishes (Cyprinidae: Schizothoracinae) in Tibet, China. *Parasitol Res* 117:347–354

ZHANG Y, CHU J, CHENG H, LI H. De novo reconstruction of satellite repeat units from sequence data. *Genome Res.* 2023; 33:1994–2001.

TAXONOMICKÁ ANALÝZA BAKTERIÁLNEJ MIKROBIOTY KOŽE KLINICKY ZDRAVÝCH KONÍ POMOCOU MALDI-TOF SPEKTROMETRIE A *16S rRNA* SEKVENOVANIA

Gondoľová D.[1,2], Štempelová L.[1], Strompfová V.[1]
[1]*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, v.v.i., Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice*
[2]*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice*

ABSTRAKT
Kožná mikrobiota zohráva významnú úlohu pri udržiavaní homeostázy kože a ochrane hostiteľa pred kolonizáciou patogénnymi mikroorganizmami. Napriek rastúcemu záujmu o mikrobiotu domácich zvierat zostáva jej zloženie u zdravých koní stále nedostatočne preskúmané. Cieľom práce preto bolo charakterizovať bakteriálne spoločenstvá na koži zdravých koní pomocou kultivačných (MALDI-TOF hmotnostná spektrometria) aj molekulárnych metód (sekvenovaním oblasti V3–V4 génu *16S rRNA* na platforme Illumina MiSeq). Pomocou MALDI-TOF spektrometrie bolo identifikovaných 286 izolátov vrátane 19 druhov stafylokokov. Najčastejšie sa vyskytovali *Staphylococcus succinus*, *S. xylosus*, *S. vitulinus* a *S. warneri*, pričom *Staphylococcus aureus* bol detegovaný u štyroch klinicky zdravých koní. Sekvenovanie *16S rRNA* odhalilo 18 bakteriálnych kmeňov, z ktorých dominovali *Pseudomonadota*, *Bacteroidota*, *Bacillota* a *Actinomycetota*. Na úrovni rodov prevládal *Acinetobacter*, nasledovaný rodmi *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Oligella*, *Pseudomonas* a *Flavobacterium*. Výsledky rozširujú poznatky o zložení kožnej mikrobioty zdravých koní a poukazujú na vplyv anatomickej lokality, pohlavia a veku hostiteľa na jej bakteriálne zloženie.

ÚVOD
Koža predstavuje chladné, kyslé a relatívne suché prostredie, ktoré umožňuje kolonizáciu iba obmedzenému počtu mikroorganizmov. Napriek tomu sa odhaduje, že na jednom štvorcovom centimetri kože sa nachádza približne jedna miliarda baktérií (Grice a kol., 2008). Kožná mikrobiota pozostáva z rezidentných mikroorganizmov, ktoré tvoria stabilnú súčasť kožného ekosystému, a prechodných mikroorganizmov pochádzajúcich z vonkajšieho prostredia, ktoré kožu kolonizujú len dočasne (Kong a Segre, 2012). Jej zloženie je ovplyvnené viacerými faktormi hostiteľa, ako sú genetická predispozícia, lokalizácia na tele, pohlavie, výživa, stav imunitného systému či prítomnosť kožných ochorení, ale aj environmentálnymi podmienkami, ktorým je koža neustále vystavená (Grice a Segre, 2011; Al-Ghazzewi a Tester, 2014). Rovnováha medzi členmi mikrobiálnych spoločenstiev zohráva kľúčovú úlohu pri ochrane zdravia kože. Narušenie zloženia kožnej mikrobioty (dysbióza) môže ovplyvniť imunitný systém a spájať sa s kožnými ochoreniami (Sfriso a kol., 2020; Zhu a kol., 2023).

MATERIÁL A METODIKA
Odber vzoriek a identifikácia pomocou MALDI-TOF spektrometrie
Kožné stery (n=250) boli odobraté 50 koňom rôzneho plemena. Skupina koní zahŕňala 25 kobýl, 2 žrebce a 23 valachov s vekovým rozmedzím 2–27 rokov. Všetky kone boli klinicky zdravé a počas predchádzajúcich troch mesiacov neboli vystavené liečbe antimikrobiálnymi látkami. Stery boli odobraté z 5 miest na tele (krk, chrbát, brucho, sponka a papuľa). Vzorky boli odoberané pomocou Amies Agar Gel Transport Swabs (Oxoid, Basingstoke, UK) navlhčených v sterilnom roztoku SCF-1 (50 mM Tris pufor, 1 mM EDTA a 0,5 % Tween-20). Odberové tyčinky boli ponorené do Ringerovho roztoku a následne inokulované na Mannitol Salt agar, Pseudomonas agar, MacConkey agar a Brain Heart Infusion agar (Becton and Dickinson, USA). Následne boli inkubované pri 37 °C 24–48 h. Po inkubácii boli odpichnuté 1-2 morfologicky odlišné kolónie a po izolácii proteínov podľa Bessede a kol. (2011) dané do

prístroja Microflex LT instrument (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany). Na vyhodnotenie bol použitý BioTyper software, version 3.0 (Bruker Daltonik).

Odber vzoriek a analýza pomocou *16S rRNA* sekvenovania

Kožné stery (n=33) boli odobraté od 11 koní plemena Slovenský teplokrvník ustajnených v blízkosti mesta Košice. Do štúdie boli zaradené kone vo veku 2 až 25 rokov (6 kobýl a 5 valachov). Kožné stery boli odobraté z troch lokalít tela – papule, chrbtovej oblasti a ľavej prednej sponky. Vzorky boli odobraté pomocou odberových tyčiniek FLOQSwabs (Copan, Taliansko) navlhčených v sterilnom roztoku SCF-1. Odberové skúmavky obsahovali 1 ml stabilizačného roztoku DNA/RNA Shield R1100-250 (Zymo Research, Irvine, USA). Vzorky boli spracované v rámci sekvenačných služieb spoločnosti BioVendor Group (Česká republika), kde bola vykonaná izolácia DNA, príprava sekvenačnej knižnice a bioinformatická analýza. DNA bola izolovaná z 33 kožných sterov, negatívnej kontroly a environmentálnej kontroly (ster získaný krátkym vystavením odberovej tyčinky okolitému vzduchu na farme) pomocou súpravy CatchGene Stool DNA Kit (CatchGene, Taiwan) podľa pokynov výrobcu. Knižnica génu *16S rRNA* bola pripravená podľa protokolu Illumina, pričom bola amplifikovaná oblasť V3–V4 génu *16S rRNA*. Taxonomická klasifikácia bola vykonaná s využitím referenčnej databázy SILVA 138.1. Štatistická analýza a vizualizácia dát boli vykonané v prostredí MicrobiomeAnalyst (Chong a kol., 2020) s využitím modulu Marker Data Profiling (MDP). Za štatisticky významné boli považované hodnoty $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pomocou MALDI-TOF spektrometrie bolo celkovo identifikovaných 286 izolátov z 250 vzoriek sterov z kože. Taxonomická analýza potvrdila 19 stafylokokových druhov prítomných na koži zdravých koní. K najpočetnejším patrili druhy *Staphylococcus succinus* (n=77, u 72 % koní*), S. xylosus* (n=37, 56 %), *S. vitulinus* (n=30, 38 %) a *S. warneri* (n=28, 38 %). *S. sciuri* (n=21), *S. hominis* (n=20*), S. epidermidis* (n=13) a *S. haemolyticus* (n=13) sa vyskytovali tiež častejšie. *S. aureus* bol detegovaný na rôznych miestach tela (krk, chrbát, sponka, papuľa) u 4 zdravých koní. Z ostatných druhov sa bežne vyskytoval *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli* a rod *Enterococcus spp*. DNA analýzou vzoriek bolo identifikovaných 18 bakteriálnych kmeňov. Dominantným kmeňom boli *Pseudomonadota* (44,9 %), *Bacteroidota* (22,7 %), *Bacillota* (12,9 %) a *Actinomycetota* (10,7 %). Kmeň *Pseudomonadota* dominoval na všetkých skúmaných lokalitách kože. Na úrovni rodov bolo identifikovaných celkovo 592 bakteriálnych rodov. Najvyššiu relatívnu abundanciu vykazoval rod *Acinetobacter*, ktorý dominoval na všetkých odberových miestach. Ďalšími významne zastúpenými rodmi boli *Sphingobacterium*, *Sphingomonas*, *Oligella*, *Pseudomonas* a *Flavobacterium*. Štatisticky významné rozdiely medzi odberovými lokalitami boli zistené pri kmeňoch *Actinomycetota* a *Patescibacteria* a pri rodoch *Corynebacterium* a *Pseudomonas* ($p < 0,05$). Rod *Oligella* bol významne početnejší u samcov. V skupine dospelých koní dominovali rody *Acinetobacter* a *Flavobacterium*. Matinpour a kol. (2025) vo svojej štúdii, kde boli odobraté vzorky od 14 koní z oblasti chrbta a sponky zo štyroch rôznych stajní v južnom Nemecku uvádzajú, že najčastejšie identifikovanými rodmi u koní boli *Bacillus* (*Bacillota*), *Pseudomonas (Pseudomonadota*), *Macrococcus* (*Bacillota*) a *Staphylococcus* (*Bacillota*). Spomedzi nich vykazoval rod *Bacillus* najvyššiu druhovú diverzitu. Druh *Bacillus cereus* bol identifikovaný ako najpočetnejší u všetkých koní, nasledovaný druhmi *Macrococcus carouselicus, Corynebacterium inhibens, Staphylococcus equorum, Erwinia mexicanum, Macrococcus goetzii, Streptococcus parauberis a Bacillus pumilus*, ktoré patria do kmeňa *Bacillota*. Naopak, Etman a kol. (2020) skúmali u hovädzieho dobytka rozdiely v mikrobiote zdravej kože a kože postihnutej dermatitídou v oblasti predného úponu vemena. V kontrolných vzorkách zdravej kože boli najviac zastúpené kmene *Actinomycetota, Bacillota* a *Pseudomonadota*. Z uvedených štúdií vyplýva, že kožný mikrobióm hospodárskych zvierat je

tvorený širokým spektrom bakteriálnych taxónov, pričom jeho zloženie sa môže líšiť v závislosti od živočíšneho druhu, anatomickej lokalizácie kože a ďalších faktorov. Napriek týmto rozdielom sa u koní aj hovädzieho dobytka opakovane vyskytujú najmä zástupcovia kmeňov *Bacillota*, *Actinomycetota* a *Pseudomonadota*.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s finančnou podporou grantov APVV-23-0005 a VEGA 2/0004/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

AL-GHAZZEWI, Fawaz H. a Robert F. TESTER. 2014. Impact of prebiotics and probiotics on skin health. *Beneficial Microbes*. 2014, roč. 5, č. 2, s. 99–107. DOI: 10.3920/BM2013.0040.

BESSEDE, E., M. ANGLA-GRÉ, Y. DELAGARDE, S. SEP HIENG, A. MÉNARD a F. MÉGRAUD. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization Biotyper: Experience in the routine of a university hospital. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011, roč. 17, č. 4, s. 533–538. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03274.x.

CHONG, J., P. LIU, G. ZHOU a J. XIA. 2020. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nature Protocols*. 2020, roč. 15, č. 3, s. 799–821. DOI: 10.1038/s41596-019-0264-1.

EKMAN, Lisa, a kol.. A shotgun metagenomic investigation of the microbiota of udder cleft dermatitis in comparison to healthy skin in dairy cows. *PLoS One*, 2020, 15.12: e0242880.

GRICE, Elizabeth A., Heidi H. KONG, Gérald RENAUD, a kol.. 2008. A diversity profile of the human skin microbiota. *Genome Research*. 2008, roč. 18, č. 7, s. 1043–1050. DOI: 10.1101/gr.075549.107.

GRICE, Elizabeth A. a Julia A. SEGRE. 2011. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*. 2011, roč. 9, č. 4, s. 244–253. DOI: 10.1038/nrmicro2537.

KONG, Heidi H. a Julia A. SEGRE. 2012. Skin microbiome: Looking back to move forward. *Journal of Investigative Dermatology*. 2012, roč. 132, č. 3, s. 933–939. DOI: 10.1038/jid.2011.417.

MATINPOUR, M., N. ZETTNER, K. NEUMANN, L. BÄUMER a A. BURKOVSKI. 2025. Analysis of the culturable skin microbiome of horses from Southern Germany. *Microorganisms*. 2025, roč. 13, č. 3, článok 623. DOI: 10.3390/microorganisms13030623.

SFRISO, R., M. EGERT, M. GEMPELER, R. VOEGELI a R. CAMPICHE. 2020. Revealing the secret life of skin – with the microbiome you never walk alone. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020, roč. 42, č. 2, s. 116–126. DOI: 10.1111/ics.12594.

ZHU, Y., X. YU a G. CHENG. 2023. Human skin bacterial microbiota homeostasis: A delicate balance between health and disease. *mLife*. 2023, roč. 2, s. 107–120. DOI: 10.1002/mlf2.12064.

VYUŽITIE KOMBINOVANÝCH INTERAKCIÍ BIOGÉNNYCH NANOČASTÍC A ÉTERICKÉHO OLEJA *SALVIA ROSMARINUS* NA POTENCIÁCIU ÚČINKU AMPICILÍNU VOČI MULTIREZISTENTNÉMU *STAPHYLOCOCCUS EQUORUM*

Hisirová S.[1], Hudecová P.[1], Hajdučková V.[1], Dančová N.[2], Mačák L.[3], Koščová J.[1], Király J.[1]
[1]*Katedra mikrobiológie a imunológie, UVLF v Košiciach*
[2]*Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF v Košiciach*
[3]*Katedra biomedicínskeho inžinierstva a merania, Strojnícka fakulta, Technická univerzita v Košiciach, Košice*

ABSTRAKT
Cieľom práce bolo posúdiť účinok biogénne syntetizovaných strieborných nanočastíc pripravených z extraktu *Salvia rosmarinus* (AgNPs-R) a príslušného éterického oleja (REO) v kombinácii s ampicilínom (AMP) voči multirezistentnému biofilm-produkujúcemu kmeňu *Staphylococcus equorum* SD75. V štúdii bola hodnotená antibakteriálna, antibiofilmová a biofilm-eradikačná aktivita mikrodilučnou riediacou metódou spolu s metódou farbenia kryštálovou violeťou. Kombinácia AgNPs-R/REO/AMP v subinhibičných koncentráciách viedla k 57,1 % redukcii bakteriálneho rastu a 69,4 % inhibícii tvorby biofilmu v porovnaní so samotným AMP. Pri eradikácii preformovaného biofilmu dosiahla trojkombinácia 42,7 % redukciu absorbancie, pričom jednotlivé zložky samostatne eradikačný účinok nepreukázali. Naše zistenia poukazujú na potenciál kombinácie AgNPs-R, REO a antibiotika ako perspektívneho prístupu na resenzibilizáciu antibiotík voči multirezistentným baktériám.

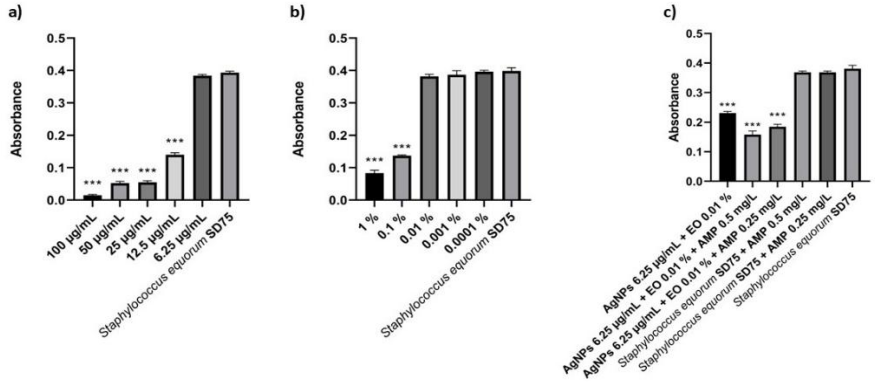
ÚVOD
Antibiotická rezistencia predstavuje jednu z najvýznamnejších výziev súčasnej aj budúcej liečby infekčných ochorení. Môže byť podmienená viacerými mechanizmami, ako je napr. enzymatická inaktivácia antibiotík, aktívny eflux, znížená permeabilita bunkovej steny, modifikácia cieľového miesta alebo perzistencia vo forme biofilmu. Významným rezervoárom génov rezistencie sú koaguláza-negatívne stafylokoky (CoNS), resp. NASM (non-aureus staphylococci and mammaliicocci), ktoré sú komenzálom kožnej a slizničnej mikrobioty a ku ktorým patrí aj *Staphylococcus equorum*. Perspektívnym prístupom k prekonávaniu rezistencie je kombinácia antibiotík s alternatívnymi antimikrobiálnymi látkami, ako sú AgNPs a EOs (Alaoui a kol., 2022).

MATERIÁL A METODIKA
Na experiment bol použitý klinický multirezistentný kmeň so schopnosťou tvorby biofilmu *Staphylococcus equorum* SD75 (GenBank acc. no. PV688033) v koncentrácii 1 McFarland, ktorý bol charakterizovaný v štúdii Hisirová a kol., 2025. Do experimentu bol zaradený AMP, biogénne AgNPs-R a REO (Calendula a.s., Nová Ľubovňa, SR). Príprava, fyzikálno-chemická charakterizácia a vlastnosti AgNPs-R, ako aj charakterizácia REO pomocou GC/MS a HPLC, sú opísané v práci Hisirová a kol. 2026. Antibakteriálna aktivita bola stanovená mikrodilučnou riediacou metódou v modifikovanom BHI bujóne (1 % glukózy, 2 % NaCl) v dvojnásobných sériových riedeniach v 96-jamkových mikrotitračných platničkách podľa štandardizovaných postupov EUCAST a CLSI. Zásobná koncentrácia AgNPs-R bola 500 µg/ml. Čistý REO bol pripravený ako 10 % (v/v) zásobný roztok v polysorbáte 20. Zásobná koncentrácia AMP bola 10 mg/ml. Testované koncentračné rozsahy boli 6,25 – 100 µg/ml pre AgNPs-R, 0,0001 – 1 % (v/v) pre REO a 0,5 mg/l pre AMP. Po príprave boli platničky inkubované 24 h pri 37 °C a rast bol hodnotený spektrofotometricky pri 600 nm (Synergy 4 Merck, Darmstadt, Nemecko). Minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) bola definovaná ako najnižšia koncentrácia inhibujúca rast mikroorganizmu. Inhibícia tvorby aj eradikácia preformovaného biofilmu bola hodnotená mikrodilučnou riediacou metódou s farbením kryštálovou violeťou podľa O'Toole (1999) a kvantifikovaná meraním absorbancie pri 550 nm. Získané údaje (z troch nezávislých opakovaní) vyjadrovali percentuálnu inhibíciu

bakteriálneho rastu, tvorby biofilmu a eradikácie preformovaného biofilmu. Potenciácia účinku bola hodnotená indexom frakčnej inhibičnej koncentrácie (FICI). Štatistická analýza dát bola vykonaná pomocou jednofaktorovej ANOVA s následným Dunnettovým testom v programe GraphPad Prism 8.3.0.

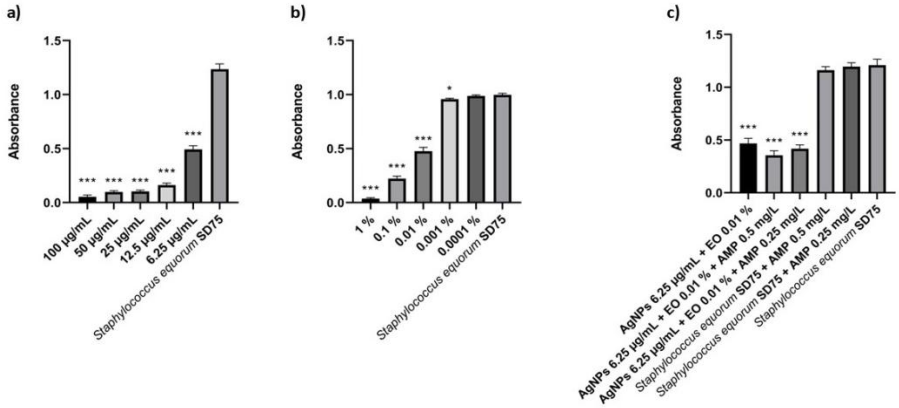
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Antibakteriálna aktivita: Minimálna inhibičná koncentrácia AMP voči *S. equorum* bola stanovená na 1 mg/l, AgNPs-R na 12,5 µg/ml a REO na 0,1 % v/v, čo zodpovedalo približne 0,0929 % w/v (0,929 mg/ml). Všetky testované kombinácie v subinhibičných koncentráciách (0,5 mg/l AMP; 6,25 µg/ml AgNPs-R; 0,01 % v/v REO) vykazovali štatisticky významnú antibakteriálnu aktivitu (Obr. 1). Trojkombinácia s dosahovala až 57.1 % redukciu bakteriálneho rastu v porovnaní so samotným AMP a silnejší inhibičný účinok ako dvojkombinácia so zvýšením inhibície o 31.6 %. FICI hodnota kombinácie dvojkombinácie bola 0,501 (hraničný aditívny účinok) a trojkombinácie 1,001 (hraničný indiferentný účinok). Pozorované 2,3-násobné zníženie rastu baktérií pri sub-MIC koncentráciách naznačuje, že kombinovaná aplikácia týchto zlúčenín môže zvýšiť antibakteriálnu aktivitu v porovnaní s ich individuálnymi účinkami.



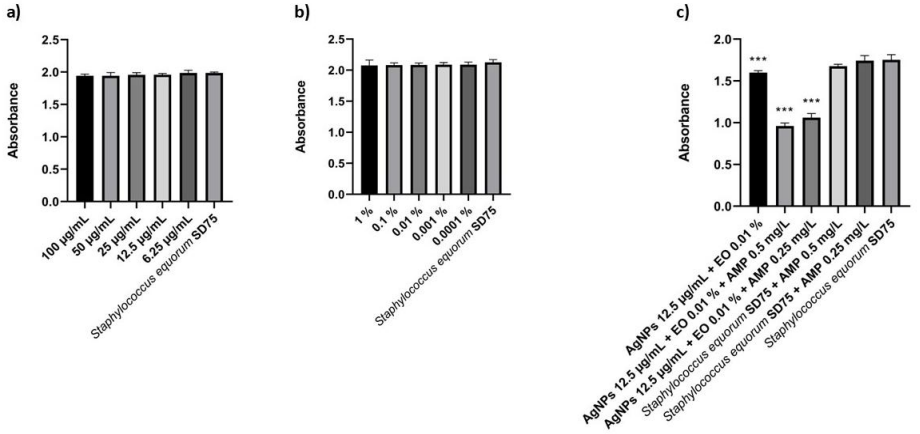
Obr. 1. Antibakteriálna aktivita AgNPs (a), REO (b) a ich kombinácii (c) proti S. equorum. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (n = 3). *** p < 0,001

Antibiofilmová aktivita: Minimálna inhibičná koncentrácia biofilmu (MBIC) AMP voči *S. equorum* bola stanovená na 1 mg/l, AgNPs-R na 6,25 µg/mL a REO na 0,01 % v/v, čo zodpovedalo približne 0,00929 % w/v. V porovnaní s hodnotami MIC bola MBIC o jedno až dve logaritmické riedenia nižšia, čo naznačuje vysokú citlivosť tvorby biofilmu na pôsobenie AgNPs-R a REO (Obr. 2). Kombinácia sub-MIC AgNPs-R/REO neviedla k štatisticky významnému zníženiu absorbancie. Po pridaní AMP však bol pozorovaný výrazný pokles absorbancie, čo zodpovedalo zvýšeniu účinku so 69,4 % redukciou bakteriálneho rastu a silnejší inhibičný účinok ako dvojkombinácia so zvýšením inhibície o 24 %. Získané výsledky potvrdili výraznú, 3,3-násobnú antibiofilmovú aktivitu trojkombinácie, ktorá dosiahla vyšší inhibičný účinok ako jednotlivé látky a ich dvojkombinácia.



Obr. 2. Antibiofilmová aktivita AgNPs (a), REO (b) a ich kombinácii (c) proti S. equorum. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (n = 3). *** p < 0,001.

Biofilm-eradikačná aktivita: Žiadna z testovaných koncentrácií AMP, AgNPs-R a REO nepreukázala signifikantnú eradikáciu biofilmu *S. equorum* a nebola tak stanovená žiadna minimálna koncentrácia eradikujúca biofilm (MBEC) (Obr. 3). V kombinácii sub-MIC AgNPs-R/REO došlo k zvýšeniu účinku s 19,5 % redukciou bakteriálneho rastu v porovnaní so samotnými AgNPs-R a s 23,3 % redukciou bakteriálneho rastu v porovnaní so samotným REO. Po pridaní AMP bolo pozorované zvýšeniu účinku so 42,7 % redukciou bakteriálneho rastu a silnejší inhibičný účinok ako dvojkombinácia so zvýšením inhibície o 39,9 %. Tieto zistenia potvrdzujú 1,7-násobne vyššiu účinnosť testovaných kombinácií pri eradikácii preformovaného biofilmu, zatiaľ čo jednotlivé zložky samostatne nepreukázali žiadnu eradikačnú aktivitu.



Obr. 3. Biofilm-eradikačná aktivita AgNPs (a), REO (b) a ich kombinácii (c) proti S. equorum. Hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD (n = 3). *** p < 0,001.

Pozorovaný potenciačný účinok AgNPs a EOs na antibakteriálnu, antibiofilmovú a biofilm-eradikačnú aktivitu antibiotík je v súlade s výsledkami viacerých štúdií (Kadi a kol., 2025 a Meroni a kol., 2024).

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol financovaný realizáciou projektov APVV-23-0488, VEGA 1/0091/26 a KEGA 018UVLF-4/2025. Poďakovanie patrí aj MVDr. Stanislavovi Laukovi PhD. za podporu a pomoc počas realizácie tejto práce.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ALAOUI, M. a kol. Alternatives Therapeutic Approaches to Conventional Antibiotics: Advantages, Limitations and Potential Application in Medicine. *Antibiotics.* 2022, roč. 11. ISSN 2079-6382.

HISIROVÁ, S. a kol. Exploitation of Nanoparticle–Essential Oil Combinations to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Agents Against *Staphylococcus equorum. Pharmaceutics.* 2026, roč. 18, č. 8, s. 1-29. ISSN 1999-4923.

HISIROVÁ, S. a kol. Resistance Genes and Virulence Factor Genes in Coagulase-Negative and Positive Staphylococci of the *Staphylococcus intermedius* Group (SIG) Isolated from the Dog Skin. *Microorganisms.* 2025, roč. 13, č. 4, s. 1-21. ISSN 2076-2607.

O'TOOLE a kol. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in Enzymology*. 1999, č. 310, s. 91–109. ISBN 978-0-08-054872-2.

KADI, R.H.H. Synergistic Effects of Silver Nanoparticles Combined with Amoxicillin or Cymbopogon schoenanthus Essential Oil on the Formation of Bacterial Biofilm. *Journal of Contemporary Medical Sciences.* 2025, roč. 11, č. 5, s. 394-401. ISSN 2413-0516.

MERONI, G. a kol. Antibacterial Potential of Essential Oils and Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates. *Pathogens*. 2024, roč. 13, č. 2, s. 1-14. ISSN 2076-0817.

HODNOTENIE ANTIOXIDAČNÉHO STATUSU U KONÍ NA ZÁKLADE VYBRANÝCH BIOMARKEROV

Hoppejová T.[1], Zigo F.[1], Récky A.[1], Tvrdá A.[1]
[1]*Katedra výživy a chovu zvierat, UVLF v Košiciach*

ABSTRAKT

Cieľom štúdie bolo charakterizovať biochemický a redoxný profil klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse (AQH). Do sledovania bolo zaradených 13 koní (7 kobýl a 6 valachov) vo veku 4 – 15 rokov. Hodnotené boli biochemické ukazovatele, koncentrácia selénu (Se), vitamínov E a A, celkový antioxidačný status (TAS), aktivita glutatiónperoxidázy (GPx) a koncentrácia malondialdehydu (MDA). Pri niektorých biochemických parametroch boli zaznamenané nižšie hodnoty. Koncentrácia Se dosiahla 0,89 ± 0,44 µmol/L, vitamínu E 5,62 ± 1,21 µmol/L a retinolu 0,66 ± 0,11 µmol/L. Priemerný TAS bol 2,42 ± 0,53 mmol/L, aktivita GPx 862 ± 265 U/L a koncentrácia MDA bola 0,131 ± 0,022 µmol/L. Získané výsledky charakterizujú východiskový stav sledovanej skupiny a umožňujú spoločné posúdenie nutričných, metabolických a antioxidačných ukazovateľov.

ÚVOD

U koní sa oxidačný stres podieľa na fyziologických adaptačných procesoch, ovplyvňuje zdravotný stav, reprodukčné funkcie aj športovú výkonnosť a jeho intenzita sa mení v závislosti od metabolickej záťaže a podmienok prostredia (Shono a kol. (2020); Arfuso a kol. (2022)).

Dôležitou súčasťou enzymatickej antioxidačnej ochrany je GPx, ktorá katalyzuje redukciu peroxidu vodíka a organických hydroperoxidov. TAS poskytuje komplexnú informáciu o antioxidačnej kapacite organizmu, zatiaľ čo MDA, konečný produkt lipidovej peroxidácie, patrí medzi najčastejšie využívané ukazovatele oxidatívneho poškodenia (Bottegaro a kol., 2018); (Yildirim A. a Yildirim B., 2023).

Významným faktorom ovplyvňujúcim antioxidačnú kapacitu je výživa. Dostatočný prísun stopových prvkov zabezpečuje optimálnu aktivitu antioxidačných enzýmov (Latham a kol., 2021). Cieľom práce bolo charakterizovať biochemický profil a súčasne vyhodnotiť oxidačno-antioxidačný status klinicky zdravých koní plemena AQH.

MATERIÁL A METÓDY

Podmienky chovu koní

Do štúdie bolo zaradených 13 klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse (7 kobýl a 6 valachov) vo veku 4 –15 rokov, s telesnou hmotnosťou 470 –540 kg a BCS 5. Kone boli chované vo vonkajšom ustajnení na farme na východnom Slovensku. Kŕmna dávka pozostávala z lúčneho sena s neobmedzeným prístupom k pitnej vode.

Stanovenie biochemických a antioxidačných ukazovateľov

Biochemické parametre boli stanovené v krvnom sére analyzátorom COBAS 111 (Roche Diagnostics). V sére boli stanovené aj koncentrácie Se, vitamínu E (α-tokoferolu) a vitamínu A (retinolu). TAS bol stanovený súpravou Randox Total Antioxidant Status pri 600 nm, GPx súpravou Ransel RS504 pri 340 nm a MDA metódou TBARS pri 532 nm pomocou spektrofotometra ONDA V-10 PLUS.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Parameter	Priemer ± SD	Minimum	Maximum	Referenčné hodnoty
Kreatinín (µmol/L)	76,82 ± 8,33	60,70	90,00	106–160
Urea (mmol/L)	3,45 ± 1,19	1,08	4,78	3,33–5,83
Glukóza (mmol/L)	5,18 ± 1,11	3,17	7,08	4,16–6,38
P (mmol/L)	1,15 ± 0,28	0,72	1,50	1,00–1,81
Ca (mmol/L)	2,87 ± 0,09	2,76	3,02	2,25–2,99
Mg (mmol/L)	0,62 ± 0,08	0,47	0,72	0,90–1,15
Cl (mmol/L)	82,62 ± 4,77	78,60	91,00	99–109
K (mmol/L)	3,42 ± 0,31	2,78	3,91	2,4-5,6
Na (mmol/L)	109,02 ± 1,79	105,60	111,50	125–150

Zdroj: Laboratórium KMZ, UVLF Košice, referenčné hodnoty podľa interných laboratórnych protokolov.

Tab. 1 Biochemické ukazovatele u koní plemena American Quarter Horse (n = 13)

V biochemickom profile boli zaznamenané nižšie koncentrácie kreatinínu, horčíka, chloridov a sodíka, zatiaľ čo ostatné sledované ukazovatele boli prevažne v referenčných intervaloch (tab. 1). Zistená nižšia koncentrácia Se môže poukazovať aj na možný vplyv výživy na minerálny profil sledovaných koní. Fernández-Villa a kol., (2026) preukázali vplyv spôsobu výživy na sérové koncentrácie minerálnych prvkov u koní, pričom najvýraznejšie rozdiely zaznamenali pri Se.

Parameter	Priemer ± SD	Minimum	Maximum	Referenčné / odporúčané hodnoty
Se (µmol/L)	0,89 ± 0,44	0,40	1,80	1,65–2,03
Vitamín E (µmol/L)	5,62 ± 1,21	4,01	7,57	2,86–7,62
Vitamín A (µmol/L)	0,66 ± 0,11	0,53	0,88	0,50–0,80
TAS (mmol/L)	2,42 ± 0,53	1,81	3,85	1,5–2,2*
GPx (U/L)	862 ± 265	538	1392	719–837*
MDA (µmol/L)	0,131 ± 0,022	0,109	0,192	0,3–0,5*

Zdroj: Vlastné výsledky. * Pri TAS, GPx a MDA ide o odporúčané hodnoty u koní podľa literatúry, NRC (2007) nestanovuje pevný referenčný interval sérového retinolu u koní.

Tab. 2 Oxidačno – antioxidačný status u koní plemena American Quarter Horse (n = 13)

Koncentrácie vitamínu E (5,62 ± 1,21 µmol/L) a retinolu (0,66 ± 0,11 µmol/L) zodpovedali porovnávacím hodnotám. Význam Se pre antioxidačnú ochranu súvisí s jeho účasťou v GPx, pričom pozitívny vzťah medzi koncentráciou Se a aktivitou GPx u zdravých koní zaznamenali Kirschvink a kol. (2006). Napriek nižšej koncentrácii Se boli aktivita GPx (862 ± 265 U/L) a TAS (2,42 ± 0,53 mmol/L) mierne vyššie ako porovnávacie hodnoty.

ZÁVER

Výsledky práce poskytujú východiskovú charakteristiku biochemického a oxidačno-antioxidačného profilu klinicky zdravých koní plemena American Quarter Horse. Najvýraznejším nálezom bola nižšia koncentrácia Se, ktorá môže súvisieť s nízkym obsahom tohto prvku v pôdach Slovenska a následne s jeho nižším zastúpením v lokálne produkovaných objemových krmivách.

POĎAKOVANIE

Práca bola realizovaná s podporou Vedeckej grantovej agentúry Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied, projekt VEGA č. 1/0427/26 a s podporou Internej grantovej agentúry s prvkom č. 10/26.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ARFUSO, F., a kol. 2022. Oxidant and Antioxidant Parameters' Assessment Together with Homocysteine and Muscle Enzymes in Racehorses: Evaluation of Positive Effects of Exercise. *Antioxidants*, 11(6), 1176. DOI: 10.3390/antiox11061176.

BOTTEGARO BRKLJAČA, N., a kol. 2018. Effect of prolonged submaximal exercise on serum oxidative stress biomarkers (d-ROMs, MDA, BAP) and oxidative stress index in endurance horses. *BMC Veterinary Research*, 14, 216. DOI: 10.1186/s12917-018-1540-y.

FERNÁNDEZ-VILLA, C., a kol. 2026. Reference intervals for serum macro- and microminerals in clinically healthy horses in Northwestern Spain: Influence of age, sex, breed and diet. *Journal of Equine Veterinary Science*, 160, 105846. DOI: 10.1016/j.jevs.2026.105846.

KIRSCHVINK, N., a kol. 2006. Investigation of blood oxidant/antioxidant markers in healthy competition horses of different breeds. *Equine Veterinary Journal*, 38(S36), 239–244. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05546.x.

KIRSCHVINK, N., DE MOFFARTS, B. a LEKEUX, P., 2008. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. *The Veterinary Journal*, 177(2), 178–191. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.07.033.

LATHAM, C. M., a kol. 2021. Complexed trace mineral supplementation alters antioxidant activities and expression in response to trailer stress in yearling horses in training. *Scientific Reports*, 11, 7352. DOI: 10.1038/s41598-021-86478-7.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC), 2007. *Nutrient Requirements of Horses*. 6th rev. ed. Washington, DC: The National Academies Press. DOI: 10.17226/11653.

SHONO, S., a kol. 2020. The Oxidative Stress Markers of Horses—the Comparison with Other Animals and the Influence of Exercise and Disease. *Animals*, 10(4), 617. DOI: 10.3390/ani10040617.

YILDIRIM, F. a APAYDIN YILDIRIM, B., 2023. Evaluation of oxidative stress parameters of horses housed with goats in individual boxes. *Online Journal of Animal and Feed Research*, 13(5), 367–372. DOI: 10.51227/ojafr.2023.52.

VPLYV WI-FI ŽIARENIA NA VÝVOJ MESONEFROS U 9-DŇOVÉHO KURACIEHO EMBRYA

Hudáková P., Almášiová V.
Katedra morfologických disciplín, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Elektromagnetické žiarenie patrí medzi jedno z najrýchlejšie rastúcich environmentálnych vplyvov. Naša populácia je denne vystavovaná rôznym frekvenciám a môžeme predpokladať, že sa tento trend bude iba zvyšovať. Práve expozícia Wi-Fi žiareniu sa stáva viac a viac bežnou a preto sa zvyšuje aj znepokojenie spojené s možnými účinkami na zdravie, pričom jeho vplyv na prenatálny vývin zostáva nedostatočne preskúmaný. Cieľom našej práce bolo zhodnotiť účinok kontinuálnej expozície Wi-Fi žiarenia na vývoj mezonefros u 9-dňového kuracieho embrya. Do experimentu bolo zaradených 40 oplodnených vajec plemena Lohmann Brown rozdelených do kontrolnej a Wi-Fi skupiny (n = 20). Wi-Fi skupina bola od 1. do 9. embryonálneho dňa kontinuálne exponovaná žiareniu s frekvenciou 2,4 GHz a výkonovou hustotou 200–500 μW/m². Na 9. deň bola hodnotená histologická štruktúra mezonefros, apoptóza a proliferačná aktivita buniek. Makroskopický vývoj embryí bol v oboch skupinách porovnateľný. V exponovanej skupine boli vo vyvíjajúcej sa obličke – mezonefros na úrovni svetelnej mikroskopie pozorovateľné difúzne degeneratívne zmeny ako zvýšený výskyt zdvojených mezonefrických teliesok, prítomnosť dezintegrovaných mezonefrických teliesok, degenerácia mezonefrických tubulov a kongescia intersticiálnych ciev. Expozícia Wi-Fi žiarením viedla k signifikantnému zvýšeniu apoptózy a zvýšenej proliferačnej aktivite buniek. Výsledky naznačujú, že kontinuálna expozícia Wi-Fi žiarenia s frekvenciou 2,4 GHz môže počas embryonálneho vývoja ovplyvniť morfologickú integritu mezonefros, dynamiku bunkovej obnovy a mechanizmy súvisiace s bunkovým stresom, a to aj pri výkonovej hustote nepresahujúcej stanovené expozičné bezpečnostné limity.

ÚVOD

Elektromagnetické žiarenie predstavuje v súčasnosti jeden z najdynamickejšie rastúcich environmentálnych faktorov. V dôsledku rozširovania bezdrôtových technológií sa práve expozícia Wi-Fi žiareniu stáva bežnou súčasťou každodenného života populácie. V súčasnom období je už relatívne veľa informácií o vplyve mobilných telefónov na organizmus, avšak štúdie venované objasňovaniu vplyvu Wi-Fi, najmä s dôrazom na prenatálny vývin sú veľmi zriedkavé (Pall, 2018). Osobitnú pozornosť si zasluhuje práve embryonálne obdobie, počas ktorého prebieha intenzívna proliferácia, migrácia, diferenciácia a apoptóza. Kuracie embryo má ako experimentálny model množstvo výhod ako je jednoduchá manipulácia, dostupnosť počas celého roka, či vývoj mimo tela matky (Ubeda a kol., 1994). V práci sme sa zamerali na vyhodnotenie vplyvu Wi-Fi na vývoj mezonefros, nakoľko sa jedná o plne funkčný a dynamicky sa meniaci embryonálny orgán. Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť účinok kontinuálnej expozície Wi-Fi žiarenia (od 1. po 9. embryonálny deň) s frekvenciou 2,4 GHz a výkonovou hustotou 200-500 μW/m². Účinok sme sledovali na viacerých úrovniach. Hodnotili sme histologickú štruktúru, apoptózu a proliferačnú aktivitu buniek.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých štyridsať oplodnených vajec kury domácej, plemena Lohmann Brown. Vajcia boli náhodne rozdelené do kontrolnej a Wi-Fi skupiny (v každej po dvadsať vajec). Wi-Fi skupina bola kontinuálne exponovaná počas deviatich dní pri frekvencii 2,4 GHz pri výkonovej hustote 200 až 500 μW/m² zo vzdialenosti 45 cm od antény. Kontrolné vajcia boli inkubované za rovnakých podmienok v tienenom inkubátore. Technické zabezpečenie experimentu bolo vykonané v spolupráci s kolegami z fakulty elektrotechniky a

informatiky TUKE. Na 9. embryonálny deň boli embryá odobrané a vzorky spracované podľa príslušných protokolov na svetelnú mikroskopiu, TUNEL a MCM2.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V kontrolnej ako aj Wi-Fi skupine sme na 9. embryonálny deň makroskopicky pozorovali normálny priebeh embryogenézy. Na mikroskopickej úrovni sa pri malom zväčšení štruktúra jednotlivých orgánov Wi-Fi skupiny neodlišovala od kontrolnej skupiny. V oblasti hlavy sme pozorovali typický vývoj mozgu, oka, nosovej a zobákovej dutiny. V telovej dutine boli prítomné pľúca, srdce, pečeň, žalúdok, črevo, pankreas, obličky v štádiu mezonefros s priľahlými gonádami ako aj prekurzory metanefros (Bellairs a Osmond, 2014). Kým u kontrolnej skupiny sme pri strednom a veľkom zväčšení pozorovali fyziologickú degeneráciu mezonefros výlučne v jeho kraniálnom oddieli, u Wi-Fi skupiny boli degeneratívne zmeny difúzneho charakteru prítomné v celom orgáne. Jednalo sa hlavne o zvýšený výskyt zdvojených mezonefrických teliesok, a ojedinele aj ich úplnú dezintegráciu. Mezonefrické tubuly obsahovali zvýšený počet scvrknutých a odumretých buniek. V interstíciu sme pozorovali zjavnú kongesciu ciev. Ďalej sme hodnotili úroveň apoptózy pomocou metódy TUNEL. TUNEL-pozitívne bunky boli prítomné v mezonefrických tubuloch aj telieskach v oboch skupinách, vo Wi-Fi skupine bol však ich počet výrazne vyšší. Semikvantitatívne hodnotenie potvrdilo vysoko signifikantné zvýšenie počtu apoptotických buniek, a to s hodnotou p menšou ako 0,001. Proliferačnú aktivitu sme hodnotili imunohistochemickou metódou MCM2. V mezonefrických tubuloch aj telieskach u oboch skupín boli prítomné MCM2 pozitívne bunky. Semikvantitatívna analýza však ukázala vyšší počet proliferujúcich buniek vo Wi-Fi skupine, s hodnotou p menšou ako 0,05. Súčasné zvýšenie apoptózy aj proliferácie naznačuje zmenu dynamiky bunkovej obnovy a regulačných mechanizmov počas vývoja mezonefros.

Viaceré vedecké štúdie už potvrdili netermálny efekt blízkeho infračerveného žiarenia a to aj pri silovej hustote nižšej ako sú povolené limity. K takým zmenám patrilo napríklad poškodenie DNA, oxidačný stres, zvýšená hladina intracelulárneho vápnika, zvýšená expresia stresových proteínov, zvýšená apoptóza ale aj bunková proliferácia (Hinrikus a kol., 2005, Belyaev, 2009, Deshmukh a kol., 2015, Shahin a kol., 2015, Dasdag a Akdag, 2016, Othman a kol., 2018, Das, 2020).

Na záver môžeme konštatovať, že kontinuálna expozícia Wi-Fi s frekvenciou 2,4 GHz počas prvých deviatich dní embryonálneho vývoja bola spojená so stredne závažnými difúznymi degeneratívnymi zmenami mezonefros. Zároveň došlo k signifikantnému zvýšeniu apoptózy aj proliferácie buniek mezonefros.

Výsledky teda naznačujú, že neionizujúce žiarenie s dávkou ktorá neprekračuje povolené bezpečnostné limity dokáže interferovať s jemnými regulačnými mechanizmami zodpovednými za normálny priebeh embryogenézy.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA č. 1/0036/22.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BELLAIRS, R. a OSMOND, M. Atlas of Chick Development. 3. vyd. Oxford: Academic Press, 2014, s. 67–76.

BELYAEV, I. Nonthermal biological effects of microwaves: current knowledge, further perspective, and urgent needs. *Electromagnetic Biology and Medicine*. 2009, roč. 24, s. 375–403. DOI: 10.1080/15368370500381844.

DAS, D. Microwave radiation and its effect on human body: a review. *International Journal of Innovative Research in Multidisciplinary Field*. 2020, roč. 6. ISSN 2455-0620.

DASDAG, S. a AKDAG, M. Z. The link between radiofrequencies emitted from wireless technologies and oxidative stress. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 2016, roč. 75, s. 85–93. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2015.09.001.

DESHMUKH, P. S., NASARE, N., MEGHA, K., BANERJEE, B. D., AHMED, R. S., SINGH, D., ABEGAONKAR, M. P., TRIPATHI, A. K. a MEDIRATTA, P. K. Cognitive impairment and neurogenotoxic effects in rats exposed to low intensity microwave radiation. *International Journal of Toxicology*. 2015, roč. 34, s. 284–290.

DOI: 10.1177/1091581815574348.

HINRIKUS, H., BACHMANN, M., TOMSON, R. a LASS, J. Non-thermal effect of microwave radiation on human brain. *Environment*. 2005, roč. 25, s. 187–194. DOI: 10.1007/s10669-005-4282-x.

OTHMAN, H., AMMARI, M., RTIBI, K., BENSAID, N., SAKLY, M. a ABDELMELEK, H. Postnatal development and behavior effects of in-utero exposure of rats to radiofrequency waves emitted from conventional WiFi devices. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018, roč. 52, s. 239–244. DOI: 10.1016/j.etap.2017.04.016.

PALL, ML. Wi-Fi is an important threat to human health. *Environ Res.* 2018 164:405–416. h t t p s : / / d o i . o r g / 1 0 . 1 0 1 6 / j . e n v r e s . 2 0 1 8 . 0 1 . 0 3 5

SHAHIN, S., BANERJEE, S., SINGH, S. P. a CHATURVEDI, C. M. 2.45 GHz microwave radiation impairs learning and spatial memory via oxidative/nitrosative stress induced p53-dependent/independent hippocampal apoptosis: molecular basis and underlying mechanism. *Toxicological Sciences*. 2015, roč. 148, s. 380–399. DOI: 10.1093/toxsci/kfv205.

UBEDA, A., TRILLO, M. A., CHACÓN, L., BLANCO, M. J. a LEAL, J. Chick embryo development can be irreversibly altered by early exposure to weak extremely-low-frequency magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 1994, roč. 15, s. 385–398. DOI: 10.1002/bem.2250150503.

ANALÝZA REFRAKČNÝCH CHÝB U PSOV

Imrichová A.[1] ,Trbolová A.[1], Balicka A.[1] , Zwolska J.[2]
[1]*Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach*
[2]*University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland*

ABSTRAKT

Refrakčné chyby oka, teda poruchy ostrosti zraku, sú bežným problémom u psov v domácnosti. Chyby do -1,0 D, väčšinou nie sú majiteľmi pozorované. Refrakčná chyba môže byť spôsobená abnormálnym zakrivením rohovky, abnormálnou pevnosťou kryštalickej šošovky alebo zmenami dĺžky optickej osi oka (Davidson a kol., 1993). Napriek tomu, že literárne zdroje dokazujú prítomnosť refrakčných vád u rôznych druhov zvierat, retinoskopia (vyšetrenie refrakčnej sily oka), nie je zahrnutá do protokolu veterinárneho oftalmologického vyšetrenia. protokolu veterinárneho oftalmologického vyšetrenia. Cieľom tejto práce je analyzovať refrakčný stav očí u brachycefalického plemena francúzsky buldoček a porovnať dve metódy merania – autorefraktometriu a retinoskopiu. Pre účely analýzy bolo vyšetrených 24 klinicky zdravých francúzskych buldočkov z organizácie OZ Frbul. Zahrnuté boli obe pohlavia, všetky vekové a váhové kategórie, bez prítomnosti iných očných abnormalít, pretože akékoľvek očné ochorenie (okrem nukleárnej sklerózy) by mohlo ovplyvniť výsledky vyšetrenia refrakčnej chyby. Získané výsledky predstavujú významný podklad pre ďalšie štúdie refrakčných vád u psov na Slovensku.

ÚVOD

Počet štúdií o refrakcii očí u zvierat je doteraz nízky, hoci diagnóza konkrétnej refrakčnej poruchy poskytuje majiteľom dôležité informácie o očakávaniach týkajúcich sa schopností zvieraťa – či už pri práci, alebo hraní. U starších psov je problém so zrakom zvyčajne sekundárny v dôsledku ochorení rohovky, katarakty alebo patologických zmien na sietnici (Mutti a kol., 1999). Analýza refrakčného stavu si vyžaduje individuálny prístup (Kubai a kol., 2008). V normálnom, emetropickom oku sa svetlo zbieha na sietnici a vytvára ostrý obraz. V opačnom prípade, pri ametropii, dochádza k refrakčnej chybe oka. Refrakčné poruchy zahŕňajú myopiu a hyperopiu, teda krátkozrakosť a ďalekozrakosť (Black a kol., 2008; Davidson a kol., 1993). Pri anizometropii je refrakčná chyba medzi očami nevyrovnaná (Kubai a kol., 2008; Maegahara a kol., 2011). S narastajúcou refrakčnou chybou sa znižuje orientácia psa v priestore (Ofri a kol., 2012). Väčšina psov je emetropická (Davidson a kol., 1993). U psov aj ľudí, nezávisle od pohlavia, sa ametropia môže s vekom zhoršovať (Lowe, 2015).

MATERIÁL A METODIKA

Kompletné oftalmologické vyšetrenie vykonali u 24 klinicky zdravých francúzskych buldočkov, vrátane 2 jedincov po jednostrannej enukleácii, čiže celkovo bolo vyšetrených 46 očí. Všetky psy pochádzali z organizácie OZ Frbul, a nemali preukaz pôvodu. Vzorka obsahovala 19 samíc a 5 samcov vo veku 3 až 11 rokov. Vyšetrenie zahŕňalo: neurooftalmologické a behaviorálne testy videnia, vyšetrenie predného segmentu oka štrbinovou lampou Kowa (SL15, Kowa, Japonsko), meranie vnútroočného tlaku prístrojom TonoVet (iCare, Fínsko). Vyšetrenie zadného segmentu oka a šošovky sa realizovalo za mydriázy po aplikácii jednej kvapky 1% cyklopentolátu (Midria, VAPP, Portugalsko) do oboch očí. Kvapky sa opakovali po 5 minútach, následne sa vykonala oftalmoskopia šošovky a sklovca pomocou štrbinovej lampy a vyšetrenie sietnice nepriamym oftalmoskopom (Keeler, UK).

Refrakčná chyba bola meraná obojstranne dvoma metódami, 30–45 minút po aplikácii 1% cyklopentolátu:

a) Retinoskopia – manuálna retinoskopia zaznamenávala refrakčnú chybu v horizontálnom aj vertikálnom meridiáne po korekcii na pracovnú vzdialenosť. Pri vyšetrení sa zdroj svetla umiestňoval pred oko a sledoval sa odraz na sietnici psa. Pohyb svetelného lúča horizontálne k pupile umožňoval posúdenie refrakčného stavu. Výsledkom bol spriemerovaný sférický ekvivalent. Použitý retinoskop bol Welch Allyn Elite spolu so skiaskopickými líštami Luneau (Wilson Ophthalmic), pracovná vzdialenosť 67 cm (1,5 D).

b) Autorefraktometria – digitálne automatické meranie refrakčných chýb. Použitý bol prenosný autorefraktor (Retinomax 3, Righton alebo Welch Allyn SureSight™). Toto vyšetrenie vykonal veterinárny oftalmológ zaškolený na prácu s týmto prístrojom.

Psy s očnými ochoreniami (okrem nukleárnej sklerózy) alebo tie, u ktorých správanie neumožnilo vyšetrenie bez sedácie, boli zo štúdie vylúčené.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Emetropiou sa rozumie refrakčný stav medzi –0,5 D a +0,5 D, myopia ≤ −0,5 D a hyperopia ≥ +0,5 D. Anizometropia je rozdiel medzi očami > 0,5 D. Významná myopia je refrakčná chyba ≥ −1,5 D, ktorá spôsobuje klinicky relevantné zhoršenie zraku (Ofri a kol.., 2012). Z vyšetrených 46 očí bolo 15 vylúčených kvôli KCS, pigmentáciám rohovky alebo katarakte. Retinoskopia bola vykonaná na 31 očiach. Priemerný sférický ekvivalent podľa retinoskopie bol +0,27 ± 0,43 D (rozmedzie −0,50 až +1,00 D). Priemerná hodnota z autorefraktometrie bola +0,70 ± 0,78 D (rozmedzie −0,50 až +2,50 D). Autorefraktometr poskytoval v priemere vyššie, teda hyperopickejšie hodnoty o 0,43 D v porovnaní s retinoskopiou. Rozdiel medzi metódami bol štatisticky významný. Tieto výsledky korelujú s prácou Barbary Nell (2026), ktorá tiež zaznamenala hyperopickejšie hodnoty pri autorefraktometrii. V našej štúdii boli obe metódy vykonané po aplikácii 1% cyklopentolátu, ktorý podľa štúdie Grotha a kol. (2013) môže výrazne ovplyvniť výsledky autorefraktometrie. Najlepšia zhoda bola dosiahnutá pri necykloplegickom autorefraktometrickom vyšetrení v porovnaní s retinoskopiou, kde vplyv cykloplégie bol zanedbateľný. Vyšetrenie refrakčných chýb nie je súčasťou rutinného veterinárneho oftalmologického vyšetrenia, preto sú dostupné štúdie zamerané iba na vybrané skupiny psov v konkrétnych oblastiach.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla vďaka podpore VEGA 1/0306/26.

POUŽITÁ LITERATÚRA

DAVIDSON, M. G., a kol.. Refractive state of aphakic and pseudophakic eyes of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1993, 54.1: 174-177., Dostupné na internete: https://doi.org/10.2460/ajvr.1993.54.01.174

MUTTI, Donald O.; ZADNIK, Karla; MURPHY, Christopher J. Naturally occurring vitreous chamber-based myopia in the Labrador retriever. *Investigative ophthalmology & visual science*, 1999, 40.7: 1577-1584., Dostupné na internete: https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2181474

KUBAI, Melissa A., a kol.. Refractive states of eyes and association between ametropia and breed in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 2008, 69.7: 946-951. Dostupné na internete: https://doi.org/10.2460/ajvr.69.7.946

BLACK, Joanna, a kol.. A canine model of inherited myopia: familial aggregation of refractive error in labrador retrievers. *Investigative ophthalmology & visual science*, 2008, 49.11: 4784-4789. . Dostupné na internete:https://doi.org/10.1167/iovs.08-1828

OFRI, Ron, a kol.. Effect of optical defocus on performance of dogs involved in field trial competition. *American Journal of Veterinary Research*, 2012, 73.4: 546-550. , Dostupné na internete: https://doi.org/10.2460/ajvr.73.4.546

OFRI, Ron, MAGGS, David J., a kol.. *Slatter's fundamentals of veterinary ophthalmology*. Elsevier Health Sciences, 2013.

LOWE, James, a kol.. The Arclight ophthalmoscope: a reliable low-cost alternative to the standard direct ophthalmoscope. *Journal of ophthalmology*, 2015, 2015.1: 743263., Dostupné na internete: https://doi.org/10.1155/2015/743263

GISELBRECHT, Juliana; NELL, Barbara. Evaluation of Refractive Measurements Using a Handheld Autorefractor (Retinomax K+ Screen) Versus Streak Retinoscopy in Dogs. *Veterinary Ophthalmology*, 2026, 29.2: e70123. Dostupné na internete: https://doi.org/10.1111/vop.70123

GROTH, Allyson D., a kol.. Clinical comparison of the Welch Allyn SureSight™ handheld autorefractor vs. streak retinoscopy in dogs. *Veterinary ophthalmology*, 2013, 16.5: 319-323. Dostupné na internete: https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01075.x

VZŤAH KONCENTRÁCIE SÉROVÉHO HAPTOGLOBÍNU V NEONATÁLNOM OBDOBÍ K NÁSLEDNÉMU VÝSKYTU OMFALITÍDY U TELIAT

Ješík J., Mudroň P., Tóthová C., Oršuľaková V.
Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Omfalitída je časté ochorenie teliat v neonatálnom období. Infekcia bežne postihuje jednotlivé časti pupka, avšak môže sa šíriť ďalej do organizmu a spôsobiť ďalšie zdravotné komplikácie. Ochorenia pupka a s ním súvisiace komplikácie majú negatívny dopad na zdravie, welfare a úžitkovosť zvierat. Haptoglobín, jeden z proteínov akútnej fázy, sa u hovädzieho dobytka preukázal ako významný marker zápalu a zmeny v jeho koncentrácii boli popísané aj u teliat postihnutých omfalitídou. Cieľom práce bolo posúdiť vzťah medzi koncentráciou sérového haptoglobínu v neonatálnom období a následným vývojom omfalitídy u teliat. Vzorky boli odobraté od 36 teliat vo veku 1 až 7 dní, ktoré nepreukazovali príznaky ochorenia. U 10 teliat bola počas nasledujúcich 6 týždňov diagnostikovaná omfalitída. Zvyšných 26 teliat bolo počas sledovaného obdobia zdravých. Hodnoty haptoglobínu boli 0,275 ± 0,124 mg/ml u zdravých a 0,270 ± 0,112 mg/ml u teliat s omfalitídou. Medzi skupinami nebol zistený štatisticky významný rozdiel. Haptoglobín sa nepreukázal ako marker schopný predpovedať vznik omfalitídy u teliat.

ÚVOD

Omfalitída je bežne vyskytujúci sa zdravotný problém u teliat. Je následkom infekcie pupka a jeho príslušných zložiek hlavne u novonarodených mláďat. Vzniká v dôsledku nefyziologického zasychania pupočného povrazca spôsobeného infekciou. Špecifická stavba pupka teliat v období pôrodu tiež vytvára predispozíciu pre vznik ochorenia. Hrubý pupočný povrazec u teliat vytvára zvýšené riziko infekcie kvôli nedostatočnej kontrakcii hrubých ciev (Kováč a kol., 1997). Infekcia pupočnej oblasti môže viesť k vzniku rôznych intraabdominálnych lézii alebo abscedácie vonkajšieho pupka. Infekcia šíriaca sa ascendentne cez pupočné cievy alebo urachus je rizikom pre vznik septikémie. Infekcia vznikajúca touto cestou môže spôsobiť akútnu alebo chronickú septikémiu s následným postihnutím kĺbov, meningitídou, uveitídou a ďalšími komplikáciami. V niektorých prípadoch je infekcia slabá a klinické príznaky sa vyvinú až u teliat starých niekoľko mesiacov (Monteiro a kol., 2022). Infekcie pupka majú negatívny vplyv na produktivitu a welfare zvierat. Zápalové ochorenia pupka znižujú priemerný denný prírastok najmä počas obdobia pred odstavením a pri dlhotrvajúcich infekciách aj u teliat na rastlinnej výžive (Virtala a kol., 1996). Celestino a kol. (2021) pozorovali v súvislosti so zdravotným stavom teliat viacero stresových a zápalových biomarkerov, z ktorých sa ako najvýznamnejší ukázal haptoglobín. Haptoglobín je jeden z najdôležitejších proteínov akútnej fázy využiteľných na diagnostiku ochorení u hovädzieho dobytka. Jeho hlavnou biologickou funkciou je tvorba stabilného komplexu s voľným hemoglobínom v krvnom obehu, čím zabraňuje stratám železa a zároveň obmedzuje jeho dostupnosť pre baktérie. U hovädzieho dobytka sa haptoglobín v normálnom sére vyskytuje vo veľmi nízkych koncentráciách, avšak pri zápalovej reakcii dochádza k jeho výraznému zvýšeniu. Zvýšené koncentrácie boli preukázané pri experimentálne vyvolaných aj prirodzene vzniknutých infekciách, traumách a ďalších závažných zápalových procesoch. Intenzita zvýšenia haptoglobínu často koreluje so závažnosťou klinických príznakov a môže odrážať rozsah zápalovej odpovede organizmu. Z tohto dôvodu je haptoglobín u hovädzieho dobytka považovaný za významný biomarker subklinického aj klinického zápalu (Petersen a kol., 2004). Seppä-Lassila a kol. (2015) uvádza, že omfalitídy u teliat sú sprevádzané zvýšenými hodnotami haptoglobínu. Včasné rozpoznanie ochorenia umožňuje skorú terapiu a môže zabrániť progresii lokalizovanej omfalitídy do závažnejších systémových komplikácií, a tým

prispieť k zníženiu mortality teliat a súvisiacich ekonomických strát (Steiner a Lejeune, 2009). Cieľom práce bolo zistiť prediktívny význam koncentrácie haptoglobínu v krvnom sére k následnému výskytu omfalitídy u teliat.

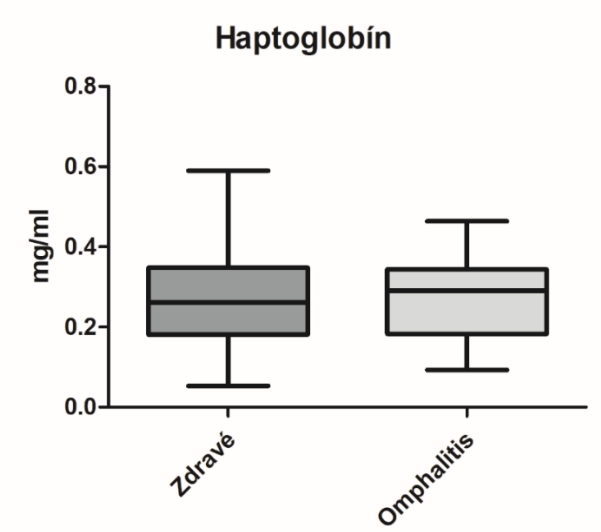
MATERIÁL A METODIKA

Teľatá vo veku 1 až 7 dní sme podrobili klinickému vyšetreniu po ktorom sme vykonali odber krvi z *vena jugularis* do skúmavky s koagulačným činidlom za účelom získania krvného séra. Odber krvi v tomto veku zodpovedá časovaniu, ktoré sa na farme bežne využíva na stanovenie koncentrácie sérových imunoglobulínov za účelom hodnotenia kolostrálnej imunity teliat. Túto rutinne odobratú vzorku sme využili aj na stanovenie koncentrácie haptoglobínu, čím sme sa vyhli potrebe dodatočného odberu a záťaže zvierat. Následne sme zdravotný stav jedincov monitorovali jedenkrát týždenne počas nasledujúcich 6 týždňov. Do štúdie sme zaradili 10 teliat, ktoré pri prvotnom klinickom vyšetrení nepreukazovali príznaky ochorenia, avšak počas nasledujúcich vyšetrení sme u nich diagnostikovali omfalitídu. Kontrolnú skupinu tvorilo 26 zdravých teliat. Koncentráciu haptoglobínu sme stanovili zo vzoriek krvného séra metódou enzýmovej imunoanalýzy použitím komerčného diagnostického ELISA testu Bovine Hp ELISA kit EB0011 (Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Wuhan, China), za použitia špecifických značených monoklonálnych protilátok. Intenzitu farebnej reakcie sme hodnotili spektrofotometricky na automatickom fotometri pre mikrotitračné platne Opsys MR (Dynex Technologies, Veľká Británia). Zistené hodnoty sme štatisticky vyhodnotili pomocou programu GraphPad Prism 5.0. Normalitu distribúcie dát sme overili Shapiro-Wilkovým testom a rovnomernosť rozptylu F-testom pre každú skupinu samostatne. Na základe tohto overenia sme následne použili Studentov nepárový t-test na porovnanie skupín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerná koncentrácia sérového haptoglobínu bola u klinicky zdravých teliat 0,275 ± 0,124 mg/ml (n = 26) a u teliat, u ktorých sa následne vyvinula omfalitída 0,270 ± 0,112 mg/ml (n = 10). Medzi skupinami nebol zistený štatisticky významný rozdiel (nepárový t-test, t = 0,110, df = 34, p = 0,913). Naše zistenia nepotvrdili predpoklad, že koncentrácia haptoglobínu stanovená v období 1.–7. dňa veku by mohla slúžiť ako prediktívny ukazovateľ následného vzniku omfalitídy u teliat. Tento výsledok je v rozpore so zisteniami Celestino a kol. (2021), ktorí identifikovali haptoglobín ako jeden z najvýznamnejších biomarkerov spojených so zdravotným stavom teliat, ako aj s prácou Petersena a kol. (2004), ktorá opisuje haptoglobín ako citlivý indikátor subklinického aj klinického zápalu u hovädzieho dobytka. Tento rozpor je však možné vysvetliť viacerými faktormi. Jedným z faktorov je aj načasovanie odberu vzoriek. Krv bola odobraná v období 1.–7. dňa veku, teda ešte pred klinickou manifestáciou omfalitídy, ktorá bola diagnostikovaná až počas následného šesťtýždňového sledovania. Haptoglobín ako proteín akútnej fázy reaguje na už prebiehajúci zápalový proces – jeho koncentrácia stúpa až po vzniku infekcie, nie pred ňou (Petersen a kol., 2004). Je preto možné, že v čase odberu ešte infekčný proces pupka nebol prítomný alebo nebol dostatočne rozvinutý na to, aby vyvolal systémovú zápalovú odpoveď merateľnú zvýšením Hp. Naše výsledky tak môžu skôr naznačovať, že bazálna koncentrácia Hp v novorodeneckom období nemá prediktívnu hodnotu, zatiaľ čo jeho diagnostický význam sa prejavuje až v období aktívneho ochorenia, ako to opisuje aj Monteiro a kol. (2022). Tóthová a kol. (2015) popisujú významný nárast hodnôt haptoglobínu u zdravých teliat počas prvého týždňa života, čo mohlo taktiež ovplyvniť naše zistené hodnoty haptoglobínu. Taktiež treba zohľadniť aj limitácie súvisiace s veľkosťou súboru vzoriek. Naše výsledky napriek tomu poukazujú na potrebu ďalšieho výskumu zameraného na dynamiku koncentrácie haptoglobínu v priebehu vývoja omfalitídy, ideálne s opakovanými odbermi v priebehu sledovaného obdobia, čo by umožnilo

presnejšie určiť, v ktorej fáze ochorenia nadobúda haptoglobín svoju diagnostickú, resp. prognostickú hodnotu.



Graf 1. Koncentrácia sérového haptoglobínu (Hp) u klinicky zdravých teliat (n = 26) a u teliat s následne diagnostikovanou omfalitídou (n = 10)

POĎAKOVANIE

Publikácia vznikla za finančnej podpory IGA UVLF 07/2026 „Vzťah včasnej zápalovej odpovede a pasívneho prenosu imunity k výskytu ochorení u teliat v neonatálnom období".

POUŽITÁ LITERATÚRA

CELESTINO, M.L. a kol. Associations of serum biomarkers of stress and inflammation measured at arrival with health, mortality, and growth of calves transported within the first 4 days of life. Journal of Dairy Science. 2021, roč. 105, č. 2, s. 1543–1555. ISSN 1525-3198.

KOVÁČ, G. a kol. *Zápalové ochorenia pupka teliat – diagnóza a prognóza. Slovenský veterinársky časopis*. 1997, roč. 22, č. 1, s. 14-19. ISSN 1335-0099.

MONTEIRO, F.D.O. a kol. Clinical and surgical approach to umbilical disorders in calves - literature review. Ciências Agrárias. 2022, roč. 43, č. 6, s. 2803-2822. ISSN 1679-0359.

PETERSEN, H.H. a kol. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Veterinary Research. 2004, roč. 35, č. 2, s. 163–187. ISSN 1297-9716.

SEPPÄ-LASSILA, L. a kol. Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2015, roč. 41, s. 10-16. ISSN 1878-1667.

STEINER, A., Lejeune, B. Ultrasonographic Assessment of Umbilical Disorders. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2009, roč. 25, s. 781–794. ISSN 1558-4240.

TÓTHOVÁ, C. a kol. Changes in the Concentrations of Acute Phase Proteins in Calves during the first Month of Life. Acta Veterinaria. 2015, roč. 65, s. 260-270. ISSN 1820-7448.

VIRTALA, A.M.K. a kol. The Effect of Calfhood Diseases on Growth of Female Dairy Calves During the First 3 Months of Life in New York State. Journal of Dairy Science. 1996, roč. 79, č. 6, s. 1040-1049. ISSN 1525-3198.

IZOLÁCIA A FENOTYPOVÁ CHARAKTERIZÁCIA PRIMÁRNYCH CHONDROCYTOV PRE 2D MODELOVÉ SYSTÉMY V *IN VITRO* PODMIENKACH

Kalinaj B., Kolibárová K., Nosálová N., Huniadi M., Čížková D.
Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bola izolácia chondrocytov z kĺbovej chrupky hlavice stehennej kosti dospelých psov, vytvorenie optimálnych 2D modelových systémov a následne overenie ich chondrogénneho fenotypu. Dvojrozmerné (2D) *in vitro* tkanivové modely osteoartrózy poskytujú cenovo dostupnú a vysoko výkonnú analýzu. Fenotypová charakterizácia bola vykonaná histochemickým farbením glykozaminoglykánov (Alcian blue, Safranin O) a imunocytochemickým dôkazom kolagénu typu II a agrekánu. Chondrocyty dospelých psov boli úspešne izolované a následne kultivované v monovrstve. Vďaka zachovaniu svojho tvaru počas celej doby kultivácie, farbenie s Alcian blue a Safranin O, ako aj imunocytochemický dôkaz kolagénu typu II a agrekánu, potvrdili zachovaný chondrogénny fenotyp izolovaných chondrocytov.

ÚVOD

Kĺbová chrupka má obmedzenú schopnosť spontánnej regenerácie, čo pri poškodení osteochondrálnych defektov vedie k progresii degeneratívnych zmien kĺbu (Poole a kol., 2001). Bunkové terapie založené na transplantácii autológnych chondrocytov (ACI) sa preto stali štandardnou súčasťou liečby chrupkových defektov v humánnej aj veterinárnej medicíne (Brittberg a kol., 1994). Predpokladom úspešnej terapie je dostupnosť dostatočného počtu chondrocytov so zachovaným chondrogénnym fenotypom, ktorý sa počas dlhodobej monovrstvovej (2D) kultivácie *in vitro* postupne stráca procesom dediferenciácie (Caron a kol., 2012; Stokes a kol., 2002). Overenie fenotypu izolovaných a kultivovaných chondrocytov je preto nevyhnutným krokom pred ich ďalším experimentálnym využitím. Cieľom tejto práce bolo zaviesť postup izolácie a primárnej kultúry chondrocytov z kĺbovej chrupky dospelých psov a overiť ich chondrogénny fenotyp pomocou histochemického farbenia glykozaminoglykánov (Alcian blue, Safranin O) a imunocytochemického dôkazu kolagénu typu II a agrekánu.

MATERIÁL A METODIKA

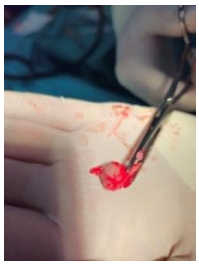
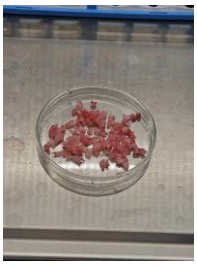
Chondrocyty boli izolované z kĺbovej chrupky hlavice stehennej kosti (*caput ossis femoris*) dospelého jedinca po štandardnom chirurgickom zákroku (ostektómia hlavice stehennej kosti pri traumatickej luxácii bedrového kĺbu). Chrupka bola za sterilných podmienok mechanicky odpreparovaná od kostného podkladu hlavice, zbavená mäkkých tkanív a následne disekovaná na fragmenty s veľkosťou približne 1–2 mm^3 a natrávená kolagenázou typu I a IV v DPBS (Dulbecco´s phosphate buffered saline) počas 24 hodín pri 37 °C. Po digescii bola bunková suspenzia prefiltrovaná cez sitko, kde sme zachytili nenatrávené častice a debris, centrifugovaná a bunková peleta resuspendovaná v kultivačnom médiu: Dulbecco´s Modified Eagle Medium s vysokým obsahom glukózy 4g/L (DMEM HG), 10 % fetal bovine serum (FBS), 1 % roztok antibiotík a antimykotika (ATB/ATM: peniclín, streptomycín, amfotericín), L-glutamín a gentamycín. Chondrocyty boli kultivované v monovrstve na kultivačných fľašiach T25 (25 cm^2) pri 37 °C a 5 % CO^2, ich morfológia bola priebežne hodnotená mikroskopicky a po dosiahnutí konfluencie (80-90 %) boli pasážované.

Fenotypová charakterizácia chondrocytov bola vykonaná histochemicky, farbením na dôkaz glykozaminoglykánov (GAG). Bunky nasadené na 24-jamkovú kultivačnú platničku boli fixované 4 % formaldehydom; na dôkaz GAG bol použitý 2 % roztok Alcian blue, na dôkaz negatívne nabitých proteoglykánov 0,1 % roztok Safranín O. Farbené preparáty boli hodnotené svetelným mikroskopom.

Imunocytochemický dôkaz chondrogénneho fenotypu bol vykonaný na chondrocytoch fixovaných 4 % paraformaldehydom, s blokovaním nešpecifickej väzby 10 % normálnym kozím sérom. Bunky boli inkubované s primárnymi protilátkami proti kolagénu typu II a agrekánu cez noc pri 4 °C, následne so sekundárnymi protilátkami a DAPI na dôkaz jadier. Negatívna kontrola bola vykonaná vynechaním primárnej protilátky.

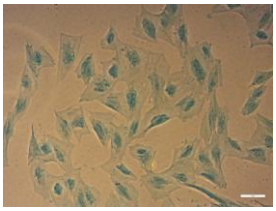
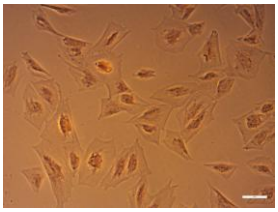
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Izolácia chrupky z hlavice stehennej kosti dospelého jedinca (Obr. 1) prebehla bez kontaminácie; mechanická disekcia na fragmenty s veľkosťou približne 1–2 mm^3 (Obr. 2) umožnila efektívne enzymatické trávenie kolagenázou typu I a IV, pričom bunkový pelet chondrocytov získaný po centrifugácii bunkovej suspenzie (Obr. 3) potvrdil efektívnosť enzymatickej digescie za získania primárnych chondrocytov na ďalšiu kultiváciu.


Obr. 1. Hlavica stehennej kosti (caput ossis femoris) dospelého jedinca získaná počas resekcie hlavice stehennej kosti (obrázok vľavo).
Obr. 2. Chrupkové tkanivo disekované na fragmenty s veľkosťou približne 1–2 mm^3 pred enzymatickým trávením kolagenázou typu I a IV (obrázok v strede).
Obr. 3. Bunkový pelet chondrocytov po centrifugácii bunkovej suspenzie, pripravený na resuspendovanie v kultivačnom médiu (obrázok vpravo).

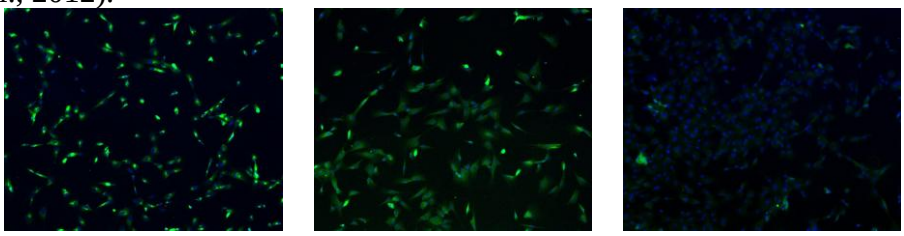
Primárne chondrocyty kultivované v monovrstve na 24-jamkovej kultivačnej platničke (5 000 buniek/jamku) počas 2 týždňov vykazovali prevažne predĺžený, vretenovitý tvar. Farbenie s Alcian blue (Obr. 4) preukázalo výraznú, difúznu pozitivitu na glykozaminoglykány v cytoplazme buniek; farbenie Safranín O (Obr. 5) rovnako ukázalo intenzívnu oranžovo-červenú reakciu svedčiacu o bohatom obsahu proteoglykánov. Toto zistenie potvrdzuje zachovaný chondrogénny fenotyp kultivovaných buniek, keďže syntéza sulfatovaných GAG a proteoglykánov, ktorých intenzita farbenia priamo koreluje s ich obsahom v extracelulárnej matrix (Rosenberg, 1971), zostala pri tomto type a dĺžke kultivácie zachovaná. Pozitívne farbenie so Safranin O v skupine ofarbených preparátov naznačilo, že proteoglykány sú hojne a homogénne rozmiestnené okolo chondrocytov (Xu a kol., 2014).

Obr. 4. Farbenie Alcian blue na dôkaz glykozaminoglykánov u chondrocytov dospelých psov kultivovaných v monovrstve (5 000 buniek/jamku, 24-jamková kultivačná platnička; obrázok vľavo).
Obr. 5. Farbenie Safranín O na dôkaz proteoglykánov u chondrocytov dospelých psov kultivovaných v monovrstve (5 000 buniek/jamku, 24-jamková kultivačná platnička; obrázok vpravo).

Imunocytochémia preukázala u chondrocytov kultivovaných v monovrstve pozitivitu na oba sledované chondrogénne markery. Kolagén typu II (Obr. 6) vykazoval prevažne perinukleárnu, miestami granulárnu fluorescenciu zodpovedajúcu jeho intracelulárnej syntéze

v drsnom endoplazmatickom retikule a Golgiho aparáte pred sekréciou do extracelulárnej matrix. Agrekán (Obr. 7) sa prejavoval difúznejšou cytoplazmatickou fluorescenciou zaberajúcou väčšiu časť bunkového tela. Negatívna kontrola s vynechanou primárnou protilátkou (Obr. 8) nevykazovala žiadnu špecifickú fluorescenciu okrem jadrového farbenia DAPI, čím sa potvrdila špecifickosť použitých sekundárnych protilátok. Vďaka vretenovitému tvaru pozorovanému v monovrstve chondrocyty teda naďalej silno exprimovali oba markery chondrogénneho fenotypu, čo potvrdzuje výsledky histochemického farbenia a svedčí o zachovanom chondrogénnom charaktere buniek pri tomto type a dĺžke kultivácie (Caron a kol., 2012).



Obr. 6. Imunocytochemický dôkaz kolagénu typu II (zelená fluorescencia) u chondrocytov dospelých psov kultivovaných v monovrstve; jadrá dofarbené DAPI (modrá; obrázok vľavo).
Obr. 7. Imunocytochemický dôkaz agrekánu (zelená fluorescencia) u chondrocytov dospelých psov kultivovaných v monovrstve; jadrá dofarbené DAPI (modrá; obrázok v strede).
Obr. 8. Negatívna kontrola imunocytochemického farbenia (vynechanie primárnej protilátky); jadrá dofarbené DAPI (modrá; obrázok vpravo).

POĎAKOVANIE

Táto štúdia bola podporená projektom VEGA 1/0122/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BRITTBERG, M. a kol. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 1994, roč. 331, č. 14, s. 889-895. ISSN 0028-4793.

CARON, M. M. J. a kol. Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2012, roč. 20, č. 10, s. 1170-1178. ISSN 1063-4584.

POOLE, A. R. a kol. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 2001, č. 391 Suppl, s. S26-33. ISSN 0009-921X.

ROSENBERG, L. Chemical basis for the histological use of safranin O in the study of articular cartilage. *Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume.* 1971, roč. 53, č. 1, s. 69-82. ISSN 0021-9355.

SCOTT, J. E. – DORLING, J. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solutions. *Histochemie.* 1965, roč. 5, č. 3, s. 221-233. ISSN 0018-2206.

STOKES, D. G. a kol. Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis. *Arthritis and Rheumatism.* 2002, roč. 46, č. 2, s. 404-419. ISSN 0004-3591.

XU, G. J. a kol. Effect of JJYMD-C, a novel synthetic derivative of gallic acid, on proliferation and phenotype maintenance in rabbit articular chondrocytes in vitro. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2014, roč. 47, č. 8, s. e3935. ISSN 0100-879X.

PRÍPRAVA ALOGÉNNEHO DEMINERALIZOVANÉHO KOSTNÉHO MATRIXU PSA A HODNOTENIE JEHO CYTOKOMPATIBILITY XTT TESTOM

Kolibárová K.[1], Kalinaj B.[1], Čížková D.[2], Trbolová A.[1], Hluchý M.[1]
[1]*Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach*
[2]*Laboratórium experimentálnej a klinickej regeneratívnej medicíny, UVLF v Košiciach*

ABSTRAKT
Demineralizovaný kostný matrix (DBM) je kostný štep, ktorý si po kyslej extrakcii minerálnej fázy kosti zachováva kolagénovú kostru s viazanými rastovými faktormi vrátane kostných morfogenetických proteínov (BMP). Cieľom práce bola príprava alogénneho DBM psa z kadáverovej spongióznej kosti a hodnotenie jeho cytokompatibility in vitro XTT testom na mezenchymálnych kmeňových bunkách z tukového tkaniva psa (AT-MSC) v teste s extraktom (1–40 mg/ml) a v teste priameho kontaktu (1–5 mg DBM na jamku) počas 72 hodín. Extrakt nevykazoval cytotoxický účinok v žiadnej koncentrácii ani časovom bode (viabilita 97–141 % kontroly). V priamom kontakte zostala viabilita pri 1–2 mg DBM na jamku po 24 a 48 hodinách na úrovni kontroly (80–108 %). Nižšie hodnoty pri 3–5 mg boli skreslené interferenciou častíc s kolorimetrickým čítaním. DBM pripravený podľa tohto protokolu teda neuvoľňuje do média cytotoxické rezíduá.

ÚVOD
Rozsiahle kostné defekty po traumách, resekciách nádorov alebo pri poruchách hojenia typu non-union často vyžadujú využitie kostného štepu. Autológny spongiózny štep zostáva zlatým štandardom, jeho odber je však spojený s morbiditou odberového miesta a poskytuje obmedzený objem materiálu (Innes a Myint, 2010). Demineralizovaný kostný matrix (DBM) vzniká kyslou extrakciou minerálnej fázy kosti. Odstránením hydroxyapatitu sa obnaží kolagénová kostra typu I s viazanými rastovými faktormi, predovšetkým BMP, zodpovednými za jeho osteoinduktívny účinok (Urist, 1965). Klinické skúsenosti u psov potvrdzujú jeho potenciál (Hoffer a kol., 2008), opierajú sa však prevažne o xenogénne komerčné prípravky s významnou variabilitou biologickej aktivity medzi výrobcami aj šaržami (Bae a kol., 2006), čo motivuje prípravu druhovo špecifického alogénneho DBM.
Základnou požiadavkou na každý implantovateľný biomateriál je cytokompatibilita. Pri DBM je podmienená dôkladným odstránením rezíduí kyseliny, lipidov a dekontaminačných činidiel (Gromošová a kol., 2009). Hodnotenie cytokompatibility tak predstavuje nevyhnutný prvý krok pred ďalším biologickým využitím pripraveného materiálu.

MATERIÁL A METODIKA
Zdrojom kostného tkaniva bol kadáver psa bez ortopedického ochorenia, eutanazovaného z dôvodov nesúvisiacich s pohybovým aparátom. Spongiózna kosť bola odobratá bezprostredne *post mortem* z proximálnych metafýz ramennej a holennej kosti, z proximálnej a distálnej metafýzy stehnovej kosti a z krídla bedrovej kosti, mechanicky očistená a do spracovania uložená pri −80 °C. Kosť bola mletá v mlynčeku v hlboko zmrazenom stave, aby sa minimalizovalo tepelné poškodenie organickej zložky matrixu. Na ďalšie spracovanie bola zvolená frakcia 0,5–1 mm, keďže častice tejto veľkosti vykazujú najvyšší osteoinduktívny potenciál (Zhang a kol., 1997). Prášok bol premytý destilovanou vodou (60 minút, dve výmeny) s cieľom odplaviť zvyšky krvi a kostnej drene, ktoré predstavujú hlavný zdroj imunogenicity alogénneho štepu. Následne bol odtučnený vo vodnom kúpeli pri 50 °C počas 60 minút a opäť počas 60 minút premytý.
Demineralizácia prebiehala v 0,5 M kyseline chlorovodíkovej pri 4 °C počas 2 hodín za miernej agitácie. Materiál bol premývaný fosfátovým pufrom (PBS) do stabilného pH 7,2–7,4, dekontaminovaný v PBS s penicilínom, streptomycínom a amfotericínom B cez noc pri 4 °C, opláchnutý sterilným PBS a dehydratovaný vzostupnou etanolovou radou (70, 80 a 96 %

etanol). DBM bol asepticky vysušený v laminárnom boxe počas 12 hodín a skladovaný pri −80 °C.

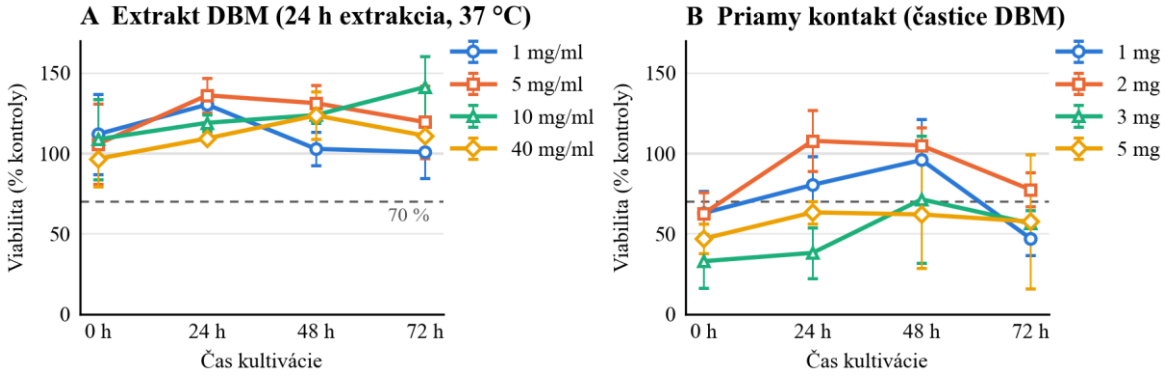
Hodnotenie cytokompatibility metódou XTT

Použité boli mezenchymálne kmeňové bunky z tukového tkaniva psa (AT-MSC) v tretej pasáži. Bunky boli osadené na dve 96-jamkové mikrotitračné platničky (12 500 buniek na jamku) a kultivované 72 hodín v médiu DMEM s 10 % fetálneho bovinného séra (FBS) pri 37 °C a 5 % CO_2. Na prvej platničke bolo médium nahradené extraktom z DBM, pripraveným 24-hodinovou extrakciou pri 37 °C v médiu s 2 % FBS v koncentráciách 1, 5, 10 a 40 mg/ml. Na druhej platničke bol DBM pridaný priamo k bunkám v množstve 1, 2, 3 a 5 mg na jamku v 150 µl média s 2 % FBS. Kontrolu tvorili bunky v médiu s 2 % FBS bez DBM alebo extraktu z neho. Pozadie tvorilo médium bez buniek a pri priamom kontakte aj DBM v médiu bez buniek. Každá skupina bola nasadená v triplikáte pre každý časový bod. Metabolická aktivita buniek bola meraná v deň začatia ko-kultivácie a po 24, 48 a 72 hodinách.

XTT test je založený na redukcii tetrazóliovej soli XTT dehydrogenázami metabolicky aktívnych buniek na rozpustný formazán úmerne počtu životaschopných buniek. V každom časovom bode bolo do samostatnej trojice jamiek každej skupiny pridané XTT činidlo (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemecko) a absorbancia bola meraná po 4 hodinách pri 450 nm. Po odpočítaní zodpovedajúceho pozadia bola viabilita vyjadrená ako percento absorbancie kontroly (priemer ± SD, n = 3). Podľa ISO 10993-5 sa materiál považuje za necytotoxický, ak viabilita neklesne pod 70 % kontroly (ISO, 2009).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Extrakt z DBM nevykazoval cytotoxický účinok v žiadnej koncentrácii ani časovom bode (Graf 1A): viabilita AT-MSC sa počas 72 hodín pohybovala v rozpätí 97–141 % kontroly, trvalo nad hranicou 70 % podľa ISO 10993-5. Pri 5 a 10 mg/ml bola metabolická aktivita po 24–72 hodinách dokonca o 20–40 % vyššia než v kontrole, čo možno vysvetliť uvoľňovaním rastových faktorov a kolagénových peptidov z matrixu do extraktu; pri 40 mg/ml zostala na úrovni kontroly.



Graf 1. Viabilita AT-MSC psa (XTT, 450 nm) v expozícii extraktu z DBM (A) a v priamom kontakte s časticami DBM (B), % kontroly (2 % FBS), priemer ± SD, n = 3; prerušovaná čiara = hranica 70 % (ISO 10993-5).

V priamom kontakte závisel výsledok od množstva materiálu (Graf 1B). Pri 1 a 2 mg DBM na jamku sa viabilita po 24 a 48 hodinách pohybovala v rozpätí 80–108 % kontroly, pri 3 a 5 mg boli hodnoty nižšie počas celého testu (33–71 %). Jamky s 3 a 5 mg DBM bez buniek však vykazovali vysokú absorbanciu pozadia (1,3–1,6 oproti 0,5–0,7 pri 1–2 mg a 0,4–0,6 pri samotnom médiu), spôsobenú rozptylom svetla na časticiach. Po jeho odpočítaní zostáva len malý špecifický signál so značným rozptylom (SD až 40 %), takže zníženie viability pri 3 a 5 mg pravdepodobne nie je dôkazom cytotoxicity. Keďže extrakt z porovnateľného množstva

materiálu (10–40 mg/ml) cytotoxický nebol, pravdepodobnejšou príčinou je prekrytie bunkovej vrstvy časticami s obmedzením difúzie živín a XTT k bunkám. Vysoký rozptyl hodnôt po 72 hodinách vrátane poklesu pri 1 mg pravdepodobne súvisí s tým, že tento časový bod bol umiestnený v krajných stĺpcoch platničky, kde odparovanie média skresľuje výsledok (Lundholt a kol., 2003).

Limitom XTT testu v priamom kontakte s časticovým materiálom je interferencia častíc s kolorimetrickým čítaním. V ďalšom hodnotení je preto vhodné častice DBM po ukončení kokultivácie z jamiek pred pridaním XTT činidla odstrániť výmenou média a opláchnutím adherentných buniek, prípadne doplniť metódu nezávislú od absorbancie. Výsledky napriek tomu ukazujú, že pripravený DBM neuvoľňuje do média cytotoxické rezíduá kyseliny, etanolu ani antibiotík, čo potvrdzuje účinnosť premývacích a neutralizačných krokov, a že AT-MSC v priamom kontakte s nižšou dávkou materiálu zostávajú metabolicky aktívne. XTT test je tak prvým stupňom validácie pripraveného DBM a východiskom pre nadväzujúce hodnotenie jeho osteoinduktívneho potenciálu.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0122/24 a APVV-25-0491.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BAE, H. W. a kol. Intervariability and intravariability of bone morphogenetic proteins in commercially available demineralized bone matrix products. *Spine*. 2006, roč. 31, č. 12, s. 1299-1306. ISSN 0362-2436.

GROMOŠOVÁ, S. a kol. Assessment of the proliferation of human mesenchymal stromal cells in the presence of human demineralised bone matrix. *Biologia*. 2009, roč. 64, č. 6, s. 1247-1251. ISSN 0006-3088.

HOFFER, M. J. a kol. Clinical applications of demineralized bone matrix: a retrospective and case-matched study of seventy-five dogs. *Veterinary Surgery*. 2008, roč. 37, č. 7, s. 639-647. ISSN 0161-3499.

INNES, J. F. a MYINT, P. Demineralised bone matrix in veterinary orthopaedics: a review. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*. 2010, roč. 23, č. 6, s. 393-399. ISSN 0932-0814.

ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.

LUNDHOLT, B. K., SCUDDER, K. M. a PAGLIARO, L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *Journal of Biomolecular Screening*. 2003, roč. 8, č. 5, s. 566-570. ISSN 1087-0571.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965, roč. 150, č. 3698, s. 893-899. ISSN 0036-8075.

ZHANG, M., POWERS, R. M. a WOLFINBARGER, L. Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *Journal of Periodontology*. 1997, roč. 68, č. 11, s. 1085-1092. ISSN 0022-3492.

INTERAKCIE STRIEBORNÝCH KOMPLEXOV S BIOMOLEKULAMI A ICH BIOLOGICKÝ POTENCIÁL

Kollárová L., Sabolová D.
Katedra biochémie, Ústav chemických vied, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Moyzesova 11, 040 01 Košice

ABSTRAKT
Dva novosyntetizované komplexy striebra s 3-substituovanými derivátmi kyseliny pikolínovej, kyselinou 3-metylpikolínovou (Ag3-MePic) a kyselinou 3-hydroxypikolínovou (Ag3-OHPic) boli testované ako potenciálne terapeutické látky pri interakcii s teľacou týmusovou DNA (ctDNA) a ľudským sérovým albumínom (HSA). Výsledky preukázali, že pri interakcii medzi komplexmi a ctDNA dochádza k bimodálnemu spôsobu viazania (interkalácia kombinovaná s väzbou do žliabku) a pri ich väzbe s HSA sa uplatňujú hydrofóbne interakcie.

ÚVOD
Kyselina pikolínová a jej deriváty patria do skupiny neproteinogénnych aminokyselín. Tieto zlúčeniny vykazujú významný terapeutický potenciál, ktorý súvisí najmä s ich schopnosťou inhibovať bunkovú proliferáciu, indukovať zastavenie bunkového cyklu, aktivovať apoptotické procesy v nádorových bunkách a ovplyvňovať progresiu infekcie vírusom ľudskej imunodeficiencie (HIV) (Tanaka a kol., 2025). Interakcie malých molekúl s DNA predstavujú významnú oblasť výskumu, najmä vzhľadom na ich využitie pri vývoji protinádorových látok. Podľa spôsobu viazania možno tieto látky rozdeliť na interkalátory a molekuly viažuce sa do žliabkov DNA. Interkalácia môže viesť k štrukturálnym zmenám DNA a narušeniu jej biologických funkcií, zatiaľ čo väzba do žliabkov zachováva základnú štruktúru DNA, ale môže interferovať s interakciami DNA s proteínmi (Palchaudhuri a Hergenrother, 2007; Bhattachryya a kol., 2014). Štúdium väzby komplexov na ľudský sérový albumín (HSA) zároveň prispieva k lepšiemu pochopeniu mechanizmov, ktoré sú základom účinku liečiv, a tiež poukazuje na význam interakcií medzi albumínom a ligandmi pri vývoji účinnejších terapeutických látok (Bern a kol., 2015).

MATERIÁL A METODIKA
V experimente boli použité komplexy striebra s 3-substituovanými derivátmi kyseliny pikolínovej zosyntetizované na Katedre anorganickej chémie PF UPJŠ v Košiciach.
Fluorescenčné štúdium kompetitívneho viazania komplexov s etídium bromidom (EB) a Hoechstom 33258 (HO) (Sigma-Aldrich Chemicals) bolo uskutočnené s cieľom posúdiť ich schopnosť vytlačiť tieto fluorescenčné sondy z ctDNA. Komplex ctDNA-EB/HO bol pripravený zmiešaním ctDNA ($3{,}89 \times 10^{-5}$ M) s EB resp. HO (2,97 µM a 1,19 µM) v 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4). Emisné fluorescenčné spektrá s rastúcou koncentráciou zlúčenín ($0 – 2{,}6 \times 10^{-5}$ M) v systéme ctDNA-EB/HO boli zaznamenané pri excitačných vlnových dĺžkach 510 nm (EB) a 343 nm (HO). Emisné spektrá boli vyhodnotené pomocou Stern-Volmerovej rovnice:

$$\frac{F}{F_0} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}[Q]$$

kde F_0 a F sú fluorescenčné intenzity v neprítomnosti, resp. prítomnosti zhášača. K_{SV} označuje Stern-Volmerovu konštantu zhášania, $[Q]$ je koncentrácia zhášača, K_q je zhášacia konštanta biomolekuly a τ_0 je životnosť fluorofóru bez komplexu (10^{-8}) (Lakowicz a Weber, 1973).
Ďalšou metodikou bolo sledovanie zhášania fluorescencie HSA (19 µM). Pri nej bol pozorovaný pokles intenzity fluorescencie pre komplex Ag3-MePic ($0 – 2{,}64 \times 10^{-5}$ M) a pre

komplex Ag3-OHPic (0 – 1,40 × 10^{-5} M). Merania sa uskutočnili v PBS (10 mM; pH 7,4) pri troch rôznych teplotách (293,15; 303,15 a 310,15 K) pri excitačnej vlnovej dĺžke 280 nm. Väzbovej konštanta K_b a počet väzbových miest n boli určené pomocou modifikovanej Stern-Volmerovej závislosti log(($F_0 - F$)/F) od log[Q] ako priesečník a sklon priamky. Následne boli pomocou Van´t Hoffovej závislosti získané termodynamické parametre ako ΔH, ΔS a ΔG (zmena entalpie, entrópie a voľnej energie) (Ross a Subramanian, 1981).
Merania cirkulárneho dichroizmu (CD) ctDNA boli zaznamenávané v rozsahu 245–350 nm, kde do 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4) v kremennej kyvete bola pridaná fixná koncentrácia skúmaných komplexov Ag3-MePic a Ag3-OHPic (4,36 × 10^{-5} M) a postupne bola do roztoku titrovaná ctDNA (0 – 1,7 × 10^{-5} M).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Fluorescenčný vytláčací experiment s EB a HO bol použitý na stanovenie väzby skúmaných komplexov s ctDNA. Po pridaní komplexov došlo k výraznému poklesu fluorescencie HO, čo poukazuje na kompetíciu komplexov s HO viazaným v malom žliabku DNA. Pokles fluorescencie v systéme DNA–EB bol menej výrazný. Stern-Volmerova analýza poskytla vyššie hodnoty zhášacích konštánt (K_{SV}) pre HO v porovnaní s EB (***Tab. 1***). Výsledky preto naznačujú, že pri skúmaných komplexoch prevažuje väzba do žliabkov DNA nad interkaláciou, pričom môže dochádzať aj k bimodálnemu spôsobu väzby. Podobné výsledky získala Rendošová a kol. pri štúdiu iných komplexov striebra.

Komplex	K_{SV} [M^{-1}]	
	HOECHST	Etídium bromid
Ag3-MePic	7,03 × 10^4	2,74 × 10^4
Ag3-OHPic	9,13 × 10^4	2,63 × 10^4

Tab. 1: Hodnoty K_{SV} získané z kompetetívneho vytláčania HO a EB z ctDNA.

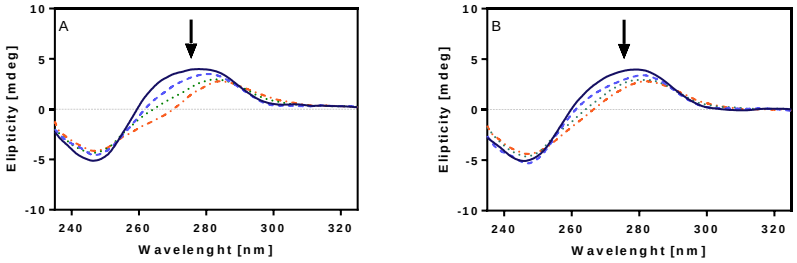
Na základe nameraných dát zhášania fluorescencie HSA s rastúcou koncentráciou skúmaných strieborných komplexov (Tab. 2***)*** pozorujeme klesajúci trend zhášacích konštánt so zvyšujúcou sa teplotou pre oba komplexy. Tento trend naznačuje, že zhášanie fluorescencie HSA s najväčšou pravdepodobnosťou prebieha statickým mechanizmom. Obdobné výsledky boli publikované pre komplexy Zn/Fe Guom a kol. (Guo a kol., 2022). Kladné hodnoty ΔH a ΔS naznačujú, že pri interakcii komplexov s HSA dochádza primárne k hydrofóbnej interakcii (Daryanavard a kol., 2020).

	T (K)	K_{sv}×10^3 (M^{-1})	K_b×10^3 (M^{-1})	n	K_q×10^{11} ($M^{-1}s^{-1}$)	ΔG (kJmol^{-1})	ΔH (kJmol^{-1})	ΔS (Jmol^{-1}K^{-1})
Ag3-MePicH	293.15	2.87	0.48	0.81	2.87	-14.89	88.79	353.68
	303.15	2.61	1.34	0.91	2.61	-18.43		
	310.15	2.37	3.66	1.04	2.37	-20.90		
Ag3-OHPicH	293.15	47.01	9.38	0.86	47.01	-21.83	55.60	264.14
	303.15	30.48	18.62	0.96	30.48	-24.47		
	310.15	27.99	25.70	0.99	27.99	-26.32		

Tab. 2: Väzbové a termodynamické parametre pre interakciu medzi komplexami striebra(I) a HSA pri troch rôznych teplotách.

CD spektroskopia bola použitá na hodnotenie štrukturálnych zmien DNA po interakcii s komplexmi. B-forma DNA vykazuje charakteristický pozitívny CD pás pri 278 nm, súvisiaci so stohovaním báz, a negatívny pás pri 246 nm, súvisiaci s helicitou polynukleotidu (Rendošová a kol., 2018). Po pridaní komplexov striebra(I) bolo pozorované zníženie elipticity pozitívneho pásu, výrazný posun jeho maxima k vyšším vlnovým dĺžkam a zvýšenie

elipticity negatívneho pásu. Tieto zmeny potvrdzujú interakciu komplexov s ctDNA prostredníctvom väzby do žliabkov sprevádzanej čiastočnou interkaláciou. Podobné správanie bolo opísané aj pri komplexoch striebra(I) Rendošovou a kol. a komplexoch medi(I) Shahabadim a kol. (Rendošová a kol., 2018; Shahabadi a kol., 2021).



Obr. 1. Zmena elipticity ctDNA (3,89 × 10^{-5} M, plná čierna čiara) s narastajúcou koncentráciou Ag3-MePic (A) a Ag3-OHPic (B) (8,7 × 10^{-7} M, modrá čiarkovaná čiara; 1,74 × 10^{-6} M, zelená bodkovaná čiara; 2,61 × 10^{-6}M, červená bodkočiarkovaná čiara).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/0347/23.

POUŽITÁ LITERATÚRA

TANAKA, M. a kol. Quinoline Quest: Kynurenic Acid Strategies for Next-Generation Therapeutics via Rational Drug Design. *Pharmaceuticals*. 2025, zv. 18, č. 5, s. 607.

PALCHAUDHURI, R. a P. J HERGENROTHER. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007, zv. 18, č. 6, s. 497–503.

BHATTACHARYYA, J. a kol. Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 2014, zv. 75, s. 45–51.

BERN, M. a kol. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2015, zv. 211, s. 144–162.

LAKOWICZ, J. R. a G. WEBER. Quenching of protein fluorescence by oxygen. Detection of structural fluctuations in proteins on the nanosecond time scale. *Biochemistry*. 1973, zv. 12, č. 21, s. 4171–4179.

ROSS, P. D. a S. SUBRAMANIAN. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*. 1981, zv. 20, č. 11, s. 3096–3102.

RENDOŠOVÁ, M. a kol. Silver pyridine-2-sulfonate complex - its characterization, DNA binding, topoisomerase I inhibition, antimicrobial and anticancer response. Journal of Inorganic *Biochemistry*. 2018, zv. 186, s. 206–216.

GUO, J.-L. a kol. Synthesis and Structure Elucidation of Two Essential Metal Complexes: In-Vitro Studies of Their BSA/HSA-Binding Properties, Docking Simulations, and Anticancer Activities. *Molecules*. 2022, zv. 27, č. 6, s. 1886.

DARYANAVARD, M. a kol. A new mononuclear zinc(II) complex: Crystal structure, DNA- and BSA-binding, and molecular modeling; in vitro cytotoxicity of the Zn(II) complex and its nanocomplex. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular *Spectroscopy*. 2020, zv. 233, s. 118175.

SHAHABADI, N. a kol. The role of both intercalation and groove binding at AT-rich DNA regions in the interaction process of a dinuclear Cu(I) complex probed by spectroscopic and simulation analysis. *Journal of Molecular Liquids*. 2021, zv. 335, s. 116290.

FAKTORY PROSTREDIA A ICH ÚLOHA PRI VÝSKYTE A DRUHOVOM ZLOŽENÍ RODU *EIMERIA* U BROJLEROVÝCH KURČIAT VO VEĽKOCHOVOCH.

Kováčová K.[1,2], Blahút S.[2], Syrota Y.[1], Hurníková Z.[1]
[1]*Parazitologický ústav SAV, v.v.i., Košice, Slovensko*
[2]*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovensko*

ABSTRAKT
Infekcie vyvolané jednobunkovými parazitmi rodu *Eimeria* predstavujú jeden z najzávažnejších problémov v intenzívnych chovoch hydiny. Naša práca predstavuje prvý, pilotný výskum zameraný na výskyt a druhové zloženie eimerií vo vybraných veľkochovoch hydiny na Slovensku a štúdium faktorov prostredia, ktoré ich ovplyvňujú. Vzorky čerstvého trusu sme odoberali v týždňových intervaloch, počas dvoch šesťtýždňových turnusov na každej farme. Vzorky boli následne v laboratóriu vyšetrené štandardnými kvalitatívnymi a kvantitatívnymi koprologickými metódami. Druhovú identifikáciu parazitov rodu *Eimeria* sme vykonali na základe kombinácie morfometrických analýz, hodnotenia lézií na črevách a konvenčnej PCR metódy. Naše výsledky potvrdili na študovaných farmách prítomnosť troch druhov: *Eimeria acervulina*, *E. tenella* a *E. maxima.* a zároveň poukázali na nevyhnutnosť kombinácie viacerých metód pre spoľahlivú diagnostiku druhov, ktoré infekciu na farmách vyvolávajú. Analýzy vplyvu vybraných environmentálnych faktorov prostredia na výskyt a intenzitu infekcie eimeriami odhalili nelineárne vzťahy medzi teplotou a vlhkosťou vzduchu a počtom oocýst. Hoci intenzita infekcie sa v priebehu šiestich týždňov počas turnusov menila, modelovaním nebol pozorovaný štatisticky podložený vzťah medzi OPG a teplotou podstielky, ani koncentráciou CO_2.. Získané výsledky naznačujú, že výskyt a intenzitu infekcie *Eimeria* spp. ovplyvňujú ešte ďalšie faktory, ktoré nemusia nevyhnutne súvisieť iba s podmienkami prostredia. Na ich identifikáciu zameriame náš nasledujúci výskum.

ÚVOD
Kokcidióza (eimerióza) patrí medzi najzávažnejšie parazitárne ochorenia vo veľkochovoch brojlerových kurčiat a spôsobuje chovateľom významné ekonomické straty. Rod *Eimeria* zahŕňa viacero druhov, ktoré sa vzájomne líšia miestom parazitácie v tenkom čreve, morfológiou oocýst a nárokmi na podmienky prostredia. Infikované kurčatá spolu s trusom vylučujú nevysporulované oocysty, ktoré sa stávajú infekčnými až po sporulácii vo vonkajšom prostredí. Proces sporulácie citlivo reaguje na klimatické podmienky prostredia. Teplota a vlhkosť prostredia patria medzi hlavné faktory ovplyvňujúce jej rýchlosť a úspešnosť. Cieľom nášho pilotného výskumu bolo stanoviť výskyt a druhové zloženie parazitov rodu *Eimeria* na dvoch študovaných farmách s intenzívnym chovom brojerových kurčiat a analyzovať vplyv vybraných faktorov prostredia na výskyt a intenzitu infekcie.

MATERIÁL A METODIKA
Zber vzoriek trusu prebiehal v období január až máj 2026 v dvoch komerčných intenzívnych chovoch brojlerových kurčiat na južnom Slovensku. Farmy označené ako Farma 1 a Farma 2 chovajú kurčatá výkrmového plemena Ross 308 s maximálnym zástavom 280-tisíc jedincov. Vzorky čerstvého trusu boli odoberané z oboch fariem počas dvoch turnusov v týždňových intervaloch, pričom každý turnus trval šesť týždňov. Zber trusu sa vykonával z troch rôznych miest chovných hál a priemerná vzorka trusu mala hmotnosť 100 g. Spolu s trusom sa zaznamenávali aj údaje o teplote a vlhkosti vzduchu, teplote podstielky a koncentrácii CO_2 v jednotlivých halách. Na vyšetrenie trusu boli použité flotačné metódy podľa Shattera a Mc Mastera. Intenzita infekcie bola stanovená ako počet oocýst v jednom grame trusu (OPG). Z pozitívnych vzoriek boli oocysty izolované podľa Bauer a kol. (2023) a Ekawasti a kol. (2019), sporulované modifikovanou metódou (Gong a kol., 2020). Morfometrické analýzy

vysporulovaných oocýst sme vykonali s použitím mikroskopu s imerzným objektívom pri 1000-násobnom zväčšení. Veľkostné parametre oocýst boli merané v programe ImageJ a hodnotené podľa Mares a kol. (2023), Blake a kol. (2021), Becker a kol. (1955).
Morfologické hodnotenie lézií na črevách uhynutých vtákov bolo vykonané štandardným skórovacím systémom podľa Johnsona a Reida (1970).
Pre extrakciu DNA sme použili vysporulované oocysty, ktorých steny sme pre zvýšenie výťažnosti DNA narušili modifikovaným postupom podľa Takano a kol. (2025). Na extrakciu sme použili komerčný kit (FavorPrep, Tissue Genomic DNA Extraction Mini Kit). Amplifikácia DNA bola vykonaná pomocou konvenčnej PCR s využitím druhovo-špecifických primerov navrhnutých autormi Blake a kol. (2021), Fornace a kol. (2013) a Haug a kol. (2007).
Prvotná štatistická vizualizácia vplyvu vybraných faktorov prostredia naznačila nelineárne vzťahy medzi teplotou vzduchu, vlhkosťou a intenzitou infekcie (OPG). Vzhľadom na zložitosť modelu vo vzťahu k dostupnej veľkosti vzorky neboli tieto premenné zahrnuté do ďalších analýz, nakoľko modelovanie ich nelineárnych účinkov si vyžaduje zaradenie ďalších parametrov, ktoré v tejto fáze výskumu ešte nemáme k dispozícii. Pre štatistické analýzy vplyvu koncentrácie CO2 a teploty podstielky na intenzitu infekcie (OPG) sme vzhľadom na špecifické vlastnosti dát použili nasledovný model: negatívny binomický zovšeobecnený lineárny zmiešaný model. Model bol fitovaný v bayesovskom rámci pomocou balíka R *brms* (v. 2.23.0). Použité boli predvolené priory balíka. Pred interpretáciou výsledkov sme na vylúčenie závažných problémov vykonali sériu diagnostických kontrol.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Infekcia eimeriami sa na študovaných farmách vyskytovala počas všetkých turnusov, s postupným nástupom od druhého týždňa od zástavu. Intenzita infekcie mala rastúci trend od týždňa 2, s priemernou hodnotou 218 OPG na Farme 1 a 480 OPG na Farme 2 a dosahovala maximum v týždni 4, s maximálnou hodnotou 99930 OPG na Farme 2. V nasledujúcich týždňoch 5 a 6 mala hodnota OPG postupne klesala na priemerné hodnoty 287 – 6020.
Na základe kombinácie mikroskopických znakov oocýst eimerií (tvar oocysty, typ steny, priemerná veľkosť (dĺžka x šírka oocysty), pomer dĺžky k šírke oocysty, dĺžka a šírka sporocysty, prítomnosť Stiedovovho telieska, zvyškového telieska, polárnych granúl a mikropyle) sme morfometrickými analýzami získanými meraním vysporulovaných oocýst vo vzorkách trusu hydiny zo študovaných fariem zistili prítomnosť troch najčastejšie sa vyskytujúcich druhov rodu *Eimeria*: *E. maxima, E. tenella* a *E. acervulina*, pričom prvý menovaný druh sme zaznamenali iba na Farme 2. Rovnaký výsledok priniesli molekulárne analýzy PCR metódou, ktoré potvrdili na Farme 1 prítomnosť druhov *E. tenella* a *E. acervulina* a na Farme 2 aj prítomnosť *E. maxima*. Hodnotenie morfometrie oocýst môže komplikovať nedostatočný proces sporulácie pri nedodržaní optimálnych podmienok, pri ktorých jednotlivé druhy eimerií sporulujú a ktoré sa medzi druhmi líšia (Edgar, 1955). Preto morfometria oocýst nemôže byť jediným nástrojom pri detekcii druhov, vyvolávajúcich infekciu na farme.
Morfologickým hodnotením zmien na črevách uhynutých vtákov sme detegovali patologické lézie, zodpovedajúce infekcii druhmi *E. maxima, E. tenella* a *E. bruneti*, avšak lézie typické pre infekciu *E. acervulina* sme vo vyšetrených vzorkách nepozorovali.
Tieto rozdiely poukazujú na problém pri použití tohto diagnostického prístupu pri druhovom rozlišovaní eimerií pri zmiešaných infekciách. Lézie sa pri takýchto typoch infekcií môžu navzájom prekrývať, čo významne komplikuje diagnostický proces. Navyše organizmus každého jedinca v kŕdli odpovedá na infekciu kokcídiami iným spôsobom, čo môže spôsobiť odlišné poškodenie čreva a ďalej komplikovať spoľahlivé určenie pôvodcu infekcie (Conway a McKenzie 2007). Rovnako sa neodporúča používanie tejto metódy ako jedinej diagnostickej

metódy na určenie závažnosti kokcidiózy vo veľkochove kurčiat, nakoľko makroskopické lézie nezodpovedajú mikroskopickému poškodeniu buniek čreva a môže dôjsť k podceneniu závažnosti infekcie v chove (Idris a kol. 1997). Štatistické analýzy vplyvu vybraných environmentálnych faktorov prostredia na výskyt a intenzitu infekcie eimeriami odhalili nelineárne vzťahy medzi teplotou a vlhkosťou vzduchu a počtom oocýst. Hoci intenzita infekcie sa v priebehu šiestich týždňov počas turnusov menila, modelovaním nebol pozorovaný štatisticky podložený vzťah medzi OPG a teplotou podstielky ani koncentráciou CO_2. Prezentované výsledky predstavujú prioritné, predbežné údaje, získané za prvý rok riešenia problematiky. Naše zistenia naznačujú, že výskyt a intenzitu infekcie *Eimeria* spp. ovplyvňujú ešte ďalšie faktory, ktoré nemusia nevyhnutne súvisieť iba s podmienkami prostredia. Na ich identifikáciu zameriame náš nasledujúci výskum.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná z prostriedkov projektu VEGA 2/0058/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BECKER, E. R., ZIMMERMANN, W. J., PATTILLO, W. A Biometrical Study of the Oocyst of Eimeria brunetti, a Parasite of the Common Fowl. *The Journal of Protozoology*. 1955, roč. 2, č. 4, s. 145-150. ISSN 0022-3921.

BLAKE, D. P. a kol. Genetic and biological characterisation of three cryptic Eimeria operational taxonomic units that infect chickens (Gallus gallus domesticus). *International Journal for Parasitology*. 2021, roč. 51, č. 8, s. 621-634. ISSN 0020-7519.

CONWAY, D. P., McKENZIE, M. E. Poultry Coccidiosis: Diagnostic and Testing Procedures. 3. vyd. Ames: Blackwell Publishing Professional, 2007. ISBN 978-0-8138-2202-0.

EDGAR, S. A. Effect of Temperature on the Sporulation of Oocysts of the Protozoan, Eimeria tenella. *Transactions of the American Microscopical Society*. 1954, roč. 73, č. 3, s. 237-242. ISSN 0003-0023.

FORNACE, K. M. a kol. Occurrence of Eimeria Species Parasites on Small-Scale Commercial Chicken Farms in Africa and Indication of Economic Profitability. *PLoS ONE*. 2013, roč. 8, č. 12, e84254. ISSN 1932-6203.

GONG, Z. a kol. Sporulation rate and viability of Eimeria tenella oocysts stored in potassium sorbate solution. *Parasitology Research*. 2021, roč. 120, č. 6, s. 2297-2301. ISSN 0932-0113.

HAUG, A., THEBO, P., MATTSSON, J. G. A simplified protocol for molecular identification of Eimeria species in field samples. *Veterinary Parasitology*. 2007, roč. 146, č. 1-2, s. 35-45. ISSN 0304-4017.

IDRIS, A. B. a kol. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially grown broilers examined for small intestinal Eimeria spp. coccidiosis. *Avian Diseases*. 1997, roč. 41, č. 2, s. 388-391. ISSN 0005-2086.

JOHNSON, J., REID, W. M. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitology*. 1970, roč. 28, č. 1, s. 30-36. ISSN 0014-4894.

LATIF, N. a kol. Improving the Sporulation of Eimeria tenella Oocysts Purified from Chicken Faeces. *Malaysian Applied Biology*. 2025, roč. 54, č. 1, s. 38-43. ISSN 2462-151X.

MARES, M. M. a kol. Morphological and Molecular Characterization of Eimeria spp. Infecting Domestic Poultry Gallus gallus in Riyadh City, Saudi Arabia. *Microorganisms*. 2023, roč. 11, č. 3, s. 795. ISSN 2076-2607.

TAKANO, A. a kol. An ultra-simplified protocol for PCR template preparation from both unsporulated and sporulated Eimeria oocysts. *Poultry Science*. 2025, roč. 104, č. 3, s. 104810. ISSN 0032-5791.

ÚLOHA HYPOXIE, ANGIOGENÉZY A MITOCHONDRIÁLNEJ REGULÁCIE V PATOLOGICKÝCH MODELOCH ENDOMETRIA

Kováčová G.[1], Tóthová I.[2], Artimovič P.[1], Mareková M.[1], Rabajdová M.[1]
[1]*Ústav lekárskej a klinickej biochémie, LF UPJŠ, Košice*
[2]*České centrum pre fenogenomiku (CCP), Ústav molekulárnej genetiky Akadémie vied Českej republiky, Praha*

ABSTRAKT
Endometrióza je chronické multifaktoriálne ochorenie, ktorého progresia závisí od schopnosti ektopických endometriálnych buniek adaptovať sa na hypoxické a metabolicky náročné mikroprostredie. Cieľom práce bolo charakterizovať a porovnať hypoxicko-angiogénne a mitochondriálne mechanizmy v endometriotickom, referenčnom epitelovom a nádorovom bunkovom modeli. Relatívna génová expresia vybraných markerov bola stanovená metódou real-time PCR. Endometriotická bunková línia 12Z vykazovala výraznú aktiváciu hypoxicko-angiogénnej osi charakterizovanú zvýšenou génovou expresiou *HIF1A, VEGFA, ANGPT1* a *ANGPT2* v porovnaní s HME1 a A2780. Výrazne zvýšený pomer génovej expresie *ANGPT2/ANGPT1* v 12Z naznačoval posun angiopoetínovej rovnováhy smerom k proangiogénnemu profilu. Analýza mitochondriálnych markerov odhalila zvýšenú génovú expresiu *MCU* a *POLRMT* v oboch patologických modeloch oproti HME1 bez významného rozdielu medzi 12Z a A2780. Génová expresia *PPARGC1A* naopak progresívne narastala od HME1 cez 12Z až po A2780. Získané výsledky poukazujú na odlišné molekulové profily analyzovaných patologických buniek. V 12Z dominuje hypoxicko-angiogénny profil sprevádzaný zmenami angiopoetínovej osi, zatiaľ čo A2780 vykazuje výraznejšiu expresiu *PPARGC1A*, súvisiacu s reguláciou mitochondriálnej biogenézy. Zvýšená génová expresia *MCU* a *POLRMT* v oboch patologických líniách zároveň naznačuje možné spoločné mechanizmy mitochondriálnej regulácie.

ÚVOD
Endometrióza je chronické gynekologické ochorenie charakterizované komplexnými zmenami mikroprostredia, v ktorom sa vzájomne prepájajú hypoxia, zápal, angiogenéza, oxidačný stres a metabolická adaptácia buniek (Zhang a kol., 2023; Dai a kol., 2024). Hypoxia prostredníctvom HIF-1α podporuje expresiu proangiogénnych faktorov vrátane VEGF a prispieva tak k vaskularizácii a prežívaniu endometriotických lézií (Bo a Wang, 2024; Dai a kol., 2024). Tiež sa ukazuje, že adaptácia endometriotických buniek na hypoxické a oxidačné podmienky je úzko prepojená so zmenami energetického metabolizmu a mitochondriálnej funkcie (Kobayashi a kol., 2023). Súčasné hodnotenie hypoxicko-angiogénnych a mitochondriálnych mechanizmov preto môže prispieť k lepšiemu pochopeniu molekulových rozdielov medzi referenčným, endometriotickým a nádorovým fenotypom.

MATERIÁL A METODIKA
V experimentálnej práci boli analyzované tri bunkové línie reprezentujúce rozdielne biologické fenotypy: HME1 ako referenčný epitelový model, 12Z ako model endometriózy a A2780 ako nádorový model. Relatívna génová expresia markerov hypoxicko-angiogénnej signalizácie (*HIF1A, VEGFA, ANGPT1, ANGPT2*) a mitochondriálnej regulácie (*MCU, POLRMT, PPARGC1A*) bola stanovená pomocou real-time PCR. Na charakterizáciu rovnováhy angiopoetínovej signalizácie bol hodnotený aj pomer expresie *ANGPT2/ANGPT1*. Štatistická významnosť rozdielov medzi bunkovými líniami bola hodnotená pomocou jednofaktorovej analýzy rozptylu (one-way ANOVA) s následným post hoc testovaním, pričom za štatisticky významné boli považované rozdiely pri $p < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Analýza génovej expresie odhalila výrazne odlišný hypoxicko-angiogénny profil medzi analyzovanými bunkovými modelmi. Najvýraznejšia aktivácia bola zaznamenaná v endometriotickej línii 12Z. Génová expresia *HIF1A* bola v 12Z signifikantne vyššia v porovnaní s HME1 aj A2780 ($p < 0,0001$), čo poukazuje na výraznú aktiváciu hypoxickej signalizácie. Dai a kol. (2024) poukazujú na HIF-1α ako kľúčový regulátor adaptačnej odpovede endometriálneho tkaniva na hypoxiu, ktorý sa podieľa na regulácii bunkového prežívania, angiogenézy a redoxnej homeostázy (Dai a kol., 2024). Podobne Tolu Cenk a kol. (2025) zaznamenali zvýšenú expresiu HIF-1α v endometriotických léziách, pričom aktivácia hypoxickej signalizácie súvisela s progresiou ochorenia a podporou angiogenézy (Tolu Cenk *a kol.*, 2025). Naše výsledky sú v súlade s uvedenými poznatkami, keďže bunková línia 12Z vykazovala spomedzi analyzovaných modelov najvyššiu expresiu génu *HIF1A*. Súčasne bola v 12Z zaznamenaná najvyššia expresia *VEGFA*, ktorá bola signifikantne zvýšená oproti HME1 ($p < 0,0001$) aj A2780 ($p = 0,0028$). Tento expresný profil podporuje predpoklad koordinovaného prepojenia hypoxickej odpovede s aktiváciou angiogenézy. Yu (2025) poukazuje na významnú úlohu VEGF v regulácii hypoxického a zápalového mikroprostredia endometriózy, kde podporuje vzájomné prepojenie hypoxie, zápalu a angiogenézy (Yu, 2025).

Výrazné rozdiely boli prítomné aj v angiopoetínovej signalizácii. Expresia *ANGPT1* aj *ANGPT2* bola najvyššia v 12Z, pričom osobitne výrazný rozdiel bol pozorovaný pri *ANGPT2*. Pomer *ANGPT2/ANGPT1* dosiahol v 12Z hodnotu 15,07, zatiaľ čo v HME1 predstavoval 0,62 a v A2780 iba 0,13 ($p < 0,0001$ medzi všetkými skupinami). Výrazne zvýšený pomer génovej expresie *ANGPT2/ANGPT1* v bunkovej línii 12Z poukazuje na posun angiopoetínovej rovnováhy smerom k profilu podporujúcemu vaskulárnu remodeláciu. ANGPT2 podporuje vaskulárnu remodeláciu a angiogenézu, najmä v podmienkach hypoxie a zápalu, zatiaľ čo ANGPT1 prispieva k stabilizácii ciev prostredníctvom signalizácie receptora Tie2. Zvýšený pomer *ANGPT2/ANGPT1* tak môže odrážať proangiogénne mikroprostredie charakteristické pre endometriotické lézie (Sabolová a kol., 2024; Sheeja MJ a kol., 2026).

Génová expresia *MCU* bola zvýšená v 12Z aj A2780 v porovnaní s HME1, pričom medzi patologickými modelmi nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel. Tento profil poukazuje na možné zapojenie regulácie mitochondriálneho Ca^{2+} v oboch patologických modeloch. Zvýšená expresia *MCU* v 12Z môže súvisieť s adaptačnými mechanizmami endometriotických buniek v podmienkach hypoxického, zápalového a metabolicky náročného mikroprostredia (Kalinová a kol., 2025). V nádorových modeloch je zvýšená aktivita MCU spájaná s mitochondriálnou bioenergetikou a invazívnym fenotypom buniek (Xiao a kol., 2024). Porovnateľná expresia *MCU* v 12Z a A2780 tak naznačuje zapojenie mitochondriálnej regulácie v oboch patologických fenotypoch, hoci jej biologický význam môže byť v endometriotických a nádorových bunkách odlišný.

Analogický profil bol pozorovaný pri *POLRMT*, ktorého expresia bola zvýšená v oboch patologických modeloch oproti referenčnému modelu. Spolu so zmenami expresie *MCU* tieto výsledky naznačujú zapojenie mitochondriálnych regulačných mechanizmov v oboch patologických fenotypoch. POLRMT pritom zohráva kľúčovú úlohu v transkripcii mitochondriálnej DNA a udržiavaní oxidačnej fosforylácie (Meng a kol., 2025; Wang a kol., 2025). V nádorových modeloch je zvýšená expresia *POLRMT* spájaná s podporou proliferácie a prežívania buniek, zatiaľ čo jej inhibícia vedie k narušeniu mitochondriálnej funkcie a zvýšeniu oxidačného stresu (Li a kol., 2023).

Naopak, *PPARGC1A* vykazoval jednoznačný progresívny nárast od HME1 ($0,586 \pm 0,191$) cez 12Z ($4,79 \pm 0,14$) až po A2780 ($26,26 \pm 1,23$), pričom rozdiely medzi všetkými skupinami boli signifikantné ($p < 0,0001$). Výrazne zvýšená expresia *PPARGC1A* v A2780 poukazuje na výraznejšiu aktiváciu transkripčného programu súvisiaceho s mitochondriálnou

biogenézou a energetickým metabolizmom, zatiaľ čo intermediárna expresia v 12Z môže odrážať adaptačnú odpoveď na metabolické nároky endometriotického mikroprostredia. Zvýšená expresia *PPARGC1A* sa spája s podporou mitochondriálnej biogenézy, energetického metabolizmu a adaptácie buniek na metabolický stres. V nádorových modeloch môže zvýšená aktivita PGC-1α prispievať k proliferácii a prežívaniu buniek (Akkuş a Lyakhovich, 2025). Tento efekt je sprostredkovaný aj prostredníctvom regulačnej osi PGC-1α/NRF1/TFAM, ktorá podporuje mitochondriálnu biogenézu a udržiavanie mtDNA, a tým prispieva k zachovaniu bioenergetickej kapacity buniek (Wang *a kol.*, 2026).

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektom APVV220357.

POUŽITÁ LITERATÚRA

AKKUŞ, E. a LYAKHOVICH, A. (2025) "Targeting the bioenergetics of a resistant tumor: clinical insights into OXPHOS inhibition for cancer therapy", *Redox Experimental Medicine*, 2025. Available at: https://doi.org/10.1530/REM-25-0003.

BO, C. a WANG, Y. (2024) "Angiogenesis signaling in endometriosis: Molecules, diagnosis and treatment (Review)", *Molecular Medicine Reports*, 29(3), s. 1–14. Available at: https://doi.org/10.3892/mmr.2024.13167.

DAI, W. *a kol.*. (2024) "Hypoxia and the endometrium: An indispensable role for HIF-1α as therapeutic strategies", *Redox Biology*, 73, s. 103205. Available at: https://doi.org/10.1016/j.redox.2024.103205.

KALINOVÁ, K. *a kol.*. (2025) "Targeting enhanced mitochondrial respiration chain activity as a potential therapeutic approach for endometriosis", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1871(6), s. 167885. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2025.167885.

KOBAYASHI, H. *a kol.*. (2023) "The role of mitochondrial dynamics in the pathophysiology of endometriosis", *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 49(12), s. 2783–2791. Available at: https://doi.org/10.1111/jog.15791.

LI, S. *a kol.*. (2023) "A first-in-class POLRMT specific inhibitor IMT1 suppresses endometrial carcinoma cell growth", *Cell Death & Disease*, 14(2), s. 152. Available at: https://doi.org/10.1038/s41419-023-05682-7.

MENG, X. *a kol.*. (2025) "Uncovering differential gene expression between mtRNA-positive and -negative osteosarcoma cells: implications beyond mitochondrial function", *Frontiers in Genetics*, 16. Available at: https://doi.org/10.3389/fgene.2025.1588581.

MJ, S. *a kol.*. (2026) "ANGPT2 as a Therapeutic Target in Endometriosis: Evolving Perspectives in Angiogenesis - ANGPT2, an Emerging Target in Endometriosis Therapy", *Biomedical Sciences and Clinical Medicine*, 65, s. 119–128. Available at: https://doi.org/10.12982/BSCM.2026.04.

SABOLOVÁ, G. *a kol.*. (2024) "The Pivotal Role of the Key Angiogenic Factors in the Development of Endometrioid Pathologies of the Uterus and Ovary", *Cancers*, 16(16), s. 2772. Available at: https://doi.org/10.3390/cancers16162772.

TOLU CENK, E. *a kol.*. (2025) "Hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in endometriosis: A retrospective observational case–control study of ovarian cyst capsules and endometrial tissue samples", *Journal of International Medical Research*, 53(10), s. 03000605251386208. Available at: https://doi.org/10.1177/03000605251386208.

WANG, J. *a kol.*. (2026) "Mitochondrial function meets oncology: the multifaceted role of TFAM across cancer types", *Apoptosis*, 31(3), s. 82. Available at: https://doi.org/10.1007/s10495-026-02305-2.

WANG, R. *a kol.*. (2025) "POLRMT enhances lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma cells by maintaining mitochondrial ATP production", *Life Sciences*, 379, s. 123876. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123876.

XIAO, H. *a kol.*. (2024) "Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) that Modulates Mitochondrial Calcium Uptake and Facilitates Endometrial Cancer Progression through Interaction with VDAC1", *Current Cancer Drug Targets*, 24(3), s. 354–367. Available at: https://doi.org/10.2174/1568009624666230912095526.

YU, W. (2025) "Mechanism of vascular endothelial growth factor regulating hypoxia and inflammatory microenvironment in endometriosis: based on bioinformatics and multi-level validation", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 774, s. 110639. Available at: https://doi.org/10.1016/j.abb.2025.110639.

ZHANG, M. *a kol.*. (2023) "Research advances in endometriosis-related signaling pathways: A review", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 164, s. 114909. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114909.

HODNOTENIE VASKULÁRNYCH ÚČINKOV JEDU HADA DRUHU *NAJA ARABICA* POMOCOU MODELU CHORIOALANTOICKEJ MEMBRÁNY KURACIEHO EMBRYA

Krúpa A.[1], Petrilla V.[1], Polláková M.[1], Petrovová E.[2], Sopková D.[1], Legáth J.[3,4]
[1] *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach*
[2] *Katedra morfologických disciplín, UVLF v Košiciach*
[3] *Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach*
[4] *Katedra biotechnológie a bioinformatiky, Fakulta chémie, Technická univerzita v Rzeszówe, Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, Poľsko*

ABSTRAKT
Cieľom práce bolo zhodnotiť vaskulárne účinky jedu hada druhu *Naja arabica* pomocou HET-CAM testu. Roztok hadieho jedu bol aplikovaný na chorioalantoickú membránu vtáčieho embrya v objemoch 2, 3 a 5 µl. Vzniknuté vaskulárne zmeny boli hodnotené podľa Luepkeho hodnotiaceho systému. Pri dávke 2 µl bolo zaznamenané kumulatívne skóre 7,25 čo zodpovedá miernemu iritačnému účinku. Dávky 3 a 5 µl dosiahli skóre 12,75 a 14,25 a boli klasifikované ako silne iritačné. Najviac zaznamenané účinky boli vzniknuté hemorágie a hemokoagulácie, zatiaľ čo v kontrolnej skupine neboli pozorované žiadne zmeny. Výsledky poukazujú na výrazný vaskulárny účinok jedu hada druhu *Naja arabica* na CAM, ktorý sa zvyšoval so stúpajúcou sa aplikovanou dávkou.

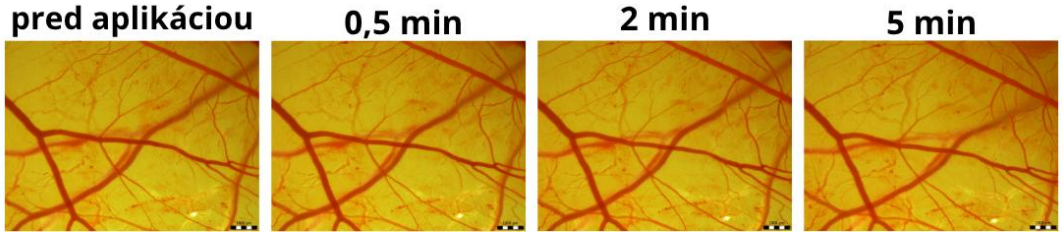
ÚVOD
Rod *Naja* zahŕňa jedovaté kobry z čeľade *Elapidae* vyskytujúce sa v rôznych oblastiach - v častiach Afriky, juhozápadnej, južnej a juhovýchodnej Ázie. Envenomácia spojená s hadím uhryznutím môže viesť k rozvoju rôznych klinických patologických príznakov, či už k lokálnym ale aj systémovým. Medzi lokálne patria najmä edém, bolesť, krvácanie a nekróza tkanív, zároveň však môže dôjsť k rozvinutiu zvýšenej vaskulárnej permeability a rozvoju zápalovej reakcie. Celkovo pri systémovom narušení môžeme pozorovať poruchy hemostázy spojené s trombocytopéniou, hypofibrinogenémiou a zmeny koagulačných faktorov (Al-Asmari, 2005).
Za účelom výskumu sme testovali jed medicínsky významného druhu *Naja arabica*, vyskytujúceho sa najmä na Arabskom polostrove (Moussa a kol., 2015). Na hodnotenie účinkov biologicky aktívnych látok na cievny systém je možné využiť HET-CAM test , ktorý je založený na sledovaní zmien chorioalantoickej membrány kuracieho embrya. Jej hustá sieť povrchovo uložených krvných ciev umožňuje priamo pozorovať vznik vaskulárnych zmien, napríklad hemorágie, hemokoagulácie či ďalších prejavov poškodenia ciev.

MATERIÁL A METODIKA
Na experiment boli použité fertilizované vajcia nosníc línie Lohmann Brown pochádzajúce z chovu v Párovských Hájoch pri Nitre. Vajcia boli inkubované pri teplote 37,5 °C a relatívnej vlhkosti 60 % v pravidelnom 3 hodinovom intervale otáčania. Za embryonálny deň 0 (ED0) sa považoval okamih začatia inkubácie.
Na tretí deň embryonálneho vývoja (ED3) bol v oblasti ostrého pólu vytvorený drobný otvor v škrupine, cez ktorý sa za aseptických podmienok odobralo približne 2 ml vaječného bielka. Po odbere bol otvor uzavretý parafínom a vajcia boli opätovne umiestnené do inkubátora.
Na ED9 sa odstránila časť škrupiny z tupého pólu vajca, čím sa umožnil prístup k chorioalantoickej membráne (CAM). Po odstránení *membrana papyracea* sa roztok hadieho jedu aplikoval na vaskularizovaný povrch CAM v objemoch 2, 3 a 5 µl. Do vajec zaradených v kontrolnej skupine bolo aplikované 5 µl *aqua pro injectione*. Zmeny na cievach CAM sa zaznamenávali v intervaloch 0,5; 2 a 5 minút. Intenzita reakcie bola stanovená pomocou Luepkeho skórovacieho systému (Lüpke, 1986).

HET-CAM test je založený na vizuálnom hodnotení bezprostrednej odpovede ciev chorioalantoickej membrány na kontakt s testovanou látkou. Posudzovaný je najmä vznik hyperémie, hemorágie a hemokoagulácie, pričom rozhodujúcim parametrom je čas, za ktorý sa jednotlivé reakcie po aplikácii objavia. Na základe ich nástupu sa následne vypočíta skóre vyjadrujúce iritačný potenciál skúšanej látky (Lüpke, 1986).

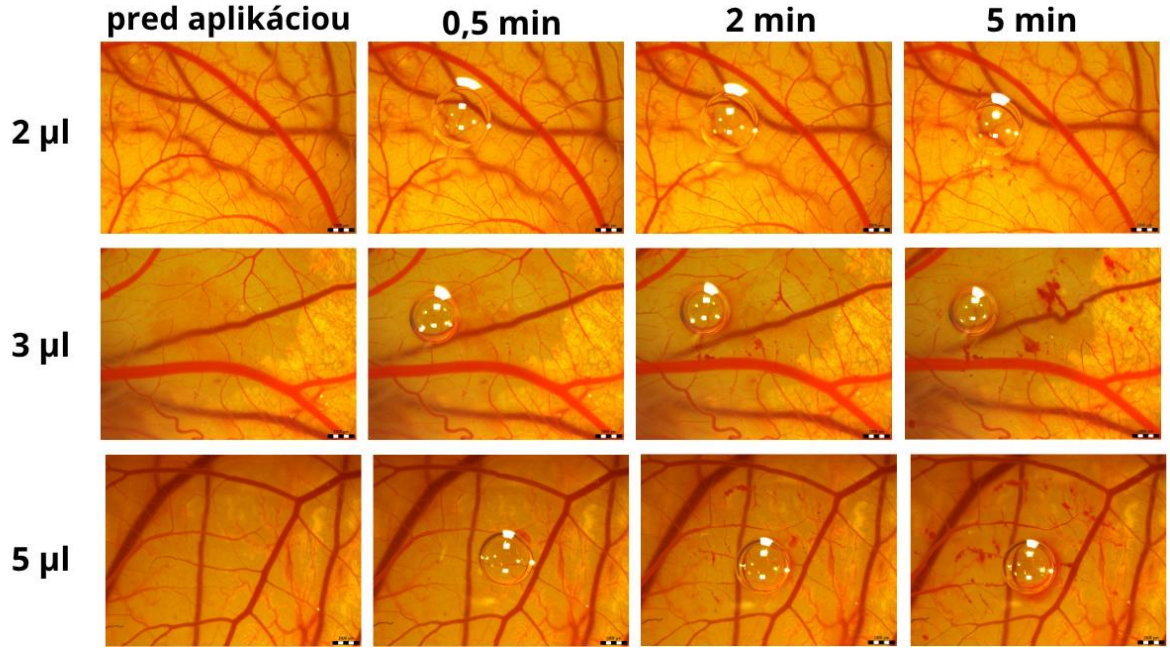
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Podľa Luepkeho systému bol stanovený iritačný potenciál na základe vzniku hyperémie, hemorágie a hemokoagulácie. Súčet bodov určil výslednú kategóriu iritačného potenciálu: <1 zanedbateľný, 1,0–4,9 slabý, 5,0–8,9 mierny a 9,0–21,0 silný (Lüpke, 1986).



Zdroj: Vlastný obrázok

Obr. 1. Výsledky HET-CAM testu kontrolnej skupiny



Zdroj: Vlastný obrázok

Obr. 2. Výsledky HET-CAM testu pre jednotlivé dávky jedu Naja arabica (koncentrácia 20 000 µg/ml)

V kontrolnej skupine neboli zaznamenané žiadne vaskulárne zmeny. Pri aplikácii 2 µl dosiahlo kumulatívne skóre hodnotu 7,25, čo zodpovedalo miernemu iritačnému účinku. Dávky 3 a 5 µl boli klasifikované ako silne iritačné so skóre 12,75 a 14,25. Celkové skóre bolo najviac ovplyvnené vznikom hemorágií a hemokoagulácií, pričom hyperémia bola v tomto prípade takmer zanedbateľná. Okrem spomínaných vaskulárnych zmien sme zaznamenali aj prítomnosť tzv. *Ghost vessels*. Ich výskyt sa využíva tak isto ako ukazovateľ poškodenia cievnej siete CAM (Donahue a kol., 2011).

Jed	Dávka [µL]	Hyperémia	Hemorágie	Hemokoagulácia	Kumulatívne skóre	Iritačný potenciál
Kontrola	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Naja arabica	**2**	**0,25**	**1,75**	**5,25**	**7,25**	**Mierny**
	3	**0,75**	**5**	**7**	**12,75**	**Silný**
	5	**0,75**	**6,5**	**7**	**14,25**	**Silný**

Zdroj: Vlastná tabuľka

Tab. 1. Hodnotenie iritačného potenciálu jednotlivých dávok roztoku hadieho jedu Naja arabica podľa Luepkeho hodnotiaceho systému

Nami sledované vaskulárne zmeny korešpondujú s doteraz publikovanými poznatkami o účinkoch kobrích jedov a ich schopnosti vyvolávať vaskulárne zmeny, ovplyvňovať integritu a hemostatické procesy (Kini a Koh, 2016)**.**

POĎAKOVANIE

Predkladaná práca bola realizovaná ako súčasť grantových úloh APVV-22-0101 a VEGA 1/0373/24 riešených na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

AL-ASMARI, A. K. 2005. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by *Naja haje arabica* venom. In: *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. Roč. 11, č. 1, s. 51–67. DOI: 10.1590/S1678-91992005000100007. Dostupné na: https://doi.org/10.1590/S1678-91992005000100007

DONAHUE, D. A. a kol.. 2011. Survey of ocular irritation predictive capacity using Chorioallantoic Membrane Vascular Assay (CAMVA) and Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) test historical data for 319 personal care products over fourteen years. In: *Toxicology in Vitro*. Roč. 25, č. 2, s. 563–572. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.12.003. Dostupné na: https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.12.003

KINI, R. M. a C. Y. KOH. 2016. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: definition and nomenclature of interaction sites. In: *Toxins*. Roč. 8, č. 10, čl. 284. DOI: 10.3390/toxins8100284. Dostupné na: https://doi.org/10.3390/toxins8100284

LÜPKE, N. P. 1986. The hen's egg test (HET) – an alternative toxicity test. In: *The British Journal of Dermatology*. Roč. 115, suppl. 31, s. 133–135. DOI: 10.1111/j.1365-2133.1986.tb02123.x. Dostupné na: https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1986.tb02123.x

MOUSSA, I. M. a kol.. 2015. Immunological properties of anti-*Naja haje arabica* (the Arabian cobra) snake venom antibodies prepared in chicken. In: *International Journal of Pharmacology*. Roč. 11, č. 8, s. 956–959. DOI: 10.3923/ijp.2015.956.959. Dostupné na: https://doi.org/10.3923/ijp.2015.956.959

NUTRIČNÉ STRATÉGIE ZNIŽOVANIA EMISIÍ SKLENÍKOVÝCH PLYNOV A KONTROLY ENDOPARAZITÓZ U MALÝCH PREŽÚVAVCOV

Leško M., Petrič D., Váradyová Z.
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, v.v.i., Košice

ABSTRAKT

V experimente sme sledovali vplyv suplementácie nanočastíc oxidu zinočnatého (ZnO-NPs) na stráviteľnosť sušiny (DMD), telesnú hmotnosť, parazitologický status, fermentáciu v bachore a emisie enterického oxidu uhličitého (CO_2) a metánu (CH_4) u jahniat infikovaných gastrointestinálnym parazitom *Haemonchus contortus*. Zvieratá boli rozdelené do štyroch skupín: dve kontrolné – jedna s pridanými ZnO-NPs (CON-ZnO-NP) a druhá bez nich (CON) – a dve experimentálne – jedna s pridanými ZnO-NPs (INF-ZnO-NP) a druhá bez nich (INF). Na začiatku boli experimentálne skupiny infikované perorálne približne 5 000 larvami *H. contortus.* Na druhý deň sa začali podávať ZnO-NPs po celú dobu trvania experimentu (39 dní). Počas posledných deviatich dní experimentu sa merali emisie CO_2 a CH_4 v respiračných komorách. Hodnota DMD v skupine jahniat INF bola o 6 % nižšia ako v skupine CON. Skupina INF-ZnO-NP mala o 8 % vyššiu hodnotu DMD ako skupina jahniat INF. Pri infikovaných skupinách jahniat bol zaznamenaný významný nárast hodnôt pH a amoniakálneho dusíka v bachore v porovnaní s neinfikovanými skupinami. Počas posledného týždňa experimentu došlo v skupine jahniat INF-ZnO-NP v porovnaní so skupinou INF k zníženiu počtu vajíčok v truse o 39,9–52,9 %. Podávanie ZnO-NPs zároveň znížilo emisie CO_2 o 12 % a emisie CH_4 o 20 % u infikovaných jahniat. Záverom, pridávanie ZnO-NPs do krmiva znížilo parazitárnu záťaž a emisie enterických plynov a zároveň zlepšilo stráviteľnosť sušiny, čo poukazuje na potenciál ich využitia ako funkčnej krmivovej prísady s viacerými pozitívnymi účinkami.

ÚVOD

Chov hospodárskych zvierat je významným zdrojom skleníkových plynov (GHG), najmä metánu (CH_4), ktorý vzniká počas fermentácie v bachore prežúvavcov. Produkcia CH_4 znižuje efektívnosť krmiva tým, že odoberá energiu z potravy, ktorá by slúžila na rast a produkciu zvierat. Gastrointestinálne nematódy (GIN) ovplyvňujú kľúčové faktory súvisiace s emisiami CH_4, vrátane efektívnosti krmiva, využitia živín, funkcie bachora a produktivity zvierat. *Haemonchus contortus* je najvýznamnejší GIN parazit malých prežúvavcov a často sa spája s multirezistenciou na antihelmintiká. Infekcia GIN mení mikrobióm v bachore a sleze, čím ovplyvňuje mikrobiálne spoločenstvá podieľajúce sa na trávení a metanogenéze (El-Ashram a kol., 2017). Naša predchádzajúca štúdia (Leško a kol., 2025) skúmala vplyv ZnO-NPs na rastové parametre, parazitologický stav, bachorovú fermentáciu a histopatológiu jahniat počas 107 dní na farme, ale len málo štúdií skúmalo vzťah medzi emisiami CH_4 a parazitologickým stavom jahniat infikovaných *H. contortus* a suplementovaných ZnO-NPs. ZnO-NPs by mohli nielen znížiť populáciu GIN u jahniat, ale aj enterické emisie GHG, moduláciou mikrobiálnej aktivity v bachore. Naším cieľom bolo preskúmať vplyv ZnO-NPs ako doplnku krmiva na bachorovú fermentáciu, emisie CO_2 a CH_4, hmotnosť jahniat a ich parazitologický status pri infekcii GIN parazitom *H. contortus*.

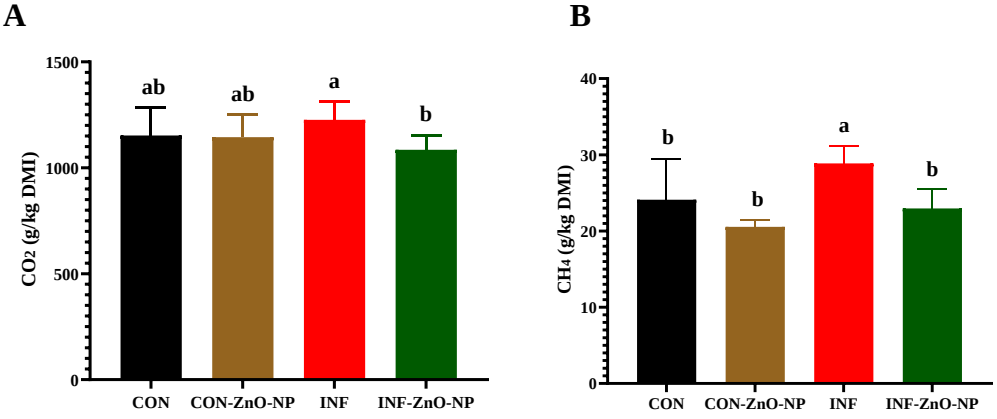
MATERIÁL A METODIKA

Pokus bol vykonaný v súlade s usmerneniami Helsinskej deklarácie a vnútroštátnymi právnymi predpismi SR (Zákon č. 377/2012; Zákon č. 39/2007) o starostlivosti o zvieratá. 24 jahniat plemena Wielkopolska bolo rozdelených do 4 skupín: kontrolná (CON), kontrolná suplementovaná zinkom (CON-ZnO-NP), GIN infikovaná skupina jahniat s približne 5 000 larvami *H. contortus* (INF) a infikovaná skupina suplementovaná zinkom (INF-ZnO-NP).

Jahňatá dostávali krmivo pozostávajúce z 2 kg trávnej siláže, 0,2 kg lúčneho sena a 0,5 kg koncentrátového krmiva denne. Zinkové skupiny boli suplementované ZnO-NPs (99 mg Zn/kg koncentrátového krmiva). Experiment trval 39 dní: 30 dní na adaptáciu a 9 dní na meranie koncentrácií CH_4 a CO_2 v respiračných komorách pomocou dvoch nedisperzných infračervených analyzátorov (SERVOMEX 4100; SERVOMEX Ltd., detektor 1210 Gfx). Bola odobraná bachorová tekutina na fermentačné a mikrobiálne analýzy. Sledované boli aj hodnoty prírastku hmotnosti, príjmu a stráviteľnosti sušiny. Kvantifikácia počtu vajíčok na gram trusu (EPG) sa vykonala pomocou modifikovanej McMasterovej metódy.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Stráviteľnosť sušiny bola v skupine jahniat INF o 6 % nižšia v porovnaní so skupinou CON a v skupine INF-ZnO-NP o 8 % vyššia v porovnaní so skupinou INF. Jahňatá v skupine ZnO-NP vykazovali nárast denných prírastkov hmotnosti ($P < 0,01$). Infekcia *H. contortus* všeobecne znižuje príjem sušiny u jahniat, denné prírastky a znižuje aj stráviteľnosť sušiny (Xiang a kol., 2022), čo je v súlade s našimi výsledkami. Prírastok na hmotnosti bol najnižší v skupinách INF a INF-ZnO-NP.V skupine jahniat INF bol zaznamenaný významný nárast hodnôt amoniakálneho dusíka (NH_3-N) a pokles koncentrácie mastných kyselín s krátkym reťazcom. Hodnoty propionátu v oboch infikovaných skupinách boli signifikantne nižšie a hodnoty butyrátu signifikantne vyššie v porovnaní s kontrolnými skupinami. Skupina INF-ZnO-NP mala o 12 % nižšie emisie CO_2 ako skupina INF (Obr. 1A). Emisie CH_4 boli v skupine INF o 21 % vyššie v porovnaní so skupinou CON, pričom skupina INF-ZnO-NP mala o 20 % nižšie emisie CH_4 ako skupina INF (Obr. 1B). Nárast produkcie CH_4 súvisí s infekciou *H. contortus* (Lima a kol., 2019), avšak infikované zvieratá vykazovali zvýšené emisie bez ohľadu na príjem sušiny. Od 18. dňa experimentu začali infikované skupiny produkovať vajíčka, pričom najvyššia hodnota EPG v skupine INF bola zaznamenaná na 33. deň a v skupine INF-ZnO-NP na 30. deň od infekcie. Skupina INF si udržala vysoké EPG až do posledného dňa, zatiaľ čo skupina INF-ZnO-NP vykazovala klesajúce EPG od 33. dňa. dňa do 39. dňa experimentu. Zníženie EPG dosiahlo v posledný deň 52,9 %. Doplnenie krmiva jahniat o nanočastice ZnO zlepšilo využitie živín a čiastočne zmiernilo nepriaznivé účinky infekcie *H. contortus*. ZnO-NPs zlepšili stráviteľnosť sušiny, znížili počet vajíčok v truse a znížili produkciu enterického CO_2 a CH_4 v komorách vyjadrenú ako ekvivalent na zviera a výťažok metánu na jednotku príjmu sušiny. Tieto zistenia naznačujú, že ZnO-NPs môžu slúžiť ako sľubná funkčná kŕmna prísada, ktorá kombinuje antihelmintickú aktivitu s environmentálnymi výhodami prostredníctvom zmierňovania produkcie metánu.



Obr. 1A, B. Vplyv suplementácie nanočasticami ZnO (ZnO-NPs) na enterické emisie oxidu uhličitého (A) a metánu (B) merané v respiračných komorách (priemer ± štandardná odchýlka, n = 6).
CON – kontrolná skupina jahniat, CON-ZnO-NP – kontrolná skupina jahniat suplementovaná ZnO-NPs, INF – skupina infikovaných jahniat, INF-ZnO-NP – skupina infikovaných jahniat suplementovaná ZnO-NPs.
[a] P < 0,05, [b] P < 0,01, [c] P < 0,001 rozdiely medzi skupinami jahniat.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom Slovenskej akadémie vied Doktogrant APP0770.

POUŽITÁ LITERATÚRA

EL-ASHRAM, S. a kol. Microbial community and ovine host response varies with early and late stages of *Haemonchus contortus* infection. *Veterinary Research Communication*. 2017, roč. 41, č. 4, s. 263-277. ISSN 1573-7446.

LEŠKO, M. a kol. Effect of zinc oxide nanoparticle supplementation on parasite infection and rumen environment of grazing lambs. *Frontiers in Veterinary Sciences*. 2025, roč. 12, s. 1684585. ISSN 2297-1769.

LIMA, P. M. T. a kol. Effects of *Acacia mearnsii* supplementation on nutrition, parasitological, blood parameters and methane emissions in Santa Inês sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*. 2019, roč. 207, s. 107777. ISSN 0014-4894.

XIANG, H. a kol. *Haemonchus contortus* infection alters gastrointestinal microbial community composition, protein digestion and amino acid allocations in lambs. *Frontiers in Microbiology*. 2022, roč. 12, s. 797746. ISSN 1664-302X.

HODNOTENIE KOGNITÍVNYCH FUNKCIÍ U PSOV PLEMIEN SEKCIE RETRÍVER POMOCOU BEHAVIORÁLNYCH TESTOV

Mezníková S., Konečný M., Kottferová J.
Katedra verejného veterinárskeho lekárstva a welfare zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Starnutie je prirodzený proces sprevádzaný postupnými zmenami kognitívnych schopností, ktoré môžu ovplyvňovať každodenné správanie a kvalitu života psov. Cieľom tejto štúdie bolo zhodnotiť vekové rozdiely vo vybraných kognitívnych funkciách u psov plemien sekcie retríver pomocou štandardizovanej batérie behaviorálnych testov. Do hodnotenia bolo zaradených 49 psov, rozdelených podľa veku na mladšie jedince (<8 rokov; n = 12) a staršie jedince (≥8 rokov; n = 37). Kognitívne schopnosti boli hodnotené pomocou Pointing testu, Food Searching testu a Problem-Solving testu, zameraných na rôzne aspekty pozornosti, priestorovej orientácie, krátkodobej pamäti a riešenia problémových úloh. Staršie psy dosiahli v porovnaní s mladšími signifikantne horšie výsledky v Pointing teste (*P = 0,010*) a Food Searching teste (*P = 0,033*), zatiaľ čo v Problem-Solving teste nebol rozdiel medzi vekovými skupinami štatisticky významný (*P = 0,120*). Celkový behaviorálny výkon sa zároveň zhoršoval so zvyšujúcim sa vekom jedincov. Exploratórne boli sledované aj možné súvislosti výsledkov s pohlavím, kastračným statusom a predchádzajúcim výcvikovým statusom psov; pričom vek sa ukázal ako dominantný faktor ovplyvňujúci kognitívny výkon testovaných psov. Výsledky poukazujú na vekovo podmienené rozdiely vo vybraných oblastiach kognitívnych funkcií u psov plemien sekcie retríver a podporujú využitie štandardizovaných behaviorálnych testov pri objektívnom hodnotení kognitívnych zmien súvisiacich so starnutím.

ÚVOD

Starnutie je prirodzený biologický proces sprevádzaný zmenami vo fyziologických, behaviorálnych a kognitívnych funkciách. Kognitívne starnutie môže ovplyvňovať pamäť, učenie, pozornosť, priestorovú orientáciu a exekutívne funkcie, pričom jeho priebeh je medzi jedincami variabilný (Landsberg a kol., 2012; Azkona a kol., 2009; Salvin a kol., 2011; Ruple a kol., 2022). Kognitívny pokles predstavuje kontinuum od fyziologických zmien spojených so starnutím až po patologický úpadok označovaný ako syndróm kognitívnej dysfunkcie psov (Canine Cognitive Dysfunction Syndrome, CCDS) (Osella a kol., 2007; Bellows a kol., 2015; Benzal a Rodríguez, 2016).

Hodnotenie miernych kognitívnych zmien je metodologicky náročné, keďže môžu byť majiteľmi považované za prirodzenú súčasť starnutia (Dewey a kol., 2019). Behaviorálne testy umožňujú objektívnejšie posúdiť vybrané oblasti kognitívneho výkonu v kontrolovaných podmienkach, pričom jednotlivé kognitívne domény nemusia byť starnutím ovplyvnené rovnakou mierou (Head, 2013; Ruple a kol., 2022). Cieľom tejto štúdie bolo posúdiť rozdiely vo vybraných kognitívnych schopnostiach medzi mladšími a staršími psami plemien sekcie retríver pomocou troch behaviorálnych testov.

MATERIÁL A METODIKA

Do štúdie boli zaradené psy plemien patriacich do sekcie retríver. U každého psa boli zaznamenané základné údaje vrátane veku, pohlavia, kastračného statusu a predchádzajúceho výcviku.

Kognitívny výkon bol hodnotený batériou troch behaviorálnych testov: Pointing Test, Food Searching Test a Problem-Solving Test, zameraných na rôzne aspekty kognitívneho výkonu vrátane pozornosti, priestorovej orientácie, pamäti a riešenia problémových úloh. Testovanie prebiehalo v experimentálnej miestnosti Pracoviska aplikovanej etológie a profesijnej etiky

UVLF v Košiciach za prítomnosti psa, majiteľa a experimentátora a bolo zaznamenávané kamerovým systémom. Pointing Test pozostával zo 6 opakovaní, Food Searching Test z 5 a Problem-Solving Test z 3 opakovaní. Celkové skóre bolo získané súčtom bodov jednotlivých opakovaní, pričom vyššie skóre predstavovalo horší výkon psa v danom teste.
Získané skóre boli následne štatisticky spracované v programe Python 3.12 (Python Software Foundation, Wilmington, DE, USA). Kontinuálne premenné boli vyjadrené ako medián a interkvartilové rozpätie (IQR), zatiaľ čo kategorické premenné boli prezentované ako početnosť a percentuálne zastúpenie. Psy boli podľa veku rozdelené na mladšie (<8 rokov) a staršie (≥8 rokov). Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené pomocou Mannovho-Whitneyho U-testu a veľkosť účinku bola vyjadrená rank-biseriálnou koreláciou. Za štatisticky významné boli považované hodnoty $P < 0,05$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

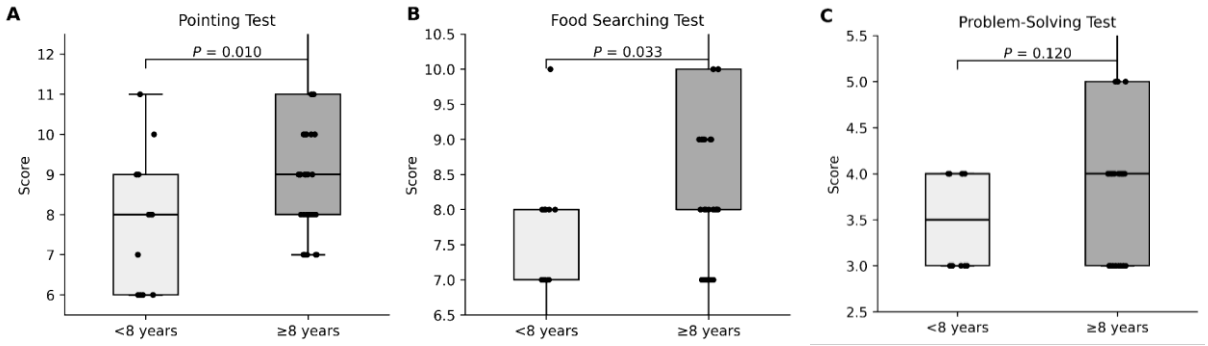
Do finálneho datasetu bolo zaradených 49 psov plemien sekcie retríver, z toho 22 samcov (44,9 %) a 27 samíc (55,1 %). Mladšia skupina (<8 rokov) zahŕňala 12 psov a staršia skupina (≥8 rokov) 37 psov; medián veku bol 4 roky (IQR 2,0–5,0) a 9 rokov (IQR 8,0–12,0).
Staršie psy dosiahli v Pointing teste vyššie skóre ako mladšie jedince (medián 9,0 vs. 8,0; $P = 0,010$; $r = 0,493$), čo vzhľadom na reverzné skórovanie predstavuje horší výkon staršej skupiny. Štatisticky významný rozdiel bol zistený aj vo Food Searching teste ($P = 0,033$; $r = 0,403$). V Problem-Solving teste boli takisto zaznamenané vyššie hodnoty skóre u starších psov, rozdiel však nedosiahol štatistickú významnosť (medián 4,0 vs. 3,5; $P = 0,120$; $r = 0,284$). Výsledky sú prehľadnejšie uvedené v Tab. 1 a na Obr. 1.

Premenná	Mladšie psy (n = 12) Median (IQR)	Staršie psy (n = 37) Median (IQR)	U	*P*	*r*
Pointing Test	8.0 (6.0–9.0)	9.0 (8.0–11.0)	112.5	**0.010**	0.493
Food Searching Test	8.0 (7.0–8.0)	8.0 (8.0–10.0)	132.5	**0.033**	0.403
Problem-Solving Test	3.5 (3.0–4.0)	4.0 (3.0–5.0)	159.0	0.120	0.284

Tab. 1. Vekové rozdiely vo výsledkoch behaviorálnych testov u mladších a starších psov plemien sekcie retríver.

Poznámka: Údaje sú uvedené ako medián (interkvartilové rozpätie, IQR). Porovnanie mladších (<8 rokov) a starších (≥8 rokov) psov bolo vykonané pomocou obojstranného Mannovho-Whitneyho U-testu. r = rank-biseriálna korelácia (veľkosť účinku). Štatisticky významné hodnoty P (P < 0,05) sú vyznačené tučným písmom.

Zhoršenie výkonu starších psov v Pointing a Food Searching teste je v súlade s poznatkami o kognitívnom starnutí, pri ktorom môžu byť ovplyvnené pozornosť, priestorová orientácia, pamäť a ďalšie kognitívne procesy (Studzinski a kol., 2006; Head, 2009; Head, 2013). Absencia štatisticky významného rozdielu v Problem-Solving teste môže súvisieť s rozdielnou citlivosťou jednotlivých úloh na vekovo podmienené zmeny. Relatívne úspešný výkon väčšiny psov mohol navyše obmedziť variabilitu výsledkov a schopnosť testu zachytiť jemnejšie rozdiely. Podobná variabilita medzi kognitívnymi doménami bola opísaná aj v predchádzajúcich štúdiách (Head, 2013; Ruple a kol., 2022).



Obr. 1. Vekové rozdiely vo výsledkoch behaviorálnych testov u mladších a starších psov plemien sekcie retríver znázornené graficky.

Poznámka: *Distribúcia celkového skóre v (A) Pointing teste, (B) Food Searching teste a (C) Problem-Solving teste. Vyššie skóre predstavuje horší behaviorálny výkon. Boxy znázorňujú interkvartilové rozpätie (IQR), horizontálna čiara vnútri každého boxu predstavuje medián, čiary siahajú po najextrémnejšie hodnoty v rozsahu 1,5 × IQR a krúžky predstavujú jednotlivé psy. Porovnanie skupín bolo vykonané pomocou obojstranného Mannovho-Whitneyho U-testu; príslušné hodnoty P sú uvedené nad jednotlivými porovnaniami.*

Celkovo výsledky podporujú existenciu vekovo podmienených zmien kognitívneho výkonu, ktoré však nemusia byť rovnomerne zachytiteľné jednotlivými behaviorálnymi úlohami. Behaviorálne testy preto predstavujú potenciálne objektívny doplnok hodnotenia kognitívneho starnutia, pričom ich využitie v klinickej praxi by malo byť súčasťou komplexného posúdenia kognitívneho stavu psa zahŕňajúceho aj informácie od majiteľa, dotazníkové hodnotenie a klinické vyšetrenie.

POĎAKOVANIE

Táto práca bola podporená projektami VEGA 1/0038/24 a KEGA 004UVLF-4/2025.

POUŽITÁ LITERATÚRA

AZKONA, G. a kol. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. *The Journal of Small Animal Practice.* 2009, roč. 50, č. 2, s. 87–91. DOI 10.1111/j.1748-5827.2008.00718.x.

BELLOWS, J. a kol. Defining healthy aging in older dogs and differentiating healthy aging from disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 2015, roč. 246, s. 77–89. DOI 10.2460/javma.246.1.77.

BENZAL, A. S. a kol. Recent developments in Canine Cognitive Dysfunction Syndrome. *Pet Behaviour Science.* 2016, č. 1, s. 47–59. DOI 10.21071/pbs.v0i1.3996.

DEWEY, C. W. a kol. Canine Cognitive Dysfunction: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 2019, roč. 49, č. 3, s. 477–499. DOI 10.1016/j.cvsm.2019.01.013.

HEAD, E. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease.* 2013, roč. 1832, č. 9, s. 1384–1389. DOI 10.1016/j.bbadis.2013.03.016.

HEAD, E. Oxidative Damage and Cognitive Dysfunction: Antioxidant Treatments to Promote Healthy Brain Aging. *Neurochemical Research.* 2009, roč. 34, č. 4, s. 670–678. DOI 10.1007/s11064-008-9808-4.

LANDSBERG, G. M. a kol. Cognitive Dysfunction Syndrome: A Disease of Canine and Feline Brain Aging. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 2012, roč. 42, č. 4, s. 749–768. DOI 10.1016/j.cvsm.2012.04.003.

OSELLA, M. C. a kol. Canine cognitive dysfunction syndrome: Prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. *Applied Animal Behaviour Science.* 2007, roč. 105, č. 4, s. 297–310. DOI 10.1016/j.applanim.2006.11.007.

RUPLE, A. a kol. Dog models of aging. *Annual Review of Animal Biosciences.* 2022, roč. 10, s. 419–439.

SALVIN, H. E. a kol. The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): A data-driven and ecologically relevant assessment tool. *The Veterinary Journal.* 2011, roč. 188, č. 3, s. 331–336. DOI 10.1016/j.tvjl.2010.05.014.

STUDZINSKI, C. M. a kol. The canine model of human cognitive aging and dementia: Pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry.* 2006, roč. 29, č. 3, s. 489–498. DOI 10.1016/j.pnpbp.2004.12.014.

HISTIDÍNOM MODIFIKOVANÝ UIO-66(ZR)-NH_2 AKO NOSIČ PRE KOMBINOVANÚ CHEMO-FOTODYNAMICKÚ TERAPIU 5-FLUOROURACILOM A METYLÉNOVOU MODROU

Migasová A.[1], Tomková S.[2], Zelenka T.[3], Zelenková G.[3] Huntošová V.[2], Almáši M.[1]
[1] *Katedra anorganickej chémie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice*
[2] *Centrum interdisciplinárnych biovied, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach , Košice*
[3] *Katedra chémie, Ostravská univerzita, Ostrava*

ABSTRAKT
V reakcii na častý výskyt liekovej rezistencie pri liečbe rakoviny sa čoraz väčšia pozornosť venuje multimodálnym nosičom schopným súčasne transportovať viacero terapeutických látok.
V rámci nášho výskumu sme sa zamerali na prípravu systému s dvojitým dodávaním liečiv, konkrétne chemoterapeutickej látky 5-fluorouracilu (5FU) a fotosenzibilizátora metylénovej modrej (MB) využívaného vo fotodynamickej terapii. Cieľom tohto navrhnutého nosiča je zvýšiť stabilitu a biologickú dostupnosť oboch terapeutických látok, zabezpečiť ich riadené uvoľňovanie a vytvoriť platformu pre kombinovanú chemo-fotodynamickú terapiu využívajúcu synergický účinok 5FU a MB. Obe tieto látky boli uzavreté do pórovitej štruktúry histidínom-funkcionalizovaného materiálu UiO-66(Zr)-NH_2 za vzniku zlúčenín His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB a His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB/5FU. Pripravené vzorky boli charakterizované infračervenou spektroskopiou pre potvrdenie úspešnosti syntéz, termogravimetrickou analýzou a na štúdium textúrnych vlastností bola využitá metóda adsorpcie/desorpcie didusíka. Následne bola študovaná schopnosť materiálov postupného uvoľňovania terapeutík do roztokov simulujúc prostredie nádorových buniek (*pH* = 5,5) a intravenózne prostredie (*pH* = 7,4). Biokompatibilita pripravených systémov bola študovaná pomocou modelu chorioalantoickej membrány (CAM) prepeličích embryí a konfokálnou fluorescenčnou mikroskopiou bola sledovaná ich internalizácia v bunkách línie SKBR3.

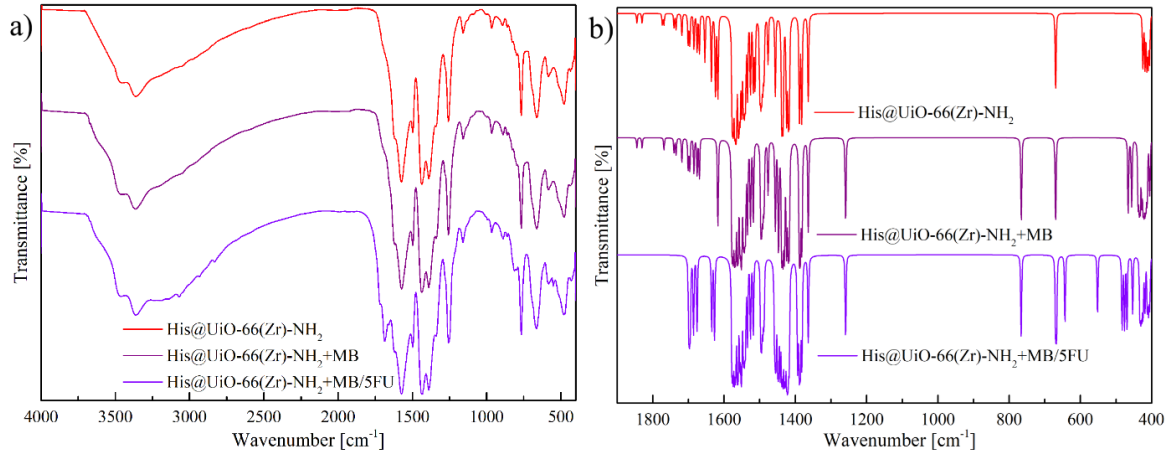
ÚVOD
Fotodynamická terapia (PDT) predstavuje perspektívny prístup v liečbe rakoviny, avšak jej účinnosť je limitovaná nízkou akumuláciou fotosenzibilizátora v nádore a náročnou koordináciou s ďalšími terapiami. Perspektívnym riešením je kombinácia chemoterapie a PDT s cieľom prekonať rezistenciu nádorových buniek, ale vyžaduje sa presná kontrola transportu a uvoľňovania liečiv. (Damodaran a kol., 2025)
Na tento účel sú vhodné nanočastice na báze UiO-66(Zr), ktoré sa vyznačujú vysokou stabilitou, veľkou povrchovou plochou, možnosťou povrchovej funkcionalizácie a umožňujú *pH*-responzívne uvoľňovanie liečiv. (Timofeev a kol., 2023)
Ako terapeutiká boli vybrané známe látky, konkrétne metylénová modrá, ktorá predstavuje klinicky schválený fotosenzibilizátor pre PDT, a 5-fluorouracil patriaci medzi najčastejšie používané chemoterapeutiká, avšak jeho účinnosť je limitovaná vznikom rezistencie a degradáciou v biologickom prostredí (Samoylova a kol., 2023; Zhong a kol., 2025).
V našom predchádzajúcom výskume boli nanočastice UiO-66(Zr)-NH_2 modifikované histidínom s cieľom dosiahnuť *pH*-responzívne uvoľňovanie 5FU prostredníctvom reverzibilnej protonácie imidazolového reťazca (Migasová a kol., 2025). Na základe týchto výsledkov sa v súčasnej práci skúma ich využitie ako nosiča pre kombinovanú chemo-fotodynamickú terapiu.

MATERIÁL A METODIKA
Materiál His@UiO-66(Zr)-NH_2 bol pripravený post-syntetickou povrchovou modifikáciou voľných amínových skupín z UiO-66(Zr)-NH_2 molekulami histidínu (His) podľa publikovaného postupu. (Migasová a kol., 2025) Do jeho pórovitej štruktúry boli

impregnáciou uzavreté molekuly metylénovej modrej a 5-fluorouracilu za vzniku His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB a His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB/5FU s výslednými koncentráciami 5 mg MB na 1 g materiálu a 100 mg 5FU na 1 g materiálu.
Pripravené vzorky boli charakterizované infračervenou spektroskopiou, termogravimetrickou analýzou a adsorpciou/desorpciou dusíka. Uvoľňovanie terapeutík sa sledovalo pri 37 °C v prostrediach s *pH* = 5,5 a *pH* = 7,4 pomocou UV-Vis spektrofotometrie. Biokompatibilita bola hodnotená na modeli chorioalantoickej membrány (CAM) prepeličích embryí a intracelulárna distribúcia pomocou konfokálnej fluorescenčnej mikroskopie.

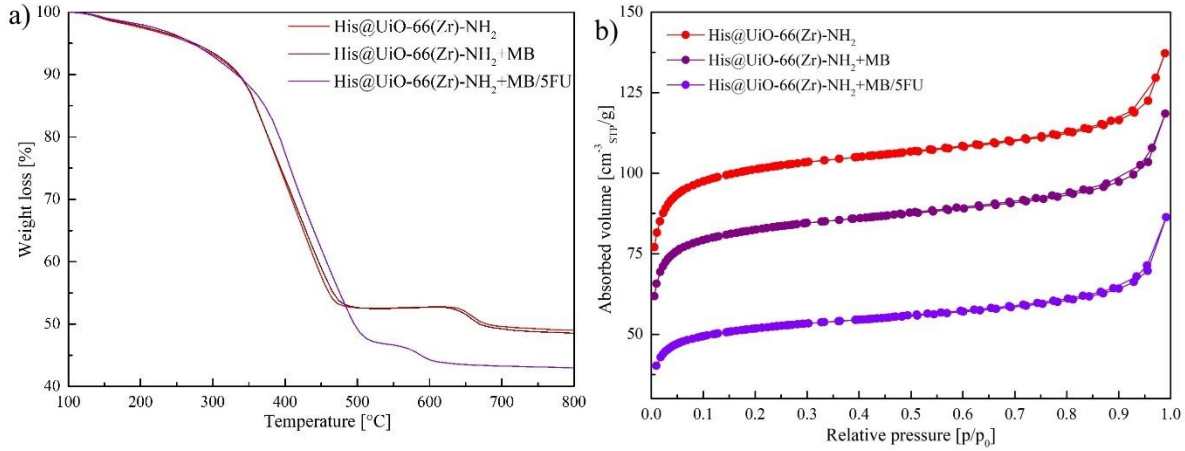
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Prvou metódou použitou na charakterizáciu pripravených zlúčenín bola infračervená spektroskopia. Namerané infračervené spektrá zobrazené na obrázku 1a spolu so spektrami s lepším oddelením jednotlivých absorpčných pásov (obr. 1b), potvrdili úspešnú funkcionalizáciu materiálu histidínom aj následné začlenenie metylénovej modrej a 5-fluorouracilu do štruktúry nosiča. Táto skutočnosť sa prejavila zmenami intenzít a prekrytím charakteristických absorpčných pásov jednotlivých zložiek.



Obr. 1. Infračervené spektrá pripravených zlúčenín.

Výsledky termogravimetrickej analýzy (obr. 2a) ukázali viacstupňové úbytky hmotnosti všetkých vzoriek v teplotnom rozsahu 100-700 °C, kedy došlo k prekrývajúcemu sa tepelnému rozkladu organických zložiek materiálu a uzavretých terapeutík. Termogravimetrické krivky zároveň potvrdili zachovanie vysokej tepelnej stability pripravených materiálov, pričom zvýšené hmotnostné straty nepriamo potvrdili prítomnosť metylénovej modrej a 5-fluorouracilu v štruktúre nosiča.



Obr. 2. Termogravimetrické krivky(a) a adsorpčno/desorpčné izotermy(b) pripravených zlúčenín.

Adsorpčno/desorpčné izotermy zobrazené na obrázku 2b ukázali postupné znižovanie dostupnosti pórov po uzavretí molekúl metylénovej modrej a 5-fluorouracilu do štruktúry materiálu. Veľkosť povrchu materiálu His@UiO-66(Zr)-NH_2 bola stanovená na 394 m^2/g a objem pórov 0,203 cm^3/g. Po uzavretí MB sa absorpcia N_2 znížila v celom rozsahu relatívneho tlaku, sprevádzaná znížením veľkosti povrchu na 322 m^2/g a objemu pórov na 0,174 cm^3/g. Po dvojitom naplnení sa prístupná povrchová plocha zmenšila na 200 m^2/g, zatiaľ čo objem pórov sa znížil na 0,125 cm^3/g.

V rámci štúdia vlastností bola pozornosť venovaná na schopnosť uvoľňovania terapeutík. Maximálne uvoľnené množstvo MB po 24 h pre materiál His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB v prostredí simulujúcom nádorové bunky (*pH* = 5,5) bolo 36 % a v prostredí simulujúcom intravenózne prostredie (*pH* = 7,4) to bolo 30 %. Z materiálu His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB/5FU sa v prostredí s *pH* = 5,5 uvoľnilo 45 % MB a 41 % 5FU. V prostredí s *pH* = 7,4 bola dosiahnutá hodnota 33 % pre MB a 46 % pre 5FU. Na základe týchto výsledkov bola preukázaná schopnosť materiálov riadeného uvoľňovania terapeutík v rámci *pH*-responzívneho správania vhodného pre nádorové tkanivá. Rozdiely v uvoľňovaní MB a 5FU súvisia s odlišnými fyzikálno-chemickými vlastnosťami oboch molekúl a ich interakciami s nosičom.

Na zabezpečenie bezpečnej aplikácie systémov bola študovaná ich biokompatibilita na CAM modeli embrya prepelice a nebola pozorovaná akútna toxicita ani negatívny vplyv na vaskularizáciu membrány.

Zároveň pomocou konfokálnej fluorescenčnej mikroskopie bolo preukázané, že 15 minút po aplikácii sa nosiče nachádzali prevažne v extracelulárnom priestore, zatiaľ čo po 24 hodinách došlo k ich efektívnej internalizácii do buniek a následnému intracelulárnemu uvoľneniu metylénovej modrej, pričom bolo taktiež pozorované, že kombinovaná chemo-fotodynamická liečba synergicky znížila proliferáciu buniek rakoviny prsníka.

Získané výsledky potvrdili úspešnú prípravu histidínom modifikovaného nosiča schopného súčasného uzavretia metylénovej modrej a 5-fluorouracilu do pórovitej štruktúry. Pripravený systém vykazoval *pH*-responzívne uvoľňovanie terapeutík, zachoval si priaznivé biologické vlastnosti a efektívne prenikal do nádorových buniek. Tieto vlastnosti predurčujú pripravený materiál His@UiO-66(Zr)-NH_2+MB/5FU ako perspektívnu platformu pre kombinovanú chemo-fotodynamickú terapiu.

POĎAKOVANIE

Výskum bol financovaný cez program EÚ NextGenerationEU prostredníctvom Plánu obnovy a odolnosti pre Slovensko v rámci projektu č. 09I03-03-V04-00007.

POUŽITÁ LITERATÚRA

DAMODARAN, C. a kol. Therapeutic resistance and combination therapy for cancer: recent developments and future directions. *Scientific Reports*. 2025, roč. 15, č. 1. ISSN 2045-2322.

MIGASOVÁ, A. a kol. Histidine-modified UiO-66(Zr) nanoparticles as an effective *pH*-responsive carrier for 5-fluorouracil drug delivery system: A possible pathway to more effective brain cancer treatments. *Chemical Engineering Journal*. 2025, roč. 522. ISSN 1385-8947.

SAMOYLOVA, N. a kol. Methylene Blue Induces Antioxidant Defense and Reparation of Mitochondrial DNA in a Nrf2-Dependent Manner during Cisplatin-Induced Renal Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 7. ISSN 1422-0067.

TIMOFEEV, K. L. a kol. NH_2-Modified UiO-66: Structural Characteristics and Functional Properties. *Molecules*. 2023, roč. 28, č. 9. ISSN 1420-3049.

ZHONG, C. a kol. Chemoresistance mechanisms to 5-Fluorouracil and reversal strategies in lung and breast cancer. *Scientific Reports*. 2025, roč. 15, č. 1. ISSN 2045-2322.

SLEDOVANIE DYNAMIKY ZMIEN V BIELKOVINOVOM PROFILE KRVNÉHO SÉRA A VYBRANÝCH ZÁPALOVÝCH PARAMETROV POČAS TERAPIE HNAČKY TELIAT

Oršuľaková V., Ješík. J. , Tóthová C.
Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Hnačkové ochorenia predstavujú významný zdravotný problém v chovoch mladého hovädzieho dobytka a sú sprevádzané početnými metabolickými poruchami, ktoré následne ovplyvňujú aj zastúpenie bielkovín krvného séra. Cieľom našej práce bolo sledovať dynamiku zmien v bielkovinovom profile krvného séra a koncentrácie fibrinogénu u teliat trpiacich hnačkovým ochorením. Do sledovania bolo zaradených 7 teliat, u ktorých boli počas terapie opakovane odoberané vzorky krvi vo vopred stanovených intervaloch. V krvnom sére bola stanovená koncentrácia celkových bielkovín a jednotlivých frakcií pomocou elektroforézy na agarózovom gély. V krvnej plazme bola stanovená koncentrácia fibrinogénu. Počas sledovania bol zaznamenaný štatisticky významný nárast relatívneho zastúpenia albumínu ($p<0,05$) a pomeru A/G ($p<0,01$), zatiaľ čo zastúpenie α_1- globulínov malo opačný charakter ($p<0,001$).Výraznú dynamiku vykazovala aj koncentrácia fibrinogénu, ktorá počas sledovania klesala ($p<0,001$). Získané výsledky poukazujú na dynamiku bielkovín krvného séra a fibrinogénu počas terapie hnačky teliat a zároveň vzniknutý trend zmien vo výsledkoch môže súvisieť s ústupom zápalovej odpovede organizmu liečených zvierat.

ÚVOD

Neonatálne hnačky teliat predstavujú jeden z najvýznamnejších zdravotných problémov v chovoch hovädzieho dobytka na celom svete (Vega a kol., 2020). Pretrvávajúca hnačka u teliat vedie k rozvoju systémových metabolických porúch. Postihnuté teľatá trpia dehydratáciou, poruchou elektrolytovej rovnováhy a metabolickou acidózou (Caffarena a kol. 2021). Súčasťou týchto zmien môže byť aj alterácia metabolizmu bielkovín krvného séra. V minuloročnom sledovaní sme hodnotili rozdiely v bielkovinovom profile krvného séra medzi teľatami s hnačkovým syndrómom a klinicky zdravými teľatami. Napriek tomu, že výsledky spomenutého sledovania neboli štatisticky významné, u hnačkujúcich teliat bola pozorovaná tendencia k nižšiemu zastúpeniu albumínovej frakcie a naopak k vyššiemu zastúpeniu α a γ globulínovej frakcie. Podobný trend bol zaznamenaný aj pri koncentrácií fibrinogénu, ktorý dosahoval vyššie hodnoty u teliat s hnačkou. Výsledky zároveň poukázali na potrebu zatriedenia teliat do jednotlivých vekových skupín z dôvodu veľkej variability výsledkov v zmenách zastúpení bielkovín krvného séra, ovplyvnených intenzívnym rastom zvierat. Cieľom našej štúdie bolo sledovanie dynamiky zmien v bielkovinovom profile krvného séra a vybraných zápalových parametrov u teliat s hnačkovým syndrómom počas terapie a posúdenie ich zmien v súvislosti s priebehom ochorenia.

METODIKA

Do sledovania boli zaradené teľatá s klinicky diagnostikovaným hnačkovým syndrómom v počte 7 kusov, s priemerným vekom dva týždne. Pri prvotnej obhliadke teliat postihnutých hnačkou bolo vykonané základné klinické vyšetrenie, zahrňujúce zhodnotenie celkového zdravotného stavu (zmeranie telesnej teploty, auskultačné vyšetrenie srdca a pľúc, palpačné vyšetrenie abdomenu a uzlín), neskôr doplnené o ďalšie diagnostické metódy. Intenzita hnačky teliat sa hodnotila stupnicou od 0 po 3, pričom 0 = teľa bez prítomnosti hnačky, 3 = prítomnosť silnej vodnatej hnačky.

Počas sledovania boli u jednotlivých zvierat opakovane odoberané vzorky krvi s cieľom zachytiť časový priebeh zmien v bielkovinovom profile krvného séra a vybraných zápalových parametrov. Krv bola získavaná priamou punkciou *vena jugularis* do dvoch typov

odberových skúmaviek. Prvá skúmavka obsahovala separačný gél a urýchľovač zrážania na získanie krvného séra. Druhá skúmavka bola určená na odber nezrážanlivej krvi a obsahovala 3,8% citrát sodný, na získanie krvnej plazmy. Krvné vzorky boli odoberané pri prijatí pacienta na kliniku prežúvavcov pred žačatím liečby, následne na 3. a 7. deň po začatí terapie. Ďalšie odbery boli realizované na 10., 17. 21. deň po začatí terapie. V krvnom sére boli hodnotené koncentrácie celkových bielkovín (CB, g/l) a jednotlivé bielkovinové frakcie. V krvnej plazme boli stanovené koncentrácie fibrinogénu (Fib, g/l).
Koncentrácia celkových bielkovín (CB, g/l) bola stanovovaná Biuretovou metódou na automatizovanom biochemickom analyzátore RX Monaco (Randox, Spojené kráľovstvo) s použitím komerčných diagnostických súprav (Randox, Spojené kráľovstvo). Jednotlivé frakcie sérových bielkovín boli rozdelené na základe zónovej elektroforézy na agarózovom gély, pomocou automatizovaného elektroforetického systému Hydrasis (Sebia Corporate, Francúzsko), podľa postupu určeného výrobcom. Elektroforetické gély boli skenované pomocou denzitometrického skenovacieho systému Epson Perfection V 700 (Epson America Inc, California, USA). Vizualizácia elektroforetických gélov, identifikácia proteínových frakcií bola vykonaná pomocou počítačového softvéru Phoresis, verzia 5.50 (Sebia Corporate, Francúzsko). Stanovenie koncentrácií fibrinogénu bolo vykonené na poloautomatickom stvorkanálovom koagulometri Behnk CL-4 (Behnk Elektronik GmbH & Co., Nemecko) s využitím komerčných diagnostických testov (Diagon Kft, Maďarsko) metódou založenou na princípe elektromagnetickej detekcie tvorby koagula.
Na štatistickú analýzu získaných výsledkov sme využili ANOVA test pre opakované merania s Tukeyho post-testom. Hodnotenie bolo vykonané v programe GraphPad Prism V5.02 (GraphPad Software Inc.).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky sledovania dynamiky zmien v bielkovinovom profile krvného séra teliat trpiacich hnačkovým ochorením sú podrobne uvedené v tabuľkách 1 a 2. Hoci v koncentráciách celkových bielkovín krvného síra neboli u teliat pozorované významné zmeny počas liečby, pri detailnejšej analýze boli v priebehu sledovaného obdobia zistené významné zmeny v zastúpení niektorých frakcií sérových bielkovín. Medzi najvýraznejšie zmeny patrili zmeny v albumínovej, α_1-,β_1- frakcii a taktiež v pomere A/G. Relatívne zastúpenie albumínu malo počas sledovania stúpajúcu tendenciu, naopak α_1- globulínová frakcia mala klesajúci trend so štatisticky vysoko významnými rozdielmi ($p<0,001$). Podobný trend bol pozorovaný aj u β_1-frakcii, avšak so štatisticky menej významným rozdielom ($p<0,05$) v porovnaní s α_1- frakciou. V súlade s vyššie spomenutými zmenami, došlo aj k zmene pomeru A/G. Ostatné sledované elektroforetické frakcie bielkovín krvného séra nevykazovali štatisticky významné zmeny medzi jednotlivými odbermi. Athanasiou a kol. (2019), vo svojej štúdií taktiež zaznamenali nárast albumínovej frakcie, ktorý pripisujú relatívnemu poklesu gama globulínovej frakcie. Aj keď v našej štúdií, sme nezaznamenali štatisticky významný pokles koncentrácie γ-globulínov, rozdiely vo výsledkoch môžu súvisieť s odlišným časovým usporiadaním odberov, vekom sledovaných zvierat a samotnou rozdielnosťou v metodickom postupe našej a spomínanej štúdie, keďže v uvedenej štúdií porovnávali dve vekové obdobia a nezameriavali sa na dynamiku. Výraznú dynamiku vykazovala aj koncentrácia fibrinogénu (g/l), ktorá mala počas sledovaného obdobia klesajúci trend so štatisticky významnými zmenami ($p<0,001$). Podobný trend zaznamenala aj Jawor (2007), ktorá u hnačkujúcich teliat pozorovala postupné znižovanie koncentrácie fibrinogénu v priebehu liečby, čo môže súvisieť s ústupom zápalovej odpovede organizmu.

	1. **odber**	**2. odber**	**3. odber**	**4. odber**	**5. odber**	**6. odber**	**p**

Tab. 1. Dynamika zmien v relatívnych	**alb %**	45,16±5,39[a]	45,60±6,32	47,29±8,10	49,26±8,71	50,91±9,36[b]	50,29±9,53	<0,05
	α_1 %	15,56±5,97[a]	14,47±5,91[ac]	13,01±5,21[acd]	11,77±4,04[bc]	10,84±3,15[bd]	9,83±3,05[b]	<0,001
	α_2 %	11,96±2,37	11,89±2,11	12,51±3,36	12,91±3,59	12,63±3,80	12,74±3,74	n.s.
	β_1 %	13,93±1,68[a]	13,39±1,69	12,91±1,43	13,36±1,07	12,51±1,09	12,31±0,59[b]	<0,05
	β_2 %	4,53±2,95	5,13±3,08	5,11±3,56	4,39±3,17	4,90±4,04	5,30±3,37	n.s.
	γ %	9,87±4,95	9,56±6,02	9,16±6,15	8,31±5,86	8,20±5,51	9,53±5,95	n.s.
	A/G	0,84±0,18[a]	0,86±0,20[a]	0,93±0,28	1,02±0,32	1,10±0,38[b]	1,08±0,41	<0,01

koncentráciách frakcií sérových proteínov (%) a pomeru albumín/globulín (A/G) u teliat s hnačkovým syndrómom (priemer ± SD)

Rôzne indexy v riadkoch znamenajú štatistickú významnosť rozdielov medzi odbermi: a,b,c,d - p<0,05; p- štatistická významnosť rozdielov; n.s.-nevýznamná

	1. odber	**2. odber**	**3. odber**	**4. odber**	**5. odber**	**6. odber**	**p**
CB	56,09±11,85	54,27±11,87	54,52±12,19	52,51±12,85	54,07±13,26	59,31±13,11	n.s.
alb g/l	25,23±4,30	24,59±5,58	25,34±4,92	25,54±4,45	27,19±4,91	28,17±5,05	n.s.
α_1 g/l	7,79±2,04[a]	7,40±2,21[a]	6,61±1,55[ab]	5,91±1,32[bc]	5,64±1,15[bc]	5,37±0,93[c]	<0,001
α_2 g/l	6,77±2	6,41±1,79	6,89±2,64	6,80±2,20	6,79±2,19	7,27±2,59	n.s.
β_1 g/l	7,83±1,51	7,29±1,89	7,10±1,91	7,07±1,63	6,80±1,53	7,06±1,72	n.s.
β_2 g/l	2,70±2	2,99±2,24	3,09±2,63	2,50±2,20	2,90±2,80	3,36±2,95	n.s.
γ g/l	5,80±3,46	5,59±4,24	5,50±4,65	4,73±4,00	4,71±3,84	5,93±4,69	n.s.
Fib g/l	3,07±0,55[a]	2,89±0,50[a]	2,49±0,46	2,19±0,78[b]	2,15±0,57[b]	2,02±0,55[b]	<0,001

Tab. 2. Dynamika zmien v absolútnych koncentráciách celkových sérových bielkovín, proteínových frakcií (g/l) a fibrinogénu (g/l) u teliat s hnačkovým syndrómom (priemer ± SD)

Rôzne indexy v riadkoch znamenajú štatistickú významnosť rozdielov medzi odbermi: a,b,c, - p<0,05 p- štatistická významnosť rozdielov; n.s.-nevýznamná

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

ATHANASIOU, LV. A kol. Serum protein electrophoretic profile in diarrheic neonatal calves. *Comparative Clinical Pathology.* 2019, roč. 28, č. 3, s. 685-688. ISSN 1618-5641.

CAFFARENA, RD. a kol. Causes of neonatal calf diarrhea and mortality in pasture-based dairy herds in Uruguay: a farm- matched case- control study. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2021, roč. 52, č. 2, s. 977-988. ISSN 1517-8382.

JAWOR, P. Determination of haptoglobin and fibrinogen during monitoring herd health and selected inflammatory states in cattle. 2007. Wroclaw University of Environmental and Life Science, PhD. Thesis

VEGA, CG. a kol. A new passive immune strategy based on IgY antibodies as a key element to control neonatal calf diarrhea in dairy farms. *BMC Veterinary Research.* 2020, roč. 16, č. 1, s. 264. ISSN 1746-6148

EXPRESIA VYBRANÝCH ACETYLCHOLÍNOVÝCH NIKOTÍNOVÝCH RECEPTOROV V PREIMPLANTAČNÝCH EMBRYÁCH

Rušinová L. [1,2], Špirková, A. [1], Kovaříková, V.[1], Šefčíková, Z. [1], Pisko, J. [1], Babeľová J. [1], Fabian, D. [1], Čikoš, Š. [1]

[1]*Centrum biovied SAV, Ústa v fyziológie hospodárskych zvierat, Šoltésovej 4-6, Košice 04001*

[2]*Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Prírodovedecká fakulta, Ústav biologických a ekologických vied*

ABSTRAKT

Viaceré štúdie ukázali, že acetylcholín okrem dobre známej úlohy neurotransmitera môže zohrávať úlohu aj v neneurálnych tkanivách, kde regulujú rôzne bunkové funkcie, akými sú bunková proliferácia, migrácia či diferenciácia. Výsledky niektorých prác naznačujú, že aktivácia nikotínových acetylcholínových receptorov by mohla ovplyvňovať aj skorý embryonálny vývin. V našej práci sme skúmali expresiu transkriptov vybraných podjednotiek nikotínového acetylcholínového receptora. Preukázali sme, že mRNA podjednotky alfa 1 je u 8 -16 bunkových embryí a blastocýst konzistentne exprimovaná, pričom u blastocýst je štatisticky signifikantne vyššia. U oocytov a 4 – bunkových embryí bola expresia nekonzistentná. Transkript podjednotky beta 1 bol konzistentne exprimovaný vo všetkých štádiách, pričom signifikantne najvyššia expresia bola v oocytoch a blastocystách. Podjednotka epsilon bola taktiež konzistentne exprimovaná, pričom najvyššie množstvo transkriptu bolo v blastocystách. Zmeny v expresii nikotínových receptorov počas preimplantačného vývinu naznačujú ich možnú úlohu v regulácii skorého embryonálneho vývinu.

ÚVOD

Acetylcholín (ACh) patrí k jedným z najdôležitejších endogénnych neurotransmiterov, ktorý zohráva svoju úlohu predovšetkým v autonómnom nervovom systéme (ANS). Cholinergný receptorový systém je tvorený dvoma hlavnými triedami acetylcholínových receptorov, na ktoré sa ACh môže v cieľových neurónoch viazať, a to konkrétne na ionotropné nikotínové receptory (nAChR) a metabotropné muskarínové receptory (mAChR) (Twyman, 2009). Nikotínové receptory predstavujú pentamérne transmembránové proteíny, ktoré sú zložené z rôznych podjednotiek. U cicavcov bolo identifikovaných 16 podjednotiek nAChR, a to konkrétne 9 alfa, 4 beta podjednotky a jedna gama, delta, a epsilon podjednotka. Nikotínové receptory vo všeobecnosti sprostredkovávajú rýchle elektrochemické signály (Wittenberg a kol., 2020) a metabotropné receptory, ktoré patria do triedy heptahelických transmembránových receptorov spojených s G proteínom, zabezpečujú pomalšie reakcie.

Okrem funkcie acetylcholínových receptorov pri prenose nervového vzruchu, viacero štúdii poukazuje na prítomnosť týchto receptorov aj v neneurónových bunkách, kde sa podieľajú na regulácii bunkových funkcií, akými sú bunková proliferácia, migrácia či diferenciácia (Beckmann a Lips, 2013). Výsledky viacerých prác pritom naznačujú, že acetylcholínové receptory by sa mohli podieľať na regulácii vývinu preimplantačného embrya (Zoli a kol., 2018).

MATERIÁL A METODIKA

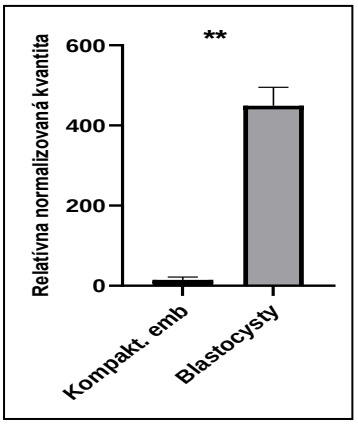
Izolácia oocytov a preimplantačných embryí Dospelé samice myší, kmeňa CD-1 IGS, boli hormonálne stimulované a približne 12 hodín po podaní hCG (ľudský choriový gonadotropín) boli z vajcovodu izolované oocyty. Na získanie preimplantačných embryí v štádiu 4-bunkového embrya, 8-16 bunkového embrya a blastocysty, boli hormonálne stimulované samice párené so samcami a 57 alebo 72 alebo 96 hodín po podaní hCG boli z vajcovodu/ maternice izolované embryá príslušného štádia

Izolácia RNA a syntéza cDNA Celkovú RNA sme izolovali z tkaniva pomocou reagencie TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Nemecko) podľa postupu odporúčaného výrobcom, pričom z každého štádia boli pripravené 4 nezávislé vzorky. Po eliminácii genomickej DNA pomocou DNase sme syntetizovali cDNA prostredníctvom RT^2 First Strand Kit.

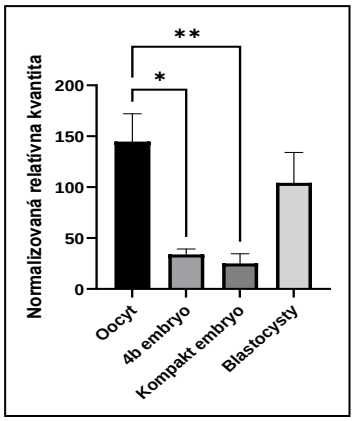
PCR analýza Na kvantifikáciu transkriptov sme použili polymerázovú reťazovú reakciu v reálnom čase (RT – PCR). Reakcie v objeme 25 µl obsahovali templát cDNA, špecifické priméry amplifikujúce špecifický transkript, Syber Green a ostatné požadované komponenty. Amplifikáciu sme uskutočnili na real time PCR systéme Light Cycler 480 (Rosch, Nemecko). Relatívnu štandardnú priamku sme pripravili sériou riedení cDNA mozgu myší a kvantitu cieľových transkriptov sme normalizovali na exogénnu referenčnú sekvenciu mRNA Luciferázy.

Štatistická analýza Na analýzu bol použitý štatistický softvér GraphPad, normalita rozloženia dát bola overená príslušnými testami. Štatistická významnosť rozdielov bola overená pomocou ANOVA + Tukey test a Studentov t-test

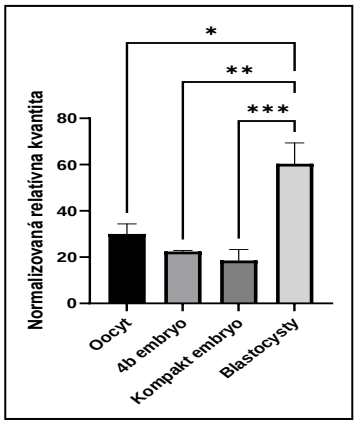
VÝSLEDKY A DISKUSIA



Obr. č. 1. Relatívna kvantita transkriptu Chrna1 v myšacích preimplantačných embryách.



Obr. č. 2. Relatívna kvantita transkriptu Chrnb1 v myšacích oocytoch a preimplantačných embryách.



Obr. č. 3. Relatívna kvantita transkriptu Chrne v myšacích oocytoch a preimplantačných embryách.

V našich experimentoch sme skúmali expresiu transkriptov reprezentujúcich skupinu alfa podjednotiek, skupinu beta podjednotiek a skupinu ostatných podjednotiek nikotínových acetylcholínových receptorov (nAChR).

Skúmanie expresie mRNA podjednotky alfa 1 (*Chrna1)* ukázalo, že expresia tohto transkriptu je u oocytov a 4-bunkových embryí nekonzistentná. Naopak u kompaktných 8-16 bunkových embryí a blastocýst sme detegovali špecifický PCR produkt vo všetkých analyzovaných vzorkách, pričom množstvo transkriptu bolo v blastocystách štatisticky významne vyššie ako v kompaktných embryách ($p<0,01$; Obr. č. 1). Hoci je α1 podjednotka skôr typická pre svalový typ nikotínového receptora, jej prítomnosť bola potvrdená aj mimo nervového a svalového tkaniva, kde sa podieľa na regulácii apoptózy, proliferácie, migrácie či diferenciácie buniek (Beckmann a Lips, 2013). Zvýšená expresia v blastocystách môže súvisieť s väčšími nárokmi na medzibunkovú komunikáciu, proliferáciu a diferenciáciu buniek trofoektodermu a embryoblastu (Wessler a Kirkpatrick, 2008).

Transkript podjednotky beta 1 (*Chrnb1*) bol konzistentne exprimovaný vo všetkých 4 skúmaných štádiách, pričom najvyššie množstvo transkriptu sme zaznamenali u oocytov. Množstvo transkriptu následne u 4-bunkového a u 8 – 16 bunkového štádia výrazne klesalo,

pričom bolo štatisticky významne nižšie ako u oocytov ($p<0,01$ a $p<0,05$; Obr. č. 2). V štádiu blastocysty došlo k opätovnému stúpaniu expresie, pričom rozdiel v množstve transkriptu oproti oocytom nebol štatisticky významný. Priebeh expresie Chrnb1 odráža všeobecný mechanizmus regulácie expresie mnohých génov počas skorého embryonálneho vývinu u cicavcov. Vysoké množstvo transkriptu v oocytoch predstavuje maternálnu zásobu mRNA, pričom po oplodnení dochádza k postupnej degradácii maternálnych transkriptov a funkciu preberá embryonálny génom v procese známom ako maternálno-zygotický prechod (maternal-to-zygotic transition, MTZ). Následne zvýšenie expresie v blastocystách predstavuje obnovenie transkripcie z aktivovaného embryonálneho genómu (Chen a kol., 2023; Vastenhouw a kol., 2019).

V prípade transkriptu podjednotky epsilon (*Chrne*) sme zaznamenali konzistentnú expresiu vo všetkých 4 štádiách, pričom najvyššie množstvo transkriptu bolo v blastocystách, a bolo štatisticky významne vyššie ako u ostatných troch štádii ($p<0,001$; $p<0,01$ a $p<0,05$; Obr. č. 3). Stúpajúca prítomnosť *Chrne* počas preimplantačného vývinu môže naznačovať jeho možnú účasť na regulačných procesoch prebiehajúcich v tomto období. Štádium blastocysty predstavuje významný medzník embryonálneho vývinu, počas ktorého dochádza k intenzívnej proliferácii, prvej bunkovej diferenciácii, tvorbe blastocelu a samotnej príprave embrya na jeho implantáciu (Fu a kol., 2020).

Naše výsledky ukazujú, že niektoré podjednotky nikotínového acetylcholínového receptora sú v skorých embryách exprimované konzistentne počas celej preimplantačnej periódy, ale expresia iných začína až v neskorších vývinových štádiách, čo naznačuje rozdielny funkčný význam rôznych podjednotiek v rôznych vývinových štádiách. Vo všetkých troch analyzovaných génoch bolo pozorované zvýšenie expresie v poslednom vývinovom štádiu. Zvýšená expresia podjednotiek nikotínového receptora v blastocystách môže súvisieť so zvýšenou potrebou regulácie bunkovej komunikácie a aktiváciou signálnych dráh potrebných pre úspešnú diferenciáciu a následnú implantáciu (Fu a kol., 2020) a naznačuje možnú účasť nikotínových receptorov na regulácii týchto procesov. Komplexné poznanie úlohy nikotínových acetylcholínových receptorov v preimplantačných embryách však bude vyžadovať ďalší výskum.

POĎAKOVANIE

Práca bola financovaná z projektov Doktogrant APP0535, VEGA 2/0041/23, APVV-22-0071.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BECKMANN, J. et. al. The Non-Neuronal Cholinergic System in Health and Disease. *Pharmacology*. 2013; 92(5-6): 286–302.

FU, X. et. al. Epigenetic regulation of mouse preimplantation embryo development. *Current opinion in genetics & development*. 2020; 64: 13–20.

CHEN, Y. et. al. Epigenetic reprogramming during the maternal-to-zygotic transition. *MedComm*. 2023; *4*(4): e331.

TWYMAN, R. M. Neutrotransmission and Neuromodulation: Acetylcholine. *Encyclopedia of Neuroscience*. 2009; p: 1115–1119.

VASTENHOUW, N. L. et. al. The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development (Cambridge, England)*. 2019; 146(11).

WESSLER, I. et. al. Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British journal of pharmacology*. 2008; 154(8): 1558–1571.

WITTENBERG, R. E. a kol.. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*. 2020; 176: 108256.

ZOLI, M. a kol.. Neuronal and Extraneuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Current neuropharmacology*. 2018; 16(4): p. 338–349.

ICHTYOPARAZITOLOGICKÝ PRIESKUM V POVODÍ RIEKY DUNAJ SO ZAMERANÍM NA ZOONOTICKÉ DRUHY HELMINTOV

Salonová S.[1], Barčák D. [1], Kiššová A.[2], Orosová M.[1], Oros M.[1]
[1]*Parazitologický ústav, Slovenská akadémia vied, Košice*
[2]*Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita, Prešov*

ABSTRAKT
Cieľom práce bol ichtyoparazitologický prieskum vo vybraných úsekoch rieky Dunaj v Rakúsku, Srbsku a v Rumunsku zameraný na detekciu zoonotických helmintov. Celkovo bolo vyšetrených 19 druhov rýb patriacich do 10 čeľadí a detegované boli metacerkárie rodov *Apophallus, Metagonimus, Clinostomum* a larvy rodu *Eustrongylides*. Rod *Apophallus* bol zaznamenaný vo všetkých troch krajinách u rýb *Chondrostoma nasus, Squalius cephalus, Vimba vimba*. Metacerkárie *Metagonimus romanicus* boli detegované v Srbsku a Rumunsku u *Rutilus rutilus, S. cephalus, Neogobius melanostomus* a *V. vimba*. Výskyt *Clinostomum complanatum* bol potvrdený v Rumunsku u *Perca fluviatilis*. Larvy hlístovca *Eustrongylides* sp. infikovali inváz ne druhy rýb v Srbsku (*N. melanostomus, Lepomis gibbosus*), a *P. fluviatilis* a *Sander lucioperca* v Rumunsku. Výsledky poukazujú na širokú distribúciu zoonotických helmintov v Dunaji a potvrdzujú význam rýb pri ich šírení. Sledované parazity predstavujú riziko pre verejné zdravie pri konzumácii nedostatočne tepelne upravených rybích produktov.

ÚVOD
V posledných rokoch sa rybie produkty stávajú čoraz obľúbenejším zdrojom bielkovín ako základná súčasť zdravej výživy. Sladkovodné ryby predstavujú malú časť produkcie v európskych krajinách, majú však lokálny obchodný význam pre obyvateľov vnútrozemia a pre turistov, ktorých lákajú tradičné jedlá. Aj keď konzumácia surových sladkovodných rýb nie je v Európe bežná, ryby, ktoré sú nositeľmi zoonotických parazitov, by mohli predstavovať riziko pre verejné zdravie. Ide najmä o helminty, ktoré najčastejšie spôsobujú alimentárne nákazy na celosvetovej úrovni (Menconi a kol., 2023).
Dunaj je druhá najdlhšia rieka v Európe, ktorá preteká cez 10 európskych krajín. Jej povodie predstavuje významný sladkovodný ekosystém s vysokou diverzitou vodných organizmov. Vzhľadom na komplexnosť riečneho systému a prítomnosť rôznych hostiteľov (ryby, rybožravé vtáky a cicavce) poskytuje táto rieka vhodné podmienky pre vývoj a cirkuláciu mnohých skupín parazitov.
Mimoriadnu pozornosť si zasluhujú helminty so zoonotickým potenciálom, ktoré môžu za určitých podmienok infikovať človeka. K prenosu dochádza predovšetkým konzumáciou surových alebo nedostatočne tepelne upravených rýb. V povodí Dunaja predstavujú potenciálne riziko hlavne trematódy rodov *Apophallus, Clinostomum* a *Metagonimus,* a nematódy rodu *Eustrongylides* (Chai a Jung, 2017; Zaharieva a kol., 2023).

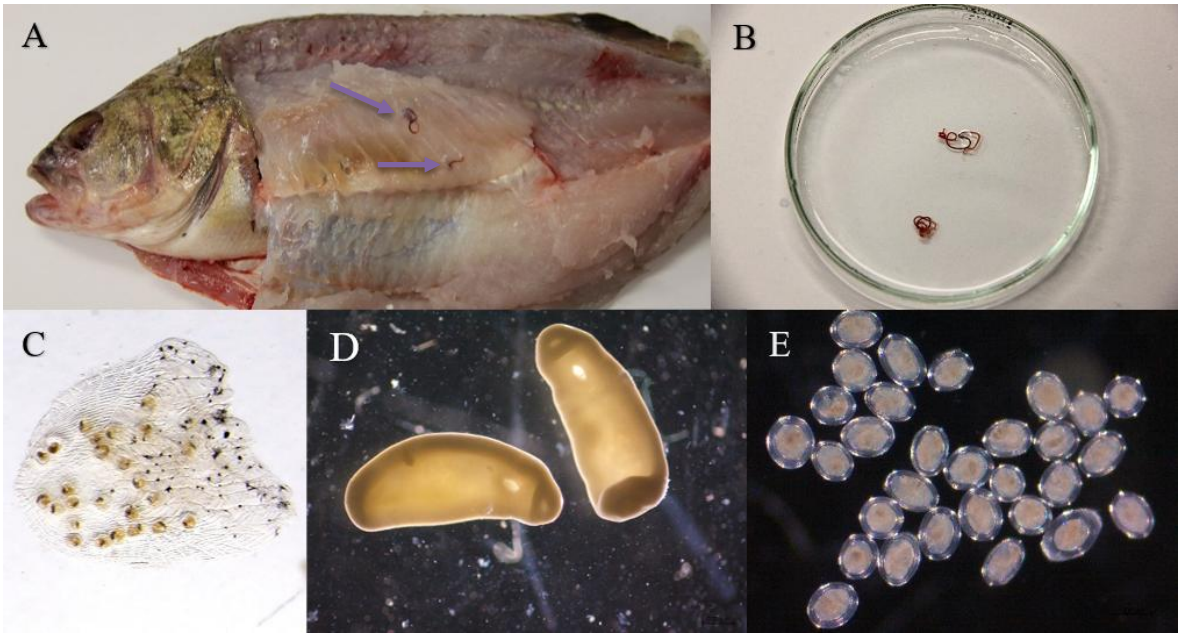
MATERIÁL A METODIKA
Lov rýb sa uskutočnil na rieke Dunaj pri mestách Ybbs (Rakúsko), v delte Dunaja pri meste Tulcea (Rumunsko) a v Srbsku pri meste Čerević. Ryby boli ulovené elektrickým agregátom alebo na udicu v spolupráci s miestnymi vedeckými inštitúciami, humánne usmrtené a transportované v chladiacich nádobách do laboratória. Celkovo bolo vyšetrených 85 jedincov, 19 druhov rýb patriacich do čeľadí Anguillidae, Centrarchidae, Cyprinidae, Esocidae, Gobiidae, Ictaluridae, Leuciscidae, Lotidae, Percidae a Siluridae. Ryby boli podrobené parazitologickému vyšetreniu so zameraním na šupiny, plutvy a svaly.
Šupiny a plutvy boli vyšetrené pod stereomikroskopom a svaly boli tráviacou metódou (zmes pepsínu a kyseliny chlorovodíkovej) natrávené pri 37°C, kým sa uvoľnili encystované metacerkárie. Tie boli následne zozbierané zo sedimentu a identifikované pod svetelným

mikroskopom podľa Vojteka (1974). Cysty boli fixované v 96% etanole. Excystované metacerkárie boli zaliate horúcim fyziologickým roztokom a následne uložené v 96% etanole pre ďalšie morfologické analýzy a genotypizáciu s využitím ITS oblasti ribozomálnej DNA (Oros a kol., 2025).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Metacerkárie rodu *Apophallus* sme detegovali u 3 druhov rýb čeľade Leuciscidae (*viď Tab. 1)*, pričom tento parazit bol zachytený naprieč celým sledovaným úsekom Dunaja (Rakúsko, Srbsko, Rumunsko), čo poukazuje na jeho širokú distribúciu v strednom aj dolnom toku. Prítomnosť *Apophallus* spp. potvrdil u rýb z maďarského úseku Dunaja aj Sándor a kol. (2017). Metacerkárie *Metagonimus romanicus* sme zaznamenali u plotice obyčajnej *Rutilus rutilus* (Cyprinidae), jalca hlavatého *Squalius cephalus* (Cyprinidae) a u býčka čiernoústeho *Neogobius melanostomus* (Gobiidae) z Dunaja v Srbsku, a v Rumunsku u nosáľa sťahovavého *Vimba vimba* (Cyprinidae). Takúto širokú hostiteľskú špecificitu zaznamenal aj Oros a kol. (2025), ktorý popísal až 50 druhov z 18 čeľadí rýb infikovaných metacerkáciami druhu *M. romanicus* v úseku Dunaja od delty až po Slovensko. *Clinostomum complanatum* bol detegovaný v delte Dunaja (Rumunsko) u ostrieža zelenkastého (*Perca fluviatilis*), pričom výskyt metacerkárií *C. complanatum* u týchto rýb bol potvrdený aj v ramennej sústave Dunaja na Slovensku a u *P. fluviatilis* a *Scardinius erythrophthalmus* z delty Dunaja (Juhásová a kol., 2025). Spektrum hostiteľov hlístovca *Eustrongylides* sp. zo Srbska zahŕňalo dva invázne druhy rýb (*Neogobius melanostomus, Lepomis gibbosus*) a v Rumunsku ostrieža zelenkastého (*Perca fluviatilis*) a zubáča veľkoústeho (*Sander lucioperca*). Výskyt u nepôvodných druhov rýb bol potvrdený aj v Bulharskom úseku Dunaja (Zaharieva a kol. 2023).

Medzi hlavné faktory ovplyvňujúce šírenie zoonotických helmintov prenášaných rybami patrí rastúci globálny obchod s potravinami, demografické zmeny, nové kulinárske návyky a zmena klímy. Vzhľadom na tieto faktory je preto nevyhnutný neustály monitoring rybích populácií, ktorý umožňuje včasnú detekciu a prevenciu rizikových zoonotických helmintov.



Obr. 1 Fotografie helmintov detegovaných u rýb z rieky Dunaj. A - larva hlístovca Eustrongylides sp. (šípka) vo svalovine Perca fluviatilis B - živé larvy Eustrongylides sp. vo fyziologickom roztoku, C - encystované metacerkárie Metagonimus romanicus v šupine jalca hlavatého (Squalius cephalus), D – preparát excystovanej metacerkárie Clinostomum complanatum E - encystované metacerkárie Apophallus muehlingi izolované zo svaloviny Vimba vimba tráviacou metódou.

KRAJINA (MESTO)	PARAZIT	HOSTITEĽ	PREVALENCIA (POZITÍVNE/VYŠETRENÉ JEDINCE)
RAKÚSKO (YBBS)	*Apophallus* sp.	*Chondrostoma nasus*	60 % (3/5)
SRBSKO (ČEREVIĆ)	*Apophallus* sp.	*Squalius cephalus*	(1/1)
	Metagonimus romanicus	*Rutilus rutilus*	50 % (3/6)
	Metagonimus romanicus	*Squalius cephalus*	(1/1)
	Metagonimus romanicus	*Neogobius melanostomus*	20 % (1/5)
	Eustrongylides sp.	*Neogobius melanostomus*	66 % (4/6)
	Eustrongylides sp.	*Lepomis gibbosus*	(1/1)
RUMUNSKO (TULCEA)	*Apophallus muehlingi*	*Vimba vimba*	100 % (5/5)
	Metagonimus romanicus	*Vimba vimba*	100 % (5/5)
	Clinostomum sp.	*Perca fluviatilis*	33 % (3/9)
	Eustrongylides sp.	*Perca fluviatilis*	66 % (6/9)
	Eustrongylides sp.	*Sander lucioperca*	1/1

Tab. 1. Zoznam a prevalencia detegovaných druhov helmintov so zoonotickým potenciálom v rybách z rieky Dunaj

POĎAKOVANIE

Výskum bol financovaný Vedeckou grantovou agentúrou MŠVVaM SR a SAV (VEGA 2/0130/24) a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-24-0140).

POUŽITÁ LITERATÚRA

CHAI, J. Y. a JUNG, B. K. Fishborne zoonotic heterophyid infections: An update. *Food and Waterborne Parasitology.* 2017, roč. 8–9, s. 33–63.

JUHÁSOVÁ, Ľ. a kol., Population structure of Clinostomum complanatum (Trematoda: Digenea) with new data on haplotype diversity of flukes from Slovakia and Italy. *Parasite*, 2025.

MENCONI, V. a kol. The Occurrence of Freshwater Fish-Borne Zoonotic Helminths in Italy and Neighbouring Countries: A Systematic Review. *Animals.* 2023, roč. 13, č. 24, s. 3793.

OROS, M. a kol. The life cycle of the potentially zoonotic trematode *Metagonimus romanicus* (Digenea: Heterophyidae): new insights from published and original data. *Food and Waterborne Parasitology.* 2025, roč. 40, e00276.

SÁNDOR, D., a kol. An investigation of the host-specificity of metacercariae of species of Apophallus (Digenea: Heterophyidae) in freshwater fishes using morphological, experimental and molecular methods. *Parasitology Research*, 2017, 116.11: 3065-3076.

VOJTEK, J. Metacercariae of fish in Czechoslovakia. 1974. *Biologia* 44, 13-51.

ZAHARIEVA, R. G. a kol. Ecological study on helminths of three species of Gobiidae from the Danube River, Bulgaria. *Helminthologia.* 2023, roč. 60, č. 1, s. 63–72.

GENOTOXICKÉ A CYTOTOXICKÉ PÔSOBENIE MIKONAZOLU NA BOVINNÉ LYMFOCYTY

Sedláková S., Schwarzbacherová V., Galdíková M., Halušková J.
Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo zistiť potenciálne genotoxické a cytotoxické účinky mikonazolu na bovinné lymfocyty *in vitro*. Možný genotoxický efekt mikonazolu na bovinné lymfocyty bol skúmaný použitím mikrojadrového testu (MN) a metódou fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH). Pri MN teste boli bunky plnej krvi exponované mikonazolu (2,5, 5, 10, 25 a 50 µg.ml^{-1}) na 24h kultiváciu. Mikonazol preukázal štatisticky významný pokles v cytokinéze-blokovanom proliferačnom indexe (CBPI) v koncentráciách 5 a 50 µg.ml^{-1} ($p<0,001$). Vznik mikrojadier bol štatisticky významný len u donora č.2 v koncentrácii 25 µg.ml^{-1}. Žiadna štatistická významnosť nebola pozorovaná v jadrových mostíkoch (NPB) a jadrových púčikoch (NBUD) u oboch donorov. Štatistická významnosť apoptózy a nekrózy bola dokázaná v koncentráciách 25 a 50 µg.ml^{-1} ($p < 0.5$, $p < 0,01$, $p < 0,001$). Metódou FISH sme zisťovali prítomnosť chromozómových translokácií. Ani jedna z testovaných koncentrácií mikonazolu neindukovala vznik chromozómových translokácií. Prítomné však boli numerické aberácie. U donora č.1 boli zaznamenané pri 24 h *in vitro* expozícii a koncentrácii mikonazolu 5 µg.ml^{-1} dva prípady trizómií BTA1 (chromozóm 1). U donora 2 bola bola jedna trizómia BTA1 prítomná pri koncentrácii mikonazolu 25 µg.ml^{-1} po expozícii 24 h.

ÚVOD

Mikonazol patrí do skupiny azolov s fungistatickým a fungicídnym účinkom, ktorý sa používa na topickú liečbu na kožných a slizničných mykóz. Táto látka sa od ostatných azolov odlišuje tým, že má dva mechanizmy účinku. Prvý mechanizmus je spoločný s ostatnými azolmi a spočíva v inhibícii syntézy ergosterolu. Druhý mechanizmus spočíva v inhibícii peroxidáz, čo vedie k hromadeniu peroxidu v bunke a následne k jej smrti (Hašek, 2013).

MN test sa celosvetovo odporúča na skríning genotoxicity chemických látok. MN test s blokovanou cytokinézou (CBMN), rozšírený na takzvaný „cytómový test“, je metóda na detekciu chromozómových aberácií, mutácií genómu, cytostatických účinkov alebo bunkovej cytotoxicity, ktoré sa vyskytujú počas bunkového delenia (Franzke a kol., 2020). Bunky sú zablokované v štádiu s dvoma jadrami, v ktorom môžeme detegovať MN, nukleoplazmatické mostíky (NPBS) vznikajúce v dôsledku asymetrických chromozómových prestavieb a/alebo fúzií koncov telomér, ako aj jadrové výrastky (NBUDS), ktoré predstavujú mechanizmus, ktorým bunky odstraňujú amplifikovanú DNA, a preto sa považujú za marker možnej amplifikácie génov (El-Zein a kol., 2008).

Fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) je cytogenetická metóda používaná na detekciu chromozómových abnormalít nielen pri vzniku nádorových ochorení ale aj pri hodnotení genotoxicity (Gozzetti a kol., 2000; Galdíková a kol., 2019).

MATERIÁL A METODIKA

V pokuse bola použitá venózna krv sterilne odobraná od dvoch donorov – býčkov (*Bos taurus*), kríženco slovenského strakatého a holšteinsko-frízskeho dobytka veku okolo 6 mesiacov.

MN test: Kultivácia lymfocytov periférnej krvi, spracovanie, príprava preparátov a farbenie prebehlo podľa Galdíková a kol. (2019). Hodnotenie prebehlo podľa Fenech a kol. (2003). Lymfocyty boli vystavené účinku mikonazolu 2.5, 5, 10, 25 a 50 µg.ml^{-1} počas 24 h. Ako negatívna kontrola bol použitý dimetylsulfoxid (DMSO; 0,1%), ktorý slúžil aj ako rozpúšťadlo.

FISH: Kultiváčný proces lymfocytov, spracovania, príprava skiel a samotná FISH procedúra je opísaná v práci Galdíková a kol. (2019); boli použité koncentrácie mikonazolu - 5 $\mu g.ml^{-1}$; 10 $\mu g.ml^{-1}$ a 25 $\mu g.ml^{-1}$.
Štatistická analýza bola vykonaná chí kvadrátovým testom (BNMN, NPB, NBUD, apotpóza, nekróza oproti negatívnej kontrole) FISH, a ANOVA (CBPI + Dunnett post test oproti negatívnej kontrole), pri štatistickej významnosti $p<0,5$, $p<0,01$, $p<0,001$.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Indukcia mikrojadier bola štatisticky významná iba u donora 2 pri koncentrácii 25 $\mu g.ml^{-1}$. Pokles CBPI bol zaznamenaný už pri koncentrácii 10 µg/ml u donora 1 a pri koncentrácii 5 $\mu g.ml^{-1}$ u donora 2 (tab. 1).

Mikonazol $\mu g.ml^{-1}$	Donor 1		Donor 2	
	% BNMN±SD	CBPI±SD	% BNMN±SD	CBPI±SD
DMSO	0,7 ± 0,084	1,529 ± 0,022	0,5 ± 0,071	1,394 ± 0,026
2,5	0,9 ± 0,094	1,487 ± 0,038	0,6 ± 0,077	1,640 ± 0,036
5	0,6 ± 0,077	1,487 ± 0,012	0,8 ± 0,089	1,287 ± 0,029 ***
10	0,8 ± 0,089	1,412 ± 0,033 ***	0,9 ± 0,094	1,242 ± 0,033 ***
25	0,5 ± 0,071	1,274 ± 0,017 ***	1,4 ± 0,118 *	1,131 ± 0,030 ***
50	1,1 ± 0,104	1,213 ± 0,028 ***	ND	1,083 ± 0,006 ***

ND – nedefinované; *, *** - štatistická významnosť ($p<0,05$; $p< 0,001$)

Tab. 1. Výsledky indukcie mikrojadier a CBPI zmeny po 24 h in vitro expozícii mikonazolom na bovinné lymfocyty

Frekvencia výskytu NPB a NBUD sa mierne zmenila, avšak bez štatistickej významnosti (tab. 2).

Mikonazol $\mu g.ml^{-1}$	Donor 1		Donor 2	
	% NPB±SD	% NBUD±SD	% NPB±SD	% NBUD±SD
DMSO	0,1 ± 0,032	0	0,1 ± 0,032	0,2 ± 0,045
2,5	0,1 ± 0,032	0	0,2 ± 0,045	0,1 ± 0,036
5	0,2 ± 0,045	0	0,1 ± 0,032	0
10	0,2 ± 0,045	0,1 ± 0,032	0,2 ± 0,045	0,2 ± 0,045
25	0	0	1,2 ± 0,045	0,1 ± 0,032
50	0	0	0,3 ± 0,055	0

Tab. 2. Výsledky výskytu NPB a NBUD po 24 h in vitro expozícii mikonazolom na bovinné lymfocyty

Výskyt apoptotických buniek sa významne zvýšil pri koncentráciách 25 a 50 $\mu.ml^{-1}$ iba u donora 2. Vyššia incidencia nekrózy bola pozorovaná pri koncentráciách 25 a 50 $\mu.ml^{-1}$ u oboch darcov (tab. 3).

Mikonazol µg.ml-1	Donor 1		Donor 2	
	% apoptóza±SD	% nekróza±SD	% apoptóza±SD	% nekróza±SD
DMSO	2,933 ± 0,116	2,733 ± 0,306	2,400 ± 0,4	2,633 ± 0,153
2,5	2,600 ± 0,2	3,200 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,867 ± 0,416
5	2,267 ± 0,416	2,467 ± 0,416	2,2 ± 0,529	3,000 ± 0,2
10	2,733 ± 0,416	2,533 ± 0,231	2,993 ± 0,116	2,733 ± 0,306
25	2,800 ± 0,721	3,533 ± 0,306 *	3,267 ± 0,306 *	3,533 ± 0,306 **
50	3,867 ± 0,306	4,133 ± 0,306 ***	3,933 ± 0,116 ***	4,267 ± 0,116 ***

ND – nedefinované; *,**,*** - štatistická významnosť ($p<0,05$; $p<0,01$; $p<0,001$)

Tab. 3. Výsledky výskytu apoptózy a nekrózy po 24 h in vitro expozíci mikonazolom na bovinné lymfocyty

Schwarzbacherová a kol. (2015) skúmali vplyv fungicídu s obsahom tebukonazolu a protiokonazolu na indukciu mikrojadier (MN). Po 24 h inkubácii s fungicídom neboli zistené žiadne významné zvýšenia frekvencie mikrojadier v lymfocytoch hovädzieho dobytka. U donorov bolo však pozorované významné zníženie indexu proliferácie blokovanej cytochalazínom (CBPI). Vplyv flukonazolu na indukciu mikrojadier hodnotili Yüzbasioglu

a kol. (2008) na ľudských lymfocytoch. Mikrojadrá boli v porovnaní s negatívnou kontrolou významne zvýšené v závislosti od dávky. Index proliferácie blokovanej cytokinézou (CBPI) nebol ovplyvnený liečbou flukonazolom.

Za translokácie sú považované výmeny určitých častí úsekov medzi chromozómami. Jednoduché translokácie sú charakteristické prenosom určitého segmentu z jedného miesta na druhé. Tento proces je uskutočnený v rámci jedného chromozómu alebo medzi homologickými, prípadne nehomologickými chromozómami (Holečková a kol., 2021). V našom experimente s mikonazolom neboli pozorované chromozómové translokácie ale numerické aberácie (zmeny v počte chromozómov). U donora 1 boli zaznamenané pri 24 h *in vitro* expozícii 5 $\mu g.ml^{-1}$ dva prípady trizómií BTA1. U donora 2 bola jedna trizómia BTA1 prítomná pri 25 $\mu g.ml^{-1}$ po expozícii 24 h. Aberácie a translokácie chromozómu BTA5 sme nedetegovali.

	24 h							
	% trizómií (± SD)							
	DMSO		5 $\mu g.ml^{-1}$		10 $\mu g.ml^{-1}$		25 $\mu g.ml^{-1}$	
chromozóm	**1**	**5**	**1**	**5**	**1**	**5**	**1**	**5**
donor 1	0±0,00	0±0,00	0,4±0,063	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00
donor 2	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0±0,00	0,2±0,045	0±0,00

DMSO – dimetylsulfoxid (negatívna kontrola) 0,1 %

Tab. 4. Výsledky numerických aberácií - trizómií po 24 h in vitro expozícii mikonazolom u chromozómov BTA 1 a BTA5

POĎAKOVANIE

Táto publikácia vznikla na základe podpory Vedeckej grantovej agentúry prostredníctvom grantu VEGA 1/0240/25.

POUŽITÁ LITERATÚRA

EL-ZEIN, R. A. et. al.: Cytokinesis-Blocked Micronucleus Cytome Assay Biomarkers Identify Lung Cancer Cases amongst Smokers. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Preventions*, 2008, 17(5), 1111-1119.

FENECH, M. a kol.. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using islated human lymphocyte cultures. Science Direct. 2003, 534 (2), 65-75.

FRANZKE, B. – Schwingshackl, L. – Wagner, K.-L.: Chromosomal damage measured by the cytokinesis block micronucleus cytome assay in diabetes and obesity – A systemic review and meta-analysis. Mutation Research, 2020, 786, 108343.

GALDÍKOVÁ, M. a kol. Identification of chromosome and aberrations after exposure to pesticide in bovine lymphocytes. F. Toxicol. & Pest Control. 2010; 2:5-9.

GOZZETTI A., Beau M. Fluorescence *in situ* hybridization: Uses and limitations. Semin. In Hemat. 2000; 37:320-333.

HAŠEK, J.: Nové, léčivé látky v magistraliter receptuře XIV – mikonazol a mikonazol-nitrát, *Praktické lékarenství*, 2013, 9 (4-5):201-203,

HOLEČKOVÁ B. a kol. Chromosomal Aberrations in Cattle. Genes. 2021; 12:1330.

SCHWARZBACHEROVÁ, V. a kol. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity induced by triazole fungicide in cultured bovine lymphocytes. Cyryologia. 2015, 68 (3), 233-238.

YÜZBAŠIOGLU, D. et. al. Genotoxicity testinf of fluconazole *in vivo* and *in vitro*. Science Direct. 2008, 649 (1-2), 155-160.

PREDBEŽNÉ HODNOTENIE VPLYVU DOPLNKOVEJ VÝŽIVY NA NOZEMATÓZU VČELSTIEV

Szabó I.[1], Sabo R.[2], Staroň M.[3] Sabová L.[2], Sabolová B., Sučik M[1]
[1] *Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach*
[2] *Katedra farmakológie a toxikológie, UVLF v Košiciach*
[3] *Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum (NPPC), Odbor živočíšnej výroby, Divízia včelárstva, Liptovský Hrádok*

ABSTRAKT
Nozematóza patrí medzi významné ochorenia dospelých včiel medonosných (*Apis mellifera*) spôsobené mikrosporídiami rodu *Nosema*. Vzhľadom na obmedzené možnosti terapie sa pozornosť venuje podpore zdravotného stavu včelstiev prostredníctvom doplnkovej výživy. Cieľom práce bolo predbežne zhodnotiť dynamiku mikroskopického nálezu spór *Nosema* spp. v troch prirodzene infikovaných včelstvách počas podávania schváleného vitamínovo-aminokyselinového prípravku ApiBiovit. Vzorky boli odobraté v štyroch termínoch od apríla do júla 2026 a vyšetrené svetelnou mikroskopiou. Počas obdobia troch podaní prípravku bol zaznamenaný pokles intenzity nálezu z počiatočnej pozitivity + až +++ na ojedinelý výskyt spór alebo negatívny nález. Približne mesiac po poslednom podaní bola vo všetkých včelstvách opätovne zaznamenaná pozitivita na úrovni +. Výsledky predstavujú pilotné pozorovanie, ktoré poukazuje na potrebu ďalšieho kontrolovaného hodnotenia významu doplnkovej výživy pri nozematóze.

ÚVOD
Nozematóza je ochorenie dospelých včiel medonosných (*Apis mellifera*) spôsobené mikrosporídiami rodu *Nosema*, pričom medzi najvýznamnejších pôvodcov patria *Nosema apis* a *Nosema ceranae*. Infekcia *N. ceranae* môže negatívne ovplyvňovať fyziologický stav jednotlivých včiel a následne celkovú kondíciu včelstva (Goblirsch, 2018).
Možnosti priamej terapie nozematózy sú obmedzené. Fumagilín bol dlhodobo využívaný na kontrolu infekcie, jeho použitie je však spojené s rizikom rezíduí v mede, možnými negatívnymi účinkami na včely a v mnohých krajinách je zakázaný. Z tohto dôvodu sa zvýšená pozornosť venuje alternatívnym prípravkom a podpore fyziologického stavu včiel prostredníctvom vhodnej výživy (Szabó a kol., 2026a). Výživové doplnky obsahujúce vitamíny a aminokyseliny môžu podporovať celkovú kondíciu včiel a ich schopnosť vyrovnávať sa s infekčným stresom (Glavinic a kol., 2017).
Cieľom práce bolo predbežne zhodnotiť vývoj mikroskopického nálezu spór *Nosema* spp. v prirodzene infikovaných včelstvách počas opakovaného podávania doplnkového výživového prípravku ApiBiovit a po prerušení jeho podávania.

MATERIÁL A METODIKA
Ako doplnková výživa bol použitý schválený veterinárny prípravok ApiBiovit obsahujúci komplex vitamínov a aminokyselín. Prípravok bol aplikovaný v dávke 5 ml na 1 l cukrového roztoku pripraveného z 1 kg cukru a 1,5 l vody. Podanie nasledovalo po odberoch 24. 4., 20. 5. a 2. 6. 2026. Po poslednom podaní nasledovalo približne mesačné obdobie bez aplikácie prípravku a 6. 7. 2026 bol vykonaný následný kontrolný odber.
Do sledovania boli zaradené tri včelstvá s mikroskopicky potvrdenou prítomnosťou spór *Nosema* spp. Z každého včelstva bolo pri jednotlivých odberoch odobratých približne 30 dospelých včiel z vnútorného priestoru úľa.
Vzorky boli vyšetrené svetelnou mikroskopiou na katedre biológie a fyziológie univerzity veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. Bruška včiel boli homogenizované vo vode a zo získanej suspenzie bol pripravený mikroskopický preparát, ktorý bol vyšetrený pri 400-

násobnom zväčšení podľa Fries a kol. (2013). Intenzita nálezu spór bola hodnotená semikvantitatívne.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Pri vstupnom vyšetrení 24. 4. 2026 boli pozitívne všetky tri sledované včelstvá. Intenzita mikroskopického nálezu dosahovala vo včelstve 1 úroveň +, vo včelstve 2 úroveň +++ a vo včelstve 3 úroveň ++ (tabuľka 1). Pri druhom odbere 20. 5. bol vo všetkých troch včelstvách zaznamenaný už iba ojedinelý výskyt spór. Pokles pokračoval aj pri odbere 2. 6., keď boli v prvom včelstve spóry prítomné iba ojedinele, zatiaľ čo v druhom a treťom včelstve neboli mikroskopicky detegované. Pri následnej kontrole 6. 7., približne jeden mesiac po poslednom podaní ApiBiovitu, bola vo všetkých troch včelstvách opätovne zaznamenaná pozitivita na úrovni +.

Dátum odberu	Včelstvo 1	Včelstvo 2	Včelstvo 3	Podanie ApiBiovitu
24. 4. 2026	+	+++	++	áno
20. 5. 2026	ojedinelý výskyt	ojedinelý výskyt	ojedinelý výskyt	áno
2. 6. 2026	ojedinelý výskyt	negatívny	negatívny	áno
6. 7. 2026	+	+	+	nie

Tab. 1. Dynamika mikroskopického nálezu spór Nosema spp. v sledovaných včelstvách

Počas obdobia podávania ApiBiovitu bol teda vo všetkých sledovaných včelstvách pozorovaný pokles intenzity mikroskopického nálezu. Najvýraznejšia zmena bola zaznamenaná vo včelstve 2, kde sa vstupná pozitivita +++ znížila až pod hranicu mikroskopickej detekcie. Zaujímavým pozorovaním bolo opätovné zachytenie spór vo všetkých troch včelstvách po približne mesačnom období bez podávania prípravku.

Pozorovaný trend možno porovnať s výsledkami Glavinic a kol. (2017), ktorí pri experimentálnej infekcii *N. ceranae* zaznamenali po podávaní aminokyselinovo-vitamínového komplexu zníženie počtu spór a ovplyvnenie vybraných parametrov imunitnej odpovede včiel. Charistos a kol. (2015) pri dlhodobom podávaní výživového doplnku HiveAlive taktiež zaznamenali nižšie spórové zaťaženie *N. ceranae* a pozitívny vplyv na silu včelstiev. Výsledky naznačujú, že nutričná suplementácia môže byť jedným z podporných faktorov ovplyvňujúcich schopnosť včiel vyrovnávať sa s infekčným zaťažením.

ApiBiovit obsahuje komplex vitamínov a aminokyselín a jeho deklarovaným účelom je predovšetkým podpora výživy, rozvoja a vitality včelstiev, nie priama terapia nozematózy (Szabó a kol., 2026a). Pozorovaný pokles mikroskopického nálezu preto nemožno interpretovať ako dôkaz priameho antimikrosporidiálneho účinku prípravku. Pri hodnotení výsledkov je potrebné zohľadniť aj prirodzenú sezónnu dynamiku infekcie *Nosema* spp. a zmeny populačnej štruktúry včelstva v priebehu aktívnej sezóny (Szabó a kol., 2026b).

Limitujúcim faktorom sledovania v tomto pokuse je najmä nízky počet včelstiev, absencia paralelnej kontrolnej skupiny bez suplementácie a semikvantitatívny charakter mikroskopického hodnotenia. Napriek týmto obmedzeniam bol vo všetkých troch včelstvách zaznamenaný podobný trend poklesu nálezu počas obdobia suplementácie a následný opätovný záchyt spór po jej prerušení. Výsledky preto predstavujú predbežný podklad pre ďalšie sledovanie na väčšom počte včelstiev s využitím kontrolnej skupiny a kvantitatívneho stanovenia spórového zaťaženia.

POĎAKOVANIE

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

CHARISTOS, L. a kol. Long term effects of a food supplement HiveAlive™ on honey bee colony strength and *Nosema ceranae* spore counts. J Apic Res. 2015;54:420-6. ISSN 2078-6913

FRIES, I. a kol. Standard methods for *Nosema* research. J Apic Res. 2013;52:1-28. ISSN 2078-6913

GLAVINIC, U. a kol. Dietary amino acid and vitamin complex protects honey bee from immunosuppression caused by *Nosema ceranae*. PLoS One. 2017;12:e0187726. ISSN 1932-6203

GOBLIRSCH, M. *Nosema ceranae* disease of the honey bee (*Apis mellifera*). Apidologie. 2018;49:131-50. ISSN 1297-9678

SZABÓ, I. a kol. Drugs and products in beekeeping: efficacy and perspectives of natural alternatives. Veterinární Medicína 2026a. 71(5):169-179. ISSN 1805-9392

SZABÓ, I. a kol. Sezónna dynamika výskytu *Nosema* spp. u včelstiev na základe mikroskopického vyšetrenia. XVIII. Interaktívna Konferencia Mladých Vedcov. 2026b. ISBN**:** 978-80-974608-6-0

VPLYV PREINKUBÁCIE VAJEC NA EXPRESIU ADIPONEKTÍNU V RÔZNYCH ORGÁNOCH KURACIEHO EMBRYA

Štefancová, S.[1], Pokorná B.[1], Petrovová E.[2], Luptáková L[1].
[1]*Katedra biológie a fyziológie, UVLF v Košiciach*
[2]*Katedra morfologických disciplín, UVLF v Košiciach*

ABSTRAKT
Cieľom štúdie bolo posúdenie vplyvu preinkubácie na rast embryí, vývoj tráviacich orgánov a génovú expresiu adiponektínu počas skladovania vajec (0, 3, 9 a 14 dní pri 16 °C). Vajcia boli rozdelené na preinkubované (PI) a nepreinkubované (BPI) skupiny, pričom PI vajcia boli pred štandardnou inkubáciou preinkubované 12 hodín pri 30 °C. Preinkubácia podporila embryonálny rast, najmä pri dlhšom skladovaní, zatiaľ čo hmotnosť tráviacich orgánov a histologická štruktúra nevykazovali výrazné zmeny. Adiponektín bol detegovaný vo všetkých skúmaných tkanivách a jeho génová expresia vykazovala tkanivovo špecifický charakter – zvýšená regulácia v žľaznatom žalúdku, znížená regulácia v čreve a relatívne stabilné hodnoty v svalnatom žalúdku.. Výsledky štúdie naznačujú, že preinkubácia môže zmierňovať nepriaznivé účinky dlhodobého skladovania vajec a adiponektín môže zohrávať úlohu v adaptačnej odpovedi tráviacich tkanív počas embryonálneho vývoja.

ÚVOD
Celosvetovo rastúci dopyt po hydinovom mäse a vajciach zvyšuje význam optimalizácie produkcie, pričom embryonálny vývoj, skladovanie násadových vajec a inkubačné podmienky významne ovplyvňujú životaschopnosť embryí, liahnivosť a následný rast kurčiat (Çalık a kol.., 2023; Tona a kol.., 2022; Tainika a kol.., 2023). Gastrointestinálny trakt prechádza počas embryonálneho vývoja dynamickými zmenami a jeho morfologický a funkčný vývoj môže byť ovplyvnený podmienkami skladovania a inkubácie (Akram a kol.., 2024; Alamin a kol.., 2025). Adipokíny, vrátane adiponektínu (ADPN) kódovaného génom *ADIPOQ*, predstavujú významné regulátory metabolizmu a vývoja tkanív. Adiponektín sa podieľa najmä na regulácii metabolizmu lipidov a glukózy a jeho expresia súvisí s rastom a metabolickými procesmi počas embryonálneho vývoja kurčiat (Mellouk a kol.., 2018; Cai a kol.., 2021; Kim a kol.., 2023). Jeho úloha v reakcii embrya na podmienky skladovania a preinkubácie však zostáva nedostatočne objasnená. Cieľom štúdie bolo zhodnotiť vplyv doby skladovania vajec a preinkubácie na vývoj embrya a génovú expresiu adiponektínu v gastrointestinálnom trakte kuracích embryí pomocou histologických, imunohistochemických a molekulárnych metód.

MATERIÁL A METODIKA
Oplodnené násadové kuracie vajcia línie Lohmann Brown (n = 120) boli skladované pri 16 °C počas 0, 3, 9 a 14 dní a rozdelené do skupín s preinkubáciou (PI) a bez preinkubácie (BPI). V skupine PI boli vajcia preinkubované 12 hodín pri 30 ± 0,5 °C a 60 % relatívnej vlhkosti a následne inkubované pri 37,5 ± 0,5 °C a 60 % relatívnej vlhkosti do ED9. Na ED9 boli odobraté vzorky žľaznatého, svalnatého žalúdka a čreva. Vzorky pre molekulárne analýzy boli uskladnené pri -80 °C, vzorky na histologické a imunohistochemické vyšetrenie boli fixované v Dentsovom roztoku. Pre hodnotenie génovej expresie génu *ADIPOQ bola extrahovaná celková RNA komerčným kitom (Qiagen, Nemecko), ktorá bola následne prevedená do cDNA. Génová expresia* bola stanovená pomocou qPCR. Ako referenčný gén bol použitý *GAPDH* a relatívna expresia bola vypočítaná metódou 2^−ΔΔCt vzhľadom na kontrolnú skupinu (bez skladovania). Každá reakcia bola vykonaná v troch opakovaniach. Histologická analýza bola vykonaná na 4 μm parafínových rezoch farbených H&E. Imunohistochemická detekcia adiponektínu bola vykonaná pomocou polyklonálnej králičej protilátky (1:100; MBS2027097, MyBioSource, USA) a DAB chromogénu. Intenzita DAB

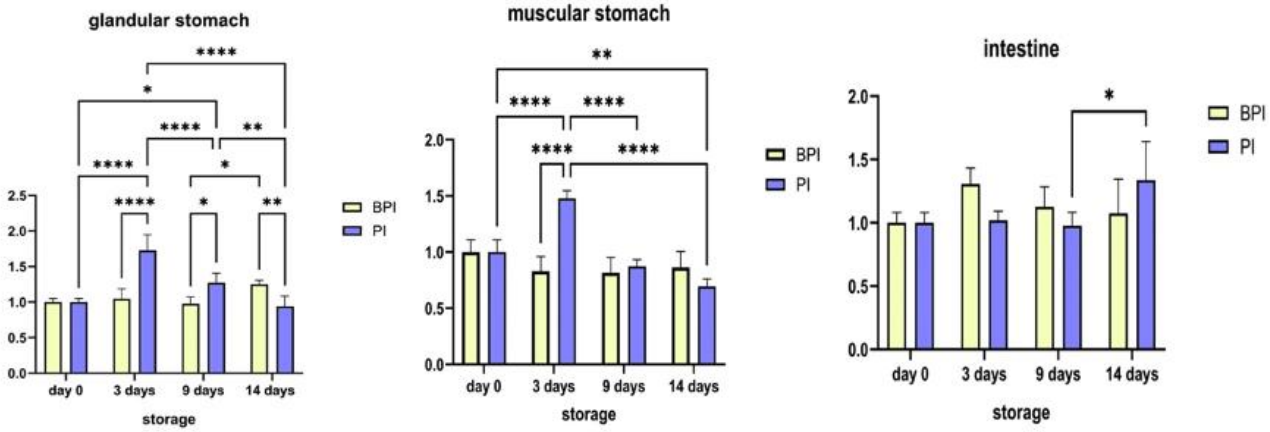
signálu bola hodnotená digitálnou analýzou zhotovených snímok, pričom z každej vzorky bolo analyzovaných päť reprezentatívnych snímok. Štatistické analýzy boli vykonané v programe GraphPad Prism 9.3. Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené pomocou dvojfaktorovej ANOVA s následnými Šidákovým a Tukeyho testom viacnásobného porovnávania. Výsledky sú uvedené ako priemer ± SD a hodnota $p < 0,05$ bolo považovaná za štatisticky významnú.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V štúdii bola hodnotená telesná hmotnosť embryí a vybraných tráviacich orgánov (svalnatatý, žľaznatý žalúdok a črevo), ako aj histologické zmeny a expresia adiponektínu v žľaznatom, svalnatom žalúdku a čreve počas skladovania vajec. V oboch skupinách bol zaznamenaný významný nárast telesnej hmotnosti embryí po 3 dňoch skladovania v porovnaní s kontrolou ($p < 0,05$), zatiaľ čo pri 9- a 14-dňovom skladovaní bola hmotnosť mierne nižšia v porovnaní so skupinami bez skladovania a 3 dňami. V skupine PI si embryá si zachovali vyššiu hmotnosť ako v skupine BPI. Hmotnosť tráviacich orgánov sa medzi skupinami signifikantne nelíšila, pričom skupina PI vykazovala pri dlhšom skladovaní stabilnejšie hodnoty. Výsledky naznačujú, že preinkubácia môže čiastočne zmierňovať negatívny vplyv dlhšieho skladovania na embryonálny rast. Dlhšie skladovanie násadových vajec môže nepriaznivo ovplyvňovať embryonálny vývoj a liahnivosť, zatiaľ čo krátkodobé skladovanie má spravidla miernejší účinok (Andri a kol.., 2024; Çam a kol.., 2022; Adriaensen a kol.., 2022). Preinkubácia môže podporovať skoršiu reaktiváciu metabolických procesov a pokračovanie embryonálneho vývoja po skladovaní (Nasri a kol.., 2019; Tainika a kol.., 2023). Histologická analýza nepreukázala medzi skupinami signifikantné morfologické ani štrukturálne zmeny tráviaceho traktu. Imunohistochemická analýza preukázala prítomnosť adiponektínu vo všetkých skúmaných tkanivách, najmä v *tunica mucosa*, epitelových bunkách a *lamina propria*, pričom v žalúdku bola imunoreaktivita pozorovaná aj v *tunica muscularis*. Hoci kvalitatívne hodnotenie nepreukázalo výrazné rozdiely v intenzite sfarbenia, analýza DAB signálu pomocou ImageJ odhalila štatisticky významné rozdiely v imunoreaktivite ($p < 0,05$). V žľaznatom a svalnatom žalúdku bola v PI skupinách najvyššia imunoreaktivita zaznamenaná po 3 dňoch a následne klesala, zatiaľ čo v čreve sa významné zvýšenie pozorovalo na 14. deň (Obrázok 1.). Tkanivovo špecifické rozdiely môžu súvisieť s rozdielnym priebehom vývoja a metabolickými požiadavkami jednotlivých častí tráviaceho traktu (Ramachandran a kol.., 2013; Cai a kol.., 2021).

Expresia génu *ADIPOQ* vykazovala tkanivovo špecifický charakter. V žľaznatom žalúdku bez preinkubácie postupne narastala a na 14. deň dosiahla približne osemnásobok kontrolnej hodnoty, pričom pri preinkubácii bol nárast nižší. V čreve bol naopak zaznamenaný postupný pokles expresie, ktorý preinkubácia taktiež čiastočne zmiernila a na 14. deň nastal nárast expresie. Svalnatý žalúdok vykazoval počas skladovania relatívne stabilnú expresiu s prechodným poklesom v PI skupine po 3 dňoch. Zmeny expresie môžu súvisieť s adaptačnou odpoveďou jednotlivých častí tráviaceho traktu na podmienky skladovania, keďže adiponektín sa podieľa na regulácii metabolizmu, lokálnej homeostáze a integrite črevného epitelu (Cai a kol.., 2021; Jeerawattanawart a kol.., 2023; Garella a kol.., 2025).

Celkovo výsledky ukazujú, že skladovanie vajec a preinkubácia ovplyvňujú embryonálny vývoj a expresiu adiponektínu rozdielne v jednotlivých častiach tráviaceho traktu. Zatiaľ čo histologická analýza nepreukázala výrazné štrukturálne zmeny, imunohistochemická a molekulárna analýza odhalila časovo a tkanivovo špecifické zmeny adiponektínu, ktoré môžu odrážať adaptačné mechanizmy vyvíjajúcich sa tkanív na podmienky skladovania.



Obr. 1. Vplyv dĺžky skladovania vajec a preinkubácie na imunoreaktivitu adiponektínu v tráviacich tkanivách kuracích embryí na ED 9.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená projektom VEGA 1/0373/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

ADRIAENSEN, H. a kol.. How Egg Storage Duration Prior to Incubation Impairs Egg Quality and Chicken Embryonic Development: Contribution of Imaging Technologies. *Front. Physiol*. 2022, vol. 13, p. 902154. ISSN 1664-042X.

AKRAM, M. a kol.. Linking gastrointestinal tract structure, function, and gene expression signatures to growth variability in broilers: a novel interpretation for flock uniformity. *Poult Sci*. 2024, vol. 103, no. 10, p. 104158. ISSN 1525-3171.

ALAMIN, M. a kol.. Histological Changes of the Mucosal Epithelium in the Chicken Intestine during Pre-and Post-Hatching Stages. *J Poult Sci*. 2025, vol. 62, no. 1, p. 2025004. ISSN 1349-0486.

Andri, F. a kol.. Effects of Hatching Eggs Storage at Room Temperature on Hatching Performance and Day Old Chick Quality of Arab Chickens. *TERNAK TROPIKA Journal of Tropical Animal Production*. 2024, vol. 25, no. 1, p. 59-64. ISSN 2503-1007.

CAI, J. a kol.. Adiponectin/adiponectin receptors mRNA expression profiles in chickens and their response to feed restriction. *Poult Sci*. 2021, vol. 100, no. 12, p. 101480. ISSN 1525-3171.

ÇALIK, Ş. a kol.. Effects of egg preheating on hatchability and chick quality in partridge and guinea fowl. *European Poultry Science*. 2023, vol. 87, no.1, p. 1-10. ISSN 0003-9098.

ÇAM, M. a kol.. Influence of egg storage time, position and turning on egg weight loss, embryonic mortality and hatching traits in chukar partridge (*Alectoris chukar*). *Italian Journal of Animal Science*. 2022, vol. 21, no.1, p. 1632–1641. ISSN 1828-051X.

GARELLA, R. a kol.. Adiponectin and gastric fundus: A potential target for gut–brain axis dysfunctions. In *Physiol Rep.* 2025, vol. 13, no. 11. ISSN 2051-817X.

JEERAWATTANAWART, S. a kol.. Regulation and function of adiponectin in the intestinal epithelial cells in response to *Trichinella spiralis* infection. *Sci Rep*. 2023, vol. 13, p. 14004. ISSN 2045-2322.

KIM, YM. a kol.. Efficient production of recombinant human adiponectin in egg white using genome edited chickens. *Front Nutr*. 2023, vol. 9, no. 1 p.1068558. ISSN 2296-861X.

MELLOUK, N. a kol.. Adipokines expression profile in liver, adipose tissue and muscle during chicken embryo development. *General and Comparative Endocrinology*. 2018, vol. 267, p. 146-156. ISSN ISSN 0016-6480.

NASRI, H. a kol.. Egg storage and breeder age impact on egg quality and embryo development. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 2020, vol. 104, no. 1, p. 257–268. ISSN 1439-0396.

RAMACHANDRAN, R. a kol.. Expression of adiponectin and its receptors in avian species. *General and Comparative Endocrinology*. 2013, vol. 190, no. 1, p. 88-95. ISSN 1095-6840.

TAINIKA, B. a kol.. Egg storage conditions and manipulations during storage: effect on egg quality traits, embryonic development, hatchability and chick quality of broiler hatching eggs. *World's Poultry Science Journal*. 2024, vol. 80, no.1, p. 75-107. ISSN 1743-4777.

TONA, K. a kol.. Chicken Incubation Conditions: Role in Embryo Development, Physiology and Adaptation to the Post-Hatch Environment. *Front Physiol.* 2022, vol. 13, 895854. ISSN 1664-042X.

EKTOPARAZITY Z ČEĽADE OVADOVITÝCH (DIPTERA: TABANIDAE)

Švirlochová K. M.[1,2], Víchová B.[1], Oboňa J.[3], Csanády A.[3], Manko P.[3], Tkoč M.[4], Dvořák L.[5], Stanko M.[1,6], Vargová L.[1], Blažeková V.[1], Zubriková D.[1]

1 Parazitologický ústav, Slovenská akadémia vied, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovensko

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

3 Katedra ekológie, Fakulta humanitných a prírodných vied, Prešovská univerzita v Prešove, 17. novembra 1, 081 16, Prešov, Slovensko

[4] Entomologické oddělení, Národní muzeum, Cirkusová 1740, CZ-193 00 Praha 9 - Horní Počernice, Česká republika

[5]Tři Sekery 21, CZ-353 01 Mariánské Lázně, Česká republika

[6] Ústav zoológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 06 Bratislava, Slovensko

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo preskúmať početnosť a druhovú diverzitu ovadov (Diptera: Tabanidae) na lokalitách situovaných prevažne v oblasti východného Slovenska. Ektoparazity boli odchytávané vo voľnej prírode pomocou sieťok pri stacionárnom vozidle alebo v okolí chovov a výskytu hospodárskych a voľne žijúcich zvierat počas ich najvyššej sezónnej aktivity v rokoch 2024 a 2025. Ovady boli určené do druhu na základe morfologických charakteristík a na molekulárnej úrovni prostredníctvom DNA barcodingu. Celkovo bolo odchytených 1 642 jedincov patriacich k 21 druhom, čo predstavuje 36,84 % doposiaľ zaznamenanej fauny Tabanidae na Slovensku. Celkovo bola zaznamenaná najvyššia abundancia druhu *Tabanus bromius* (999 jedincov, 60,8 %), nasledovali druhy *Haematopota pluvialis* (250 jedincov, 15,4 %) a *Atylotus rusticus* (158 jedincov, 9 %). Výsledky prispievajú k súčasným poznatkom o diverzite a početnosti čeľade Tabanidae na Slovensku a poukazujú na potrebu systematického monitorovania výskytu týchto ektoparazitov.

ÚVOD

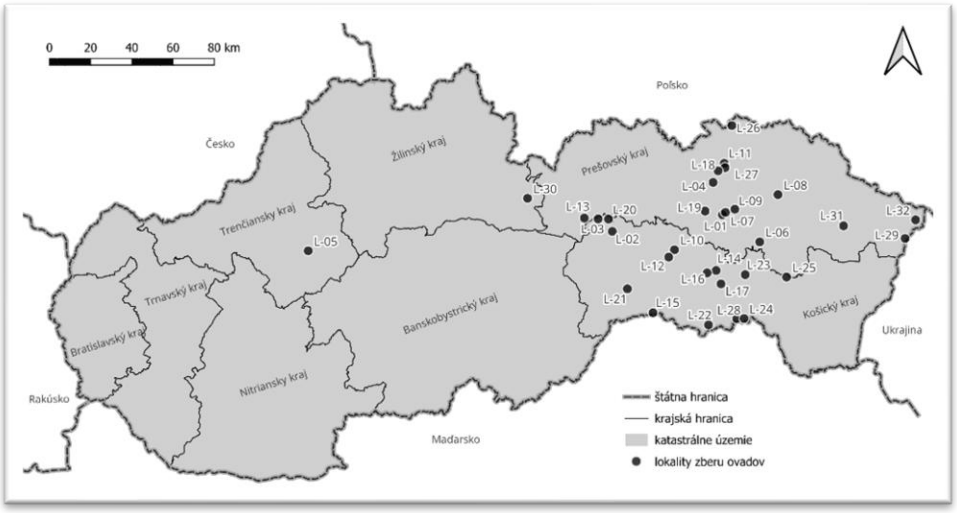
Ovadovité (Diptera: Tabanidae) sú bohato zastúpenou čeľaďou článkonožcov, rozšírenou celosvetovo v rôznych biotopoch (Baldacchino a kol., 2014). Samice ovadov sú hematofágne a známe pre svoje bolestivé cicanie krvi hostiteľa, čo z nich robí významných škodcov zvierat a ľudí. V súvislosti so spôsobom výživy samíc sú tieto ektoparazity považované taktiež za mechanické alebo biologické vektory mnohých vírusových, bakteriálnych, protozoálnych či filariárnych patogénov veterinárneho a medicínskeho významu (Krinsky, 1976, Foil, 1989, Baldacchino a kol., 2014).

V súčasnosti do čeľade patrí viac ako 4700 druhov (Bánki a kol., 2026), z toho 220 bolo detekovaných na území Európy (Pape a kol., 2015). Na Slovensku bolo zaznamenaných 57 druhov patriacich do čeľade Tabanidae, vrátane nedávneho nálezu *Haematopota ocelligera* (Chvála, 2009, Balogh, 2025).

MATERIÁL A METODIKA

Ovady boli zbierané v období rokov 2024–2025 na 32 lokalitách na Slovensku (Obr. 1). Odchyt bol vykonávaný pomocou entomologickej sieťky v okolí stacionárneho vozidla, vo vozidle alebo priamo zo zvierat. Ovady boli následne individuálne uskladnené a zmrazené v skúmavkách pri -20 °C. Druhová determinácia bola uskutočnená na základe charakteristických znakov obsiahnutých v morfologických kľúčoch (Chvála a kol., 1980, Zeegers a Schulten, 2022). Pre potvrdenie druhovej príslušnosti bola morfologická identifikácia doplnená o DNA barcoding. Izolácia genómovej DNA bola uskutočnená prostredníctvom alkalickej hydrolýzy (Guy a Stanek, 1991). Pomocou konvenčnej PCR bol amplifikovaný fragment mitochondriálneho génu kódujúceho podjednotku *I cytochróm c oxidázy* (COI), pričom boli použité špecifické primery LCO1490 a HCO2198 (Folmer a kol., 1994). Amplifikované produkty boli purifikované pomocou komerčného kitu NucleoSpin®

Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Düren, Germany) a následne obojsmerne sekvenované. Výsledné sekvencie boli upravované pomocou MEGA 12 a porovnávané s referenčnými sekvenciami v NCBI GenBank a v systéme BOLD.



Obr. 1 Lokalizácia miest odchytu ovadov na Slovensku
(Kódy lokalít L01-L032 sú vysvetlené v Tab. 1)

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Počas terénnych zberov bolo na 32 lokalitách odchytených celkovo 1 642 jedincov čeľade Tabanidae. Druhovou determináciou bolo zistené zastúpenie 21 druhov, čo predstavuje 36,84% slovenskej fauny ovadov. Celková abundancia a počet druhov zaznamenaných na jednotlivých lokalitách (druhová bohatosť – S) sú uvedené v Tab. 1. Celkovo bolo zachytených 6 rodov ovadov, pričom najpočetnejší bol rod *Tabanus* (42,9%), v rámci ktorého bolo zaznamenaných 9 druhov. Nasledovali rody *Haematopota* (4 druhy), *Hybomitra* (3 druhy), *Chrysops* (2 druhy), *Atylotus* (2 druhy) a *Silvius* (1 druh).

Kód	Lokalita	N	S	Kód	Lokalita	N	S
L-01	Bikoš (Prešov)	1	1	L-17	Košice	9	9
L-02	Bikšova	12	1	L-18	Kríže	2	2
L-03	Betlanovce	98	10	L-19	Lažany	13	4
L-04	Čergov-Lysá	116	5	L-20	Letanovce	249	9
L-05	Diviacka Nová Ves	5	3	L-21	Pača	1	1
L-06	Dubník-Červenica	50	4	L-22	Perín-Chym	2	2
L-07	Dúbrava (Prešov)	4	1	L-23	Rozhanovce	399	12
L-08	Fijaš	61	3	L-24	Skároš	5	2
L-09	Fintice	89	4	L-25	Stankovce	106	5
L-10	Turzov (Gelnica)	1	1	L-26	Stebnícka Huta	4	2
L-11	Hervartov	7	3	L-27	Šiba	103	6
L-12	Helcmanovce	1	1	L-28	Trstené pri Hornáde	8	3
L-13	Hranovnica	2	2	L-29	Uličˇ	2	2
L-14	Hrešná	2	2	L-30	Východná	9	2
L-15	Hrhov	213	13	L-31	Vyšný Hrušov	2	1
L-16	Jahodná	64	4	L-32	Zboj	2	1

Tab. 1. Celková abundancia (N) a druhová bohatosť (S) na jednotlivých lokalitách zberu

Celkovo bol najpočetnejším zaznamenaným druhom *Tabanus bromius* Linnaeus, 1758, ktorého jedinci tvorili 60,8% celkového počtu a dominovali takmer na všetkých sledovaných lokalitách. Druhým najpočetnejším bol druh *Haematopota pluvialis* (Linnaeus, 1758), ktorý

tvoril 15,4%. Podobne aj predchádzajúce štúdie na území Slovenska vyhodnotili tieto dva druhy ako najpočetnejšie (Gunárová, 1970; Balogh, 2025). V širšom kontexte ide o najrozšírenejšie druhy ovadov aj v iných európskych krajinách (Baldacchino a kol. 2017). Tretia najvyššia abundancia bola zaznamenaná pri druhu *Atylotus rusticus* (Linnaeus, 1767), ktorého jedince tvorili 9% všetkých ovadov. Pri tomto druhu je zaujímavé, že väčšina jedincov bola zaznamenaná len na dvoch lokalitách (L-03, L-20). Tento nález je v súlade s ekologickými charakteristikami druhu podľa Chválu a kol. (1980), ktorý opisuje *A. rusticus* ako miestami hojný druh, najmä na vlhkých lúkach a pastvinách. Z celkového počtu 1 642 jedincov bolo samčieho pohlavia len 10 jedincov (0,61%), zvyšných 1 632 jedincov bolo samičieho pohlavia (99,39%). Z hľadiska druhovej príslušnosti patrilo 7 samcov k druhu *T. bromius*, ďalšie 2 jedince k druhu *Atylotus loewianus* (Villeneuve, 1920) a posledný samec k druhu *Hybomitra muehlfeldi* (Brauer, 1880).
Sekvencie boli uložené v NCBI GenBank pod prístupovými číslami PZ185301-PZ185305, Pz188214-PZ188244 a v systéme BOLD pod ID TBSK001-26 až TBSK036-26.

POĎAKOVANIE

Štúdia bola realizovaná vďaka finančnej podpore projektov VEGA 2/0051/24; APVV SK-PL-25-0018 a PAS-SAS-2024-16.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BALDACCHINO, F. a kol.. Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect Genet Evol.* 2014, vol. 28. ISSN 1567-7257.

BALOGH, A. *Fauna ovadov (Diptera: Tabanidae) Slovenska:* dizertačná práca. Bratislava: UK, 2025. 146 p.

BÁNKI, O. a kol.. Tabanidae. *Catalogue of Life Foundation.* Netherlands: Amsterdam, 2025. Available from:

FOIL, L. D. Tabanids as Vectors of Disease Agents. *Parasitology Today*. 1989, vol. 5, no. 3, pp. 88-96. ISSN 0169-4758.

FOLMER, O. a kol.. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1994, vol. 3, no. 5, pp. 294-299. ISSN 1053-6426.

GUNÁROVÁ, V. Sezónna dynamika ovadov (Tabanidae, Diptera) na hovädzom dobytku vo východoslovenskom kraji. *Ac. Rev. Natur. Mus. Nat. Slov.* 1970, vol. 16, no. 2, pp. 45-110. ISSN 0139-5424.

GUY, E. C. and STANEK, G. Detection of *Borrelia burgdorferi* in patients with Lyme disease by the polymerase chain reaction. *J Clin Pathol.* 1991, vol. 44, no. 7, pp. 610-611. ISSN 2995- 8598.

CHVÁLA M. Tabanidae Latreille, 1802. In JEDLIČKA L. a kol. *Checklist of Diptera of the Czech Republic and Slovakia.* El. verzia 2. 2009, http://zoology.fns.uniba.sk/diptera2009. ISBN 978-80-969629-4-5.

CHVÁLA, M. a kol. Krevsající mouchy a střečci. Fauna ČSSR. Praha: Academia, 1980. 540 s.

KRINSKY W. L. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J Med Entomol*. 1976, vol. 13, no. 3, pp. 225-275. ISSN 0022-2585.

PAPE, T. a kol.. Fauna Europaea: Diptera – Brachycera. *Biodivers Data J.* 2015, vol. 3. ISSN 1314-2828.

ZEEGERS, T. and SCHULTEN, A. *Field Guide to Flies with Three Pulvilli Families of Homeodactyla of Northwest Europe*. Graveland : Stichting Jeugdbondsuitgeverij, 2022. 256 s. ISBN 978-90-5107-068-2.

TRANSKRIPTOMICKÁ ANALÝZA PERIFÉRNEJ KRVI PO VZDIALENOM POSTKONDICIONOVANÍ

Urbanová A.[1], Berecká J.[2], Kecerová Z.[3], Mucha R.[1]
[1]*Neurobiologický ústav, Biomedicínske centrum SAV, v.v.i., Košice*
[2]*Katedra bunkovej biológie, Ústav biologických a ekologických vied, Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice*
[3]*Neurologické oddelenie, Fakultná Nemocnica AGEL Košice-Šaca, Košice*

ABSTRAKT
Periférna krv odráža dynamické zmeny génovej expresie po ischémii aj po kondicionovaní, a preto predstavuje vhodné médium na identifikáciu génov zapojených do ischemickej tolerancie (IT). V projekte bol analyzovaný transkriptóm periférnej krvi potkanov po letálnej globálnej ischémii a po jej kombinácii s postkondicionovaním s cieľom odhaliť gény súvisiace s neuroprotektívnou odpoveďou. Pozorovali sme mRNA expresiu štyroch génov – *PLLP, PDE4DIP, AGBL3 a ARFGEF2*, ktoré regulujú myelín, mikrotubuly a vezikulárny transport, teda sa podieľajú na udržiavaní bunkovej stability. Analýza ukázala, že postkondicionovanie selektívne moduluje tieto gény: downregulácia *PLLP, PDE4DIP* a *AGBL3* v skupinách skorého respektíve neskorého postkondicionovania naznačujú útlm stresovej aplikácie dráh spojených s myelínom a cAMP/mikrotubulovými mikrodoménami. Upregulácia *ARFGEF2* v skupine skorého postkondicionovania naznačuje čiastočnú obnovu vezikulárneho transportu. Získané profily môžu prispieť k pochopeniu molekulárnych mechanizmov IT a podporiť vývoj biomarkerov pre včasnú diagnostiku akútnej cievnej mozgovej príhody a personalizáciu liečby.

ÚVOD
Cievna mozgová príhoda (CMP) patrí medzi najvýznamnejšie príčiny úmrtí v rámci neprenosných ochorení a jej výskyt aj mortalita pravdepodobne porastú v dôsledku demografických zmien a životného štýlu (Feigin a kol., 2025). Jednou zo sľubných neuroprotektívnych stratégií je ischemické kondicionovanie, aktivujúce endogénne ochranné mechanizmy. Tento koncept bol pôvodne opísaný pri myokarde (Murry a kol., 1986) a následne potvrdený aj v mozgovom tkanive (Kitagawa a kol., 1990). Najväčší klinický potenciál vykazuje postkondicionovanie – stimul indukujúci ischemickú toleranciu (IT) je aplikovaný po ischémii. Subletálne ischemické podnety môžu byť lokálne alebo vzdialené (RIC – Remote Ischemic Conditioning), kde sa využívajú krátke cykly kompresie končatiny (Wang a kol., 2015). Kondicionovanie vyvoláva dynamické zmeny v génovej a proteínovej expresii – v skorej fáze dochádza k rýchlym posttranslačným modifikáciám a metabolickým zmenám, v neskorej k aktivácii transkripcie a syntéze nových proteínov (Zhao a kol., 2012; Stetler a kol., 2014). Analýza periférnej krvi po letálnej ischémii a po postkondicionovaní môže odhaliť biomarkery akútnej CMP a mechanizmy spojené s indukciou IT. Biomarkery môžu zlepšiť diagnostiku, monitorovanie aj individualizáciu kondicionačných protokolov. Súčasné klinické ukazovatele môžu byť doplnené o personalizované -omické markery, ktoré lepšie zachytia individuálny priebeh CMP (Simpkins a kol., 2020). Preto je potrebné ďalšie skúmanie molekulárnych mechanizmov a ich odrazov v periférnej krvi.

MATERIÁL A METODIKA
Na samcoch potkana kmeňa Wistar albino bola indukovaná globálna letálna cerebrálna ischémia (GCI) podľa Pulsinelli & Brierley (1979), resp. postkondicionovanie formou ischemizácie kostrového svalu ľavej zadnej končatiny. Zo zvierat boli vytvorené študijné skupiny s počtom 5 zvierat/skupina, uvedené v nasledujúcej tabuľke:

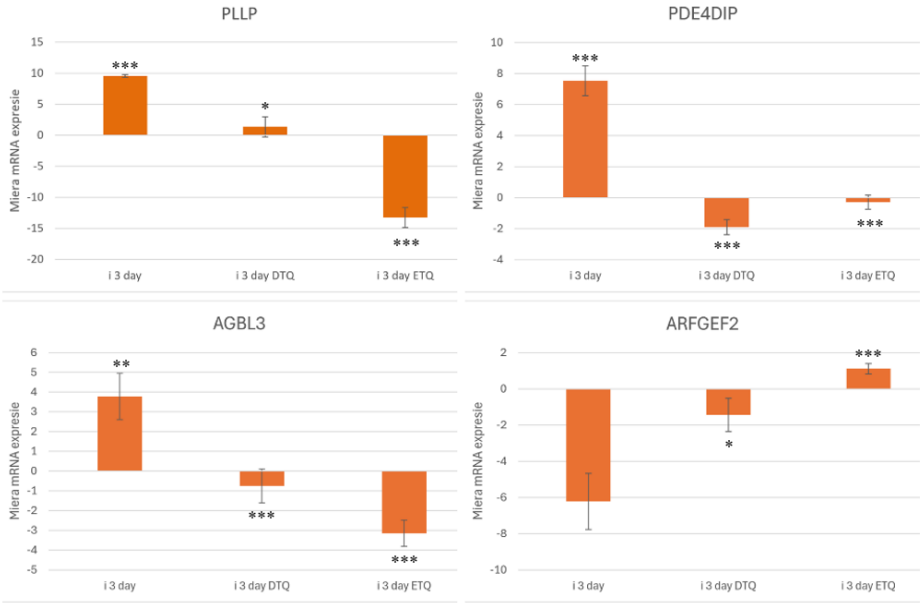
I 3 day	GCI; po 3 dňoch odber krvi
I 3 day ETQ (Early Tourniquet)	GCI; po 1 hodine postkondicionovanie; po 3 dňoch odber krvi
I 3 day DTQ (Delayed Tourniquet)	GCI; po 48 hodinách postkondicionovanie; 3 dni po postkondicionovaní odber krvi
Skupiny negatívnych kontrol – vytvorené ku všetkým vyššie uvedeným skupinám	rovnaké operačné postupy ako v testovných skupinách, avšak bez aplikácie ischémie

Tab. 1. Zoznam študijných skupín a procesy, ktoré v nich boli na potkanov aplikované

Z bunkovej frakcie krvi bola izolovaná mRNA, ktorú sme opracovali DNAzou. Na základe výsledkov microarray celotranskriptómovej analýzy boli vybraté určité gény, ktoré boli následne ďalej analyzované pomocou kvantitatívnej real time PCR. Na záver prebehlo vyhodnotenie dát in silico.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po analýze génovej expresie vybraných génov a vyhodnotení štatistickej významnosti boli zhotovené grafy (Obrázok 1), zobrazujúce rozdiely v expresii medzi skupinami I 3 day, I 3 day DTQ a I 3 day ETQ (všetky normalizované voči negatívnej kontrole, predstavujúcej 0 hodnotu na osi X).



Obr. 1. Porovnanie miery expresie mRNA jednotlivých génov (PLLP, PDE4DIP, AGBL3, ARFGEF2) medzi študijnými skupinami, normalizované voči negatívnej kontrole (0 hodnota na osi X). Štatisticky významné zmeny expresie sú zvýraznené pomocou *, kde platí p≤0,1 = *, p≤0,005 = **, p≤0,001 = ***.

PLLP je exprimovaný v centrálnej aj periférnej nervovej sústave. Je súčasťou myelínu a je zapojený do jeho biosyntézy. Pravdepodobne sa podieľa aj na remyelinzačných procesoch počas regenerácie nervov a na axonálnom transporte (Shulgin a kol., 2021).
PDE4DIP, známy aj ako *MMGL* – myomegalín je scaffold proteín, ktorý zabezpečuje reguláciu lokálnej cAMP signalizácie a mikrotubulovú organizáciu (Roubin a kol., 2013).
AGBL3 (CCP3) je karboxypeptidáza, podieľajúca sa na jemnej regulácii mikrotubulov prostredníctvom deglutamylácie a deaspartylácie. Vytvára Δ2-tubulín, čo je posttranslačná modifikácia typická pre neuróny a ciliované bunky (Tort a kol., 2014). Pozorovaná

downregulácia *PLLP*, *PDE4DIP* a *AGBL3* po postkondicionovaní pravdepodobne odráža stabilizáciu remyelinzačných procesov, cAMP/PKA mikrodomén a cytoskeletu, resp. mikrotubulov, oproti zrejmému kompenzačnému zvýšeniu expresie týchto proteínov počas akútnej ischémie (stresu).

ARFGEF2 (BIG2) sa podieľa na regulácii vezikulárneho transportu a udržiavaní štruktúry endozómov a Golgiho aparátu (Shin a kol., 2004). Znížená expresia tohto génu po ischémii môže odrážať zlyhanie transportného systému a integrity Golgiho aparátu, zatiaľ čo zvýšenie expresie v skorej fáze postkondicionovania by predstavovalo adaptívnu odpoveď, ktorá zlyhanie opravuje. Downregulácia v skupine neskorého postkondicionovania môže znamenať, že k neuroprotekcii dochádza skrz iné procesy, nie napravenie transportného systému. Výsledky práce ukazujú, že postkondicionovanie zasahuje do biologických dráh kľúčových pre neuroprotektívnu odpoveď.

POĎAKOVANIE

Práca bola podporená grantom VEGA 2/0101/24.

POUŽITÁ LITERATÚRA

FEIGIN, V. L. a kol. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. *International Journal of Stroke.* 2025, roč. 20, č. 2, s. 132–144. ISSN 1747-4930.

KITAGAWA, K. a kol. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Research.* 1990, roč. 528, č. 1, s. 21–24. ISSN 0006-8993.

MURRY, C. E., JENNINGS, R. B., REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986, roč. 74, č. 5, s. 1124–1136. ISSN 0009-7322.

PULSINELLI, W. A., BRIERLEY, J. B. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke.* 1979, roč. 10, č. 3, s. 267–272. ISSN 0039-2499.

ROUBIN, R. a kol. Myomegalin is necessary for the formation of centrosomal and Golgi-derived microtubules. *Biology* Open. 2013, roč. 2, č. 2, s. 238–250. ISSN 2046-6390.

SHIN, H. W. a kol. BIG2, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors: its localization to recycling endosomes and implication in the endosome integrity. *Molecular Biology of the Cell.* 2004, roč. 15, č. 12, s. 5283–5294. ISSN 1059-1524.

SIMPKINS, A. N. a kol. Biomarker application for precision medicine in stroke. *Translational Stroke Research*. 2020, roč. 11, s. 615–627. ISSN 2040-7378.

STETLER, R. A. a kol. Preconditioning provides neuroprotection in models of CNS disease: paradigms and clinical significance. *Progress in Neurobiology.* 2014, roč. 114, s. 58–83. ISSN 0301-0082.

SHULGIN, A. A. a kol. Plasmolipin and Its Role in Cell Processes. *Molecular Biology.* 2021, roč. 55, č. 6, s. 773–785. ISSN 0026-8933.

WANG, Y. a kol. Ischemic conditioning-induced endogenous brain protection: Applications pre-, per- or post-stroke. *Experimental Neurology.* 2015, roč. 272, s. 26–40. ISSN 0014-4886.

TORT, O. a kol. The cytosolic carboxypeptidases CCP2 and CCP3 catalyze posttranslational removal of acidic amino acids. *Molecular Biology of the Cell*. 2014, roč. 25, č. 19, s. 3017–3027. ISSN 1059-1524.

ZHAO, H. a kol. From rapid to delayed and remote postconditioning: the evolving concept of ischemic postconditioning in brain ischemia. *Current Drug Targets*. 2012, roč. 13, č. 2, s. 173–187. ISSN 1389-4501.

VYUŽITIE KURACIEHO MODELU *EX VIVO* NA HODNOTENIE SLIZNIČNEJ IMUNITNEJ ODPOVEDE NA RÔZNE KONCENTRÁCIE *SAMONELLA* ENTERITIDIS

Vinclérová V., Kiššová Z., Karaffová V.
Katedra morfologických disciplín, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Salmonelóza patrí medzi najvýznamnejšie alimentárne ochorenia a hydina predstavuje významný rezervoár baktérie *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis. Cieľom práce bolo pomocou *ex vivo* modelu ileálnych explantov kurčiat zhodnotiť lokálnu slizničnú imunitnú odpoveď na rôzne koncentrácie *Salmonella* Enteritidis PT4 (10^7, 10^8 a 10^9 CFU/ml) a určiť vhodnú infekčnú dávku pre ďalšie experimentálne využitie modelu. Relatívna expresia génov pre prozápalové interleukíny 8 a 18 (IL-8, IL-18) a aviárne β-defenzíny AvBD2 a AvBD4 bola analyzovaná pomocou RT-qPCR. Produkcia IL-8 a IL-18 bola následne hodnotená metódou ELISA. Expozícia *Salmonella* Enteritidis vyvolala zmeny expresie sledovaných génov a zvýšenú produkciu prozápalových cytokínov, pričom výrazná odpoveď bola zaznamenaná najmä pri aviárnych β-defenzínoch. Koncentrácia 10^7 CFU/ml vyvolala merateľnú lokálnu imunitnú odpoveď pri súčasnom zachovaní tkanivovej integrity, a preto sa javí ako najvhodnejšia infekčná dávka pre ďalšie využitie modelu.

ÚVOD

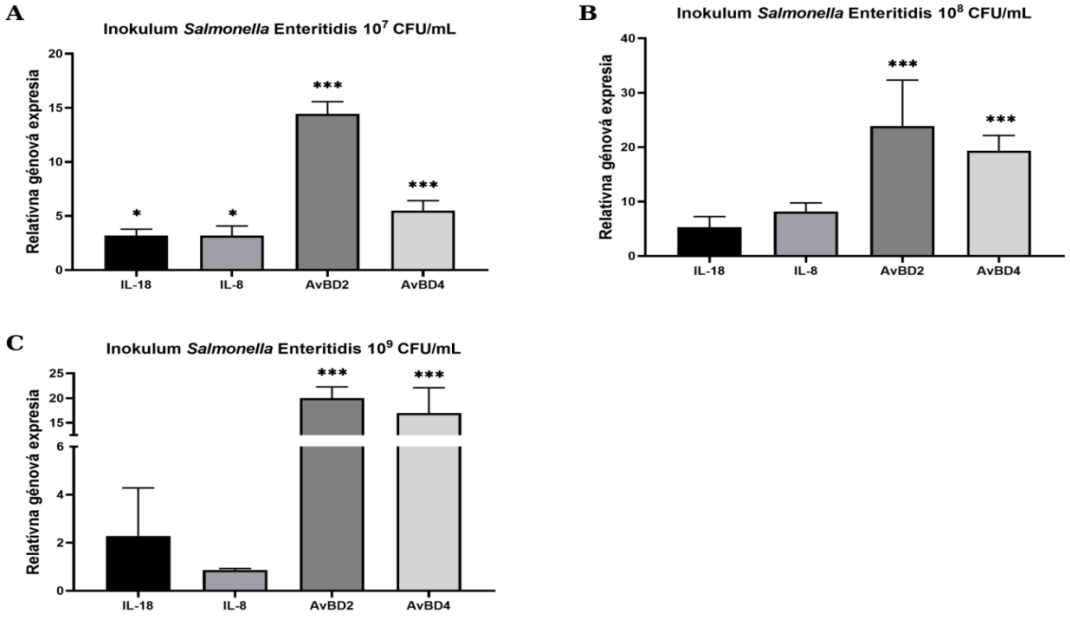
Salmonella spp. po vstupe do tráviaceho traktu adherujú k črevnému epitelu, prenikajú cez bariéru a aktivujú lokálnu vrodenú imunitnú odpoveď. Poznanie týchto interakcií je dôležité pre vývoj účinných preventívnych a terapeutických stratégií (Zhang a kol., 2014). Súčasťou včasnej slizničnej odpovede na bakteriálnu infekciu je produkcia prozápalových cytokínov a antimikrobiálnych peptidov. IL-8 podporuje migráciu heterofilov a ďalších buniek imunitného systému do miesta prebiehajúcej infekcie, zatiaľ čo IL-18 prispieva k regulácii zápalovej odpovede. Aviárne β-defenzíny sú významnou zložkou vrodenej imunity hydiny a uplatňujú sa v prvej línii obrany slizníc proti bakteriálnym patogénom. Expresia β-defenzínov môže byť modulovaná v reakcii na kontakt črevných epitelových buniek so *Salmonella* Enteritidis a AvBD4 zároveň vykazuje priamu antimikrobiálnu aktivitu (Derache a kol., 2009; Yacoub a kol., 2015). Zmeny expresie IL-8, IL-18, AvBD2 a AvBD4 preto umožňujú charakterizovať lokálnu zápalovú a antimikrobiálnu odpoveď črevného tkaniva na *S.* Enteritidis. Cieľom práce bolo pomocou *ex vivo* modelu ileálnych explantov kurčiat zhodnotiť lokálnu slizničnú imunitnú odpoveď na rôzne koncentrácie *Salmonella* Enteritidis PT4 na základe expresie vybraných génov a produkcie cytokínov IL-8 a IL-18 a určiť vhodnú infekčnú dávku pre ďalšie experimentálne využitie modelu.

MATERIÁL A METODIKA

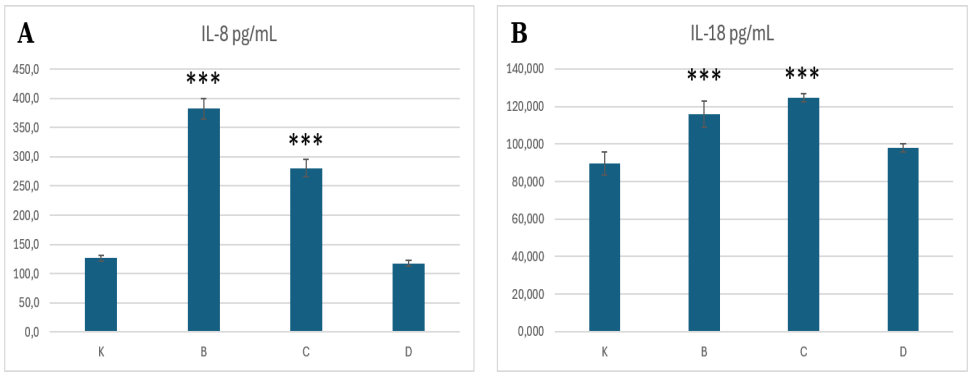
Brojlerové kurčatá Ross 308 boli humánne usmrtené po anestézii oxidom uhličitým. Z odobratého ileálneho segmentu boli pomocou sterilných bioptických ihiel s piestom pripravené črevné explanty (Kiššová a kol., 2025). V experimente bola použitá *Salmonella enterica* sérovar Enteritidis PT4 (VRI, Brno). Baktérie boli kultivované v LB bujóne a ich koncentrácia stanovená meraním optickej denzity pri 600 nm (Kiššová a kol., 2025). Explanty boli rozdelené do kontrolnej skupiny a troch skupín infikovaných *S.* EnteritidisPT4 v koncentráciách 10^7, 10^8 a 10^9 CFU/ml počas 4 hodín. Celková RNA bola izolovaná pomocou RNeasy Mini Kitu podľa pokynov výrobcu. Po reverznej transkripcii (iScript cDNA Synthesis Kit) bola relatívna expresia génov stanovená metódou RTqPCR. Hodnoty Cq boli normalizované voči ref. génu GAPDH a relatívna expresia bola vypočítaná metódou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Koncentrácie IL-8 a IL-18 boli stanovené metódou ELISA a vyjadrené v pg/ml.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Expozícia ileálnych explantov rôznym koncentráciám *S.* Enteritidis PT4 ovplyvnila expresiu všetkých sledovaných génov (graf č. 1). Najvýraznejšia odpoveď bola zaznamenaná hlavne pri koncentrácii 10^8 CFU/ml, pri génoch AvBD2 a AvBD4. Pri dávke 10^9 CFU/ml bola expresia pre β-defenzíny stále zvýšená, zatiaľ čo expresia IL-8 a IL-18 bola nižšia ako pri koncentrácii 10^8 CFU/ml. Výsledky tak poukazujú na aktiváciu zápalovej a antimikrobiálnej odpovede ileálnej sliznice, ktorej intenzita nebola priamo úmerná zvyšujúcej sa bakteriálnej koncentrácii. Podobné zmeny expresie týchto cytokínov v čreve kurčiat infikovaných *S.* Enteritidis zaznamenali Berndt a kol. (2007). Výrazná expresia AvBD2 a AvBD4 poukazuje na zapojenie vrodených antimikrobiálnych mechanizmov sliznice (Derache a kol., 2009), pričom antimikrobiálnu aktivitu AvBD4 potvrdili aj Yacoub a kol. (2015). Naše výsledky sú v súlade s predchádzajúcimi štúdiami (Swaggerty a kol., 2014; Chang a kol., 2020). Zvýšené koncentrácie cytokínov pri 10^7 a 10^8 CFU/ml potvrdili zápalovú odpoveď na proteínovej úrovni. Pri 10^9 CFU/ml koncentrácie cytokínov opäť klesli približne k hodnotám kontrolnej skupiny, čo naznačuje, že zvyšovanie bakteriálnej záťaže už nemusí viesť k ďalšiemu zosilňovaniu cytokínovej odpovede (graf č. 2). Pre štandardizáciu modelu je potrebná dávka vyvolávajúca merateľnú imunitnú odpoveď bez poškodenia tkaniva. Koncentrácia 10^7 CFU/ml pri 4-hodinovej expozícii aktivovala sledované cytokíny a β-defenzíny, čo podporuje význam optimalizácie stimulácie (Mátis a kol., 2024). *Ex vivo* model ileálnych explantov umožnil zachytiť odlišnú lokálnu slizničnú odpoveď na jednotlivé koncentrácie *S.* Enteritidis PT4. Najvýraznejšia génová odpoveď bola zaznamenaná pri 10^8 CFU/ml, avšak koncentrácia 10^7 CFU/ml predstavovala najvhodnejší kompromis medzi aktiváciou zápalových a antimikrobiálnych mechanizmov a zachovaním tkanivovej integrity. Výsledky potvrdzujú vhodnosť *ex vivo* modelu na štúdium lokálnej imunitnej odpovede počas infekcie *S.* Enteritidis a jeho využitie pri predbežnom hodnotení probiotík v hydinárstve.



Graf 1. Relatívna expresia génov IL-18, IL-8, AvBD2 a AvBD4 v ileálnych explantoch kurčiat po expozícii Salmonella* Enteritidis *PT4 v koncentráciách 10^7CFU/ml (A), 10^8 CFU/ml (B) a 10^9 CFU/ml (C)



Graf 2.Koncentrácia cytokínov IL-8 (A) a IL-18 (B) v ileálnych explantoch kurčiat stanovená metódou ELISA po expozícii rôznym koncentráciám Salmonella* Enteritidis *PT4 v koncentráciách 10^7 CFU/ml (B), 10^8 CFU/ml (C) a 10^9 CFU/ml (D)

POĎAKOVANIE

Tento výskum bol podporený Vedeckou grantovou agentúrou Ministerstva školstva, výskumu, vývoja a mládeže Slovenskej republiky a Slovenskej akadémie vied v rámci grantu č. VEGA 1/0010/26 a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja v rámci grantu č. SK-HU-24-006.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BERNDT, A. a kol. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infection and Immunity.* 2007, roč. 75, č. 12, s. 5993–6007. ISSN 0019-9567. Dostupné na: https://doi.org/10.1128/IAI.00695-07

CHANG, C. a kol. Effects of multi-strain probiotic supplementation on intestinal microbiota, tight junctions, and inflammation in young broiler chickens challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *Asian-AustralasianJournal of AnimalSciences.* 2020, roč. 33, č. 11, s. 1797–1808. ISSN 1011-2367. Dostupné na: https://doi.org/10.5713/ajas.19.0427

DERACHE, C. a kol. Differential modulation of β-defensin gene expression by *Salmonella* Enteritidis in intestinal epithelial cells from resistant and susceptible chicken in bredlines. *Developmental and Comparative Immunology.* 2009, roč. 33, č. 9, s. 959–966. ISSN 0145-305X. Dostupné na: https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.03.005

KIŠŠOVÁ, Z. a kol. Research note: Utilizing a novel chicken ileal explant model to assess the efficacy of probiotic *Limosilactobacillus reuteri* CCM 9425 against *Salmonella* Enteritidis infection. *Poultry Science.* 2025, roč. 104, č. 4, článok 104909. ISSN 0032-5791. Dostupné na: https://doi.org/10.1016/j.psj.2025.104909

MÁTIS, G. a kol. Immunomodulatory properties of chicken cathelicidin-2 investigated on an ileal explant culture. *Veterinary Research Communications.* 2024, roč. 48, č. 4, s. 2527–2535. ISSN 0165-7380. Dostupné na: https://doi.org/10.1007/s11259-024-10428-7

SWAGGERTY, C. L. a kol. Selection for pro-inflammatory mediatorsyields chickens with increased resistance against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *PoultryScience.* 2014, roč. 93, č. 3, s. 535–544. ISSN 0032-5791. Dostupné na: https://doi.org/10.3382/ps.2013-03559

YACOUB, H. A. a kol. Antimicrobial activities of chicken β-defensin 4 and 10 peptide sagainst pathogenic bacteria and fungi. *Frontiers in Cellular and InfectionMicrobiology.* 2015, roč. 5, článok 36. ISSN 2235-2988. Dostupné na: https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00036

ZHANG, T. a kol. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis modulates intestinal epithelial miR-128 levels to decrease macrophage recruitment via macrophagecolony-stimulating factor. *The Journal of Infectious Diseases.* 2014, roč. 209, č. 12, s. 2000–2011. ISSN 0022-1899. Dostupné na: https://doi.org/10.1093/infdis/jiu006

VYUŽITIE REGENERAČNEJ MEDICÍNY PRI TERAPII POŠKODENÉHO TKANIVA U PSOV S CHOROBAMI CHRBTICE A MIECHY V KLINICKEJ PRAXI

Zelezník P., Kuricová M.
Klinika malých zvierat, UVLF v Košiciach

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv doplnkovej terapie kondiciovaným médiom mezenchýmových kmeňových buniek (MKB-KM), na funkčné zotavenie psov s ochoreniami chrbtice a miechy. Izolované MKB spĺňali kritériá ISCT (vysoká expresia CD29/CD44, nízka CD34/CD45) a kondiciované nebunkové médium bolo podávané počas chirurgickej dekompresie topicky a tiež systémovo vo forme intravenóznej infúzie v stanovených intervaloch. V prospektívnej časti výskumu bola u 14 z 45 zvierat s ochorením chrbtice a miechy liečených chirurgickou dekompresiou na Klinike malých zvierat v období 2023-2026 použitá aj doplnková terapia s MKB-KM. Neurologický status bol hodnotený modifikovaným Frankelovým skóre (MFS) pri prijatí, na 14. a 150. deň. Prevažovali chondrodystrofické plemená (71 %) a diagnóza IVDD (73 %); dlhší čas do terapie súvisel s horším funkčným výsledkom MFS ($p = 0,035$) po terapii. Skupina s MKB-KM mala závažnejší vstupný deficit (medián MFS 4,5 vs. 4,0; $p = 0,0033$), napriek tomu bol podiel dobrých výsledkov na 14. aj 150. deň medzi skupinami zhodný ($p = 1,000$ v oboch prípadoch).

ÚVOD

Po primárnom poškodení tkaniva priamou mechanickou silou pri traume dochádza k primárnemu a následne sekundárnemu poškodeniu miechy, ktoré kaskádou množstva rôznych patologických procesov vedie k výraznej strate buniek, vyplaveniu cytotoxických látok a vytváraniu cystických dutín v parenchýme miechy. Najčastejšou mechanickou silou je kompresia miechy okolitými štruktúrami (medzistavcové platničky, kostné fragmenty, hematóm). Medikamentózna liečba týchto ochorení nie je preto presne stanovená a doterajšie metódy konzervatívneho manažmentu sú nepodložené alebo kontroverzné. Chirurgické riešenie kompresívneho ochorenia miechy vykazuje vyššie percento zotavenia pacientov, rýchlejší návrat do pôvodného stavu a nižšie riziko rekurencie ochorenia, najmä pri závažných neurologických deficitoch (Olby a kol., 2022). Terapia založená na mezenchymálnych dospelých kmeňových bunkách vo všeobecnosti moduluje oxidačný stres a vylučované cytokíny a rastové faktory. Tým znižuje negatívne pôsobenie sekundárneho poškodenia CNS po jeho traume a potenciálne zlepšuje regeneračné schopnosti nervového tkaniva resp. podporuje zachovanie nepoškodených neurónov a ich plasticitu, čím môže urýchliť neurologickú rekonvalescenciu.

MATERIÁL A METODIKA

U zvierat ošetrených chirurgickou terapiou neurologických ochorení chrbtice a miechy na pracovisku Kliniky malých zvierat v rokoch 2023 až 2026 sme okrem základných epidemiologických údajov (postihnuté plemená, BCS, postihnutý segment) zaznamenali skóre neurologickej dysfunkcie (Modified Frankel Score - MFS).

Stupeň MFS	Klinická prezentácia
0	Bez bolestivosti a/alebo neurologických deficitov
1	Len bolestivosť bez ataxie alebo neurologických deficitov
2	Ambulatórna para/tetraparéza alebo ataxia
3	Non-ambulatórna para/tetraparéza
4	Para/tetraplégia so zachovanou citlivosťou na panvových končatinách a/alebo na chvoste
5	Para/tetraplégia bez hlbokej citlivosti na panvových končatinách a/alebo na chvoste

Tab. 1. Invertovaná modifikovaná Frankelova škála (Martin a kol., 2020).

Na základe výsledkov klinického, neurologického vyšetrenia a vyšetrenia vyššou zobrazovacou diagnostikou je stanovená presná lokalizácia, diagnóza, poskytnutá indikovaná terapia a zaznamenaný výsledok terapie na 14. a 150. deň. V prospektívnej časti štúdie sme okrem tradičnej chirurgickej terapie aplikovali nebunkovú terapiu založenú na mezenchymálnych dospelých kmeňových bunkách 14 zvieratám, ktorých majitelia súhlasili zo zaradením do klinickej štúdie po informovanom súhlase v experimentálnom modeli schválenom etickou komisiou UVLF.

Mezenchymálne kmeňové bunky (MKB) použité na výrobu kondiciovaného média (KM-MKB) boli izolované a kultivované metódou vyvinutou a popísanou viacerými autormi (Humenik a kol., 2021). Na charakterizáciu buniek bola vykonaná imunofenotypizácia pomocou komerčne dostupných metód na prítomnosť štandardných CD markerov CD29, CD44, CD90 a na absenciu CD34 a CD45. Pre prípravu kondiciovaného média sme použili P2-P8 pasáže MKB, pri kofluencii buniek 70-90%. Bunky boli pred prípravov MKB-KM kultivované 24-72h bez fetálneho bovinného séra a spolu s filtráciou cez 0,2 μm sitko sme zabezpečili aby médium neobsahovalo samotné MKB alebo molekuly odvodené od fetálneho bovinného séra. Pri terapii chirurgickou dekompresiou bolo MKB-KM podávané topickou aplikáciou rozpusteného MKB-KM v hemostatickej želatínovej špongii (Surgispon standard) a priložené k mieche epidurálne alebo subarachnoidálne po durotómii, zároveň im bolo podané aj MKB-KM systémovo v intravenóznej infúzií (rýchlosť podávania infúzie 10% NaCl 2ml/kg/hod vrátane objemu KM v dávke 1 ml/10 kg). Systémovo bolo podávané aj na 1., 3. a 5. deň po iniciálnom chirurgickom zákroku.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Najčastejšie zastúpeným plemenom bol francúzsky buldoček (n=11) a jazvečík (n=8), spolu tvorili chondrodystrofické plemená 71 % súboru. Najčastejšou diagnózou bola IVDD (extrúzia/protrúzia disku, 73 % prípadov), najčastejšie postihnutým segmentom torakolumbálny úsek Th3–L3 (71,1 %), nasledovaný cervikálnym (17,8 %) a lumbosakrálnym (11,1 %). Prevažujúcou terapiou bola hemilaminektómia (77,8 %) a ventrálny slot (17,8 %) a v prípade fraktúr bola dekompresívna procedúra doplnená o osteosyntézu (4,4 %). Doplnková terapia MKB-KM bola podaná u 14/45 pacientov (31 %). Dlhší odklad terapie súvisel s horším MFS (Spearman $\rho = -0{,}318$; $p = 0{,}035$), sledovanom pri príjme zvieraťa na naše pracovisko. Zaznamenali sme BCS ≥6 (mierna nadváha až obezita) u 29 z 45 pacientov (64 %) — teda väčšina súboru bola nad ideálnou telesnou kondíciou.

Prietoková cytometria AT-MKB (pasáž P4; Tab. 2) potvrdila fenotyp zodpovedajúci minimálnym kritériám ISCT (Dominici a kol., 2006): vysoká expresia CD29 (99,4 %) a CD44 (96,9 %), v súlade so štúdiami (Bearden a kol., 2017), a minimálna expresia CD34 (0,2 %) a CD45 (2,4 %), čím sa potvrdila absencia kontaminácie hematopoetickými bunkami.

CD34	CD29	CD90	CD44	CD45
0,2 %	99,4 %	3,6 %	96,9 %	2,4 %

Tab. 2. Imunofenotypizácia canine AT-MKB (P4) prietokovou cytometriou – CD29, CD44, CD90 (pozitívne) a CD34, CD45 (negatívne).

Zvieratá, ktorým bola podaná MKB-KM terapia, mali pri vstupnom vyšetrení štatisticky významne závažnejší neurologický deficit ako pacienti bez tejto terapie (medián MFS 4,5 oproti 4,0; Mann-Whitneyho U test, p = 0,0033). Keďže závažnosť vstupného neurologického deficitu patrí medzi najsilnejšie a najkonzistentnejšie potvrdené prognostické faktory naprieč veterinárnou literatúrou (Olby a kol., 2022), napriek tomu je podiel dobrých výsledkov v oboch časových bodoch prakticky identický, dokonca na 150. deň numericky mierne vyšší v MKB-KM skupine (71,4 % vs 67,7 %) avšak rozdiel nebol štatisticky významný (p = 0,182).

Ukazovateľ	MKB-KM Áno (n=14)	MKB-KM Nie (n=31)	p
Vstupné MFS (medián)	4,50	4,00	0,0033
MFS na 14. deň (medián)	2,50	2,00	0,135
Dobrý výsledok, 14. deň (MFS ≤ 3)	13/14 (92,9 %)	29/31 (93,5 %)	1,000
MFS na 150. deň (medián)	0,00	0,00	0,810
Dobrý výsledok, 150. deň (MFS < 1)	10/14 (71,4 %)	21/31 (67,7 %)	1,000

Tab. 3. Deň 14 — dobrý výsledok = MFS ≤ 3. Deň ~150 / 6 mesiacov — dobrý výsledok = MFS < 1 (t.j. MFS = 0).

Napriek vyššej vstupnej závažnosti dosiahla MKB-KM skupina na 14. deň (MFS ≤ 3: 92,9 % vs. 93,5 %) aj na 150. deň (MFS < 1: 71,4 % vs. 67,7 %) štatisticky zhodný podiel dobrých výsledkov ako kontrolná skupina (p = 1,000 v oboch bodoch). Zmena skóre (Δ MFS) bola v KM skupine numericky dokonca vyššia (medián 4,0 oproti 3,5) čo je zaujímavý výsledok, ktorý bude potrebné overiť na väčšej, randomizovanej vzorke.

Vplyv nebunkových produktov v experimentálnych modeloch na potkanoch preukázateľne zlepšil motorické zotavenie a potlačil zápalovú reakciu parakrinnými mechanizmami (Čížkova a kol., 2018). V našej klinickej štúdii sa však táto korelácia jednoznačne nepotvrdila – napriek priaznivým in vitro a experimentálnym in vivo výsledkom sme v prirodzenej klinickej populácii nezaznamenali štatisticky preukázateľný rozdiel vo výsledku terapie. Vzhľadom na veľkú rozmanitosť ovplyvňujúcich faktorov v klinickej štúdií je pre prínos štatisticky presvedčivejších dôkazoch o účinnosti terapie nutné pracovať s výrazne väčším súborom pacientov.

POĎAKOVANIE

Práca vznikla s podporou projektu APVV-19-0193, VEGA 1/0376/20 a bola realizovaná v súlade so súhlasom Etickej komisie UVLF v Košiciach.

POUŽITÁ LITERATÚRA

BEARDEN RN, HUGGINS SS, CUMMINGS KJ, SMITH R, GREGORY CA, SAUNDERS WB. Canine adipose-derived mesenchymal stromal cells transcriptome composition alterations: A step towards standardizing therapeutic use. Stem Cell Res Ther. 2017;8:218.

CIZKOVA D, CUBINKOVA V, SMOLEK T, MURGOCI AN, DANKO J, VDOVIAKOVA K, HUMENIK F, CIZEK M, QUANICO J, FOURNIER I, SALZET M. Localized intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells conditioned medium improves functional recovery in a rat model of spinal cord injury. Int J Mol Sci. 2018;19(3):870.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, KRAUSE DS, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317.

HUMENIK F, JEGO S, HORNAKOVA L, MALOVESKA M, VALENCAKOVA-AGYAGOSOVA A, VIKARTOVSKA Z, MUDRONOVA D, HUDAKOVA N, ZILKOVA M, CIZEK M, CIZKOVA D. Impact of mesenchymal stem cells derived conditioned media on neural progenitor cells. Gen Physiol Biophys. 2021;40(6):551-559.

MARTIN S, LIEBEL F, FADDA A, LAZZERINI K, HARCOURT-BROWN T. Same-day surgery may reduce the risk of losing pain perception in dogs with thoracolumbar disc extrusion. J Small Anim Pract. 2020;61(7):442-448.

OLBY NJ, MOORE SA, BRISSON B, FENN J, FLEGEL T, KORTZ G, LEWIS M, TIPOLD A. ACVIM consensus statement on diagnosis and management of acute canine thoracolumbar intervertebral disc extrusion. J Vet Intern Med. 2022;36(5):1570-1596.

Názov: VEDECKÉ PRÁCE DOKTORANDOV 2026
Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu
XXI. ročník

Zostavila: RNDr. Veronika Kovaříková, PhD.

Rok vydania: 2026

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 978-80-69269-00-2

ISBN 978-80-69269-00-2