



# **NOVÉ SMERY VO VETERINÁRNEJ FYZIOLOGII**

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

**25. október 2006  
Košice**

*Usporiadali:*  
Univerzita veterinárskeho lekárstva  
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat Slovenskej akadémie vied  
Slovenská spoločnosť pre biochémiu a molekulárnu biológiu, Východoslovenská pobočka

## **NOVÉ SMERY VO VETERINÁRNEJ FYZIOLOGII**

Zborník príspevkov prezentovaných na  
Seminári doktorandov venovanom pamiatke akademika Boďu,  
ktorý sa konal dňa 25. októbra 2006  
v Košiciach

Zostavil: MVDr. Dušan Fabian, PhD.  
Vydal: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV  
Šoltésovej 4  
04001 Košice

Recenzoval: MVDr. Imrich Zeleňák, DrSc.  
Neprešlo jazykovou úpravou.

**ISBN 80-968618-1-6**  
**EAN 9788096861811**

## SEMINÁR DOKTORANDOV VENOVANÝ PAMIATKE AKADEMIKA BOĎU Súťaž o najlepšiu prácu doktorandov UVL a ÚFHZ SAV



Profesor Boďa (1927-2005) patril medzi popredných slovenských vedeckých pracovníkov a na ňom je postavená bohatá tradícia základného výskumu v oblasti fyziológie hospodárskych zvierat na Slovensku.

Ako mladý docent (31 rokov) Koloman Boďa v roku 1958 prevzal vedenie Ústavu patologickej fyziológie Veterinárskej fakulty VŠP a o päť rokov neskôr sa stal vysokoškolským profesorom. Na výuke študentov v odbore patologickej fyziológie hospodárskych zvierat sa zúčastňoval počas 31 rokov – až do roku 1989. V rokoch 1958-1959 zastával funkciu prodekana VF pre pedagogiu, v rokoch 1959-1963 bol prorektorom VŠP v Nitre pre VF v Košiciach.

V roku 1964 kreoval oddelenie fyziológie hospodárskych zvierat ÚEB SAV v Košiciach, z ktorého v r. 1969 vznikol Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV. Jeho cieľom bolo vybudovať moderný ústav reprezentujúci československú veterinársku fyziológiu nielen v Československu ale aj vo svete. Ústav fyziológie hospodárskych zvierat mal pôvodne tri pracoviská, v Košiciach, Ivanke pri Dunaji a vo Zvolene. V roku 1990 vznikli na ich základe 2 samostatné ústavy: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat v Košiciach a Ústav biochémie a genetiky živočíchov v Ivanke pri Dunaji.

Pod vedením profesora Boďu bol získaný rad prioritných poznatkov najmä v oblastiach využitia dusíka, fyziológie trávenia a využitia rôznych zdrojov energie, ktoré boli ocenené celým radom vyznamenaní a cien. Profesor Koloman Boďa inicioval výskum v niektorých progresívnych oblastiach biotechnológií, ktoré sa rozvíjali naďalej a tvoria súčasť dnešného vedeckého programu ÚFHZ SAV. Ide napríklad o rozvoj poznania mikroflóry tráviaceho traktu hospodárskych zvierat využitím metód molekulárnej biológie a štúdium fyziologických procesov v bachore v in vitro podmienkach. Zvlášť významné sú jeho práce zamerané na oblasť kozmickej fyziológie, ktoré boli riešené na pracovisku v Ivanke pri Dunaji, v rámci medzinárodného programu Interkozmos. Tento výskum bol mu veľmi blízky a aktívne sa v ňom angažoval aj po odchode do zaslúženého dôchodku.

Profesor Boďa vychoval niekoľko generácií veterinárnych lekárov ako aj mnohých vedeckých pracovníkov najmä v odbore veterinárnej fyziológie a fyziológie živočíchov. Jeho meno je naozajstným pojmom nielen na Slovensku a okolitých krajinách ale aj vo svete.

Doc. MVDr. Juraj Koppel, DrSc.

## OBSAH

1. ANTIOXIDAČNÝ A IMUNITNÝ STATUS BROJLEROV KŔMENÝCH DIÉTOU KONTAMINOVANOU DEOXYNIVALENOLOM (DON) A DOPLNENOU SELENIZOVANÝMI KVASNICAMI  
Bořutová R.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 6
2. RELATÍVNA KVANTIFIKÁCIA TRANSKRIPTOV POMOCOUC PCR V REÁLNOU ČASE – METÓDY ANALÝZY DÁT  
Bukovská A.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 10
3. SLEDOVANIE RÁDIOPROTEKTÍVNYCH ÚČINKOV VYBRANÝCH CHEMICKÝCH LÁTOK U LETÁLNE OŽIARENÝCH MYŠÍ GAMA LÚČMI  
Daňová D., Nováková J., Strišková K., Kafka I.  
*Ústav rádiobiológie, UVL, Košice* str. 14
4. VPLYV PERORÁLNE PODÁVANÉHO GLYCEROLU NA BIOCHEMIZMUS BACHORA  
Farkašová Z.  
*II. interná klinika, UVL, Košice* str. 18
5. RASTLINNÉ ADITÍVA A ICH ÚČINOK ZA IN VITRO A IN VIVO PODMIENOK  
Haviarová M.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 22
6. MONITOROVANIE PATOGENITY NÁDOROV MLIEČNEJ ŽLAZY SÚK  
Jakubčínová M., Valocký I.  
*Klinika pôrodnictva, gynekológie a andrológie, UVL, Košice* str. 26
7. BIOLOGICKÉ ÚČINKY RASTLINNÝCH EXTRAKTOV  
Juhás Š.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 32
8. ZÁKLADNÉ ETAPY DEZINSEKCIE V POTRAVINÁRSKYCH PREVÁDZAKACH  
Kudrliková D., Laktičová K., Ondrašovičová S., Vargová M., Hromada R., Ondrašovič M.  
*Katedra životného prostredia, UVL, Košice* str. 36
9. MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA ÚČINNOSTI DEZINFEKCIE PRI POUŽITÍ TOPAXU 91 V PRIESTOROCH HYDINÁRNE  
Laktičová K., Kudrliková D., Ondrašovičová O., Sasáková N., Čulenová K., Ondrašovič M.  
*Katedra životného prostredia, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice* str. 40

10. WELFARE MAČIEK CHOVANÝCH V BYTOCH  
Mareková J., Kottferová J., Ondrašovičová O., Ondrašovič M., Sasáková N.  
*Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, UVL, Košice* str. 44
11. ŠTRUKTÚRNE GÉNY VYBRANÝCH BAKTERIOCÍNŮV U ENTEROKOKOV  
A STREPTOKOKOV TRÁVIACEHO TRAKTU ZVIERAT  
Nigutová K.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 48
12. GENETICKÁ TYPIZÁCIA A VARIABILITA PESTIVÍRUSOV  
INFIKUJÚCICH HOVÄDZÍ DOBYTOK  
Nováčková M., Jacková A., Vilček Š.  
*Katedra infekčných a parazitárnych chorôb, UVL, Košice* str. 52
13. ANTIKSIDAČNÝ A SELÉNOVÝ STATUS BACHOROVÉHO  
A VNÚTORNÉHO PROSTREDIA OVIEC KŔMENÝCH DIÉTOU OBOHATENOU  
SELENIČITANOM SODNÝM  
Petrovič V.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 55
14. VÝSKYT ENDOPARIZITOV KAMZÍČEJ ZVERI V SLOVENSKOM RAJI  
Sabo R.<sup>1</sup>, Sabová (rod. Droppová) L.<sup>2</sup>, Krupicer I.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav toxikológie, UVL, Košice*  
<sup>2</sup>*Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice* str. 61
15. KLINICKÉ ZMENY POZOROVANÉ U MYŠÍ PO APLIKÁCII IMELA  
BIELEHO  
Sabová (rod. Droppová) L.<sup>1</sup>, Sabo R.<sup>2</sup>, Šutiak V.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>*Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice*  
<sup>2</sup>*Ústav toxikológie, UVL, Košice* str. 64
16. „BIOLOGICKÁ CENA“ PRENOSNEJ REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ  
Seliga R.  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 68
17. PRÍTOMNOSŤ „GENE SIZED” CHROMOZÓMOV U PRVOKA *OXYTRICHA*  
SP. TT-2005  
Tóthová T.  
*Ústav chemických vied, UPJŠ, Košice;*  
*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice* str. 72

# ANTIOXIDAČNÝ A IMUNITNÝ STATUS BROJLEROV KRŤMENÝCH DIÉTOU KONTAMINOVANOU DEOXYNIVALENOLOM (DON) A DOPLNENOU SELENIZOVANÝMI KVASNICAMI

Bořutová R.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Cieľom pokusu bolo skúmať účinky diét prirodzene kontaminovaných fuzáriovým mykotoxínom DON 3 mg.kg<sup>-1</sup>, doplnených selenizovanými kvasnicami na aktivity antioxidačných enzýmov glutation peroxidázy (GPx) v krvi a tkanivách, superoxid dizmutázy (SOD) v erytrocytoch, na koncentrácie malondialdehydu (MDA) v plazme a tkanivách pečene, obličky a sliznice dvanástnika. Ukazovateľom imunitnej odpovede na DON bola expresia T-buniek (CD3+, CD4+, CD8+) a B-buniek (IgM+) v krvi. Brojlery plemena Ross boli od prvého dňa života rozdelené do štyroch pokusných skupín, ktoré sa líšili v koncentrácii DON a prídavku alebo absencii Se-kvasníc. Výsledky poukázali na to, že žiadny z parametrov antioxidačného statusu ani expresia T- a B- buniek v krvi neboli príjmom diéty s obsahom DON 3 mg.kg<sup>-1</sup> ovplyvnené. Na druhej strane, doplnok supranutričných dávok organického selénu vo forme selenizovaných kvasníc spôsobil signifikantné zvýšenie aktivity GPx a obsahu selénu v krvi a tkanivách v negatívnej kontrolnej skupine (Se-kvasnice) a vo štvrtjej skupine zvierat (DON+ Se-kvasnice). Navyiac v skupinách brojlerov, ktoré dostávali diétu obohatenú Se- kvasnicami, bola signifikantne zvýšená expresia T- a B-lymfocytov v krvi v porovnaní so skupinami, ktoré prídavok Se nedostávali.

## ÚVOD

Deoxynivalenol (DON, vomitoxín) je trichotecénový mykotoxín produkovaný viacerými druhmi plesne Fuzárium, najčastejšie F. graminearum a vyskytuje sa ako kontaminant s inými mykotoxínmi v rôznych plodinách. Deoxynivalenol je známym inhibítorom proteosyntézy. Toxín sa viaže na peptidyl transferázu (Feinberg a McLaughlin, 1989), inhibuje proteosyntézu RNA a DNA naviazaním sa na ribozóm (WHO, 1999). Trichotecény zasahujú do metabolizmu membránových fosfolipidov, poškodzujú bunkovú membránu a zvyšujú lipidovú peroxidáciu v živom organizme (Bunner a Morris, 1988). DON po absorpcii v gastrointestinálnom trakte podstupuje de-epoxidáciu a glukuronidáciu, čo vedie ku vzniku relatívne menej toxických metabolitov (Beasley a kol., 1986).

Udáva sa, že najcitlivejšie na účinky DONu sú ošípané, hydina je voči účinkom DONu menej citlivá a najmenej senzitivný je hovädzí dobytok (Eriksen, Pettersson, 2003).

Cieľom experimentu bolo zistiť, či môžu koncentrácie do 3 mg.kg<sup>-1</sup> DONu spôsobiť zvýšený oxidačný stres organizmu a či môže aplikácia selenizovaných kvasníc zabrániť možným poškodeniam tkanív spôsobených deoxynivalenolom.

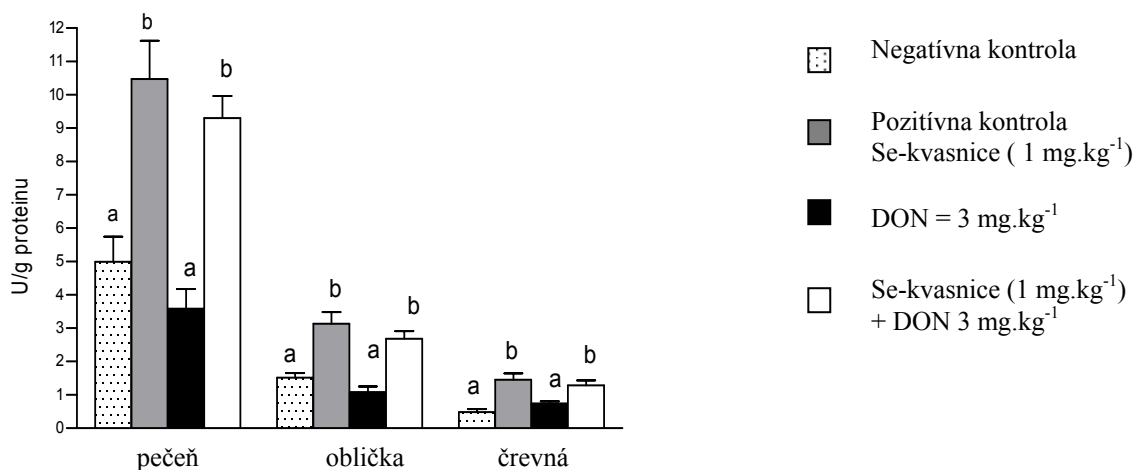
## MATERIÁL A METODIKA

Brojlery plemena Ross boli od prvého dňa života rozdelené do štyroch pokusných skupín po 20 zvierat. Vtáky pokusnej skupiny boli krmené krmnou zmesou na báze kukurice (40%) prirodzene kontaminovanej DONom. Negatívna kontrola dostávala diétu obsahujúcu DON v koncentrácii 0,2 mg.kg<sup>-1</sup> a selén bol 0,4 mg.kg<sup>-1</sup>. Brojlery v druhej pokusnej skupine (pozitívna kontrola) dostávali diétu doplnenú supranutričnou dávkou selenizovaných kvasníc, Se 1 mg.kg<sup>-1</sup>. Tretia skupina bola krmená diétou kontaminovanou DONom 3 mg.kg<sup>-1</sup>. Štvrtá skupina dostala diétu kontaminovanú DONom 3 mg.kg<sup>-1</sup> a doplnenú Se-kvasnicami o selén, 1 mg.kg<sup>-1</sup>. Brojlery boli vo veku

6 týždňov anestezizované zmesou ketamínu ( Narkamon 5%) a xylazínu (Rometar 2%) pre odber krvi intrakardiálnou punkciou. Vzorky pečene, obličky, prsnej svaloviny a črevnej sliznice boli odobraté po eutanázii. Koncentrácie selénu v diétach, krvi a orgánoch boli stanovené podľa Rodriguez a kol. (1994). Aktivita GPx ( EC 1.11.1.9) bola stanovená podľa Paglia a Valentine (1967) použitím Ransel kitu (Randox,VB). Koncentrácie MDA v plazme a tkanivách pečene, obličky a črevnej sliznice bola stanovená podľa Jo a Ahn (1998). Obsah hemoglobínu (Hb) a aktivita SOD ( EC 1.15.1.1) (Arthur a Boyne, 1985) v erythrocytoch boli analyzované kitmi (Randox, VB). Koncentrácia bielkovín v tkanivách bola meraná podľa Bradforda (1976). Ellmanovou metódou (1958) sme stanovili –SH skupiny v plazme. Expresia imunokompetentných buniek krvi bola stanovená metódou prietokovej cytometrie na prístroji Becton Dickinson. Fagocytárna aktivita bola stanovená metódou s použitím MSHP častíc podľa Větvičku a kol. (1982). Štatistická analýza výsledkov bola urobená jednocestnou ANOVOU s post hoc Tukey testom. Výsledky sú udávané ako priemer ± SEM.

## VÝSLEDKY

Aktivita GPx v krvi a orgánoch nebola ovplyvnená DONom, iba prídavok Se ju signifikantne zvýšil ( Obr. 1; Tab. 1).



**Obrázok 1.** Aktivita GPx v tkanivách orgánov u brojlerov kŕmených diétami kontaminovanými DON (3 mg.kg<sup>-1</sup>) a doplnených Se-kvasnicami (1 mg.kg<sup>-1</sup>). Hodnoty sú ± SEM. Rozdielne písmená nad stĺpcami označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami (P<0,05).

Prítomnosť DONu v diétach v koncentrácii 3 mg.kg<sup>-1</sup> neovplyvnila signifikantne aktivitu SOD v erythrocytoch ani koncentrácie MDA v plazme a tkanivách pečene, obličky a črevnej sliznice.

## DISKUSIA

Výsledky ukázali, že kontaminácia krmiva DONom v koncentrácii do 3 mg.kg<sup>-1</sup> nemala negatívny vplyv na sledované parametre antioxidačného a imunitného statusu brojlerov. Neznamená to ale, že by sme ju mohli považovať za bezpečnú hladinu deoxynivalenolu v krmive hydiny. Hydina je voči účinkom DON relatívne rezistentná v porovnaní s ošípanými. Odmietanie krmiva a znížené prírastky na živej hmotnosti sa prejavili až keď koncentrácie DONu dosiahli 9-18 mg.kg<sup>-1</sup> krmiva (Kubena a kol., 1985). DON môže pôsobiť imunostimulačne alebo imunosupresívne v závislosti od dávky a dĺžky expozície (Bondy a Pestka, 2000). V nízkych koncentráciách a v kombinácii s inými

mykotoxínmi môže mať množstvo škodlivých účinkov spojených so zníženou úžitkovosťou a imunitnými funkciami (Rotter a kol., 1996).

**Tab.1.** Antioxidačný status brojlerov kŕmených diétou kontaminovanou deoxynivalenolom (DON) a doplnenou selenizovanými kvasnicami. Hodnoty sú priemer  $\pm$  SEM.

Parameter	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola (Se 1,0 mg.kg <sup>-1</sup> )	Obsah DON 3 mg.kg <sup>-1</sup>	Obsah DON (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) + Se 1,0 mg.kg <sup>-1</sup>
GPx v krvi (U.g <sup>-1</sup> Hb)	159,5 $\pm$ 14,8 <sup>a</sup>	270,6 $\pm$ 34,5 <sup>b</sup>	160,8 $\pm$ 15,4 <sup>a</sup>	271,2 $\pm$ 18,7 <sup>b</sup>
GGT v plazme (U.l <sup>-1</sup> )	49,3 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>	36,7 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	41,0 $\pm$ 1,7	47,3 $\pm$ 2,1
SOD krvi (U.g <sup>-1</sup> Hb)	835,6 $\pm$ 65,1	774,4 $\pm$ 59,7	654,1 $\pm$ 74,6	732,9 $\pm$ 62,3
SH skupiny v plazme ( $\mu$ mo.l <sup>-1</sup> )	185,4 $\pm$ 10,6	216,6 $\pm$ 20,3	204,7 $\pm$ 19,8	160,0 $\pm$ 12,6

Rozdielne horné indexy v rámci riadku označujú signifikantné rozdiely medzi skupinami (P<0,05).

Prídavok Se-kvasníc do diéty zvýšil expresiu CD3+, CD4+, CD8+ T-buniek a IgM-buniek v krvi brojlerov, avšak DON nemal vplyv na žiadny z uvedených parametrov, okrem mierne zníženej fagocytárnej aktivity v krvi brojlerov (Tab.2)

**Tab.2.** Expresia imunokompetentných buniek (počty, 1.10<sup>9</sup>.l) v krvi a fagocytárna aktivita brojlerov kŕmených diétou kontaminovanou deoxynivalenolom a Se-kvasnicami. Hodnoty sú priemer  $\pm$  SEM.

Typ buniek	Negatívna kontrola	Pozitívna kontrola (Se 1,0 mg.kg <sup>-1</sup> )	Obsah DON (3 mg.kg <sup>-1</sup> )	Obsah DON (3 mg.kg <sup>-1</sup> ) + Se 1,0 mg.kg <sup>-1</sup>
CD3+	0,95 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	5,15 $\pm$ 0,69 <sup>b</sup>	1,88 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	4,23 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>
CD4+	0,83 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	3,19 $\pm$ 0,63 <sup>c</sup>	1,22 $\pm$ 0,15 <sup>ab</sup>	2,59 $\pm$ 0,34 <sup>bc</sup>
CD8+	0,40 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	2,23 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	0,56 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	1,57 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>
IgM+	0,21 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,52 $\pm$ 0,11 <sup>b</sup>	0,12 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,47 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>
Fagocytárna aktivita (%)	19.5 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>	22.3 $\pm$ 1.7 <sup>ac</sup>	12.8 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	26.5 $\pm$ 1.7 <sup>c</sup>

Udáva sa, že oxidačný stres spôsobený mykotoxínmi môže poškodzovať komunikáciu medzi imunitnými bunkami, čoho následkom môže byť deregulácia imunitného systému a následná imunosupresia (Corrier, 1991). Jediným negatívnym účinkom DONu na parametre imunitného statusu bola znížená fagocytárna aktivita v skupine zvierat, ktoré dostávali diétu s obsahom DON 3 mg.kg<sup>-1</sup>. Absencia rozdielov v aktivitách SOD, ktorá je hlavným enzýmom prvého stupňa antioxidačnej ochrany bunky (Surai, 1999) a MDA, ktorý je typickým ukazovateľom lipidovej peroxidácie zároveň ukázala, že diéty kontaminované obsahom DONu do 3 mg.kg<sup>-1</sup> nespôsobili zvýšený oxidačný stres v tele brojlerov.



Flowcytometria potvrdila stimulačné účinky supranutričnej dávky organického selénu na proliferáciu T- a B-buniek u brojlerov (Leng a kol., 2003).

Výsledky tejto práce ukázali, že diéty kontaminované mykotoxínom DON do obsahu 3 mg.kg<sup>-1</sup> neovplyvňujú parametre oxidačného stresu a imunitného statusu brojlerov okrem mierne, ale signifikantne potlačenej fagocytárnej schopnosti krvi.

*Táto práca bola podporovaná agentúrou na podporu vedy a techniky na základe zmluvy č. APVT-51-004804.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Beasley VR, Swanson SP, Corley RA, Buck WB, Koritz GD, Burmeister HR. Pharmacokinetics of trichothecene mycotoxin, T-2 toxin in swine and cattle. *Toxicon* 1986; 24(1):13-23.

Bondy GS, Pestka JJ. Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit.* 2000; 3:109-143.

Bunner DL, Morris ER. Alteration of multiple cell membrane function in L-6 myoblast by T-2 toxin: an important mechanism of action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1988; 92:113-121.

Corrier DE. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 1991; 30:73-87.

Eriksen GS, Pettersson H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2003; 114:205-239.

Feinberg B, McLaughlin CS. Biochemical mechanism of action of trichothecene mycotoxins. In: Beasley, V.R. (Ed.) *Trichothecene Mycotoxins pathophysiologic Effects.* 1989; 1:27-35.

Jo C, Ahn DU. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poult. Sci.* 1998; 77: 475-480.

Kubena LF, Swanson SP, Harvey RB, Fletcher OJ, Rowe LD, Phillips TD. Effects of feeding deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat to growing chicks. *Poult. Sci.* 1985; 64:1649-1655.

Leng, L., Bobček, R., Kuricová, S., Boldižárová, K., Grešáková, L., Ševčíková, Z., Révajová, V., Levkutová, M., Levkut, M.: Comparative metabolic and immune responses of chickens fed diets containing inorganic selenium and Sel-Plex<sup>TM</sup> organic selenium. In: *Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries* (T. P. Lyons and K. A. Jacques, eds). Nottingham University Press, Nottingham, UK, 2003, pp. 131-145.

Paglia DE, Valentine WN. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Med.* 1967; 70: 158-169.

Rodriguez EM, Sanz MT, Romero CD. Critical study of fluorometric determination of selenium in urine. *Talanta.* 1994; 12: 2025-2031.

Rotter BA, Oh YN. Mycotoxin fumonisin B1 stimulates nitric oxide production in a murine macrophage all line. *Natural Toxins.* 1996; 4:491-294.

Surai PF. Vitamin E in avian reproduction. *Poultry and Avian Biology Review.* 1999; 10:1-60.

Větvička V, Fernůšek I, Kopeček J, Kamíková J, Kapárek I, Vránová M. Phagocytosis of human leukocytes: A simple micromethod. *Immunol. Lett.* 1982; 5:97-100.

WHO. Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. 1990; *Environmental Health Criteria* 105, Geneva.

# RELATÍVNA KVANTIFIKÁCIA TRANSKRIPTOV POMOCOU PCR V REÁLNOM ČASE – METÓDY ANALÝZY DÁT

Bukovská A.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

PCR v reálnom čase je v súčasnosti jednou z najpoužívanejších techník kvantifikácie expresie génov na úrovni mRNA, pričom existuje viacero analyzačných metód na spracovanie dát získaných z PCR merania. V našej práci sme pomocou PCR v reálnom čase kvantifikovali mRNA vybraných génov v hrubom čreve myši s TNBS indukovanou kolitídou, pričom sme porovnali výsledky získané tromi rozdielnymi metódami analýzy dát získaných z PCR merania.

## ÚVOD

Polymerázová reťazová reakcia s detekciou amplifikačného produktu po každom amplifikačnom cykle („PCR v reálnom čase“, „real-time PCR“) je významný nástroj pre detekciu a kvantifikáciu mRNA vyznačujúci sa vysokou citlivosťou, dobrou reprodukovateľnosťou a širokým dynamickým rozsahom. Vďaka vysokej citlivosti možno túto metódu použiť pre detekciu a kvantifikáciu málo početných mRNA, ako napr. mRNA cytokínov a cytokínových receptorov (Peinnequin a kol., 2004), pre analýzu mRNA zo vzoriek tkaniva s limitovaným objemom (biopsia, jednotlivé bunky) alebo pre objasnenie malých zmien v hladinách mRNA (Bustin 2002, Pfaffl 2001). Využitie všetkých výhod techniky PCR v reálnom čase však vyžaduje dôkladné zváženie početných možností zostavenia experimentu a analýzy dát (Wong a kol., 2005), ako aj zohľadnenie možných problémov, ktoré môžu byť zdrojom chýb a výrazne tak ovplyvniť výsledok merania. Pri relatívnej kvantifikácii mRNA pomocou techniky PCR v reálnom čase sa používa viacero analyzačných metód, ktorými možno spracovať dáta získané z PCR merania (Bustin 2004). Skern a kol. (2005) upozorňujú, že metóda, ktorou sa dáta získané z PCR merania v reálnom čase analyzujú, môže výrazne ovplyvniť výsledky relatívnej kvantifikácie mRNA, pričom vo svojej práci demonštrujú, že rozdielne analytické prístupy môžu viesť až k protichodným biologickým záverom. Cieľom našej práce bolo porovnať výsledky relatívnej kvantifikácie transkriptov vybraných génov získané pomocou troch odlišných analyzačných metód používaných na spracovanie dát z PCR merania v reálnom čase, pričom sme použili model TNBS indukovanej kolitídy myši pri ošetrovaní rastlinnými esenciálnymi olejmi. Úloha rastlinných esenciálnych olejov v rôznych fyziologických procesoch bola preukázaná vo viacerých experimentálnych modeloch aj na našom pracovisku (Domaracký a kol., 2006; Horosová a kol., 2006; Faix a kol., 2006).

## MATERIÁL A METODIKA

### *Zvieratá, indukcia kolitídy, odber vzoriek*

V práci boli použité 7 týždňové samce Balb/c myši (VELAZ-Praha), ktoré boli držané v nepatogénnych podmienkach a bolo s nimi zaobchádzané podľa platných smerníc pre prácu so zvieratami. Zvieratá boli kŕmené štandardným krmivom pre laboratorne myši a potkany, alebo krmivom obohateným zmesou rastlinných esenciálnych olejov - tymiánu a pamajoránu. Zápal hrubého čreva bol u myši vyvolaný intrarektálne, aplikáciou roztoku zloženého z 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovej kyseliny (TNBS), FLUKA (120 mg TNBS / kg telesnej hmotnosti) rozpustenej v zmesi fyziologického roztoku (INFUSIA, ČR) a 100% etanolu v pomere 1:1. Po 7 dňoch od indukcie kolitídy boli zvieratá

usmrtené cervikálnou dislokáciou. Po usmrtení bolo hrubé črevo oddelené, pozdĺžne rozstrihnuté a zbavené trusu.

#### *Kvantifikácia transkriptov pomocou PCR v reálnom čase*

Z hrubého čreva myši bolo odobraté po 15-20 mg tkaniva, z ktorého bola izolovaná celková RNA pomocou TRIzol Reagent (Invitrogen). RNA bola následne prečistená a ošetrovaná s DNase I pomocou RNeasy Micro kit (Qiagen). Koncentrácia RNA bola stanovená spektrofotometricky a z 0,75 ug RNA každej vzorky bola potom v 30 ul reakcii pripravená cDNA tak, ako je uvedené v Čikoš a kol. (2005).

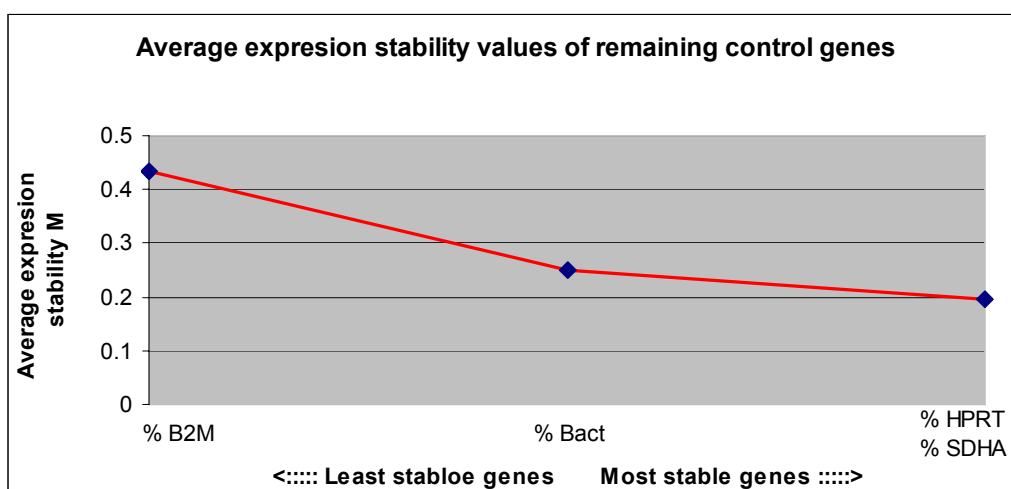
Štandardná krivka bola pripravená z hodnôt „CT“ (počet cyklov potrebných na dosiahnutie zvolenej hodnoty fluorescence, tzv. „prahovej“ fluorescence) PCR reakcií, do ktorých bola ako templát vložená cDNA syntetizovaná z riedení štandardného RNA preparátu pripraveného zmiešaním aliquotov RNA jednotlivých vzoriek. Štandardná krivka bola vytvorená softvérom systému Mx 3000P (Stratagene), vynesím hodnôt CT proti logaritmovaným hodnotám riediacich faktorov preparátu štandardnej RNA.

PCR bola uskutočnená na systéme Mx 3000P v duplikátoch 20 ul reakcií s fluorescenčným detekčným farbivom SYBRGreen I a príslušnými primérm, v 40 cykloch podľa príslušného protokolu (Bukovská a kol., v príprave). Údaje získané z jedného PCR merania pre každý gén boli spracované pomocou troch rôznych analyzačných metód – metódou so štandardnou krivkou, metódou podľa Pfaffla (Pfaffl 2001) a metódou podľa Liu a Saint (Liu a Saint 2002).

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

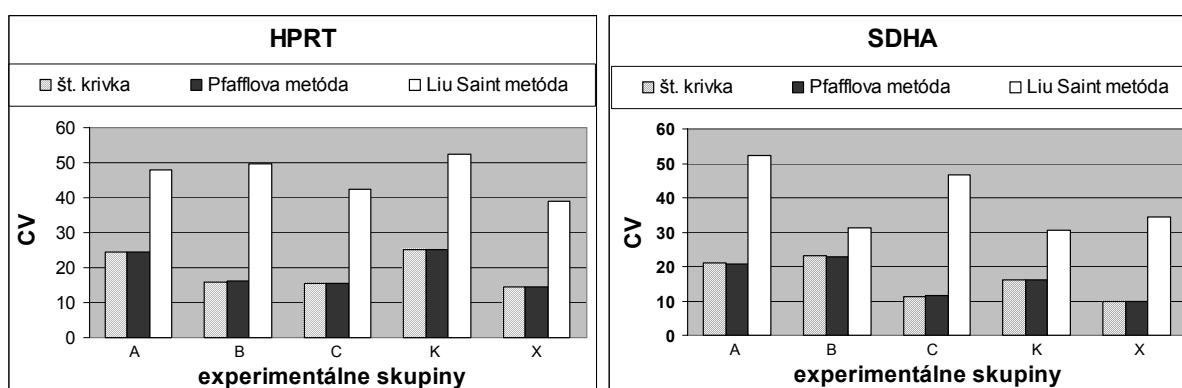
Pre výpočet normalizačného faktora bola vo všetkých vzorkách kvantifikovaná mRNA nasledovných štyroch génov s predpokladanou stabilnou mierou expresie (tzv. „referenčné gény“): hypoxantín fosforibozyl-transferáza (HPRT), sukcinát dehydrogenáza, podjednotka A (SDHA), beta-aktín (B-act),  $\beta$ 2 mikroglobulín (B2M). Pomocou programu geNorm (Vandesompele a kol., 2002) bol B2M určený ako gén s najmenej stabilnou expresiou mRNA (najvyššia hodnota parametra „M“, Obr.1) v rámci porovnávaných vzoriek. Ostatné tri stabilnejšie gény boli potom použité na určenie normalizačného faktora, ktorý bol pre každú vzorku vypočítaný ako geometrický priemer relatívnej kvantity mRNA týchto génov.

**Obr. 1.** Analýza stability expresie referenčných génov pomocou softvéru geNorm



Porovnanie hodnôt relatívnej kvantity mRNA referenčných génov (normalizovanej na množstvo celkovej RNA vloženej do RT-PCR) v jednotlivých experimentálnych skupinách zvierat ukázalo podobné výsledky pri použití všetkých troch analyzačných metód, avšak porovnanie variačných koeficientov ukázalo vyššie hodnoty u metódy analýzy podľa Liu a Saint ako u metódy so štandardnou krivkou a metódy podľa Pfaffla (Obr.2, ukázané sú gény s najstabilnejšou expresiou – HPRT a SDHA

**Obr. 2.** Variačné koeficienty (CV) pri analýze relatívnej kvantity mRNA referenčných génov HPRT a SDHA



**K** – skupina myši s TNBS indukovanou kolitídou; **A**, **B**, **C** – skupiny myši s TNBS indukovanou kolitídou ošetrované rastlinnými esenciálnymi olejmi, **X** – kontrolná skupina myši

Normalizačné faktory získané z hodnôt expresie mRNA HPRT, SDHA a B-act boli potom použité na korekciu hodnôt expresie mRNA vybraných cytokínov, pričom boli získané pomocou všetkých troch analyzačných metód podobné výsledky.

Jednotlivé analyzačné metódy spracovania dát z PCR merania použité v našej práci sa odlišujú spôsobom transformácie hodnôt CT (viď. Materiál a metodika) na hodnoty relatívnej kvantity mRNA meraného génu ako aj určením účinnosti PCR amplifikácie (Bustin 2004). Pri metóde so štandardnou krivkou je relatívna kvantita mRNA meraných génov v každej vzorke určená odčítaním z príslušnej štandardnej priamky a hodnota účinnosti PCR amplifikácie („E“) sa určí zo sklonu štandardnej priamky. Pri metóde podľa Pfaffla (Pfaffl 2001) a metóde podľa Liu a Saint (Liu a Saint 2002) sa relatívna kvantita meranej mRNA v každej vzorke určí pomocou matematických vzťahov (odvodených zo základného vzťahu popisujúceho priebeh PCR v exponenciálnej fáze), pričom do týchto vzťahov je potrebné zadať hodnotu E. V prípade metódy podľa Pfaffla sa hodnota E zisťuje z kvázi-štandardnej priamky pripravenej riedeniami typickej vzorky alebo mixu vzoriek. Pri metóde podľa Liu a Saint sa hodnota E určuje meraním intenzity fluorescenčného signálu pri rôznom počte amplifikačných cyklov v exponenciálnej fáze reakcie, pričom sa vypočíta pre každú amplifikačnú reakciu individuálne.

Skern a kol. (2005) použili pri kvantifikácii mRNA dve rôzne analyzačné metódy, pričom interpretácia ich výsledkov sa výrazne líšila v závislosti od toho, ktorá z metód bola použitá na spracovanie dát z PCR merania a to napriek tomu, že autori preverili splnenie požadovaných podmienok pre aplikáciu každej z týchto metód. Na základe týchto faktov, autori odporúčajú pre dostatočnú verifikáciu výsledkov používať aspoň dve metódy analýzy dát z PCR merania. V našej práci sme pri kvantifikácii transkriptov

vybraných génov v hrubom čreve myši s TNBS indukovanou kolitídou získali použitím každej z troch analyzačných metód podobné výsledky aj keď porovnanie variačných koeficientov určených pri stanovení relatívnej kvantity mRNA referenčných génov poukazuje na vyššiu nepresnosť metódy analýzy podľa Liu a Saint v porovnaní s ostatnými dvomi metódami. Na základe uvedených faktov možno konštatovať, že nami zoptimalizovaný postup kvantifikácie mRNA dáva v uvedenom experimentálnom modeli spoľahlivé informácie o expresii meraných génov na úrovni mRNA.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-51-015404*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Bukovská A, Čikoš Š, Juhás Š, Il'ková G, Rehák P, Koppel J. Positive effects of plant essential oils thyme and oregano on TNBS-induced colitis in mice; publikácia v príprave.

Bustin SA. A-Z of Quantitative PCR. International University Line, La Jolla, California 2004.

Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29: 23-39.

Čikoš Š, Veselá J, Il'ková G, Rehák P, Czikková S. Expression of beta adrenergic receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev.* 2005; 71: 145-153.

Domaracký M, Rehák P, Juhás Š, Koppel J. Effects of selected plant essential oils on the growth and development of mouse preimplantation embryos in vivo. *Physiol Res.* 2006; v tlači.

Faix Š, Juhás Š, Faixova Z. The effect of essential oils on changes of plasma antioxidant status in mice. *Vet Med Czech*; podané pre publikovanie.

Horosová K, Bujňáková D, Kmeť V. Effect of oregano essential oil on chicken lactobacilli and *E.coli*. *Folia Microbiol.* 2006; 51: 278-280.

Liu W, Saint DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem.* 2002; 302: 52-9.

Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarencon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004; 5:3.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 2002-2007.

Skern R, Frost P, Nilsen F. Relative transcript quantification by Quantitative PCR: Roughly right or precisely wrong? *BMC Mol Biol.* 2005; 6:10.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3: RESEARCH0034.

Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques.* 2005; 39: 75-85.

# SLEDOVANIE RÁDIOPROTEKTÍVNYCH ÚČINKOV VYBRANÝCH CHEMICKÝCH LÁTOK U LETÁLNE OŽIARENÝCH MYŠÍ GAMA LÚČMI

Daňová D., Nováková J., Strišková K., Kafka I.

Ústav rádiobiológie, UVL, Košice

## ABSTRAKT

Rádioprotektívny účinok vybraných substituovaných tiomočovín a z nich pripravených tiouracilov a tiazínov aplikovaných intraperitoneálne v dávke  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  v rozsahu jednej až dvoch hodín bol skúmaný u bielych laboratórnych myší (samíc) pred ožiarovaním letálnou dávkou 12,0 Gy gama lúčov. Kým u zvierat, u ktorých bolo použité pôsobenie samotného gama žiarenia došlo k stopercentnému úhynu do 14. dní, tak pôsobenie rozpúšťadla dimetylsulfoxidu ( DMSO ) zvýšilo prežívanie o 45 %. Aplikácia tiomočoviny ( I ) ako aj tiazínu ( V ) mali oveľa nižší ochranný účinok ako samotné rozpúšťadlo. Tiouracil ( III ) a tiazín ( IV ) z hľadiska rádioprotekcie neovplyvnili prežívanie zvierat v porovnaní s DMSO. Z nášho experimentu vyplýva zistenie, že tiouracil ( II ) má výrazné rádioprotektívne účinky – jeho aplikáciou bolo dosiahnuté prežívanie zvierat na úroveň 75 %.

## ÚVOD

V súčasnosti je snahou zamerať sa o úsilie na hľadanie chemických aj biologických látok, ktoré by boli schopné zvyšovať rádiorezistenciu (Pistl a kol., 2003), pretože ako z doposiaľ nám známych poznatkov v oblasti rádiobiológie vyplýva, že o osude každého organizmu je rozhodnuté v okamihu, ak ožarovanie bolo ukončené. V predloženej práci sme takýto účinok sledovali u niektorých syntetizovaných chemických látok.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili biele laboratórne myši (samice) kmeňa ICR chovu SPF vo veku 10 – 15 týždňov a priemernej telesnej hmotnosti 27 – 33 g . Zvieratá pred začiatkom pokusu boli adaptované na podmienky ústavného zverinca v plexitových kliečkach pri teplote 22-25 °C, prirodzenom osvite, kŕmené peletami LD diéty (zloženie vid': Toropila a kol., 1996) a napájané vodovodnou vodou *ad libitum*.

Pred začiatkom experimentu boli najprv skúmané možné toxické pôsobenia vybraných substituovaných tiomočovín a z nich pripravených tiouracilov a tiazínov v dávkach 33 – 666  $\text{mg.kg}^{-1}$  rozpustených v 0,15 ml dimetylsulfoxidu ( DMSO ).

Z chemických látok sme použili nasledovné, vid'. (tabuľka č.1).

### Tabuľka: Použité chemické látky v experimente

1. N-/4-dimetylamino-fenyl/-N'-/2-chlórnikotinoyl/ tiomočovinu ( I ),
2. 1-/p-dimetylamino-fenyl/pyrido[3,2e] – 2-tiouracil ( II ),
3. 1-/p-tolyl/pyrido[3, 2e] – 2 –tiouracil ( III )
4. 2-/N,N-metyl-fenyl/amino-4-oxopyrido[3, 2e]/1,3/tiazín ( IV ),
5. 2-anilino-5,7-dimetylpyrido-4-oxo[3,4e]/1,3/tiazín ( V ),
6. dimetylsulfoxid (ako rozpúšťadlo).

Aby nedošlo k tepelnému šoku boli všetky použité látky vrátane rozpúšťadla temperované na telesnú teplotu zvieratá (Karlson, 1982).

Na základe zistenej toxicity sme zvolili optimálne množstvo látky pre skúmanie možných rádioprotektívnych účinkov.

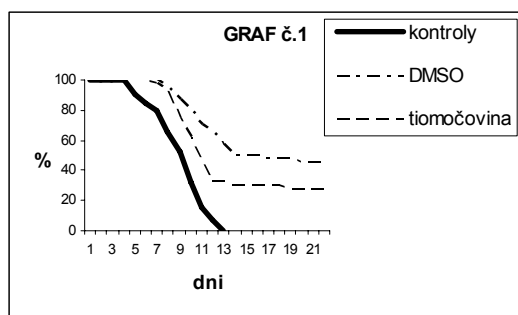
Experimentálne zvieratá sme rozdelili do siedmich skupín ( 40 v každej skupine). V skupinách 1 – 5 bol podaný jeden druh látky v dávke  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  rozpustenej v 0,15 ml DMSO. 6. skupine bol aplikovaný čistý DMSO ( 0,15 ml ), a siedma skupina zostala neinjikovaná – kontrolná. Jeden a pol až dve hodiny od podania látok boli všetky skupiny zvierat ožiarené jednorázovo celotelovo dávkou 12 Gy gama lúčov pomocou prístroja CHISOSTAT s príkonom  $0,81 \text{ Gy/min}$ . Prežívanie sme sledovali počas 30. dní.

#### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Od dávky  $166 \text{ mg.kg}^{-1}$  bol vo väčšine prípadov vplyv samotných použitých chemických látok pre laboratórne zvieratá toxický. Najtoxickejším bol tiazín IV a najmenej toxickým tiouracil II.

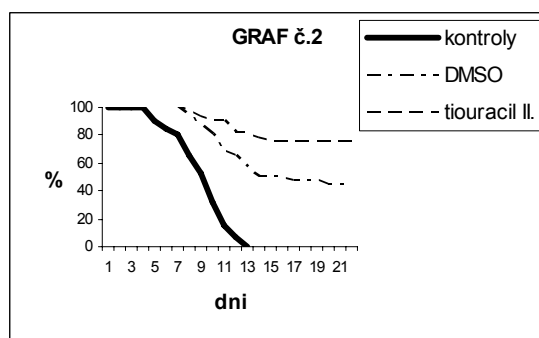
Aplikácia tiomočoviny I (graf č. 1) zvýšila po ožiarení percento prežívania u zvierat v porovnaní s kontrolnou skupinou, avšak tento účinok bol menší ako pri aplikácii samotného rozpúšťadla.

**Graf č. 1:** Percento prežívania kontrolných zvierat a zvierat po aplikácii tiomočoviny I a DMSO



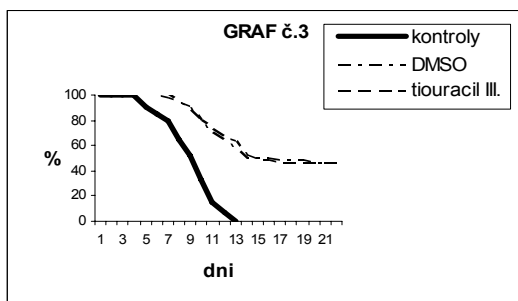
V porovnaní s kontrolnou skupinou i so skupinou zvierat, ktorej bol aplikovaný čistý DMSO sa prejavil rádioprotektívny účinok tiouracilu II. Po dobu 30 dní preživalo 75 % zvierat (graf č. 2).

**Graf č. 2:** Percento prežívania kontrolných zvierat a zvierat po aplikácii tiouracilu II a DMSO

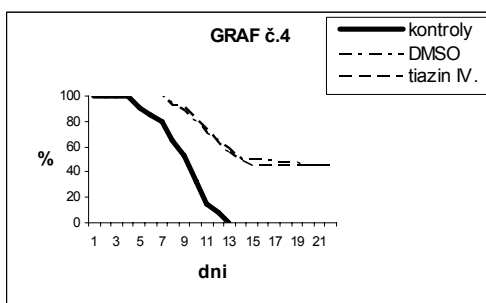


Rádioprotektívny účinok tiouracilu III (graf č. 3) a tiazínu IV (graf č. 4) nebol preukázaný, pretože výsledok prežívania zvierat bol rovnaký ako pri podaní samotného DMSO.

**Graf č.3:** Percento prežívania kontrolných zvierat a zvierat po aplikácii tiouracilu III a DMSO

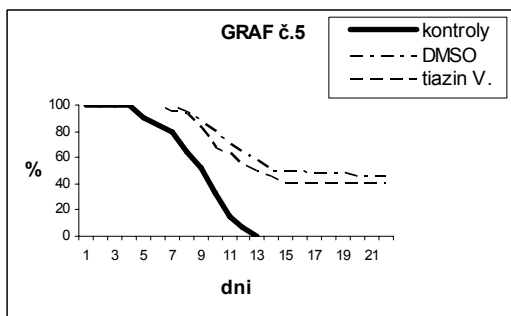


**Graf č.4:** Percento prežívania kontrolných zvierat a zvierat po aplikácii tiazínu IV a DMSO



Podanie tiazínu V (graf č. 5) malo nižší rádioprotektívny účinok ako samotný DMSO.

**Graf č. 5:** Percento prežívania kontrolných zvierat a zvierat po aplikácii tiazínu V a DMSO



Nepomer medzi malými dávkami a výrazným účinkom mnohých rádioprotektívnych látok rozhodne vylučuje jednoduchý mechanizmus rádioprotekcie, ako napr. len zneškodňovanie vznikajúcich voľných radikálov (Pospíšil a kol. 1966). Pravdepodobnejším sa zdá, že nízka dávka rádioprotektíva vyvolá určitú zmenu, napr. uvoľnenie glutationu zo zásob vo veľkom množstve, a ten je potom zodpovedný



primárne za najväčšiu časť účinkov, pripisovaných rádioprotektívu (Jocelyn, 1972, Cram a kol., 1983). Toto by slúžilo len ako akýsi „štartér“ na aktiváciu obranného mechanizmu samotného jedinca. Nemusí teda chemické rádioprotektívum primárne upravovať postradiačné poškodenie, stačí ak svojou prítomnosťou, alebo aj toxickými účinkami aktivuje v organizme obranné mechanizmy, ktoré tak s predstihom začnú pracovať aj na reparácii poškodení, spôsobených ionizujúcim žiarením (Toropila, 1980).

*Práca bola riešená v rámci projektu VEGA 1/2378/05.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Cram D. J., Hammond G. S.: Organická chemie, Academia, Praha, 1969.

Jocelyn P. C. : Biochemistry of the SH Group, Academic Press, London and New York, 1972.

Karlson P.: Základy biochemie, Academia, Praha, 1982.

Pistl, J., Kovalkovičová, N., Novotný, J., Holovská, V., Legáth, J., Mikula, I.: Klinická imunológia a alergológia, 13, 2003, 3, 40.

Pospíšil, M., Šonka, J., Dienstbier, Z., Dostál, M., Mráz, J.: Experimentální postradiační syndrom, SZdN, Praha, 1966.

Ryskulova S. T., Verbolovič, V. P., Petrenko, E. P., Cvetkova, T. V., Balachči, T. A.: Radiobiol. 23, 1983, s. 185.

Toropila, M.: Vplyv obmedzenia prístupu k potrave na metabolické zmeny u letálne X- ožiarených potkanov. Rigorózna práca. Košice, 1980.

Toropila, M., Ahlers, I., Ahlersová, E., Ondrašovič, M., Beňová, K.: Vet. Med.(Czech), 41, 2, 1996, s. 41-44.

# VPLYV PERORÁLNE PODÁVANÉHO GLYCEROLU NA BIOCHEMIZMUS BACHORA

Farkašová Z.

II. Interná klinika, UVL, Košice

## ABSTRAKT

U 6 kusov dojníc sme sledovali vplyv rôznych koncentrácií perorálne podávaného prípravku na báze glycerolu (Powerglyc, fy. Polychem s.r. o.) na dynamiku zmien unikavých mastných kyselín (UMK) a aktuálnej acidity (pH) v bachore. Predpokladali sme priaznivý vplyv glycerolu ako glukoplastickej substancie na zmenu pH a zníženie pomeru kyseliny octovej ku kyseline propiónovej (C2:C3), pričom sme zisťovali aj optimálnu dávku glycerolu. Očakávaný priaznivý vplyv na celkový biochemizmus UMK sa pri tomto type krátkodobého experimentu nepotvrdil.

## ÚVOD

Glycerol ako glukoplastická látka je používaný na prevenciu nutričných porúch u dojníc a to najmä v prechodnom období okolo pôrodu (prepartálnom, peripartálnom a postpartálnom) až do obdobia vrcholnej laktácie. V tomto období dochádza u dojníc k zníženému príjmu krmiva, kedy prijaté krmivo nestačí kryť energetické potreby metabolizmu. Pri nedostatočnom prijíme energie potravou dochádza k poklesu hladiny glukózy v krvi, k mobilizácii zásobných tukov a k ich odbúraniu na neesterifikované mastné kyseliny (NEMK) a glycerol. Nadmerná mobilizácia NEMK vedie následne k ukladaniu triglyceridov v pečeni a k celkovému zhoršeniu výkonnosti a zdravotného stavu. Aj keď glycerol je prírodná látka, doposiaľ bola dávaná prednosť propylénglykolu ako glukoplastickej látke. Mechanizmus účinku glycerolu je obdobný účinku propylénglykolu. Glycerol je glukoplastická látka a zúčastňuje sa metabolizmu glukózy. Vzhľadom k tomu, že sa jedná o prírodnú látku jeho začlenenie do glycidového metabolizmu je pohotovejšie než u propylénglykolu. Glycerol prijímaný v krmive je z veľkej časti vstrebávaný v bachore (viac než 40 %), prípadne je bakteriálnou mikroflórou metabolizovaný na kyselinu propiónovú. Podľa (Schröder a Südekum, 1999) glycerol znižuje pomer acetátu k propionátu. Takisto efektívne znižuje obsah NEMK v plazme a zvyšuje hladinu glukózy v krvi.

Používa sa preventívne ak sú v stáde diagnostikované poruchy energetického metabolizmu alebo je vzhľadom k zloženiu krmnej dávky možné takéto poruchy očakávať.

## MATERIÁL A METODIKA

V experimente sme použili 6 ks dojníc dovezených z ŠPP Z. Teplica. Experiment prebiehal počas štyroch dní v klinických podmienkach II. internej kliniky UVL v Košiciach. Každý deň pokusu predstavoval jednu pokusnú skupinu, pričom prvý deň bol kontrolný (K, P1, P2, P3).

**Tab 1.** Prehľad skupín, počtu použitých zvierat ako aj aplikovaných p. o. dávok prípravku v g/kus/deň a obsah glycerolu (g) v jednotlivých dávkach.

skupina	počet zvierat	p .o. aplikácia prípravku v g/kus/deň	obsah glycerolu v g
K	6	-	-
P1	6	150	50,0
P2	5	200	66,6
P3	5	300	100,0

Perorálnu (p. o.) aplikáciu glycerolu v prípravku POWER-GLYC sme uskutočnili jednorázovo nosohltanovou sondou dojniciam v pokusných skupinách I., II. a III. v naváženom množstve rozriedenom v konštantnom množstve vody.

Odber vzoriek bachorového obsahu sme uskutočňovali v intervaloch 0., 3., 4., 6. a 10. hod, pričom 0. odber bol kontrolný a prípravok sme aplikovali až po tomto odbere. Vo vzorkách BO sme stanovovali pH, UMK (suma UMK, kys. octová-C2, kys. propiónová-C3, kys mliečna, kys. maslová a pomer C2 : C3).

Aktuálna acidita (pH) bachorového obsahu bola stanovovaná pH metrom Orion 720 A, a UMK izotachoforeticky prístrojom ISOTACHOFRETIC ANALYSER ZKI 02 (Laberko, Spišská nová Ves). Tabuľkové, grafické, štatistické vyhodnotenie a spracovanie dynamiky zmien ukazovateľov sme robili v rámci jednotlivých odberov a medzi skupinami navzájom. Na štatistické vyhodnotenie boli použité One- Way ANOVA a Tukey's Multiple Comparison Test. Ako štatisticky významné sme považovali hodnoty ( $p < 0,05$  a  $p < 0,001$ ).

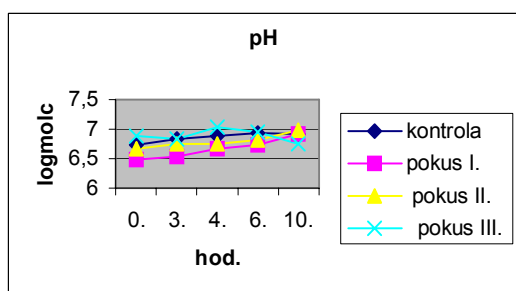
## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Po perorálnej aplikácii prípravku POWER-GLYC na báze glycerolu sme zaznamenali zmeny v dynamike vzostupu a poklesu hladín UMK v závislosti od času po podaní prípravku a taktiež v závislosti od dávky podaného prípravku. Na základe výsledkov v kontrolnej skupine, v ktorej dojnice boli bez prídavku glycerolu sme si vytvorili určitý grafický model zmien v bachore. V pokusných skupinách sme sledovali rozdiely týchto zmien oproti kontrolnej skupine. (Linke a kol., 2004) uvádzajú, že podávanie glycerolu v období laktácie spôsobuje zmeny v hodnotách bachorového profilu a to zvýšením molárnej koncentrácie kyseliny propiónovej a znížením pomeru C2:C3. Na základe výsledkov nášho experimentu (Graf 1 – 7) sme dospeli k záveru, že krátkodobé podávanie prípravku na báze glycerolu POWER-GLYC nemá výrazný vplyv na zníženie pomeru C2:C3 ani nedošlo k signifikantným zmenám v koncentrácií kyseliny propiónovej. (Schröder a Südekum, 1999) uvádzajú vplyv glycerolu na zvýšenie pH bachorového obsahu, kedy podprahové hodnoty pH stúpili na hodnotu 6,2. V našom experimente neboli zmeny pH štatisticky významné a v jednotlivých skupinách sa signifikantne nelíšili. Takisto (Reichel a kol., 2006) uvádzajú vplyv tekutého prípravku na báze glycerolu (Ketozan, fy. Polychem s r.o.) na stabilizáciu pH bachorovej tekutiny, zníženie koncentrácie kyseliny octovej, zvýšenie koncentrácie kyseliny propiónovej a zníženie pomeru C2:C3, avšak po dlhodobom podávaní (21 dní a. p. a 100 dní p. p.)

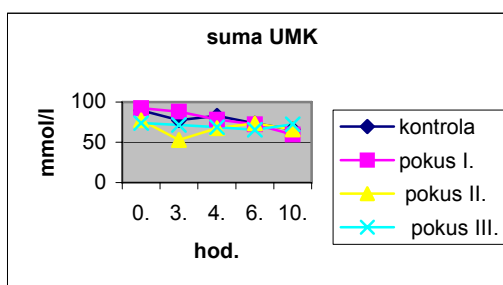
Na základe výsledkov nášho experimentu nemôžeme potvrdiť priaznivý vplyv na dynamiku a biochemizmus bachora, čo však mohlo byť spôsobené nedostatočnou adaptabilitou bachora na zmenu kŕmenia v experimentálnych podmienkach, individuálnym zdravotným stavom, krátkodobým podávaním prípravku a nevhodnou formou podania prípravku, ktorá mohla u dojnic vyvolať stresové podmienky. Takisto sa nám nepodarilo určiť optimálnu dávku prípravku a preto sa ako najvhodnejšia javí najvyššia skúmaná dávka 300 g prípravku na kus a deň, ktorú s úspechom podávajú na viacerých farmách, kde konštatovali priaznivý vplyv dlhodobého podávania na zdravotný stav a zvýšenie mliečnej produkcie, čo však je cieľom našich ďalších experimentov.

**Graf 1 - 7.:** Dynamika zmien ukazovateľov BO v závislosti od času a dávky prípravku

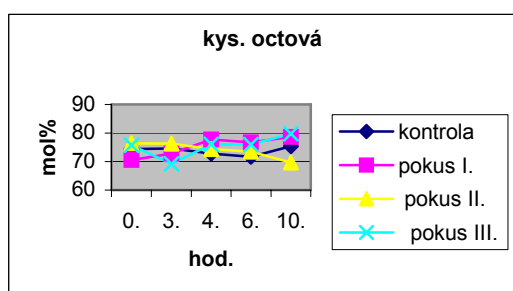
Graf 1.



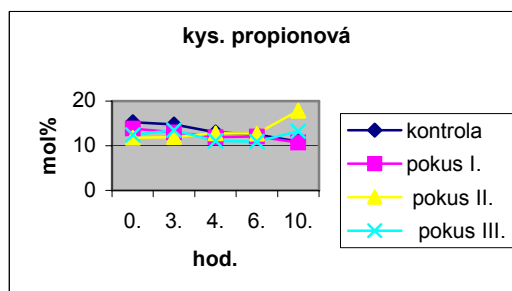
Graf 2.



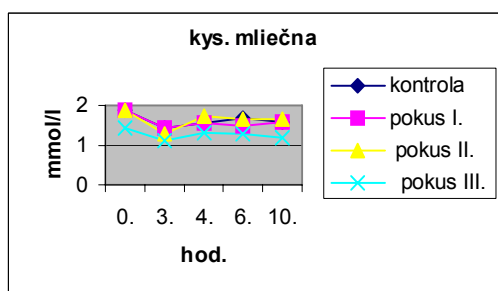
Graf 3.



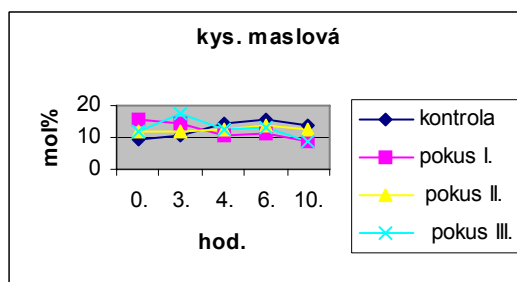
Graf 4.



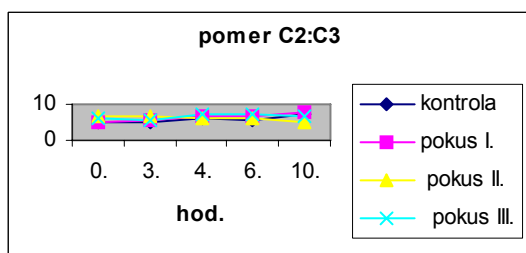
Graf 5.



Graf 6.



Graf 7.



**POUŽITÁ LITERATÚRA**

DeFrain, J. M., Hippen, A. R., Kaischeur, Jardon, P. W.: Feeding glycerol to transition dairy cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. J. Dairy Sci, 2004, 87, 4195 – 4205.

Linke, P. L., J. M. DeFrain, A. R. Hippen, and P. W. Jardon.: Ruminal and plasma responses in dairy cows to drenching or feeding glycerol. *J. Dairy Sci.* 2004, 87 (Suppl. 1): 343 (Abstr.).

Reichel, P., Hybský, Š., Kováč, G., Zavadová, Z., Húska, M., Paulíková, I.: Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on rumen fluid, blood metabolites and lactation performance. In supplement 10: 7<sup>th</sup> Middle European Buiatric Congress, Slovenia. 2004, 137 – 139.

Schröder, A., and K.- H. Südekum.: Glycerol as a by – product of biodiesel production in diets for ruminants. In *New Horizons for an Old Proc.*1999, 10th Int. Rapeseed Congr. Canberra, Australia, september 26 – 29, Paper No. 241 N. wratten and P. A. Salisbury, ed.

# RASTLINNÉ ADITÍVA A ICH ÚČINOK ZA *IN VITRO* A *IN VIVO* PODMIENOK

Haviarová M.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Rastlinné aditíva predstavujú jedno z možných riešení profylaxie ako v humánnej, tak aj vo veterinárnej medicíne. Cieľom našich experimentov bolo otestovať pôsobenie rastlinného extraktu Eleuterokoka a esenciálnych olejov oregana, šalvie, rumančeka, fenikla a koriandra za *in vitro* a *in vivo* podmienok. Najvýraznejší inhibičný účinok za *in vitro* podmienok prejavil esenciálny olej z oregana. V *in vivo* experimentoch s podávaním Eleuterokoka a oregana bolo zaznamenané zlepšenie imunologických a zootecnických parametrov.

## ÚVOD

Rastlinné aditíva (fytoaditíva), so širokou paletou prospešných vlastností, predstavujú jeden z možných spôsobov riešenia profylaktických otázok nielen v humánnej, ale aj vo veterinárnej medicíne. Využitie takýchto esenciálnych olejov (silíc) a rastlinných extraktov na profylaxiu podporujú aj mnohé vedecké štúdie, prostredníctvom *in vitro* a *in vivo* experimentov. Využitie fytoaditív je možné na základe ich rozsiahleho spektra vlastností ako sú napr. imunostimulačné vlastnosti (Di Carlo a kol., 2005; Steinmann a kol., 2001), antiradiačné (Ruujin a kol., 1990), antioxidačné (Davydov a kol., 2000), antibakteriálne (Marcin a kol., 2004; Nostro a kol., 2004), antivírusové, antikarcinogénne (Davydov a kol., 2000; Teissedre a Waterhouse, 2000), antiinflamatórne (Davydov a kol., 2000), antifugálne (Manohar a kol., 2001) a ďalšie. Nesmieme zabudnúť ani na možnosť pozitívneho ovplyvnenia produkčných ukazovateľov (Marcin a kol., 2004), či už znáškovosti (Poráčová a kol., 2005), hmotnostných prírastkov alebo mortality zvierat (Haviarová a kol., 2006; Szabóová a kol., 2006) posilnením nešpecifickej imunity či limitovaním patogénnych mikroorganizmov. Mechanizmus účinku fytoaditív je možné vysvetliť viacerými procesmi ako je súťaženie o živiny, inaktivácia bakteriálnych enzýmov, väzba na bakteriálne adhezíny alebo tvorba komplexov s bakteriálnou stenou. Na základe týchto poznatkov sme sa rozhodli vybrať a otestovať inhibičný účinok extraktu rastliny *Eleutherococcus senticosus* (Eleuterokokus), esenciálnych olejov *Origanum aetherolum* (oregano), *Salvia aetheroleum* (šalvia), *Chamomila recutita* (rumanček), *Coriandri aetheroleum* (koriander), *Foenicul aetheroleum* (fenikel) a komerčne používaného fytoaditíva XTRACT (carvarol, cinnamaldehyd, capsaicín) na rast širokého spektra indikátorových kmeňov z rôznych ekosystémov za *in vitro* podmienok a následne overiť získané informácie vo vybranom ekosystéme králikov v *in vivo* podmienkach pri sledovaní mikrobiologických, zootecnických, imunologických a biochemických parametrov po podaní extraktu Eleuterokoka, esenciálneho oleja oregana a komerčne vyrábaného XTRACTu (Cymedika SK s.r.o., Zvolen, Slovenská republika).

## MATERIÁL A METODIKA

*In vitro* testy boli uskutočnené za štandardných laboratórnych podmienok (teplota a dĺžka kultivácie v závislosti od indikátorového kmeňa) tzv. agar spot testom (De Vuyst a kol. 1996). Použili sme nasledovné kultivačné médiá: Brain Heart agar (Becton & Dickinson) pre G<sup>+</sup> baktérie, Tryptic Soy agar (Becton & Dickinson) pre G<sup>-</sup> baktérie. Extrakt rastliny *Eleutherococcus senticosus* (konc. 5% a 10%, Dr. Poráčová, Prešovská univerzita, Prešov, Slovenská republika; Calendula a.s., Nová Ľubovňa, Slovenská

republika) a esenciálne oleje boli použité v dávke 5  $\mu$ l, pričom esenciálny olej *Origanum aetheroleum* (Calendula) obsahoval 55% účinnej látky karvakrol, esenciálny olej *Chamomila recutita* (Calendula) bol s obsahom účinných látok  $\alpha$ -bisabolol 26% a chamazulen 6,5% a *Coriandri aetheroleum*, *Salviae aetheroleum*, *Foeniculi aetheroleum* (Calendula) s obsahom účinných látok thujón 24%, borneol 18%, cineol 15%. Na zistenie inhibičných účinkov extraktu a esenciálnych olejov bol použitý súbor 330 indikátorových izolátov z rôznych ekosystémov (izoláty z nášho laboratória, LŽM, ÚFHZ-SAV, Košice): *Escherichia coli*- izoláty z mäsových výrobkov (19), *Escherichia coli* z trusu psov (10), *Escherichia coli*-izoláty z trusu a céka králikov (71), 3 kmene salmonel-*Salmonella enterica* serovar Düsseldorf SA31 (Dr. Vasilková, Parazitologický ústav SAV, Košice), *S. enterica* serovar Enteritidis PT4 (Dr. Šišák, VÚV, Brno), *S. enterica* serovar Typhimurium (Dr. Marounek, ÚFGZ AVČR, Praha), *Enterococcus* sp.- izolované z trusu moriek (54), EK13- *Enterococcus faecium* (Dr. Lauková, ÚFHZ- SAV, Košice), EF55- *Enterococcus faecium* (Dr. Strompfová, ÚFHZ-SAV, Košice), EA5- *Enterococcus faecium* (Dr. Vasilková, Parazitologický ústav SAV, Košice), *Lactobacillus* sp.- z trusu hlodavcov (13), AD1- *Lactobacillus fermentum* izolovaný z trusu psa, *Pseudomonas*-like sp. z fermentovaných mäsových výrobkov (25), *Pseudomonas*- like sp. izolované z trusu a céka králikov (45), 13 izolátov z trusu koní-*Enterobacter asburiae* (1), *Yersinia enterocolitica* (5), *Aeromonas caviae* (1), *Pantoea agglomerans* (4), *Escherichia coli* (1), 1 kmeň neurčený; *Aerococcus viridans* z mäsových výrobkov (5), *Clostridium*-like sp. z trusu a céka králikov (33), *Listeria monocytogenes* CCM4699-zberkový kmeň (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno), LM9, LM10, LM6, LM7 izolované zo siláže a *Listeria innocua* LMG13568 (Univerzita Ghent-Brusel-Belgicko), *Clostridium*-like sp. izoláty z trusu a céka králikov (32) a *Staphylococcus* sp. z trusu a céka králikov (30).

Do *in vivo* pokusu (v spolupráci so Slovenským centrom poľnohospodárskeho výskumu v Nitre, farma králikov pri Ústave pre chov malých hospodárskych zvierat) bolo zaradených 72 králikov plemena HY- plus, samce, vo veku 5 týždňov, rozdelené do 4 skupín po 24 zvierat. Doba trvania pokusu bola 42 dní. V 1. experimentálnej skupine (ES1), bol podávaný extrakt rastliny *Eleutherococcus senticosus* (15g/100kg krmiva) po dobu 21 dní. V 2. experimentálnej skupine (ES2) bol podávaný esenciálny olej *Origanum aetheroleum* (10 $\mu$ l/zviera/deň) vo vode po dobu 21 dní. V 3. skupine-kontrolnej (KS) bolo podávané komerčné fytoaditívum XTRACT (15g /100kg krmiva) po dobu 21 dní. Zvieratá boli kŕmené štandardnou kŕmnom zmesou ANPRO.FEED (VKZ Bučany). Vzorky trusu boli odoberané na 0., 7., 21., 35. a 42. deň, vzorky krvi na 0., 21. a 42. deň a vzorky céka na 21. a 42. deň po odporazení 3 zvierat z každej skupiny, pričom 0.deň znamená začiatok podávania extraktu a esenciálnych olejov, začiatok pokusu; 7.deň-týždeň od začiatku podávania; 21.deň-3 týždne od začiatku podávania; 35. deň-2 týždne od nepodávania; 42.deň- 3 týždne od nepodávania, koniec pokusu. Sledované skupiny baktérií z trusu a céka boli izolované štandardnou mikrobiologickou metódou po predchádzajúcom vyriedení v Ringerovom roztoku (pH 7.0 Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) a vysiati na príslušné kultivačné média: M- Enterococcus agar (Becton&Dickinson) pre *Enterococcus* sp., DeMann-Rogosa-Sharpe agar (Merck) pre kyselinu mliečnu produkujúce mikroorganizmy (KMPM), Mannitol salt agar (Becton & Dickinson) pre koaguláza-negatívne stafylokoky (CNS), Baird-Parker agar (Becton & Dickinson) pre koaguláza-pozitívne stafylokoky (KPS) a *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* agar so suplementom (Oxoid Ltd.) pre *Clostridium*-like sp., Cetrimide agar (Becton & Dickinson) pre *Pseudomonas*- like sp., Mac Conkey agar (Becton&Dickinson) pre *Escherichia coli* pri teplote a dĺžke kultivácie typickej pre daný bakteriálny druh. Počty baktérií boli

vyjadrené v KTJ/ml/g (kolónie tvorné jednotky v 1 ml média a v 1 g trusu). Biochemické parametre boli stanovené z venóznej neheparinizovanej krvi, resp. zo séra, získaného centrifugáciou pri 3000 ot./10 min, s použitím komerčných kitov RANDOX (Anglicko). Sledované boli celkové bielkoviny (g/l), cholesterol (mmol/l), glukóza (mmol/l), vápnik (mmol/l), celkové lipidy (g/l) a enzým alanín-aminotransferáza ( $\mu\text{kat/l}$ ). Z imunologických parametrov (venózna neheparinizovaná krv) bola sledovaná fagocytárna aktivita (%) s prepočtom na index fagocytárnej aktivity (%) modifikovanou metódou podľa Hrubíšku (1981). Zo zootecnických parametrov bola sledovaná spotreba krmiva, prírastky živej hmotnosti, konverzia krmiva a mortalita, v spolupráci s kolegami zo Slovenského centra poľnohospodárskeho výskumu v Nitre.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Esenciálny olej *Oregani aetheroleum* prejavil najvýraznejší inhibičný účinok (*in vitro*) na rast indikátorových baktérií. Poznatok o bakteriostatickom/baktericídnom účinku zložiek oregana podporujú aj mnohé štúdie napr. s testovaním *Listeria monocytogenes* (Ting a kol., 1991) či *E. coli* (Burt a kol., 2003). Z celkového počtu 330 mikroorganizmov (144  $G^+$ , 186  $G^-$ ), oregano inhibovalo rast 142  $G^+$  baktérií (96%) a 173  $G^-$  (93%) baktérií. Šalvia inhibovala rast 57  $G^+$  mikroorganizmov (40%) a 69  $G^-$  (37%) baktérií. Esenciálny olej z koriandra inhiboval rast 72  $G^+$  indikátorov (50%) a 22  $G^-$  (12%). Najnižší inhibičný účinok prejavil esenciálny olej z fenikla; inhiboval 6  $G^+$  baktérií (4%) a 4  $G^-$  (2%) baktérie a Eleuterokokus, ktorý inhiboval 5  $G^+$  mikroorganizmov (3%) a 2  $G^-$  (1%). Účinok rumančeka bol otestovaný na súbore 127 indikátorových baktérií (82  $G^+$ , 45  $G^-$ ), pričom inhiboval rast 6  $G^+$  (7%) a 4  $G^-$  (9%) mikroorganizmov. Menej výrazný účinok rumančeka v tejto štúdii pri porovnaní s našimi predchádzajúcimi testovaniami môže byť spôsobený rôznorodým pôvodom testovaných indikátorov (Lauková a kol., 2006; Simonová a kol., 2006). Pri *in vivo* experimente neboli signifikantne ovplyvnené v truse a céku králikov počty sledovaných bakteriálnych skupín. V skupine zvierat, ktoré prijímali rastlinný extrakt *Eleutherococcus senticosus* bola na 7. a 21. deň trvania pokusu zaznamenaná redukcia vo výskyte zárodkov *Staphylococcus aureus* (oproti ES2 aj KS) a koagulázopozitívnych stafylokokov (oproti ES2) o 1-2 matematické rády. Po aplikácii esenciálneho oleja *Origanum aetheroleum* bol zaznamenaný pokles enterokokov o 1-2 matematické rády na 7. a 21. deň trvania pokusu (oproti KS) a pokles *Escherichia coli* bol zaznamenaný na 7. deň (oproti ES1) pokusu. Biochemické parametre neboli vplyvom podávaných fytoaditív ovplyvnené. Výrazný imunostimulačný účinok bol zaznamenaný v experimentálnej skupine, v ktorej bol podávaný rastlinný extrakt Eleuterokoka (oproti ES2 a KS) a tento účinok pretrvával aj tri týždne od nepodávania extraktu (42.deň, Tab. č. 1). V skupine zvierat, ktoré prijímali rastlinný extrakt z Eleuterokoka a oregana, boli zaznamenané zvýšené hmotnostné prírastky pri nižšej konverzii a celkovej spotrebe krmiva a znížená bola aj mortalita zvierat (oproti ES2 aj KS).

*Výsledky prezentované v tejto štúdii vznikli za finančnej podpory grantovej vedeckej agentúry VEGA, projekt č. 2/5139/26.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Burt S.A., Reinders R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 Letters in Applied Microbiology 2003; 36:162-167
- Davydov A., Krikorian A.D. *Eleutherococcus senticosus* (Araliaceae) as an adaptogen Journal of Ethnophar. 2000; 72:345-393



Di Carlo G., Pacilio M., Capasso R., Di Carlo R. Effect on prolactin secretion of *Echinacea purpurea*, *Hypericum perforatum* and *Eleutherococcus senticosus*. *Phytomedicine* 2005; 12:644-647

Haviarová M., Chrastinová L., Szabóová R., Simonová M., Stropfiová V., Faix Š., Vasilková Z., Plachá I., Lauková A., Rafay J., Poráčová J. *Eleutherococcus senticosus* a chov králikov. Zborník abstraktov, Dni výživy a veterinárnej dietetiky VII., Košice, 13.-14. sept. 2006, str. 101

Lauková A., Simonová M., Stropfiová V., Marciňáková M., Haviarová M., Líšková A., Šalamon I. In vitro inhibitory Effect of Chamomile Essential Oil Against Different Clinical, Intestinal, Human and Animal Bacteria Zborník abstraktov, I. International Symposium on Chamomile Research Development and Production, Prešov, 07.-10. jún

Manohar V., Ingram C., Gray J., Talpur N.A., Echart B.W., Bagchi D. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2001; 228:111-117

Marcin A., Bujňáková D., Kmeť V., Mati R. Mikrobiologické, metabolické, produkčné a zdravotné aspekty aplikácie rastlinných silíc do krmiva odstavených prasiat. Zborník abstraktov, XXI. Dni živočíšnej fyziológie, Košice, 23.-24. sept. 2004, p. 52

Nostro A., Blanco A.R., Cannatelli M.A., Enea G.F., Morelli I., Roccaro A.S. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microb. Letters* 2004; 230:191-195

Poráčová J., Šutiaková I., Zahatňanská M., Šály J., Blaščáková M., Šalamon I., Taylorová B. Vplyv suchého extraktu eleuterokoka tŕnistého (*Eleutherococcus senticosus*, Maxim.) na znášku nosníc. Zborník referátov, 4. Biologické dni, Nitra, 8.-9. sept. 2005, str. 458

Ruujin Z., Jinkang Q., Gnanghua Y., baozhen W., Xiulan W. Medicinal protection with Chinese herb-compound against radiation damage. *Aviation, Space and Environmental Medicine* 1990; 61:729-731

Steinmann G.G., Esperester A., Joller P. Immunopharmacological in vitro Effects of *Eleutherococcus senticosus* Extracts. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2001; 51:76-83

Szabóová R., Chrastinová L., Haviarová M., Simonová M., Stropfiová V., Faix Š., Vasilková Z., Plachá I., Lauková A., Rafay J. Fytoaditíva v chove králikov. Zborník abstraktov, Dni výživy a veterinárnej dietetiky VII., Košice, 13.-14. sept. 2006, str. 99

Teissedre P.L., Waterhouse A.L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties 2000; 48:3801-3805

Ting W.T.E., Deibel K. E. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to spices at two temperatures. *Journal of Food Safety* 1991; 12: 129-137

**Tab. č. 1** Imunostimulačný účinok Eleuterokoka, oregana a XTRACTu

	Eleutherococcus	Oregano	XTRACT
	Fagocytárna aktivita %		
Deň			
0.	31		
21.	15	22	13
42.	24	19	17
	Index fagocytárnej aktivity		
0.	1,7		
21.	0,7	1,2	0,8
42.	1,3	0,2	1,5

## MONITOROVANIE PATOGENITY NÁDOROV MLIEČNEJ ŽĽAZY SÚK

Jakubčinová M., Valocký I.

*Klinika pôrodnictva, gynekológie a andrológie, UVL, Košice*

### ABSTRAKT

Tumory mliečnej žľazy patria medzi najčastejšie sa vyskytujúce tumory u psov, v súčasnosti sa prezentuje 25-50% všetkých neoplaziem u týchto druhov s priemerným vekom výskytu medzi 6 a 10 rokom. Majoritou týchto tumorov je fakt, že sú malígne, agresívne a môžu metastázovať do regionálnych lymfatických uzlín, sleziny, pľúc a pečene. Ovariálne hormóny hrajú dôležitú úlohu v rozvoji mamárnych tumorov podobne ako u progresívnej rakoviny prsníka u ľudí. U psov a mačiek, podiel steroidných hormónov v rozvoji mamárnych karcinómov je podporovaný protektívnym efektom ovariektómie a sporadickým výskytom mamárnych dysplastických a neoplastických lézií u zvierat liečených progestagénmi. Kanínne mamárne tumory sú heterogénne od ich patologického aspektu ku klinickému chovaniu. Niekoľko štúdií bolo robených na stanovenie prognózy tumorov mliečnej žľazy súk, ale niektoré oblasti, najmä tie týkajúce sa úlohy estrogénnych receptorov, zostávajú neurčité.

### ÚVOD

Nádory mliečnej žľazy sú veľmi častým problémom u súk vo veku 10-11 rokov, kedy incidencia výskytu každým rokom stúpa. Mamárne tumory sú v poradí druhé najčastejšie vyskytujúce sa nádory, hlavne u súk (Tab.1). Mliečna žľaza je najčastejším miestom výskytu malígnych tumorov psov (Tab.2). Mamárne tumory sa vyskytujú najmä u starších zvierat (vo veku 10 rokov). Incidencia sa zvyšuje po 6 roku veku. Zriedka sa vyskytujú u súk mladších ako 5 rokov veku (MacEwen a Withrow, 1996). Zvyčajne sú postihované všetky plemená. Najvyššia frekvencia výskytu tumorov je u pudlov, Bostonských teriérov, Foxteriérov, Airedailských teriérov, Pyrenejských psov, Samojedov, Keeshondov a zo športových plemien u pointrov, labradorov, Írskych setrov i kokeršpanielov. Približne 35-50% tumorov mliečnych žliaz súk a 90% tumorov mliečnych žliaz mačiek je malígnych (Ogilvie a Moore, 1995). Výskyt mamárnych tumorov súk pred prvým estrom je 0,5%. Tento výskyt sa zvyšuje do 8% po prvom estrálnom cykle a tvorí 26% po druhom estre. Väčšina mamárnych tumorov sa vyskytuje primárne v kaudálnych mliečnych žľazách. V 50-60% sa u pacientov vyskytuje viac ako jeden tumor. Príčina vzniku tumorov mliečnej žľazy nie je známa. Väčšina tumorov mliečnej žľazy je však závislá od hormónov, čoho dôkazom je prevencia formou vykonania ovariohysterektómie pred dosiahnutím veku 1 roku. Estrogénové a progesterónové receptory boli nájdené v 80% prípadov tumorov súk, hoci v nižšej koncentrácii ako u nádorov prsníkov žien (Donnay, 1995). Progesterónové receptory boli nájdené aj v niektorých tumoroch mliečnej žľazy mačiek. Progesterón vplýva na rozvinutie malígnych tumorov mliečnej žľazy mačiek a benígnych tumorov mliečnej žľazy súk. Niektoré progestagény zahrňujúc medroxyprogesteron acetate, megestrol acetate a chlormadinone acetate môžu zvyšovať riziko benígnych, ale nie malígnych mamárnych tumorov u súk.

**Tab.1:** Distribúcia primárnych tumorov psov podľa miesta postihnutia  
(Priester a Mantel, 1971)

miesto postihnutia	prevalencia (%)	malignita (%)
koža	28,1	20
mliečna žľaza	12,2	46
GIT	9,6	33
cievny a lymfatický systém	7,4	95

**Tab.2:** Distribúcia malígnych tumorov psov podľa miesta postihnutia  
(Dorn, 1968)

miesto postihnutia	incidencia výskytu malígnych tumorov (na vzorke 100 000 psov)
mliečna žľaza	105,0
koža (okrem melanómu)	90,4
spojovacie tkanivo	35,8
kožný malígny melanóm	25,0
cievny a lymfatický systém	21,7

## MATERIÁL A METODIKA

### *1. Odber a spracovanie krvi na hematologické, biochemické vyšetrenie a RIA analýzu pohlavných hormónov $P_4$ a $E_2$ :*

Odber krvi robíme za účelom vyšetrenia biochemických parametrov, diferenciálneho krvného obrazu a vyšetrenia pohlavných hormónov progesterónu a 17-beta estradiolu.

### *2. Ultrasonografia nádoru mliečnej žľazy (USG):*

USG nádoru mliečnej žľazy sme vykonali u suky v dorzoventrálnej polohe, po vyholení srsti v oblasti brucha. Na postihnutú mliečnu jednotku sme naniesli kontaktný gel Gelson<sup>®</sup> (VUP, a.s., SR). Tkanivo mliečnej žľazy je echogénne a homogénne. Tumor mliečnej žľazy má rôznu echotextúru, javí sa anechogénne. Používali sme elektronickú, sektorovú, konvexnú sondu o frekvencii 3,5 MHz (FF Sonic 4000 Fukuda) a lineárnu sondu o frekvencii 5 MHz (Aloka SSD 500, Japonsko).

### *3. Röntgenogram hrudníkovej dutiny:*

Röntgenogram bol vykonaný v latero-laterálnej polohe. Používali sme röntgen Moveta Typ II; kazetu Blue 200, Curix EU cassette; film Agfa 30x40 cm.

### *4. Chirurgická extirpácia tumoru mliečnej žľazy:*

Po zdiagnostikovaní tumoru mliečnej žľazy je najvhodnejšie tumor čo najskôr chirurgicky odstrániť. Po uvedení suky do anestézy sa vykoná mastektómia postihnutého mliečného tkaniva s časťou zdravého tkaniva mliečnej žľazy.

### 5. Príprava histologickej vzorky tkaniva:

Po excízii vzorky tkaniva nasleduje vypieranie v tečúcej vode, odvodnenie v rade alkoholov, prejasnenie xylénom, impregnovanie parafínom a zalievanie vzorky do parafínových bločkov. Po stuhnutí parafínu vzorku režeme na mikrotóme a farbíme. Takto pripravenú vzorku vyšetrujeme pod mikroskopom.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 1. Hematologické vyšetrenie krvi (Tab.3):

Vyšetrované boli 4 vzorky. U vzorky 4. bola zaznamenaná mierna erytrocytopenia, vo vzorke 3. leukopénia; vo vzorke 2. znížené percento segmentovaných neutrofilov, vo vzorke 1. zvýšené % tyčinkových neutrofilov; vo vzorke 3. zvýšené % eozinofilov; lymfocytóza vo vzorke 2. Podobné výsledky uvádza Shekar et al. (2001) vo svojej štúdii, kde zaznamenal mierny stupeň anémie, ale pri porovnaní s našimi výsledkami zaznamenal mierny stupeň leukocytózy. Tieto nami namerané odchýlky sú však len minimálne a nevykazujú zdravotné problémy.

Tab.3

parametre	norma	vzorka č.1	vzorka č.2	vzorka č.3	vzorka č.4
EC ( $T.l^{-1}$ )	5,5-8,5	5,7	6,94	8,44	<b>5,12</b>
LC ( $G.l^{-1}$ )	6,0-12	8,9	10,1	<b>5,2</b>	11,3
NS (%)	55-75	65	<b>43</b>	70	62
NJ (%)		0	0	2	2
NT (%)	0-4	<b>8</b>	4	4	4
EO (%)	0-5	5	5	<b>7</b>	1
Ba (%)	0-1	0	0	0	0
Ly (%)	12,0-32,0	22	<b>48</b>	17	31
Mo (%)	0-5	0	0	0	0
HK (%)		44	40		36

### 2. Biochemické vyšetrenie krvi (Tab.4):

Parametre	norma	vzorka č.1	vzorka č.2	vzorka č.3
ALT ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	do 0,333	<b>0,473</b>	<b>2,83</b>	<b>3,80</b>
ALP ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	0,084-0,410	<b>2,3</b>	<b>8,11</b>	<b>8,67</b>
CREAT ( $\mu\text{mol.l}^{-1}$ )	88-177	<b>80,9</b>	<b>85,6</b>	<b>61,7</b>
TP ( $\text{g.l}^{-1}$ )	57,0-75,0	<b>49,82</b>	<b>56,3</b>	<b>48,9</b>
Urea ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )	3,33-6,33	5,19	5,37	6,21
GLU ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )	4,0-6,0	5,92	<b>6,22</b>	<b>6,58</b>
CHOL ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )	3,25-6,5	<b>6,82</b>	6,01	<b>2,74</b>
Ca ( $\text{mmol.l}^{-1}$ )	2,25-2,99	2,3	<b>1,96</b>	2,36

Vo všetkých troch vzorkách sme zaznamenali zvýšené hodnoty ALT a ALP, ktoré sú nielen pečenevé enzýmy, ale vyskytujú sa aj v kostiach, svaloch. Zvýšené hodnoty sa

zistili pri vzorkách 2. a 3. v hladine glukózy. V hodnotách cholesterolu sme zaznamenali vo vzorke 1. zvýšenú hodnotu a pri vzorke 3. zníženú hodnotu. Vyšetrenia týchto troch vzoriek zaznamenali znížené hodnoty kreatinínu a celkového proteínu. Hodnoty urei sú v norme a hodnoty vápnika sú tiež v norme okrem vzorky 2., kde je znížená hladina.

### 3. Hodnoty progesterónu a 17-beta estradiolu (Tab.5):

číslo vzorky/odber	progesterón (ng.l <sup>-1</sup> )	17-beta estradiol (pg.l <sup>-1</sup> )
1. v deň operácie	14,4	65,5
1 mesiac po operácii	< 0,03	86,1
2. v deň operácie	0,2	101,0
3. v deň operácie	< 0,03	26,6
4. v deň operácie	< 0,03	< 3,0
5. v deň operácie	< 0,03	83,4
6. v deň operácie	1,8	< 3,0
7. v deň operácie	10,2	28,5
8. v deň operácie	< 0,03	< 3,0
9. v deň operácie	0,42	< 3,0
10. v deň operácie	0,27	< 3,0
11. v deň operácie	0,06	37,0

Keďže štúdia podľa Weya (2000) poukazuje na vplyv hormónov 17-beta estradiolu a progesterónu na rast nádorov mliečnej žľazy, sledovali sme hodnoty progesterónu a 17 – beta estradiolu v sére. Wey (2000) uvádza, že nie je rozdiel v hladinách týchto hormónov u súk s mamárnymi tumormi a u súk zdravých. My sme krv odoberali v čase anestrie, minimálne mesiac po skončení ruje, avšak namerané hodnoty nezodpovedali prebiehajúceho pohlavnému cyklu. Napríklad mesiac po skončení ruje sme zaznamenali vysoké hladiny 17-beta estradiolu, ktoré by mali byť v tomto štádiu minimálne. Takáto vysoká hladina estradiolu sa vyskytuje pred proestrom, nie však mesiac po estre. Vysoká koncentrácia progesterónu sa vyskytuje u jednej vzorky, približne dva mesiace po estre, čo však môže byť následkom pseudogravidity (Concannon, 1975). Len u prvej vzorky sme mohli urobiť vyšetrenie hormónov pred aj po mastektómii. Došlo k výraznému zostupu hladiny progesterónu a miernemu zvýšeniu koncentrácie estradiolu. Avšak aby sme mohli vysloviť nejaký vzťah hormónov k tumorom, museli by sme dať vyšetriť väčší počet vzoriek v širšom časovom diapazóne.

### 4. Výsledky histológie:

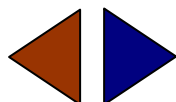
#### 4.1. Typy nádorov mliečnej žľazy súk:

Zistili sme 10 typov nádorov najčastejšie sa vyskytujúcich u súk. Sú to nasledujúce: zmiešaný nádor mliečnej žľazy, adenokarcinóm, medulárny karcinóm, papilomatózny karcinóm, osteochondrosarkóm, vretenobunkový karcinóm, fibroadenokarcinóm, medulárny adenokarcinóm, papilárny adenokarcinóm, mucinózny karcinóm.

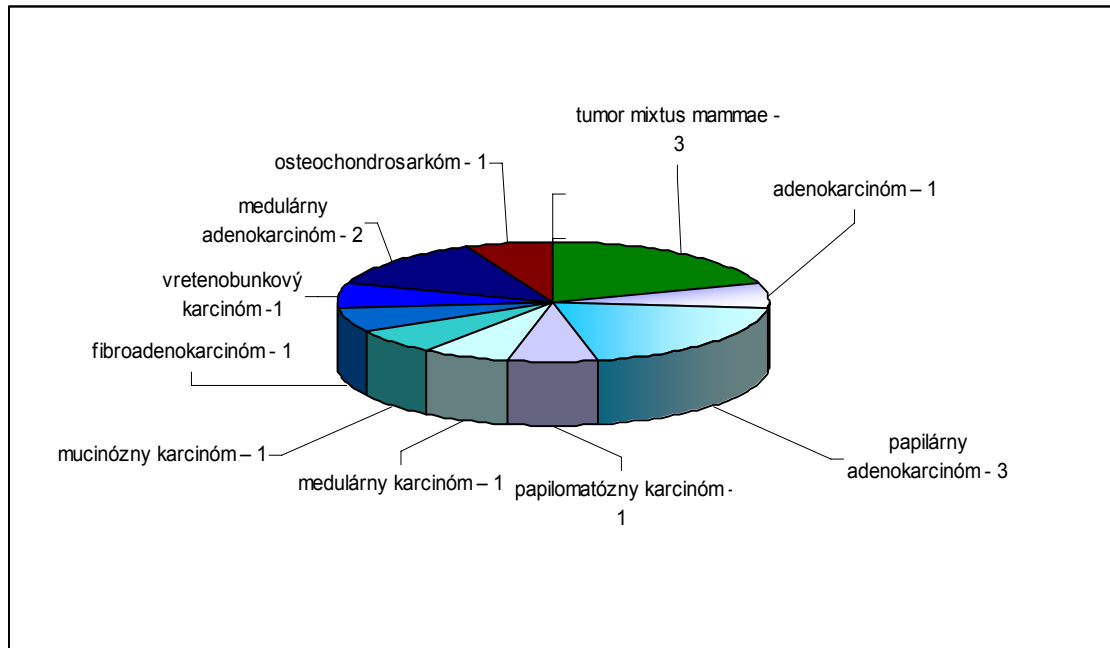
#### 4.2. Frekvencia výskytu nádorov podľa typu:



- benigný  
tumor



- maligné  
tumory



**Graf 1.:** Vyšetrenia našich histologických vzoriek poukázali na to, že väčšina, konkrétne 80% vzoriek je malígnych, zvyšok benígnych. Avšak podľa Bostocka (1986) sa malígne tumory vyskytujú vo frekvencii 49% a benígne tumory v incidencii 51%.

Z 15 vyšetovaných vzoriek, v troch vzorkách bol diagnostikovaný benígny tumor mliečnej žľazy (tumor mixtus mammae), čo predstavuje frekvenciu 20%. V ostatných vzorkách sa zistili malígne tumory mliečnej žľazy, sarkóm a karcinómy rôzneho bunkového zloženia v 80% frekvencii. Karcinómy tvoria 91% z malígnych tumorov, podobne 90% karcinómov z malígnych tumorov uvádza aj literatúra.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Bostock, D.E. : Canine and feline mammary neoplasms. *British Veterinary Journal*, 142, 1986, 506-15.

Concannon, P.W., Hansel, W. et Visek, W.J.: The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol.Reprod.*, 13, 1975, s.112-121.

Donnay, I.: Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 56, 1995, s. 1188.

Dorn, C.R.: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California. II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J.Natl.Cancer Inst.* 4, 1968, s. 307.

MacEwen, E.G., Withrow, S.J.: Tumors of the mammary gland. In: Withrow, S.J., MacEwen, E.G., *Small Animal Clinical Oncology*, 2nd edn, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1996, s.356-372.

Ogilvie, G.K., Moore, A.S.: *Managing the veterinary cancer patient: A practice manual*, Trenton, N.J., Veterinary Learning Systems, 1995, s. 690-698.

Priester, W.A., Mantel, N.: Occurrence of tumours in domestic animals. Data from 12 United States and Canadian colleges of veterinary medicine. *J.Natl.Cancer Inst.* 47, 1971, s. 1333.

Shekar, C. S., Vijarasarathi, S. K., Suguda, R.: Haematological screening in dogs with mammary tumours. *Indian Vet. J.*, 2001, 78, 163-164.

Wey, N.: Mammary tumours in the bitch: hormonal influence with emphasis on 17beta-oestradiol and progesterone, *J. Natl. Cancer Inst.*, 45, 2000, s. 1, 19-31; 2.

## BIOLOGICKÉ ÚČINKY RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

Juhás Š.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Rastliny a ich extrakty sú využívané človekom od nepamäti. Pokrok súvisiaci s vývojom syntetických liečiv je úzko spojený aj s modernizáciou technických postupov na izoláciu účinných látok prítomných v rastlinách. V súčasnosti sú z rastlín pripravované preparáty, ktorých terapeutický účinok môže byť porovnateľný s umelo syntetizovanými prípravkami, pričom v niektorých prípadoch majú rastlinné liečivá menej nežiaducich účinkov ako ich syntetické ekvivalenty. Tento fakt a nedôvera širokej verejnosti v bezpečnosť syntetických preparátov vedie k rozsiahlemu výskumu v oblasti prijateľných alternatív, napríklad rastlinných extraktov a ich zložiek. Najviac prakticky použiteľných údajov priniesli práce skúmajúce antibakteriálne a antioxidačné účinky rastlinných extraktov v *in vitro* podmienkach.

### ÚVOD

*In vitro* a *in vivo* štúdie dokázali rozmanité účinky rastlín, ich extraktov, prípadne ich extrahovaných zložiek. Z pozitívnych účinkov rastlín a ich extraktov môžeme spomenúť najmä ich antioxidačné, antimutagénne, antibakteriálne, antivírusové, antimykotické vlastnosti (Lauková a kol., 2006; Burt, 2004; McKay a Blumberg, 2006; Cavanagh a Wilkinson, 2002). Mnohé rastlinné extrakty a esenciálne oleje môžu tiež výrazne ovplyvniť imunitné reakcie a neuroendokrinný systém (Yamada a kol., 2005; Abe a kol., 2003; Salem, 2005). Okrem pozitívnych účinkov boli zistené aj negatívne účinky rastlín a ich zložiek na živé organizmy. Tak napríklad boli pozorované anafylaktické reakcie u pestovateľov bylín, u ktorých bol zvýšený výskyt akútnych dýchacích obštrukcií spôsobených inhaláciou bylínneho prachu (Benito a kol., 1996; Golec a kol., 2005).

### ANTIMIKROBIÁLNE ÚČINKY RASTLINNÝCH EXTRAKTOV

Za antibakteriálne účinky rastlín sú predovšetkým zodpovedné fenoly a polyfenoly, terpenoidy, esenciálne oleje, alkaloidy, lektíny, polypeptidy a iné látky prítomné v rastlinách (Cowan, 1999). Napríklad pamajorán (*Origanum onites* L.) s jeho antioxidačnými, antimikrobiálnymi a antiparazitárnymi vlastnosťami bol účinný na viaceré patogény (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Eimeria tenella*) (Alma a kol., 2003; Nostro a kol., 2004; Giannenas a kol., 2003). Antimikrobiálne účinky karvakrolu a *p*-cyménu, ktoré sú zložkami jeho esenciálneho oleja, sa využívajú na stabilizáciu a dezinfekciu potravín napríklad ovocných štiav (Kiskó a Roller, 2005). Medzi antibakteriálne látky esenciálnych olejov patria prírodné fenoly a monoterpény napr. tymol, karvakrol, eugenol, cinamaldehyd atď., u ktorých bol preukázaný synergický prípadne antagonistický antibakteriálny účinok (Burt, 2004; Ferme a kol., 2004). Pamajoránový esenciálny olej bol tiež účinný nielen voči rozličným patogénom v odlišných koncentráciách, ale mal aj silný baktericídny účinok voči komenzálnej mikroflóre (Horosová a kol., 2006). Naproti tomu použitie esenciálnych olejov v koncentráciách úplne potláčajúcich bakteriálny rast pôsobilo deštruktívne na kultúru buniek podobných črevným v *in vitro* podmienkach. Naopak použitie nižších koncentrácií esenciálnych olejov a ich zložiek viedlo naopak k významnej redukcii cytotoxického účinku *E. coli* na kultúru Caco-2 buniek (Fabian a kol., 2006). Podobne pri podávaní harmančekového esenciálneho oleja v pitnej vode králikom bolo zistené zníženie počtu izolovaných



bakteriálnych pôvodcov črevných ochorení a takisto zníženie koncentrácie vylučovaných oocýst rodu *Eimeria* (Simonová a kol., 2006). Dôležitou vlastnosťou tymolu a karvakrolu (príp. esenciálnych olejov s ich obsahom) je ich účinok aj na mikroorganizmy rezistentné na antibiotiká, čo dáva priestor na ich využitie v terapii infekčných ochorení (Nostro a kol., 2004).

#### VPLYV RASTLINNÝCH EXTRAKTOV NA IMUNITNÝ A NEUROENDOKRINNÝ SYSTÉM

Viaceré ak nie všetky rastlinné extrakty sú zložitou zmesou látok, niektorých ešte neidentifikovaných, ktoré môžu ovplyvniť neuroendokrinný systém živých organizmov, prípadne pôsobia protizápalovo alebo imunomodulačne. Napríklad sušený pamajorán obohatený o esenciálny olej z pamajoránu ako komerčný prípravok „Oregpig“ bol experimentálne použitý u rastovo retardovaných prasatách, pričom sa zistili zvýšené prírastky a lepšia konverzia krmiva ( $P < 0,05$ ) v skupine s pamajoránom a nižšia mortalita ( $P < 0,001$ ). V ich periférnej krvi sa zistil nešpecifický imunomodulačný efekt prípravku „Oregpig“ (Walter a Bilkei, 2004). „Oregpig“ takisto zlepšil reprodukčné ukazovatele u prasiat. Znížil počet mŕtvo narodených prasiatok a zvýšil počet živo narodených prasiatok a početnosť vrhov (Allan a Bilkei, 2005). Medzi zaujímavé substancie patria napr. tymol a karvakrol, ktoré sú prítomné vo viacerých esenciálnych olejoch a boli účinné pri liečbe akútneho zápalu stredného ucha spôsobeného patogénom *Haemophilus influenzae* (Kristinsson a kol., 2005). Imunomodulačné účinky viacerých rastlinných extraktov sa potvrdili v *in vitro* podmienkach na ľudských bunkových kultúrach imunitných prípadne endoteliálnych buniek zväčša lymfocytoch a makrofágoch. Napríklad extrakty zo stredomorských rastlín *Scandix australis* a *Artemisia alba* inhibovali, zatiaľ čo extrakty z rastlín *Amaranthus sp.*, *Eryngium campestre*, *Thymus pulegioides* a *Reichardia picroides* stimulovali prozápalový transkripčný faktor (NF- $\kappa$ B) aktivovaný IL-1 v kultúre humánných endoteliálnych buniek (Stalińska a kol., 2005). Podobne kyslé polysacharidy izolované z tymiánu ovplyvňovali komplement, čím môžu modulovať imunitné reakcie (Chun a kol., 2001). Levanduľa a jej extrakty sú v ľudovom liečiteľstve známe svojimi ukludňujúcimi a protikrčovými účinkami. Tieto jej antistresové účinky a vplyv na hormonálny systém bol pozorovaný v experimente s levanduľovým olejom a jeho hlavnou zložkou linalolom. Inhaláciou linalolu ako aj levanduľového oleja pred podaním éteru, ktorý navodil stres a tým zvýšenie hladín ACTH, FSH a zníženie koncentrácií adrenalínu, noradrenalínu a dopamínu, došlo k významnému upraveniu koncentrácií týchto hormónov u potkanov (Yamada a kol., 2005). Podobne levanduľová arómaterapia spojená s masážou zvýšila počet cytotoxických T lymfocytov ( $CD8^+$ ) (Kuriyama a kol., 2005). Predpoklad, že niektoré rastlinné látky by mohli mať terapeutický účinok v liečbe niektorých závažných humánných ochorení, potvrdzuje aj experiment s tymochinónom. Preventívne podávanie tymochinónu (10mg/kg), účinnej zložky liečivej čiernej rasce (*Nigella sativa*), potkanom malo výrazný ochranný účinok pri experimentálne indukovanej kolitíde. Tento protektívny efekt tymochinónu bol účinnejší ako v skupine potkanov liečených sulfasalazínom (500mg/kg), bežne používaného liečiva u pacientov s Crohnovou chorobou (Mahgoub, 2003). Odvar z klinčeka a ďalších rastlín mal značný antivírusový účinok u imunosupresovaných myší a potláčal infekciu cytomegalovírusom, čo by mohlo byť využité v liečbe imunodeficientných pacientov (Yukawa a kol., 1996). Vplyv esenciálnych olejov a ich zložiek na imunitné reakcie je pravdepodobne závislá od ich dávky. Príkladom je použitie eugenolu - majoritnej zložky škoricovej a klinčekovej silice - v *in vitro* podmienkach, pričom koncentrácia

eugenolu presahujúca 1mM pôsobila cytotoxicky a naopak pri použití nižších dávok eugenolu sa pozorovala stimulácia (zvýšenie aktivity NK buniek) imunitného systému (Vishteh a kol., 1986). Tento predpoklad podporuje aj ďalší experiment *in vitro* podmienkach, ktorý skúmal peroxidom indukovanú fragmentáciu DNA v ľudských lymfocytoch pri použití rozličných koncentrácií zložiek tymiánu (tymol, karvakrol,  $\gamma$ -terpinén). Použitie nižších koncentrácií tymolu a karvakrolu malo protektívny účinok, naopak ich vyššie koncentrácie ako 0,1 mM indukovali zvýšenú fragmentáciu DNA (Aydin a kol., 2005).

## ZÁVER

Kombinácie rastlinných extraktov alebo ich zložiek majú pravdepodobne synergické alebo naopak antagonistické účinky. Ich zloženie a účinky sa takisto výrazne odlišujú s ohľadom na spôsob ich získavania (tlak, teplota, rozpúšťadlo). Navyše mechanizmy pôsobenia rastlín na živé organizmy patria medzi kľúčové otázky, ktoré sú v súčasnosti čoraz častejšie experimentálne skúmané. Spoločným prvkom liečivých rastlín je najmä ich antioxidantný účinok, ktorý je zodpovedný za ochranu tkanív a orgánov živých organizmov pred toxickým poškodením voľnými radikálmi. Antioxidantný účinok sa pripisuje viacerým zložkám rastlín, ale hlavne polyfenolom prítomným v týchto rastlinách, ktoré majú aj protizápalový, protinádorový a antimutagénny účinok. Ako príklad môže slúžiť rozmarín a šalvia, rastliny bohaté na polyfenoly. Viaceré rastliny a ich extrakty majú výrazne pozitívne účinky pozorované *in vivo* a *in vitro* podmienkach, prípadne v klinických štúdiách na ľuďoch a je potrebný ich ďalší podrobný výskum.

*Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu vedy a techniky na základe Zmluvy č. APVT-51-015404*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Abe S, Maruyama N, Hayama K, Ishibashi H, Inoue S, Oshima H, Yamaguchi H. Suppression of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil adherence responses by essential oils. *Mediators Inflamm.* 2003; 12: 323-328.

Allan P, Bilkei G. Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology.* 2005; 63: 716-721.

Aydin S, Basaran AA, Basaran N. Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 1299-1305.

Benito M, Jorro G, Morales C, Pelaez A, Fernandez A. Labiatae allergy: systemic reactions due to ingestion of oregano and thyme. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1996; 76: 416-418.

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94: 223-253.

Cavanagh HM, Wilkinson JM. Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Res.* 2002; 16: 301-308.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12: 564-582.

Fabian D, Sabol M, Domaracka K, Bujňáková D. Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol In Vitro.* 2006; 20: 1435-45.

Ferre D, Banjac M, Calsamiglia S, Busquet M, Kamel C, Avgustin G. The Effects of Plant Extracts on Microbial Community Structure in a Rumen-Simulating

Continuous-Culture System as Revealed by Molecular Profiling. *Folia Microbiol (Praha)*. 2004; 49: 151-155.

Golec M, Skórska C, Mackiewicz B, Góra A, Dutkiewicz J. Respiratory effects of exposure to dust from herbs. *Ann Agric Environ Med*. 2005; 12: 5–10.

Horosová K, Bujňáková D, Kmet' V. Effect of Oregano Essential Oil on Chicken *Lactobacilli* and *E. coli*. *Folia Microbiol*. 2006; 51: 278-280.

Chun H, Shin DH, Hong BS, Cho HY, Yang HC. Purification and biological activity of acidic polysaccharide from leaves of *Thymus vulgaris* L. *Biol Pharm Bull*. 2001; 24: 941—946.

Kristinsson KG, Magnúsdóttir AB, Petersen H, Hermansson A. Effective treatment of experimental acute otitis media by application of volatile fluids into the ear canal. *J Infect Dis*. 2005; 191: 1876–1880.

Kuriyama H, Watanabe S, Nakaya T, Shigemori I, Kita M, Yoshida A, Masaki D, Tadaï T, Ozasa K, Fukui K, Imanishi J. Immunological and Psychological Benefits of Aromatherapy Massage. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005; 2: 179-184.

Lauková A, Simonová M, Stropfiová V, Marciňáková M, Haviarová M, Líšková A. In vitro inhibitory effect of chamomile essential oil against different clinical, intestinal, human and animal bacteria. Program and Abstract Book of the I. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 2006: 121.

Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett*. 2003; 143: 133-/143.

McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*. 2006; 20: 519-530.

Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Roccaro AS, Alonzo V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 230: 191-195.

Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int immunopharmacol*. 2005; 5: 1749-1770.

Simonová M, Stropfiová V, Marciňáková M, Haviarová M, Faix Š, Vasilková Z, Lauková A, Šalamon I. Experimental application of chamomile essential oil in rabbits. Program and Abstract Book of the I. International Symposium on Chamomile Research, Development and Production. 2006: 122.

Stalińska K, Guzdek A, Rokicki M, Koj A. Transcription factors as targets of the anti-inflammatory treatment. A cell culture study with extracts from some Mediterranean diet plants. *J Physiol Pharmacol*. 2005; 56: 157-169.

Vishteh A, Thomas I, Imamura T. Eugenol modulation of the immune response in mice. *Immunopharmacology*. 1986; 12: 187-192.

Walter BM, Bilkei G. Immunostimulatory effect of dietary oregano etheric oils on lymphocytes from growth-retarded, low-weight growing-finishing pigs and productivity. *Tijdschr Diergeneeskd*. 2004; 129: 178-181.

## ZÁKLADNÉ ETAPY DEZINSEKCIE V POTRAVINÁRSKÝCH PREVÁDZAKACH

Kudríková D., Laktičová K., Ondrašovičová S., Vargová M., Hromada R., Ondrašovič M.

*Katedra životného prostredia, UVL, Košice*

### ABSTRAKT

Zabezpečenie objektov potravinárskych prevádzok proti výskytu škodlivého hmyzu usmerňuje zákon **č.596/2002 Z.z.** Výkon preventívnych a represívnych opatrení vychádza z monitoringu okolia chránených objektov, ako aj samotného objektu. Pri represívnych opatreniach sa môžu využívať prípravky a postupy len v nevyhnutnej a potrebnej miere pre dosiahnutie účelu vykonávanej činnosti. Dôležitou súčasťou prác je kontrola účinnosti prijatých opatrení.

### ÚVOD

Dezinsekcia je súbor opatrení zameraných na ničenie hmyzu a ostatných článkonožcov prenášajúcich pôvodcov nákazlivých chorôb, obťažujúcich človeka, zvieratá a spôsobujúcich hospodárske škody poškodzovaním a znehodnocovaním uskladnených a vyrábaných výrobkov a produktov. Predpokladom účinnej dezinsekcie je znalosť biológie ničeného škodcu, ako aj účinnosť a riziká, ktoré vyplývajú z použitia dezinsekčných látok pri uplatnení poznatkov v rámci preventívnych, ako aj devitalizačných opatrení. Špecifické požiadavky sú pri ničení škodlivého hmyzu v potravinárskych prevádzkach problematikou, ktorou sa predkladaná práca zaoberá.

### VŠEOBECNÉ ZÁSADY VYPLÝVAJÚCE Z PLATNEJ LEGISLATÍVY

Zabezpečenie objektov potravinárskych prevádzok proti výskytu škodlivého hmyzu vychádza zo zákona č. 596/2002 Z.z., ktorým sa dopĺňa zákon NR SR č. 272/1994 Z.z. o ochrane zdravia ľudí v znení neskorších predpisov a preventívnych opatrení. V zmysle § 8 a odsek 3 tohto zákona, dezinsekcii môžu vykonávať len osoby, ktoré spĺňajú podmienky ustanovené týmto zákonom v § 13s, odsek 10. Uvedený paragraf, odsek 1, písmena a ukladá povinnosť používať len prípravky, ktorých používanie schválil príslušný orgán na ochranu zdravia, čo je definované v § 27, ods. 2, písmena d a dodržiavať návody výrobcu a prípravky a postupy používať len v nevyhnutnej a potrebnej miere na dosiahnutie účelne vykonávanej činnosti. Súčasne sa ukladá kontrolovať účinnosť prijatých opatrení.

Druhá časť tohto zákona sa zaoberá opatreniami na predchádzanie ochoreniam, kde v § 4, písmeno e ukladá zákaz alebo obmedzenie prevádzok v miestnostiach, budovách a zariadeniach na čas potrebný na vykonanie sanitácie.

V zmysle „Správnej výrobnéj praxe“ za zabezpečenie ochrany pred škodcami a za výkon dezinsekcie je zodpovedný vedúci zariadenia potravinárskeho závodu. Dezinsekčné práce v potravinárskom objekte spočívajú v nasledovných etapách :

1. Monitoring výskytu škodlivého hmyzu v okolí chránených objektov a uplatnenie základných preventívnych opatrení proti prenikaniu z okolia do chránených objektov.
2. Monitoring výskytu škodlivého hmyzu v objektoch a uplatnenie základných preventívnych opatrení voči ich prítomnosti a prežívanie v daných podmienkach.
3. Uplatnenie cielených preventívnych a represívnych zásahov v chránených objektoch.

## MONITORING VÝSKYTU ŠKODLIVÉHO HMYZU V OKOLÍ CHRÁNENÝCH OBJEKTŮV A UPLATNENIE ZÁKLADNÝCH PREVENTÍVNYCH OPATRENÍ

V rámci danej etapy sú realizované nasledovné úkony :

- a) Spracovanie pôdorysnej mapy okolia objektov pre vyznačenie kritických miest s výskytom škodlivého hmyzu a miest s prijatými opatreniami vrátane vyložených nástrah (návnad) ich číselné označenie. V rámci monitoringu pri zistení prítomnosti škodcov určiť druh a stupeň zamorenia so stanovením príčin tohto stavu, zdrojmi krmiva, vody a miest na hniezdenie. V rámci uvedeného využiť lepiace pásy uložené v krabičkách pre monitoring škodlivého hmyzu.
- b) Základné preventívne opatrenia v okolí chránených objektov zamerať na
  - hygienu prostredia, t.j. poriadok a minimalizáciu priestorov slúžiacich na hniezdenie hmyzu. V prípade uskladnenia materiálu vo vonkajšom prostredí, vytvoriť priestor na kontrolu, resp. možnosť vykladania a uplatnenie dezinfekčných opatrení. Odpad z objektov musí byť uskladnený v uzavretých nádobách neprístupných pre hmyz s pravidelným odstraňovaním.
  - objekty musia byť uzavreté, neprístupné pre hmyz, nevyhnutne existujúce otvory opatrené sieťkami zabraňujúcimi prenikaniu hmyzu
  - dvere, prah dverí pevný, priliehajúce v zárubni bez štrbín , ktoré by umožňovali priechod škodcom do vnútra objektu riešené s funkčným samozatváracím mechanizmom
  - kontrola obvodových stien ako celku so zameraním na ich nepriestupnosť pre škodlivý hmyz
- c) Podľa zistených skutočností rozloženie lepidlových krabičiek hlavne na šváby na vhodných miestach, napr. nevyhnutných otvoroch a pod.. Číselné označenia týchto krabičiek, ako aj označenie na obvodovej stene, resp. inom vhodnom viditeľnom mieste, ako aj v pôdorysnej mape a protokole. Podľa aktuálnej situácie meniť nástrahový materiál za návnadový s atraktantom pre škodlivý hmyz za účelom monitorovania ich prítomnosti.

Po úvodnej obhliadke a spísaní záznamu a označení kritických miest, vykonať ďalšiu kontrolu 2 x za sebou s odstupom dvoch týždňov. Na základe zistených výsledkov monitoringu ďalšie kontroly vykonávať 1 x mesačne, resp. podľa aktuálnej situácie 1x štvrťročne.

## MONITORING VÝSKYTU ŠKODLIVÉHO HMYZU VO VNÚTORNÝCH ČASTIACH OBJEKTU A UPLATNENIE ZÁKLADNÝCH PREVENTÍVNYCH OPATRENÍ

- a) Spracovanie pôdorysnej mapy vnútorných priestorov pre vyznačenie kritických miest s prípadným výskytom škodlivého hmyzu s určením druhu, stupňa zamorenia a príčinami daného stavu.
- b) Základné preventívne opatrenia v objektoch so zameraním na :
  - hygienu prostredia, v rámci ktorej je dôležité minimalizovať tzv.“ mŕtve priestory“, otvory a škáry, ktoré slúžia na hniezdenie hmyzu
  - kontrolu uskladneného materiálu s požiadavkou jeho uloženia na paletách s manipulačnými uličkami so vzdialenosťou od stien minimálne 40 cm
  - miesta prítoku vody a kanalizácie, ich riešenie a prevádzka organizovaná tak, aby nebolo nadmerné zvlhčovanie priestoru. Podlahy a steny nesmú byť zvlhčené.

- kontrolu uzavretosti a celistvosti objektu voči vonkajšiemu prostrediu, t.j. podlahy a stien so zameraním na nevyhnutne existujúce otvory, t.j. potrubia, okná, dvere a pod. a ich celistvosť
- manipulácia s odpadom, ktorý musí byť uskladnený v uzavretých nádobách neprístupných pre hmyz a pravidelne odstraňovaný
- spôsob preberania surovín a obalov s nevyhnutnou kontrolou na možné zavlečenie škodcov do priestorov objektu

## UPLATNENIE CIELENÝCH PREVENTÍVNYCH A REPRESÍVNYCH ZÁSAHOV V CHRÁNENÝCH OBJEKTOCH

Na základe monitoringu o výskyte škodlivého hmyzu v okolí chránených objektov a v objektoch a uplatnení základných preventívnych opatrení sa vzhľadom na zistené druhy a ich intenzitu výskytu, ale aj potenciálne možný výskyt škodcov v daných prevádzkach uplatňujú ciele preventívne a represívne zásahy. V rámci týchto opatrení sú volené metódy v súlade so „správnou výrobnou praxou“, ktoré sú pre potravinárske prevádzky neškodné a nevzniká riziko znehodnotenia potravinárskych produktov.

Povrch lepidlových staničiek označiť číslom, výstražným označením, použitým materiálom a jeho množstvom. Miesta vyloženia staničiek vyznačiť určeným číslom do pôdorysnej mapy a na priliehajúcej stene, resp. inom vhodnom priľahlom priestore.

V objekte umiestniť elektrické insektory tak, aby neboli nad potravinami, prípadne odpad nepadal na ľudí. Podľa návodu meniť žiarivky tak, aby ich funkčnosť bola zabezpečená. Využitie feromónových pascí a ich uloženie a výmenu zabezpečiť tak, aby bola účinná. Lepidlové doštičky vydržia v priemere 1 mesiac. Je nutné zabrániť ich inaktivácii a podľa návodu spracovať harmonogram výmeny.

Jedenkrát štvrťročne, resp. v prípade nezvládnutia situácie preventívnymi opatreniami, sa robí represívna dezinfekcia. Realizuje sa postrekom, resp. pásovým ošetrením. Musí sa robiť v čase mimo prevádzky. Pravidelné ošetrenie sa musí zabezpečiť vo vnútorných častiach elektrických rozvádzačov za prítomnosti elektrikára, vo výtahových šachtách, resp. iných podobných priestoroch a to 1x za polrok. O týchto prácach sa vedú špeciálne záznamy. Pri výbere prípravkov v objektoch sa zameriavame na prípravky s omračujúcim účinkom (knok-down), ako napr. prípravky na báze pyretra. Krátky reziduálny účinok majú aj insekticídy patriace do skupiny organofosfátov s výnimkou tých, kde sa technologicky enkapsuluje účinná látka a tieto sú označené za názvom prípravku skratkou „CS“.

## ZÁVER

Pri ničení škodlivého hmyzu sa môžu aplikovať len také postupy, metódy a prostriedky, pri ktorých nevzniká riziko znehodnotenia vyrábaných (uskladnených) produktov, ktoré by mohli byť príčinou porúch zdravotného stavu konzumenta. Prijaté opatrenia vychádzajú zo zákona č. 596/2002 Z.z., ktorým sa dopĺňa zákon NR SR č. 272/1994 Z.z. o ochrane zdravia ľudí. Výkon práce sa zameriava na monitoring výskytu škodlivého hmyzu, druh a stupeň zamorenia, podmienky existencie jednak v okolí objektov, ako aj vo vnútorných priestoroch. Na základe uvedených skutočností sú prijímané preventívne a represívne opatrenia.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Ondrašovič, M., Para, Ľ., Ondrašovičová, O., Vargová, M., Kočišová, A.: Veterinárna starostlivosť o životné prostredie. Košice, 1996, 107

Ondrejka, J. a kol.: Správna výrobná prax. Plán vykonávania dezinfekcie a deratizácie. ÚVZ SR, Bratislava 2004, Epos Bratislava, 2004, 280

Rupeš, V., Ledvinka, J.: Příručka dezinfekce a deratizace, Združení pracovníků DDD, ČR, Praha 2003

Zákon NR SR č. 596/2002 Z.z.

## MIKROBIOLOGICKÁ KONTROLA ÚČINNOSTI DEZINFEKCIE PRI POUŽITÍ TOPAXU 91 V PRIESTOROCH HYDINÁRNE

Laktičová K., Kudríková D., Ondrašovičová O., Sasáková N., Čulenová K., Ondrašovič M.

*Katedra životného prostredia, UVL, Košice*

### ABSTRACT

Dezinfekčný prípravok Topax 91 bol testovaný pri laboratórnych podmienkach ako aj v prevádzkach hydinární. V laboratórnych podmienkach devitalizoval *B.cereus* už pri 0,1 % koncentrácii a 20-minútovej expozícii. Keď sme použili tú istú koncentráciu dezinfekčného roztoku na testované mikrobiálne kmene *E.coli* a *S.aureus* devitalizačný účinok sa prejavil už pri expozícii 5 minút. Dobrý dezinfekčný účinok bol zaznamenaný aj pri dezinfekcii v priestoroch hydinárskeho závodu, kde však výrazný nález *E.coli* bol zaznamenaný na povrchoch používaných pomocných zariadení. Dezinfekcia použitým dezinfekčným prostriedkom sa pozitívne prejavila aj na počte mikroorganizmov ovzdušia prevádzkarne, keď nález *E. coli* po očiste bol negatívny.

### ÚVOD

Hodnotenie úrovne hygieny a sanitácie v potravinárskych prevádzkach musí nadväzovať na jednotlivé odvetvia a výrobné postupy zohľadňujúce ich špecifitu pre objektívne hodnotenie zistených výsledkov. Najobjektívnejším ukazovateľom je zisťovanie mikrobiálnej kontaminácie, na základe ktorej môžeme hodnotiť účinnosť použitého dezinfekčného prípravku, resp. účinnosť prechádzajúcej mechanickej očisty, ktorá výrazne ovplyvňuje účinnosť sanitačných prác a prijímať opatrenia na zlepšenie hygieny. Predkladaná práca je zameraná na mikrobiologickú kontrolu priestorov hydinárne.

### MATERIÁL A METODIKA

Testovaný dezinfekčný prípravok Topax 91 – tekutý, neutrálny dezinfekčný prípravok s obsahom kvartérnych amónnych zlúčenín určený na dezinfekciu v potravinárskom priemysle v koncentrácii 0,5-1 %. Výrobcom je firma Henkel Ecolab, Nemecko. Použitie mikrobiálne kmene. Štandardné zbierkové kmene : *E.coli* (CCH 5172); *S. aureus* (CCM 2012); *B.cereus* (CCM 1999).

#### *Mikrobiologická kontrola účinnosti*

Mikrobiologické stery boli odoberané z plochy 10 cm<sup>2</sup> pomocou sterilného tampónu do sterilného fyziologického roztoku. Následne v laboratóriu boli očkované na mäsopeptónový agar (CPM-celkové počty mikroorganizmov), Endov agar (*E.coli*) a Sabouradov agar (plesne). Po 48 hod. inkubácii v termostate pri 37 °C boli zisťované CPM a *E.coli*. Počet plesní bol odpočítaný po 5-dňovej inkubácii pri teplote 22 °C. Odber vzoriek vzduchu bol vykonaný sedimentačnou metódou pri expozícii platní so živnou pôdou v prostredí 3 minúty. Prepočet bol vykonaný po požadovanej inkubácii zo vzťahu, že za 5 minút sedimentujú na plochu 100 cm<sup>2</sup> mikroorganizmy z 10 l vzduchu (Para a kol., 2000).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

Čistenie priestorov a technologických zariadení v potravinárskej výrobe je rozhodujúcou súčasťou hygieny a má bezprostredný vplyv na výsledok dezinfekcie. Na znečistení v potravinárskych podmienkach sa podieľajú rozhodujúcou mierou aj zbytky spracovávanej hygienicky nezávadnej hmoty, ktorá sa dostáva na podlahu, steny, resp.



zostáva na používaných technologických zariadeniach. V tejto forme sa stáva odpadom, ktorý sťažuje prevádzku (napr. klzká podlaha), resp. vytvára živnú pôdu pre rast nežiadúcej mikroflóry v prostredí, čím môže negatívne ovplyvniť kvalitu vyrábaných produktov.

Táto vrstva vytváraná v potravinárskych prevádzkach sa označuje ako biofilm a je zložená z bielkovín, tukov a iných ingrediencií, ktoré sa vo výrobe používajú. Biofilm pre mikroorganizmy v danom prostredí vytvára jednak nutričnú vrstvu, ktorá umožňuje ich rozmnožovanie, ale aj ochrannú vrstvu, ktorá obmedzuje devitalizačné účinky používaných dezinfekčných prostriedkov (Hoffmann, 2000; Gracey a Collins, 1992).

Pri kontrole účinnosti sanitačných opatrení sa využíva mikrobiologická kontrola, resp. bioluminiscenčná ATP metóda. Mikrobiologická metóda zisťuje aktuálny počet, resp. druh mikroorganizmov v prostredí, pričom ATP metóda, ako alternatívna, nám určuje celkovú biologickú kontamináciu prostredia (Kottferová a kol., 2005).

Na sanitáciu prostredia v sledovanom objekte bol používaný Topax 91 zahriaty na teplotu 40 °C. Ako vyplýva z výsledkov testovania, nepôsobil baktericídne na testované bakteriálne kmene pri 0,01 % koncentrácii. Avšak pri koncentrácii 0,1 % bol účinný na *B.cereus* pri expozícii 20 minút. *E. coli* a *S. aureus* boli pri tejto koncentrácii devitalizované už pri 5-minútovej expozícii (tab. 1).

**Tab.1** Testovanie baktericídnej účinnosti Topax 91 na niektorých bakteriálnych kmeňoch

prípravok	expozícia (min)	koncentrácia (%)				
		0,01	0,1	0,5	1,0	2,0
<i>B. cereus</i>	5	+	+	-	-	-
	20	+	-	-	-	-
	60	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	5	+	-	-	-	-
	20	+	-	-	-	-
	60	+	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	5	+	-	-	-	-
	20	+	-	-	-	-
	60	+	-	-	-	-

V tab. 2 sú uvedené výsledky mikrobiologických sterov z povrchov technických zariadení z časti balenia a stanovenia akosti. Pred dezinfekciou boli najvyššie CPM a pohybovali sa od 15 do 125 z plochy 10 cm<sup>2</sup>. Po dezinfekcii bol najvyšší nález z povrchu sklzu na akosť a to CPM 100 a plesní 560. Pred výrobou sa ich nález znížil jednotlivo na 15 a 17.

**Tab.2** Stery z povrchov technologických zariadení z časti balenia a stanovenia akosti/10 cm<sup>2</sup> (priemer z 3 meraní)

miesto steru	pred sanitáciou			po čistení a dezinfekcii			pred výrobou		
	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.
<i>sklz zo spreja</i>	58	15	37	0	0	1	0	0	0
<i>sklz na akosť</i>	125	11	23	100	1	560	15	0	17
<i>baliaca hlava</i>	44	0	8	9	0	10	2	0	1
<i>sklz balička</i>	15	0	6	0	0	2	0	0	0

Výsledky získané pomocou mikrobiologickej kontroly účinnosti sú podkladom pre vyhládavanie nedostatkov v sanitácii a späťne vytvárajú možnosť ich odstraňovania (Ivanová a kol., 1998, Hofmann, 1996). V sanitačnej praxi sa mikrobiologická kontrola vyžaduje po použití dekontaminačného prostriedku, ale aj pred začiatkom smeny. Význam týchto kontrol je dokumentovaný v tab. 3, kde sme zaznamenali pokles počtov zárodokov z povrchov pomocných zariadení po vykonaní očisty a dezinfekcie. Pred výrobou opäť počty týchto zárodokov výrazne stúpili.

**Tab.3** Stery z povrchov pomocných zariadení /10 cm<sup>2</sup> (priemer z 3 meraní)

miesto steru	pred sanitáciou			po čistení a dezinfekcii			pred výrobou		
	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.
<i>háky</i>	620	290	330	110	70	45	480	190	220
<i>vozík</i>	410	260	690	50	0	800	230	90	310
<i>lodňa</i>	3,8.10 <sup>3</sup>	560	4,1.10 <sup>3</sup>	812	20	960	2,4.10 <sup>3</sup>	280	640

Účinnosť sanitačných opatrení sa prejavila aj v počtoch mikroorganizmov nachádzajúcich sa v ovzduší, keď najvyššie CPM a plesne sa nachádzali v návesovni a pitvacej časti, kde dosahovali rádove hodnotu 10<sup>3</sup>. Nález *E.coli* bol najvyšší v pitvacej časti a to 8,8.10<sup>3</sup>. Celkový pokles počtov zaznamenaný po dezinfekcii postupne stúpol, avšak pred výrobou ich počty rádove nepresahovali hodnoty 10<sup>2</sup> (tab.4).

**Tab. 4** Vzdušné mikroorganizmy na 1 m<sup>3</sup> (priemer z 3 meraní)

miesto steru	pred sanitáciou			po čistení a dezinfekcii			pred výrobou		
	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.	CPM	E.coli	Ples.
<i>návesovňa</i>	71.10 <sup>3</sup>	19	32.10 <sup>3</sup>	34	0	103	676	0	538
<i>pitvacia časť</i>	18.10 <sup>3</sup>	8880	27.10 <sup>3</sup>	91	0	34	756	11	515
<i>porcovňa</i>	479	0	460	91	0	148	114	0	80

Dezinfekčný prípravok Topax 91 určený na dezinfekciu v potravinárskych prevádzkach devitalizoval v laboratórnych podmienkach testované mikrobiálne kmene *E.coli* a *S.aureus* už pri 0,1 % koncentrácii a expozícii 5 minút. Devitalizácia *B.cereus* pri uvedenej koncentrácii bola zaznamenaná po 20-minútovej expozícii. Dobré dezinfekčné účinky boli zaznamenané aj pri dezinfekcii v priestoroch hydínárskeho závodu, kde však výrazný nález *E.coli* bol zaznamenaný na povrchoch používaných pomocných zariadení. Dezinfekcia použitým dezinfekčným prostriedkom sa pozitívne prejavila aj na počte mikroorganizmov ovzdušia prevádzkarne, keď nález *E. coli* po očiste bol negatívny.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Bremner, A., Johnston, M.: Poultry Meat Hygiene and Inspection, VVB Sanders Company Ltd, The University Press, Cambridge, 1996, 125-169

Gracey, J., F., Collins, D., S.: Meat hygiene, 9th edition, Bailiere Tindal, London, 1992, 129-130

Hofmann, I.: Hodnotenie úrovne prevádzkovej hygieny, Maso, 4, 1996, 43-44

Hofmann, I. : Asanační opatření a řádná sanitační činnost mají v masných provozech výjimečný význam. Maso, 1, 2000, 19-22

Ivanová, M., Lokajová, K., Najmik, F., Pavlák, M., Dunčáková, E., Petrová, Z., Petro, J.: Hodnotenie kontaminácie a sledovanie účinnosti dezinfekcie pri spracovaní jatočnej hydiny za II. štvrt'rok 1998, Hygiena Alimentorum XIX, Zborník prednášok a posterov, 1998, 97

Kottferová, J., Sasáková, N., Ondrašovičová, O., Ondrašovič, M., vargová, M., Čulenová, K.: Kontrola účinnosti sanitácie v mäsospracujúcej prevádzke. Zb. Hygiena Alimentorum XXVI, Štrbské Pleso, Vysoké Tatry, ISBN 80-7148-052-5, 2005, 234-236

Para, L., Ondrašovič, M., Ondrašovičová, O., Kottferová, J.: Praktické cvičenia zo zoohygieny. Vienale, Košice, 2000, 63

## WELFARE MAČIEK CHOVANÝCH V BYTOCH

Mareková J., Kottfěrová J., Ondrašovičová O., Ondrašovič M., Sasáková N.  
*Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, UVL, Košice*

### ABSTRAKT

Záujem o problematiku welfare domestikovaných zvierat sa v poslednom období výrazne zvyšuje. Päť slobôd predstavuje minimálny štandard pre welfare hospodárskych zvierat. Na ich základe je navrhnutých päť bodov – „poskytnutí“, ktoré môžu byť použité pre stanovenie welfare mačiek chovaných v bytoch. Poskytnutie vhodného prostredia, v ktorom majú zvieratá možnosť prejavíť svoje prirodzené správanie a vyhnúť sa strachu a distresu, si vyžaduje vhodné obohatenie ich životného prostredia.

J. Webster (1999) definoval pohodu (welfare) zvierat nasledovne: „Pohoda zvierat'a je daná jeho schopnosťou vyhnúť sa utrpeniu a zachovať si zdatnosť“. Táto formulácia vystihuje podstatu welfare. Zložitejšiu formuláciu použil G. Van Putten (1981): „Životná pohoda zvierat je stav naplnenia všetkých materiálnych a nemateriálnych podmienok, ktoré sú predpokladom zdravia organizmu, kedy je zviera v súlade so svojím životným prostredím“.

Tieto materiálne a nemateriálne podmienky boli prvý krát konkrétnejšie priblížené v správe tzv. Brambellovej komisie, ktorá ako prvá uskutočnila inšpekciu životnej pohody zvierat. Impulzom na vznik tejto komisie bola kniha Ruth Harrisonovej „Animals Machines“ (1964). Komisia bola ustanovená britským parlamentom v roku 1965. Brambellova komisia navrhla, aby všetky zvieratá mali možnosť „vstať, ľahnúť si, otočiť sa, očistiť si telo a natiahnuť končatiny“. Tieto minimálne požiadavky, ktoré sa stali známe ako „5 slobôd“, sa ďalej upravovali. Svoju súčasnú podobu získali v roku 1993, keď boli sformulované Farm Animal Welfare Council (FAWC).

Welfare domácich mačiek môžeme posudzovať podľa upravených Piatich Slobôd (Rochlitz, 2005).

1. Poskytnutie potravy a vody: vyvážená kŕmna dávka, ktorá zodpovedá potrebám zvierat'a, čerstvá voda
2. Poskytnutie vhodného prostredia: adekvátny priestor a úkryt, bez extrémnych teplôt, primerané osvetlenie, nízka úroveň hluku, čistota, chov v byte alebo s prístupom do vonkajšieho prostredia
3. Poskytnutie zdravotnej starostlivosti: vakcinácia, prípadná sterilizácia, ochrana pred vnútornými aj vonkajšími parazitmi
4. Poskytnutie ochrany pred situáciami, ktoré by mohli spôsobiť strach a distres
5. Poskytnutie možnosti prejavíť normálne správanie

Názory na chov mačiek bez možnosti výbehu vo vonkajšom prostredí sa rôznia. Zástancovia voľného pohybu mačiek argumentujú najmä obmedzeniami, ktoré život v byte so sebou nevyhnutne prináša. Ich oponenti poukazujú na zvýšené riziká súvisiace s voľným pohybom. Oba spôsoby chovu majú svoje výhody aj nevýhody. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené najčastejšie choroby mačiek a možné riziká v závislosti na spôsobe chovu (Buffington, 2002):

<b>Mačky chované v bytoch</b>	<b>Mačky s prístupom do vonkajšieho prostredia</b>
Feline urologic syndrome	Infekčné ochorenia (napr.: vírusové, parazitárne)
Odontoclastic resorptive lesions	Dopravné nehody
Hypertyreoidizmus	Iné nehody (napr.: pády)
Obezita	Boje s inými mačkami
Nebezpečenstvá v domácnosti (napr.: nehody, otravy)	Útoky psov a iných zvierat
Behaviorálne problémy (napr.: nežiaduca eliminácia)	Otravy
Nuda	Krádež
Inaktivita	Prehľadávanie odpadkov

Výskyt horeuvedených ochorení na prvých dvoch miestach je spôsobené pravdepodobne tým, že väčšina týchto zvierat sú čistokrvné jedince, u ktorých je ich frekvencia vyššia.

Čo sa týka kvantitatívnych požiadaviek mačiek na prostredie, Novák a Kubíček (2002) uvádzajú ako minimálnu plochu pre jednu mačku chovanú vo vonkajšom priestrešku s výbehom spolu 15 m<sup>2</sup>, z toho 4,5 m<sup>2</sup> na vnútorný priestor a 10,5m<sup>2</sup> na vonkajší. Zároveň uvádzajú minimálnu teplotu vykurovaného priestoru +8°C pre dlhosrsté mačky a +13°C pre mačky krátkosrsté. V bytových podmienkach je však pokles teplôt pod tieto hodnoty málo pravdepodobný.

Bernstein a Strack (1996) opísali využitie priestoru a interakcie medzi 14-timi nepríbuznými, kastrovanými mačkami, ktoré boli chované v prízemnom dome bez prístupu do vonkajšieho prostredia. Densita zvierat bola 1 mačka na 10 m<sup>2</sup>. Každá z mačiek mala svoje obľúbené miesto, ktoré mohla využívať sama alebo s ďalšími mačkami. V prípade, že viac mačiek malo rovnaké obľúbené miesto, najčastejšie ho využívali v rôznom čase. Počas celej doby sledovania bolo pozorovaných len málo prejavov agresivity. Napriek tomu, že určité jedince boli dominantnejšie, presná hierarchia nebola jasná. Z práce Barryho a Crowell-Davisa (1999), v ktorej sa zaoberali vplyvom pohlavia na sociálne správanie u kastrovaných mačiek chovaných v byte, nepriamo vyplýva, že pri chove viacerých mačiek je im potrebné poskytnúť dostatok priestoru na to, aby mohli dodržať vzájomnú vzdialenosť 1 – 3 metre. Bytová mačka by mala mať prístup aspoň do dvoch miestností (Mertens and Schär, 1988).

Dôležitejšia ako kvantita (rozmery) je kvalita prostredia. Obohatenie životného prostredia je kľúčovým prvkom vo vzťahu k naplneniu Piatich slobôd, najmä piatej slobody – mať možnosť prejaviť prirodzené správanie. Tieto odporúčania sú založené najmä na pozorovaniach a radách skúsených chovateľov a behavioristov, ale len málo ich bolo zatiaľ vedecky preskúmaných a vyhodnotených.

Mačka má výborné dispozície pre šplhanie. Je potrebné jej v byte vytvoriť podmienky pre využitie vertikálneho priestoru (Rochlitz, 2005). Vyvýšené miesta používajú mačky aj ako pozorovateľne. K dispozícii sú rôzne druhy komerčne vyrábaných škrabadiel. Mnoho majiteľov však ponúka svojim mačkám doma zhotovené škrabadlá alebo police.

Zároveň sledované mačky sa 48 – 50% vyhýbali očným kontaktom ostatných mačiek (Barry and Crowell-Davis, 1999). Preto je dôležité poskytnúť mačke okrem vyvýšeného miesta na pozorovanie aj miesto na oddych, kryté z troch strán, v ktorom sa cíti byť neohrozená. V prípade, že sa v byte vyskytuje viac mačiek je vhodné vizuálne priestor oddeliť napríklad závesom. Pozitívny vplyv poskytnutia úkrytu na zníženie úrovne stresu potvrdili vo svojej práci aj Ottway a Hawkins (2003).

Veľa mačiek trávi čas pozorovaním vonkajšieho prostredia cez okno (Shyan-Norwalt, 2005). Preto uvítajú, ak majú možnosť vykonávať túto činnosť pohodlne (napr. zo škrabadla – mačacieho stromu umiestneného pri okne alebo širšej parapetnej dosky).

Pre podporu aktivity sú vhodné hračky, ktoré spĺňajú charakteristiku malej koristi – majú adekvátnu veľkosť a chlpatý povrch, sú pohyblivé alebo meniace sa (Hall *et al.*, 2002). Ich atraktivitu môže zvýšiť naplnenie hračiek Kocúrnikom obyčajným (*Nepeta cataria*) alebo Valeriánou lekárskou (*Valeriana officinalis*), ktoré pôsobia ako stimulanty na väčšiu časť mačacej populácie. Pri štúdiu vplyvu rôznych pachov na aktivitu mačky čiernonohej (*Felis nigripes*) v zoologickej záhrade sa zistilo, že vôňa kocúrnika spôsobila zvýšenie aktivity na podobnej úrovni ako pach koristi (Wells and Egl, 2003).

Pohodu mačiek negatívne ovplyvňuje nielen monotónnosť prostredia a nedostatok podnetov ale aj nepredvídateľné zmeny (cudzía mačka, cudzie osoby, narušenie rutiny). To ako sa jednotlivé mačky dokážu s takýmito situáciami vysporiadať závisí od ich predchádzajúcich skúseností a temperamentu (Lowe and Bradshaw, 2001).

Poruchy eliminačného správania a nežiaduca urinácia sú často sa vyskytujúce problémy pri chove mačiek v bytoch. Heidenbergerová (1997) uvádza, že zo sledovanej vzorky 1177 mačiek sa tieto problémy vyskytli u 15,3%. Základným predpokladom pre zabránenie ich výskytu je umiestnenie mačacej toalety na pokojné a chránené miesto, ktoré však je zároveň vzdialené od miest na odpočinok aj kŕmenie. V prípade chovu viacerých mačiek je nutné poskytnúť minimálne jednu toaletu na dve mačky. Ideálny je stav, keď pripadá na každú mačku jedna toaleta (Rochlitz, 2005).

Sociálne správanie mačiek môžeme definovať výrokom „living apart together“, teda žiť pri sebe a od seba zároveň (deMonte, M. and LePape, G., 1997). Z pozorovaní ferálnych mačiek vyplýva, že veľkosť kolónie, resp. hustota kolónií je závislá na dostupnosti potravy. No v oblastiach s nízkou denzitou miestnej populácie majú mačky tendenciu obsadzovať územia tak, aby vzájomne hraničili (Beaver, B. V., 2003). Z tejto skutočnosti je zrejmá potreba kontaktu s predstaviteľmi vlastného druhu, prípadne iných druhov a s ľuďmi.

V súčasnosti chýbajú štúdie porovnávajúce welfare mačiek chovaných v bytoch a mačiek s možnosťou voľného pohybu. Mali by sa v nich zohľadniť viaceré aspekty: správanie, vplyv rôznych spôsobov obohatenia prostredia, zdravotný stav, úroveň morbidít a mortality ako aj vzťahy vnútrodrohové a vzťahy človek - zviera.

## POUŽITÁ LITERATÚRA

- Barry, K. J., Crowell-Davis, S. L.: Gender differences in the social behaviour of the neutered indoor –only domestic cat. *Appl Anim Behav Sci*, 1999, 64, 193-211.
- Beaver, B. V.: *Feline Behaviour- A Guide for Veterinarians*, Saunders, St. Luis, USA, 2nd ed., 2003.
- Bernstein, P. L., Strack., M.: A game of cat and house: Spatial patterns and behaviour of 14 domestic cats (*Felis catus*) in the home. *Antrozoos*, 1996, 9, 25-39.
- Buffington, C. A. T.: External and internal influences on disease risk in cats. *Javma*, 2002, 220, 994-1002.
- Demonte, M., Lepape, G.: Behavioural effects of cage enrichment in single-caged adult cats. *Anim Welf*, 1997, 6, 53-66.
- Farm Animal Welfare Council: *Second Report on Priorities for Research and Development in Farm Animal Welfare*, Ministry of Agriculture Fisheries and Food, 1993.
- Hall, S. L., Bradshaw, J. W. S., Robinson, I. H.: Object play in adult domestic cats: the roles of habituation and disinhibition. *Appl Anim Behav Sci*, 2002, 79, 263-271.
- Harrison, R.: *Animal Machines*. Stuart, London, 1964.
- Heidenberger, E.: Housing conditions and behavioural problems of indoor cats as assessed by their owners. *Appl Anim Behav Sci*, 1997, 52, 345-364.
- Lowe, S. E., Bradshaw, J. W.: Ontogeny of individuality in the domestic cat in the home environment. *Anim Behav*, 2001, 61, 231-237.
- Mertens, C., Schär, R.: Practical aspects of research on cats. In: Turner, D. C., Bateson, P. (Eds.), *The Domestic Cat: The Biology of is Behaviour*. 1st ed., Cambridge University Press, Cambridge, 1988, 179-190.
- Novák, P., Kubíček, K.: Zoohygiena chovu psa a kočky. In: Svoboda, M. et al.: *Nemoci psa a kočky I. díl*. Noviko, a.s., Brno, 2000, 286-290.
- Ottway, D. S., Hawkins, D. M.: Cat housing in rescue shelters: a welfare comparison between communal and discrete-unit housing. *Anim Welf*, 2003, 12, 173-189.
- Rochlitz, I.: A review of housing requirement of domestic cats (*Felis silvestris catus*) kept in the home. *Appl Anim Behav Sci*, 2005, 93, 97-109.
- Van Putten, G.: Quantifying well-being in farm animals. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 1981, 106 (3), 106-118
- Webster, J.: *Welfare: Životní pohoda zvířat aneb střízlivé kázání o ráji*. Nadace na ochranu zvířat, 1999, 264 pp.
- Wells, D. L., Egli, J. M.: The influence of olfactory enrichment on the behaviour of captive black-footed cats, *Felis nigripes*. *Appl Anim Behav Sci*, 2004, 85, 107-119.

# ŠTRUKTÚRNE GÉNY VYBRANÝCH BAKTERIOCÍNOV U ENTEROKOKOV A STREPTOKOKOV TRÁVIACEHO TRAKTU ZVIERAT

Nigutová K.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## ABSTRAKT

Enterokoky a streptokoky získané z tráviaceho traktu rôznych druhov zvierat sa testovali jednoduchým platňovým testom na produkciu bakteriocínom podobnej aktivity, ktorý ukázal, že približne 40% testovaných kmeňov je aktívnych voči štandardnému indikátorovému organizmu. Pomocou PCR sa sledoval výskyt štruktúrnych génov kódujúcich syntézu vybraných bakteriocínov, konkrétne enterocínu A, enterocínu B, enterocínu P, enterolyzínu A a cytolyzínu. Získané údaje sa porovnali s údajmi o produkcii bakteriocínom podobnej aktivity. Všetky testované kmene obsahovali aspoň jeden štruktúrny gén z vybraných bakteriocínov a u troch izolátov sa našli štruktúrne gény všetkých piatich nami testovaných bakteriocínov. Výsledky tejto práce rozširujú poznatky o produkcii a výskyte bakteriocínov medzi enterokokmi a streptokokmi tráviaceho traktu zvierat.

## ÚVOD

Produkcia antimikrobiálnych zlúčenín sa zdá byť typickým javom pre väčšinu, ak nie pre všetky baktérie. Antimikrobiálne zlúčeniny predstavujú toxíny, bakteriolytické enzýmy, antibiotiká a bakteriocíny. Termín „bakteriocín“ zahŕňa veľkú a rôznorodú skupinu ribozomálne syntetizovaných antimikrobiálnych peptidov alebo proteínov, z ktorých niektoré podliehajú posttranslačným úpravám (Nes a Eijsink, 1999). V súčasnosti sa už väčšina nových informácií o aktivitách bakteriocínov a bakteriocínom podobných substanciách týka Gram-pozitívnych baktérií. Je zrejmé, že zvýšený záujem o tieto substancie je odpoveďou na ich možné praktické využitie pri ochrane trvanlivosti potravín alebo tiež na prevenciu, prípadne aj na liečbu bakteriálnych infekcií. Enterocíny, bakteriocíny produkované enterokokmi, sú obzvlášť aktívne voči patogénom ako sú *Listeria*, *Clostridium* a *Staphylococcus* (Laukova a Czikkova, 1999; Rilla a kol., 2003).

Bakteriocíny laktát produkujúcich baktérií sa zaraďujú do 3 skupín: lantibiotiká, nemodifikované tepelne stabilné bakteriocíny a proteínové bakteriocíny. II. trieda sa rozdeľuje na 3 podskupiny: IIa - pediocin-like bakteriocíny, IIb - dvojpeptidové bakteriocíny, IIc - ďalšie peptidové bakteriocíny (Klaenhammer, 1993; Nes a kol., 1996).

V našej práci sme sa zamerali na štúdium bakteriocínov, a to cytolyzínu patriaceho do I. triedy bakteriocínov laktát produkujúcich baktérií, enterocínu A, enterocínu B, enterocínu P patriacich do II. triedy bakteriocínov laktát produkujúcich baktérií a enterolyzínu A patriaceho do III. triedy bakteriocínov laktát produkujúcich baktérií.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Použité mikroorganizmy a ich kultivácia*

Testovalo sa 30 bakteriálnych kmeňov druhu *Enterococcus* a *Streptococcus*, z toho bolo 16 fekálnych a 14 bachorových izolátov. Kmene sa izolovali z rôznych druhov zvierat, 5 kmeňov bolo z bizóna, 3 z antilopy, 2 z pakoňa, 1 kmeň sa izoloval zo zebry, 3 z ťavy, 1 z kamzíka, 2 z prepelice, 4 z teľaťa, 2 zo soba, 1 z kravy a 6 kmeňov bolo z ovce. Bakteriálne kmene *Enterococcus faecium* BC25 produkujúci enterocín A (Morovsky a kol., 2001a), *E. faecium* CTC 492 produkujúci enterocín A a B (Nilsen a kol., 1998),



*E. faecalis* II/1 produkujúci enterolyzín A (Morovsky a kol., 2001b) a *E. faecium* AL41 produkujúci enterocín P (Laukova a kol., 2003) sa použili ako kontrola pri PCR analýze. Kmeň *E. malodoratus* NCDO846 sa použil ako indikátorový organizmus. Bakteriálne druhy *Enterococcus* a *Streptococcus* sa kultivovali v TH médiu pri 37°C.

#### *Stanovenie produkcie bakteriocínom podobnej aktivity*

Produkčné kmene sa nechali narásť na TH agarových platniach (1,5% agar) cez noc pri 37°C v termostate. Tieto platne sa potom preliali vrchným agarom (TH + 0,6% agar), ktorý obsahoval 250 µl nočnej kultúry indikátorového organizmu *E. malodoratus* NCDO846 a nechali inkubovať pri 37°C v termostate 4-6 hodín. Citlivosť indikátorového kmeňa na produkciu bakteriocínom podobných aktivít sa detegovala a vyhodnocovala na základe veľkosti vzniknutej zóny okolo produkčného organizmu.

#### *Izolácia DNA a PCR analýza*

Na izoláciu chromozomálnej DNA sa použila modifikácia metódy autorov Pospiech a Neumann (1995).

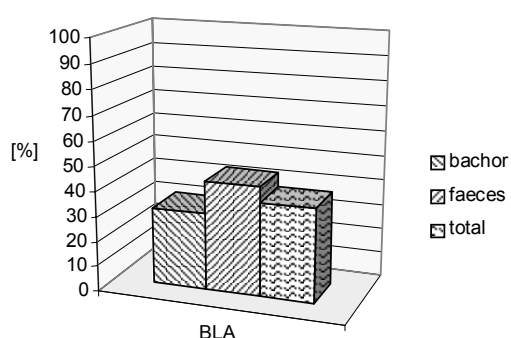
Časovo-teplotný profil všetkých PCR reakcií pozostával u všetkých amplifikovaných génov z iniciačnej denaturácie (94°C; 5 minút), po ktorej nasledovalo 35 cyklov s parametrami: denaturácia 94°C 45 sekúnd; annealing 45°C 45 sekúnd pre *EntA*, *EntP* a *EnLA*, 56°C 45 sekúnd pre *EntB*, 58°C 45 sekúnd pre *Cyl*; extenzia 72°C 1 minúta. Po prebehnutí 35 cyklov nasledovala extenzia (72°C; 10 minút) a následné ochladenie zmesi na 12°C. Špecifické priméry pre jednotlivé testované bakteriocíny ako aj očakávané veľkosti amplikónov sú uvedené v tabuľke 1. Reakčná zmes pre PCR reakcie (50 µl) obsahovala 10x PCR tlmivý roztok s 15 mmol.l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µmol.l<sup>-1</sup> forward aj reverse priméra, 0,2 mmol.l<sup>-1</sup> dNTP, 1,25 jednotiek Taq polymerázy a 0,5–1 µl (≈250 ng) DNA.

**Tab.1.** Špecifické priméry na detekciu štruktúrnych génov testovaných bakteriocínov

Bakteriocín	Priméry (názov a sekvencie)		Očakávaná veľkosť amplikónov
<i>Enterocín A</i>	TH10	5'-GATTATGAAACATTTAAAAATTTGTC-3'	726 bp
	<i>EntF5</i>	5'-TGATGCCCCGTTTTTCCTTGA-3'	
Enterocín B	EntB-F	5'-CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG-3'	200 bp
	EntB-R	5'-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3'	
Enterocín P	EntPRe v	5'-CCACTAATTGCAGGTTGA-3'	755 bp
	EntPFor	5'-CCCGAAGAATACAAATGAG-3'	
Enterolyzín A	EntlA3	5'-GGACAACAATTCGGGAACACT-3'	1007 bp
	EntlA9	5'-GCCAAGTAAAGGTAGAATAAA-3'	
Cytolyzín	CylF	5'-GGCGGTATTTTTACTGGAGT-3'	247 bp
	CylR	5'-CCTACTCCTAAGCCTATGGTA-3'	

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bakteriocíny sú antimikrobiálne peptidy a proteíny, ktoré sú syntetizované baktériou. U laktát produkujúcich baktérií, enterokoky produkujú diverznú a heterogénnu skupinu bakteriocínov s rozličným antimikrobiálnym spektrom, štruktúrou a sekrečným mechanizmom. V tejto práci sa testovalo 16 fekálnych a 14 bachorových kmeňov na stanovenie produkcie bakteriocínom podobnej aktivity (BLA). Bakteriocíny bachorových baktérií pravdepodobne zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii bachorového mikrobiálneho systému. 12 z 30 testovaných bakteriálnych kmeňov bolo aktívnych voči štandardnému indikátorovému organizmu *E. malodoratus* NCDO846. Producenti bakteriocínov majú rozvinutý svoj ochranný systém, ktorý zaručuje ich rezistenciu proti vlastným bakteriocínom. Tento "imunitný systém - proteín" sa exprimuje spolu s príslušným bakteriocínom (Klaenhammer, 1993; Nes a kol., 1996). V našej práci fekálne izoláty vykazovali vyššiu frekvenciu produkcie BLA (7/16) porovnaním s bachorovými kmeňmi (5/14) (Obr. 1.).

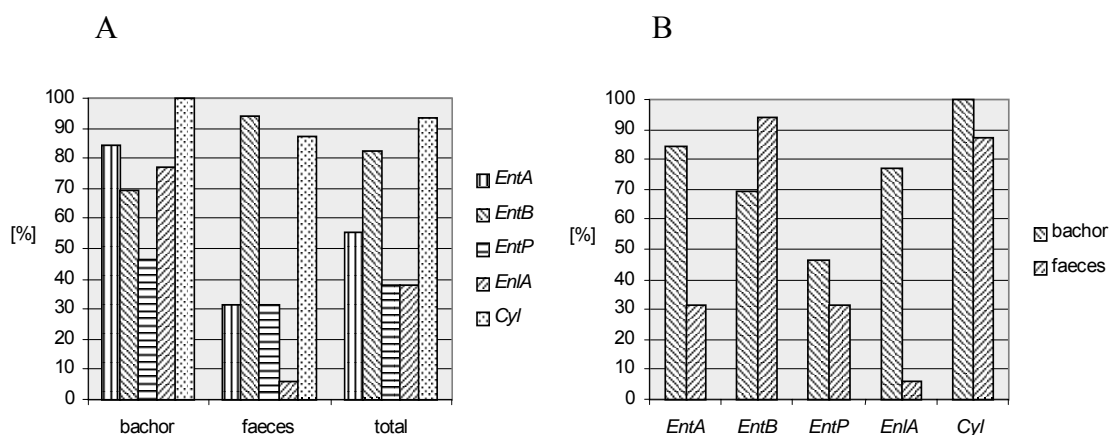


**Obr. 1.** Produkcia bakteriocínom podobnej aktivity (BLA) testovaných kmeňov voči kmeňu *E. malodoratus* NCDO846 a porovnanie produkcie medzi bachorovými a fekálnymi kmeňmi

Na detekciu prítomnosti štruktúrnych génov vybraných bakteriocínov (enterocín A, enterocín B, enterocín P, enterolyzín A a cytolyzín) sa použila PCR analýza. Použitím špecifických primérov a podmienok PCR pre jednotlivé bakteriocíny sa získali amplikóny zodpovedajúcej veľkosti. Najčastejšie sa vyskytujúci gén medzi testovanými kmeňmi je gén kódujúci syntézu cytolyzínu a najmenej vyskytujúce sa sú gény kódujúce syntézu enterocínu P a enterolyzínu A. Medzi fekálnymi kmeňmi sa najčastejšie vyskytoval štruktúrny gén pre enterocín B a medzi bachorovými kmeňmi to bol gén kódujúci syntézu cytolyzínu (Obr. 2A). Frekvencia výskytu génov kódujúcich syntézu jednotlivých bakteriocínov u bachorových baktérií bola porovnaním s fekálnymi kmeňmi vyššia u všetkých bakteriocínov okrem enterocínu B, kde bola frekvencia výskytu vyššia u kmeňov fekálnych (Obr. 2B). Všetky kmene obsahovali aspoň jeden štruktúrny gén z jednotlivých testovaných bakteriocínov, dokonca u 3 bakteriálnych kmeňov sa pozoroval výskyt všetkých piatich nami testovaných štruktúrnych génov.

Štúdium bachorových a fekálnych bakteriocínov má veľký význam kvôli ich možnému použitiu ako probiotiká na ochranu voči rôznym črevným infekciám alebo iným patogénnym procesom v tráviacom trakte zvierat. Presne vymedziť úlohu bakteriocínov v tráviacom trakte zvierat si vyžaduje ešte rozsiahle štúdium ich diverzity, spôsobu účinku, génov a mechanizmu ich regulácie.

**Obr. 2.** Frekvencia výskytu štruktúrnych génov vybraných bakteriocínov (A) a porovnanie výskytu génov medzi bachorovými a fekálnymi izolátmi (B)



Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA-grant č. 2/6175/26.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 1993; 12:39-86.

Laukova A, Czikkova S. The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 1999; 87:182-6.

Laukova A, Turek P, Marekova M, Nagy J. Use of ent M, new variant of ent P to control *Listeria innocua* in experimentally contaminated Gombasek sausage. Archiv für Lebensmittelhygiene 2003; 54:25-48.

Morovsky M, Pristaš P, Javorský P, Nes IF, Holo H. Isolation and characterization of enterocin BC25 and occurrence of the entA gene among ruminal Gram-positive cocci. Microbiol Res. 2001a; 156:1-6.

Morovsky M, Pristaš P, Javorský P. Bacteriocins of ruminal bacteria. Folia Microbiol. 2001b; 46:61-2.

Nes IF, Diep DB, Håvarstein LS, Brurberg MB, Eijsink VGH, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 70:113-28.

Nes IF, Eijsink VGH. Regulation of group II peptide bacteriocin synthesis by quorum-sensing mechanisms. 1999. In: Dunny, G.M., Winans, S.C. (Eds.) Cell-Cell Signaling in Bacteria. ASM Press. USA. pp. 175-92.

Nilsen T, Nes IF, Holo H. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. J Bacteriol. 1998; 180:1848-54.

Pospiech A, Neumann B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trend Genet. 1995; 11:217-218.

Rilla N, Martinez B, Delgado T, Rodriguez A. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. Int J Food Microbiol. 2003; 85:23-33.

# GENETICKÁ TYPIZÁCIA A VARIABILITA PESTIVÍRUSOV INFIKUJÚCICH HOVÄDZÍ DOBYTOK

Nováčková M., Jacková A., Vilček Š.

*Katedra infekčných a parazitárnych chorôb, UVL, Košice*

## ABSTRAKT

Časť práce je zameraná na štúdium genetickej typizácie a variability vírusu BVD vo francúzskej oblasti Burgundy. Výsledky analýzy 5'-UTR oblasti BVDV genómu 48 vzoriek a N<sup>pro</sup> oblasti 14 vzoriek ukázali, že spomínané izoláty patria do subtypov BVDV-1b, BVDV-1d a BVDV-1e. Tri izoláty sformovali novú fylogenetickú vetvu BVDV-11. Jeden izolát bol typizovaný ako BVDV-2 subtyp v 5'-UTR aj v N<sup>pro</sup> oblasti. V súčasnosti jediný známy BVDV-2 izolát zo Slovenska (BVDV-2SK) sme podrobili podrobnejšej genetickej analýze, nakoľko predošlé štúdie naznačili, že tento sa javí ako geneticky vzdialený od referenčného kmeňa 890.

## ÚVOD

Vírus hnačky hovädzieho dobytku (BVDV) taxonomicky patrí do rodu *Pestivirus*, čeľaď *Flaviviridae* (Murphy a kol., 1999). Pestivírusy patria medzi ekonomicky významné patogény vyvolávajúce množstvo prenatálnych a postnatálnych infekcií spojené s významnými stratami v populáciách hovädzieho dobytku a ďalších živočíšnych druhov (Moenning a Plagemann, 1992).

BVDV je jedným z agensov spôsobujúcich respiračný syndróm hovädzieho dobytku, ale vyvoláva aj reprodukčné a enterálne poruchy a za istých okolností tiež slizničnú chorobu. Ak ku infikovaniu zvierat dôjde v priebehu prvého trimestra gestácie, novonarodené jedince sú perzistentne infikované a tak sa stávajú doživotnými nositeľmi vírusu (Baker, 1995; Brownlie, 1991; Nettleton a Entrican, 1995).

Genóm pestivírusov tvorí jednovláknová RNA s pozitívnou orientáciou a dĺžkou približne 12.3 kb (Collet a kol., 1988).

Genóm vírusu ohraničujú 5' a 3' úseky, ktoré sú nekódujúcimi oblasťami (untranslated regions - UTR) vymedzujúce ORF (open reading frame) kódujúci proteín s dĺžkou približne 4000 aminokyselín (Collet a kol., 1988). Polyproteín je postranslačne štiepený bunkovými a vírusovými proteázami na štruktúrne a neštruktúrne proteíny. Po 5'-UTR nasleduje oblasť N<sup>pro</sup>, E<sup>ms</sup>, E1, E2, NS2-3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B a nakoniec 3'-UTR (Meyers a Thiel, 1996).

V súčasnosti sú známe dva genotypy BVDV. BVDV-1 bol objavený v 50-tych rokoch (Baker a kol., 1954) a je celosvetovo rozšírený. Existencia genotypu BVDV-2 bola po prvýkrát potvrdená v 90-tych rokoch v USA a Kanade (Pellerin a kol., 1994; Ridpath a kol., 1994), kde sa objavilo akútne prebiehajúce ochorenie charakterizované silnými hnačkami, horúčkami, trombocytopéniou, leukopéniou, hemoragickým syndrómom a spojené s vysokou mortalitou zvierat (Corapi a kol., 1989; Rebhun a kol., 1989). Rozsiahla genetická analýza BVDV-1 izolátov pochádzajúcich z viacerých krajín zatiaľ viedla k potvrdeniu existencie 11 genetických skupín (Vilček a kol., 2001). Zdá sa, že BVDV-2 izoláty sa v Európe vyskytujú sporadicky, napr. v Belgicku, Francúzsku, Nemecku, Taliansku, Slovensku, Portugalsku a Veľkej Británii (Vilček a kol., 2006).

Cieľ práce bol zameraný na štúdium genetickej diverzity BVDV izolátov cirkulujúcich vo francúzskej oblasti Burgundy a podrobnejšiu genetickú analýzu BVDV-2 izolátu zo Slovenska.

## MATERIÁL A METODIKA

Na genetickú analýzu bolo použitých 48 vzoriek (krv, sérum, parenchymatózne orgány) získaných z klinicky chorého hovädzieho dobytká. Prítomnosť vírusu bola potvrdená Ag-ELISA testom.

BVDV-2SK izolát pochádza z chovu hovädzieho dobytká na západnom Slovensku.

Na izoláciu celkovej RNA bol použitý TRIzol (Invitrogen) a na syntézu cDNA random hexaméry (Invitrogen). Primery 324/326 v priebehu 37 cyklov PCR amplifikovali 288 bp dlhý fragment z 5'-UTR (Vilček a kol., 1994). Výsledkom amplifikácie vybraných francúzskych vzoriek z N<sup>pro</sup> oblasti pri použití primerov BD1 a BD3 bol fragment s veľkosťou 425 bp (Vilček a kol., 2001).

Analýza genómu BVDV-2SK izolátu prebiehala za rovnakých podmienok, približne 780bp dlhý fragment z N<sup>pro</sup> oblasti vírusového genómu ohraničovali primery BD1 a BD2.

PCR produkty boli purifikované použitím Wizard PCR DNA purifikačného kitu (Promega) a sekvenované v oboch smeroch na sekvenačnom zariadení ABI PRISM za použitia vyššie spomínaných primerov. Nukleotidové sekvencie boli verifikované počítačovým programom SeqMan II (DNASTAR) a porovnané použitím metódy CLUSTAL W. Konštrukciu fylogenetického stromu zabezpečil program NEIGHBOR (PHYLIP).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Genetická typizácia 48 izolátov z Francúzska v 5'-UTR oblasti ukázala, že izolované vírusy patria do štyroch BVDV-1 subtypov a jeden izolát bol typizovaný ako BVDV-2. Zo 47 BVDV-1 izolátov, patrí 9 izolátov do BVDV-1b, 2 izoláty do BVDV-1d, 33 izolátov do BVDV-1e subtypu. Genetická analýza ukázala, že 3 izoláty patria do novoobjavenej fylogenetickej vetvy označenej ako BVDV-11. Na potvrdenie typizácie vírusu sa uskutočnila analýza vybraných izolátov aj v N<sup>pro</sup> oblasti vírusového genómu. Zo štrnástich BVDV-1 izolátov boli tri typizované ako BVDV-1b, jeden ako BVDV-1d a sedem ako BVDV-1e, rovnako ako v oblasti 5'-UTR. Objavenie novej fylogenetickej vetvy potvrdila genetická analýza troch izolátov, ktoré sa zoskupili do vetvy BVDV-11. Typizácia BVDV-2 bola potvrdená aj v N<sup>pro</sup> oblasti genómu.

Vilček a kol. (2001) typizoval 78 BVDV izolátov zozbieraných v rokoch 1993-1998 zo siedmich európskych krajín. Z 25 izolátov pochádzajúcich z Francúzska, 23 izolátov bolo zaradených medzi BVDV-1 a dva izoláty medzi BVDV-2 genotyp. BVDV-1 izoláty boli zoskupené do štyroch subtypov: BVDV-1a (n=3), BVDV-1b (n=6), BVDV-1d (n=1) a BVDV-1e (n=13).

Pri porovnaní vyššie spomínanej štúdie so súčasnými výsledkami genetickej typizácie vírusu z oblasti Burgundy, môžeme konštatovať, že u hovädzieho dobytká vo Francúzsku dominuje BVDV-1e subtyp. Výskyt BVDV-2 vo Francúzsku bol opäť potvrdený. Navyše oproti predchádzajúcej štúdii, v súčasnosti evidujeme existenciu novej fylogenetickej vetvy BVDV-11.

Výsledky analýzy BVDV-2SK genómu boli porovnané s údajmi získanými o niekoľkých BVDV-2 izolátoch z medzinárodnej databázy GeneBank. Fylogenetická analýza BVDV-2 izolátov bola upriamená na N<sup>pro</sup> oblasť, ktorá u pestivírusov dosahuje dĺžku 504 nt kódujúcich 168 aminokyselín. Podobnosť nukleotidových sekvencií porovnávaných BVDV-2 izolátov v N<sup>pro</sup> oblasti je v rozmedzí 79.4-99.4% na úrovni aminokyselín. Najnižšiu podobnosť pozorujeme medzi BVDV-2SK a referenčným kmeňom 890. Z analýzy aminokyselinových sekvencií z N<sup>pro</sup> oblasti vyplýva, že sedem z ôsmich cysteínových reziduí (pozícia 69, 106, 112, 134, 138, 161 a 168) je

konzervovaných u všetkých porovnávaných izolátov. Výnimkou je cysteínový zvyšok v polohe 30.

Genetická analýza BVDV-1 izolátov potvrdila značnú diverzitu BVD vírusu. Táto štúdia tiež naznačuje, že genetická analýza ďalších izolátov z Francúzska a iných krajín by mohla potvrdiť vyšší stupeň diverzity vírusu, prípadne odhaliť nové fylogenetické vetvy.

Podrobnejšia analýza ďalších génových oblastí izolátu BVDV-2SK by umožnila komplexnejší pohľad na tento ojedinelý izolát identifikovaný na našom území.

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Baker, J. C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 1995, 11(3): 425-445

Baker, J.A., York, C.J., Gillespie, J.H., Mitchell, G.B. Virus diarrhoea in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 1954, 57: 525-531

Brownlie, J. The pathways for bovine virus diarrhoea virus biotypes in the pathogenesis of disease. *Arch. Virol.* 1991, 3: 79-96

Collet, M.S., Larson, R., Gold, C., Strinck, D., Anderson, D.K., Purchio, A.F. Molecular cloning and nucleotide sequence of pestivirus bovine viral diarrhoea virus. *Virology* 1988, 165: 191-9.

Corapi, W. V., French, T. W., Dubovi, E. J. Severe thrombocytopenia in young calves experimentally infected with noncytotoxic bovine viral diarrhoea virus. *J. Virol.* 1989, 63(9): 3934-3943

Meyers, G., Thiel, H.J. Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus Res.* 1996, 47: 53-118

Moening, V. a Plagemann, G. W. The pestiviruses. *Virus Research* 1992, 41: 53-98

Nettleton, P.F., Entrican, G. Ruminant pestiviruses. *Br. Vet. J.* 1995, 151: 615-642

Pellerin, C., Van den Hurk, J., Lecomte, J., Tijssen, P. Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* 1994, 203: 260-268

Rebhun, W. C., French, T. W., Perdrietz, J. A., Dubovi, E. J., Dill, S. G. Karcher, L. F. Thrombocytopenia associated with acute bovine diarrhoea infection in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 1989, 3(1): 42-46

Ridpath, J., Bolin, S. R., Dubovi, E. J. Segregation of bovine viral diarrhoea virus into genotypes. *Virology* 1994, 205: 66-74

Vilček, Š., Herring, A.J., Herring, J.A., Nettleton, P.F., Lowings, J.P., Paton, D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 1994, 136: 309-323

Vilček, Š., Paton, D.J., Durkovic, B., Strojny, L., Ibata, G., Moussa, A., Loitsch, A., Rosmanith, W., Vega, S., Scicluna, M.T., Pálffy, V. Bovine viral diarrhoea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups. *Arch. Virol.* 2001, 146: 99-115

Vilček, Š., Jacková, A., Kolesárová, M., Nováčková, M. Identifikácia BVDV-2 v Európe: Analýza možných problémov a rizík. *Slovenský veterinársky časopis* 2006, 31(2): 104-105

# **ANTIOXIDAČNÝ A SELÉNOVÝ STATUS BACHOROVÉHO A VNÚTORNÉHO PROSTREDIA OVIEC KŔMENÝCH DIÉTOU OBOHATENOU SELENIČITANOM SODNÝM**

Petrovič V.

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice*

## **ABSTRAKT**

Cieľom pokusu bolo sledovanie vplyvu doplnenia kŕmnej dávky pre ovce seleničitanom sodným na aktivitu glutatión peroxidázy v krvi, tkanivách a bakteriálnej a protozoálnej bachorovej frakcii, aktivitu krvnej superoxid dismutázy, koncentrácie malondialdehydu a selénu v telových tekutinách, orgánoch a bakteriálnej a protozoálnej bachorovej frakcii prežúvavcov. Ovce s priemernou ž. h. 38 kg boli náhodne rozdelené do dvoch skupín po päť zvierat. Boli ustajnené v individuálnych boxoch s voľným prístupom k vode. Počas dvoch mesiacov boli ovce kontrolnej skupiny kŕmené bazálnou diétou (BD) zabezpečujúcou denný príjem Se 42,35 µg na zviera, kým ovce seleničitanovej skupiny dostávali rovnakú BD obohatenú o 228 µg Se vo forme seleničitanu sodného. Ovce boli eutanázované kvôli odberu vzoriek na analýzy. Aktivita superoxid dismutázy bola významne znížená v seleničitanovej skupine oviec, kým glutatión peroxidáza v krvi, tkanive pečene, kôry obličky, drene obličky a epiteli mala naopak v seleničitanovej skupine vyššiu aktivitu než v kontrolnej skupine oviec. Koncentrácia malondialdehydu ostala nezmenená v plazme, ale vo všetkých sledovaných orgánoch a v bachorovom prostredí boli jej hodnoty u oviec kŕmených diétou obohatenou o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> nižšie ako u zvierat iba s bazálnym príjmom Se. Koncentrácie Se v krvi, orgánoch a bachorovom prostredí boli štatisticky významne zvýšené v seleničitanovej skupine oproti kontrole. Obohatenie diéty pre ovce seleničitanom sodným spôsobilo zlepšenie antioxidačného a selénového statusu bachorového i vnútorného prostredia prežúvavcov.

## **ÚVOD**

Antioxidačná ochrana je aktívne odstraňovanie kyslíkových voľných radikálov pomocou antioxidantov „vitamínov, kys. močovej, superoxid dismutázy, zložiek zahrnutých do glutatiónového a tioredoxínového systému a iných“. Antioxidanty zabezpečujú ochranu biologicky dôležitých molekúl pred oxidačným poškodením vyvolaným pôsobením voľných radikálov. Sú lokalizované v organelách, subcelulárnych kompartmentoch a extracelulárnom priestore (Surai a kol., 1999). Enzýmy ako superoxid dismutáza (SOD) a selénoenzýmy „glutatión peroxidáza (GPx), tioredoxín reductáza, glutatión reductáza“ sú považované za hlavné zložky antioxidačnej ochrany organizmu.

Selén vo forme selénocysteínu zabudovaný do aktívneho centra selénoenzýmov zodpovedá za ich enzymatickú aktivitu (Behne a Kyriakopoulos, 2001), i preto je sledovanie selénového a antioxidačného statusu zvierat a ľudí stredobodom záujmu (Leng a kol., 2000; Boldžárová a kol., 2003).

Našu prácu sme preto zamerali na hodnotenie antioxidačného a selénového statusu bachorového a vnútorného prostredia oviec, pomocou merania vybraných antioxidačných parametrov, pri skrmovaní bazálnej diéty a diéty obohatenej o seleničitan sodný.

## **MATERIÁL A METODIKA**

Ovce s priemernou ž. hmotnosťou 36 kg boli náhodne rozdelené do dvoch skupín po päť zvierat. Boli ustajnené v individuálnych boxoch s voľným prístupom k vode. Počas dvoch mesiacov boli ovce kontrolnej skupiny kŕmené bazálnou diétou (BD)

zabezpečujúcou denný príjem Se 42,35 µg na zviera, kým ovce seleničitanovej skupiny dostávali rovnakú BD obohatenú o 228 µg Se vo forme seleničitanu sodného. Ovciam boli po eutanázii odberaté vzorky orgánov na analýzy, ktoré sme uložili pod -60 °C do ich analyzovania. Aktivita SOD bola meraná hneď po odbere krvi kitom RANSOD od firmy Randox, UK. Aktivita GPx v krvi bola meraná kitom RANSEL od firmy Randox, UK. Aktivitu GPx v tkanive pečene, obličky, duodéna a bachorovom obsahu sme merali ako zmenu absorbancie vzorky spôsobenú vznikajúcim oxidovaným NADP<sup>+</sup> pri 340 nm metódou (Paglia a Valentine, 1967) modifikovanou podľa Zagrodzského et al. (1998). Hemoglobín bol analyzovaný kitom od firmy Randox, UK. Koncentrácia selénu v krmive, krvi a orgánoch bola hodnotená v duplikátoch použitím fluorometrickej metódy (Rodriguez a kol., 1994). Koncentrácie MDA v plazme, tkanive pečene, obličky, duodéna a bachorovom obsahu boli merané modifikovanou fluorometrickou metódou (Jo a Ahn, 1997). Bielkoviny sme stanovili metódou podľa Bradforda (1976). Bakteriálnu a protozoálnu frakciu sme z bachorového obsahu oviec získali metódou podľa Czerkawského (1976).

Na štatistické vyhodnotenie významnosti výsledkov sme použili Studentov t-test nepárový. Výsledky sú uvedené ako priemerné hodnoty ± SEM.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

**Tabuľka 1.** Koncentrácie Se v krvi, tkanive pečene, kôry obličky, drene obličky, slezine, epiteli, chrbtovej svalovine a srdci oviec kŕmených bazálnou diétou a diétou obohatenou seleničitanom sodným.

parameter	kontrolná skupina	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> skupina	
Se v krvi µmol.l <sup>-1</sup>	0,43 ± 0,03	3,62 ± 0,26	p < 0.001
Se v pečeni µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	4,06 ± 0,11	23,04 ± 2,58	p < 0.001
Se v kôre obličky µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	45,85 ± 3,03	66,86 ± 2,37	p < 0.001
Se v dreni obličky µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	8,77 ± 1,13	14,61 ± 1,15	p < 0.01
Se v epiteli µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	5,86 ± 0,67	14,07 ± 0,59	p < 0.001
Se v chrbtovom svale µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	0,89 ± 0,08	3,43 ± 0,14	p < 0.001
Se v srdci µmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	3,88 ± 0,23	14,88 ± 0,49	p < 0.001

Hodnoty sú priemery ± SEM, n=5 v každej skupine.

Koncentrácie Se v krvi, tkanive pečene, kôry obličky, drene obličky, duodéna, chrbtovej svaloviny a srdca oviec sú prezentovaná v Tabuľke 1. Skrmovanie diéty obohatenej o seleničitan sodný ovciam viedlo k významnému zvýšeniu koncentrácie Se v krvi, ako i všetkých sledovaných tkanivách v porovnaní s koncentraciami selénu stanovenými v krvi a orgánoch oviec s bazálnym príjmom Se.

Je známe, že koncentrácia Se v telových tekutinách a tkanivách je v úzkej lineárnej korelácii s aktivitou GPx v krvi (Pavlatá a kol., 2001). Rovnako ako koncentrácia Se i aktivita GPx v krvi a všetkých sledovaných orgánoch bola významne zvýšená v seleničitanovej skupine v našich oviec. Tieto výsledky sú v zhode s pozorovaniami



uvedenými v mnohých prácach, v ktorých sledovali vplyv skrmovania diét doplnených o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> u rôznych druhov zvierat (Kuricová a kol., 2003; Zuberbuehler a kol., 2006).

**Tabuľka 2.** Aktivity GPx v krvi, tkanive pečene, kôry obličky, drene obličky, duodéna, koncentrácie MDA v plazme, tkanive pečene, obličky, duodéna a koncentrácia –SH skupín v plazme oviec kŕmených bazálnou diétou a BD obohatenou seleničitanom sodným.

parameter	kontrolná skupina	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> skupina	
GPx v krvi U.g <sup>-1</sup> Hb	265,9 ± 53,2	993 ± 66,04	p < 0.001
GPx v pečeni U.g <sup>-1</sup> bielkovín	18,06 ± 2,36	88,25 ± 4,77	p < 0.001
GPx v kôre obličky U.g <sup>-1</sup> bielkovín	47,19 ± 8,21	88,52 ± 15,39	p < 0.01
GPx v dreni obličky U.g <sup>-1</sup> bielkovín	26,95 ± 4,53	44,43 ± 3,34	p < 0.05
GPx v duodéne U.g <sup>-1</sup> bielkovín	36,17 ± 4,66	114,8 ± 17,38	p < 0.01
MDA v plazme μmol.l <sup>-1</sup>	0,28 ± 0,04	0,29 ± 0,02	NS
MDA v pečeni nmol.g <sup>-1</sup> bielkovín	22,53 ± 1,15	16,76 ± 0,87	p < 0.01
MDA v kôre obličky nmol.g <sup>-1</sup> bielkovín	31,9 ± 3,53	19,51 ± 3,42	p < 0.05
MDA v dreni obličky nmol.g <sup>-1</sup> bielkovín	26,09 ± 1,84	20,04 ± 1,52	p < 0.05
MDA v duodéne nmol.g <sup>-1</sup> bielkovín	47,59 ± 2,80	38,42 ± 1,17	p < 0.05
–SH skupín v plazme mmol.l <sup>-1</sup>	0,54 ± 0,01	0,46 ± 0,02	p < 0.01

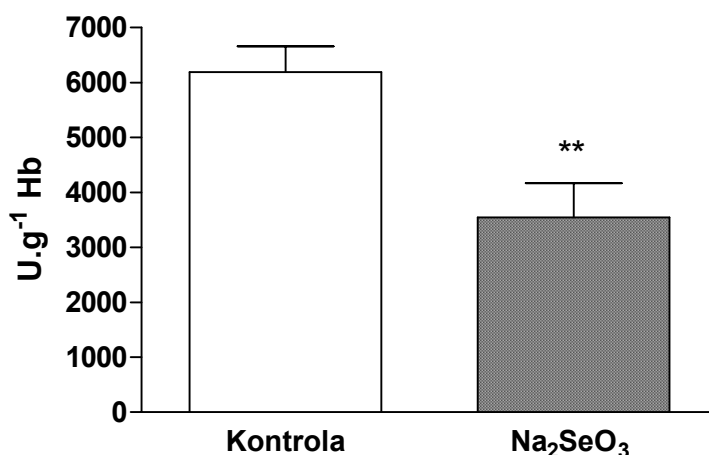
Hodnoty sú priemery ± SEM, n=5 v každej skupine.

Koncentrácia MDA v tkanive pečene, kôry obličky, drene obličky a duodéna bola významne znížená v seleničitanovej skupine v porovnaní s kontrolnou skupinou oviec. Balogh a kol., (2004) zistili, že pokles hladín GPx v tkanivách je sprevádzaný vzostupom koncentrácie MDA v sledovaných tkanivách.

Koncentrácia –SH skupín v plazme oviec bola významne znížená v seleničitanovej skupine oproti kontrolnej skupine. Tiolové skupiny sú významnou ochrannou bariérou plazmy pred oxidačným pôsobením voľných radikálov. Ich pokles poukazuje na zníženie tvorby alkoxylového a hydroxylového radikálu v organizme.

Aktivita krvnej SOD bola v seleničitanovej skupine významne znížená v porovnaní s kontrolnou skupinou oviec (Graf 1). K rovnakému záveru sme dospeli i v našom predošlom experimente na sliepkach, v ktorom skrmovanie diéty obohatenej o Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> resp. selenizované kvasnice, spôsobilo významný pokles aktivity SOD v porovnaní s hydinou kŕmenou iba BD (Petrovič a kol., 2006). Predpokladáme, že zvýšenou aktivitou selénoenzýmov (GPx, TRxR a iných) v seleničitanovej skupine oviec sa zabezpečilo zlepšenie recyklácie vitamínu C a vitamínu E, ktoré slúžia ako scavenger

„zberač odpadkov metabolizmu“ superoxidového radikálu (Surai, 2002), ktorý je špecifickým substrátom pre superoxid dismutázu.



**Graf 1.** Efekt obohatenia bazálnej diéty pre ovce seleničitanom sodným na aktivitu krvnej superoxid dizmutázy. Hodnoty sú priemery ± SEM, n=5 v každej skupine.

Porovnanie koncentrácie Se prijímaného diétou s koncentráciou selénu v bakteriálnej a protozoálnej frakcii bachorovej tekutiny potvrdzuje schopnosť bachorovej mikroflóry kumulovať Se do mikrobiálnych proteínov (tabuľka 3). V telách bachorových mikroorganizmov sa selén nachádza hlavne vo forme selénoaminokyselín. Van Ryssen a kol. (1989) zistili, že selénocysteín bol predominantnou selénoaminokyselinou prítomnou v bachorových mikroorganizmoch kultivovaných v médiu obsahujúcom Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Preto môžeme predpokladať, že nami zaznamenané zvýšenie v koncentrácii Se v oboch frakciách bachorového obsahu oviec seleničitanovej skupiny v porovnaní s kontrolou je zapríčinené hlavne prítomnosťou selénocysteínu v mikrobiálnych Se-enzýmoch.

**Tabuľka 3.** Koncentrácie Se v bakteriálnej a protozoálnej frakcii bachorového obsahu oviec kŕmených bazálnou diétou a BD obohatenou seleničitanom sodným.

parameter	kontrolná skupina	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> skupina	
Se v bakteriálnej frakcii μmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	3,08 ± 0,28	9,72 ± 1,73	p < 0.01
Se v protozoálnej frakcii μmol.kg <sup>-1</sup> sušiny	5,06 ± 0,54	12,21 ± 0,1	p < 0.001

Hodnoty sú priemery ± SEM, n=5 v každej skupine.

Pokusy z nedávneho obdobia odhaľujú, že baktérie vykazujú aj inú enzymatickú aktivitu ako katalázovú. Baktérie *Lactobacillus* boli pozitívne testované na GPx aktivitu (Kim a kol., 2006). V baktériách *Streptococcus bovis* a *Selenomonas ruminantium*, obývajúcich práve nami sledované bachorové prostredie, bola zistená GPx, SOD a GR enzymatická aktivita (Holovská a kol., 2002). V našom pokuse sme zaznamenali zvýšenie aktivity GPx v bakteriálnej i protozoálnej frakcii bachorového obsahu u oviec prijímajúcich diétu obohatenú o seleničitan sodný v porovnaní s ovcami iba na bazálnej diéte (tabuľka 4).

Samotný tráviaci trakt je považovaný za hlavné miesto tvorby voľných radikálov (Surai, 2002). Poukazuje na to i nami zistená vysoká koncentrácia MDA v bakteriálnej

a protozoálnej frakcii bachorového obsahu u kontrolných zvierat ( $804,9 \pm 48,96$  nmol.g<sup>-1</sup> bielkovín bakteriálnej frakcie a  $492,7 \pm 34,65$  nmol.g<sup>-1</sup> bielkovín protozoálnej frakcie) v porovnaní s koncentraciami MDA vo vnútornom prostredí prežúvavcov prezentovaných v tabuľke 2. Zaujímavé je zistenie, že koncentrácie MDA v bakteriálnej a protozoálnej frakcii bachorového obsahu kontrolných zvierat boli významne vyššie ako koncentrácie MDA v bakteriálnej a protozoálnej frakcii bachorového obsahu zvierat so seleničitanom obohatenou diétou. Sledované ukazovatele antioxidačného statusu bachorového prostredia zobrazuje (tabuľka 4).

**Tabuľka 4.** Aktivity GPx a koncentrácie MDA v bakteriálnej a protozoálnej frakcii bachorového obsahu oviec kŕmených bazálnou diétou a BD obohatenou seleničitanom sodným.

parameter	kontrolná skupina	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> skupina	
GPx v homogenáte bakteriálnej frakcie U.ml <sup>-1</sup>	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,01	p < 0.01
GPx v homogenáte protozoálnej frakcie U.ml <sup>-1</sup>	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,02	p < 0.05
MDA v homogenáte bakteriálnej frakcie nmol.ml <sup>-1</sup>	2,33 ± 0,03	1,62 ± 0,06	p < 0.001
MDA v homogenáte protozoálnej frakcie nmol.ml <sup>-1</sup>	2,51 ± 0,14	1,1 ± 0,11	p < 0.001

Hodnoty sú priemery ± SEM, n=5 v každej skupine.

Obohatenie diéty pre ovce seleničitanom sodným spôsobilo zlepšenie sledovaných parametrov antioxidačného i selénového statusu bachorového i vnútorného prostredia prežúvavcov.

*Táto práca bola podporovaná agentúrou na podporu vedy a techniky na základe zmluvy č. APVT-51-004804.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Arthur J.R., Boyne R., 1985. Superoxide-dismutase and glutathione-peroxidase activities in neutrophils from selenium deficient and copper deficient cattle. Life Sci. 36, 1569-1575.

Balogh K., Weber M., Erdélyi M., Mézes M., 2004. Effect of excess selenium supplementation on the glutathione redox system in broiler chicken. Acta Vet. Hung. 52, 403-411.

Behne D., Kyriakopoulos A., 2001. Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 145, 1-46.

Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Boldižárová, K., Grešáková, E., Faix, Š., Levkut, M., Leng, E., 2003. Urinary selenium excretion in selenite-loaded sheep and subsequent Se dynamics in blood constituents. Reprod. Nutr. Development, 43, 385-393.

- Czerkawski J.W., 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 27, 621-632.
- Ellman G.L., 1958. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77
- Jo C., Ahn D.U., 1998. Fluorometric analysis of 2-thiobarbituric acid reactive substances in turkey. *Poultry Sci.* 77, 475-480.
- Hholovská K., Lenártová V., Holovská k., pristaš P., Javorský P. 2002. Are ruminal bacteria protected against environmental stress by plant antioxidants ? *Lett. App. Microbiol.* 35, 303-304.
- Kim H.S., Chae H.S., Jeong S.C., Ham J.S., Im S.K., Ahn C.N., Lee J.M. 2006. In vitro antioxidative properties of lactobacilli, *J Anim. Sci.* 19 (2): 262-265.
- Kuricová S., Boldižárová K., Grešáková L., Levkut M., Leng L., 2003. Chicken selenium status when fed a diet supplemented with Se-yeast. *Acta Vet. Brno* 72, 339-346.
- Leng, L., Boldižárová, K., Faix, Š., Kováč, G., 2000. The urinary excretion of selenium in sheep treated with a vasopressin analogue. *Vet. Res.*, 31, 499-505.
- Paglia D.E., Valentine W.N., 1967. Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Med.* 70, 158-169.
- Pavlata L., Illek J., Pechová A., 2001. Blood and tissue selenium concentration in calves treated with inorganic or organic selenium compounds - A comparison. *Acta Vet. Brno* 70, 19-26.
- Petrovič V., Boldižárová K., Faix š., Mellen M., Arpašová H., Leng L., 2006. Antioxidant and selenium status of laying hens fed with diets supplemented with selenita or Se-yeast. *Anim. Feed Sci.* 15, 435-445.
- Rodriguez E.M., Sanz M.T., Romero C.D., 1994. Critical study of fluorometric determination of selenium in urine. *Talanta* 12, 2025-2031.
- Surai P.F., 2002. Selenium in poultry nutrition 1. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *World Poultry Sci. J.* 58, 333-347.
- Zagrodzki P., Nicol F., McCoy M.A., Smyth J.A., Kennedy D.G., Beckett G.J., Arthur J.R., 1998. Iodine deficiency in cattle: compensatory changes in thyroidal selenoenzymes. *Res. Vet. Sci.* 64, 209-211.
- Zuberbuehler C.A., Messikommer R.E., Arnold M.M., Forrer S.R., Wenk C., 2005. Effects of selenium depletion and selenium repletion by choice feeding on selenium status of young and old laying hens. *Physiol. Behav.* 87, 430-440.

## VÝSKYT ENDOPARIZITOV KAMZÍČEJ ZVERI V SLOVENSKOM RAJI

Sabo R.<sup>1</sup>, Sabová (rod. Droppová) L.<sup>2</sup>, Krupicer I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav toxikológie, UVL, Košice

<sup>2</sup>Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice

### ABSTRAKT

Do oblasti Slovenského raja bol introdukovaný kamzík alpský, pôvodom zo Štajerských Alp. Kamzíky v Národnom parku Slovenský raj sú v relatívne dobrom zdravotnom stave. Zo zdravotných problémov sa u kamzíkov najčastejšie zisťujú práve parazitózy. Zisťovali sme výskyt endoparazitov u kamzíkov z vybraných lokalít Slovenského raja. Veľmi častým nálezom u kamzíkov sú pľúčne nematodózy, pri ktorých sme zistili 100 %-nú prevalenciu pľúcnych nematódov vo všetkých sledovaných lokalitách Slovenského raja. Kocciédie, ktorých celková prevalencia je 30 %, sú nebezpečné hlavne pre mladých jedincov v populácii kamzíkov. Taktiež sme zistili prítomnosť GIT nematódov v populácii kamzíkov.

### ÚVOD

V 70-tych rokoch minulého storočia boli do Slovenského raja, lokality Veľký Sokol introdukované alpské kamzíky z Jeseníkov (ČR), pôvodom zo Štajerských Alp, v počte 6 zvierat a to 4 samice a dva samce. Populácia introdukovaných alpských kamzíkov (*Rupicapra rupicapra*) je v Národnom parku v súčasnosti premnožená. Podľa posledného sčítania v roku 2005 sa nachádza v Slovenskom raji 110 – 120 kamzíkov.

Územie Slovenského raja patrí do oblasti Slovenského rudohoria, do centrálnej zóny Západných Karpát s nadmorskou výškou 400 – 1200 m.n.m. Nie je klasifikované ako vysoké horstvo, no vzhľadom na svoje špecifické podmienky má alpínsky charakter. Parazitózy pôsobia negatívne na zdravotný stav kamzíčej zveri, hlavne mladých jedincov, u ktorých nie je dostatočne vyvinutý imunitný systém. Najväčšie straty v kamzíčej populácii zapríčiňuje kokciidióza mladých jedincov, menej už ostatné parazitózy kamzíkov všetkých vekových kategórií.

Podľa súčasných prieskumov patria parazitárne ochorenia k najvýznamnejším problémom v chove a ochrane populácie kamzíkov nielen v TANAP-e (Mituch, 1974; Mituch a kol., 1989; Sattlerová-Štefančíková, 1982, 1987; Krupicer a kol., 1998), ale aj v národných parkoch Nízke Tatry (Štefančíková, 1994) a Slovenský raj (Krokavec ml. a Krokavec st., 1991; Ciberej a kol., 1997).

Na výskyt parazitóz vplývajú viaceré aspekty a to hlavne:

- klimatické podmienky
- migrácia čried kamzíčej zveri za potravou
- hustota, zdravotný stav a vekové zloženie populácie
- spoločné pastviny s domácimi zvieratami.

### MATERIÁL A METODIKA

Vzorky fekálií kamzíkov boli odoberané podľa Hella (1979) a Bakossa (1988), označené a uskladnené pri 4 °C až kým neboli vyšetrené. Vzorky fekálií zvierat sa vyšetrovali na Ústave toxikológie Univerzity veterinárskeho lekárstva flotačno - sedimentačnou metódou na prítomnosť vajíčok helmintov a oocýst kokciidií použitím Sheatherovho roztoku. Larvoskopické vyšetrenie bolo robené modifikovanou Baermanovou metódou.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

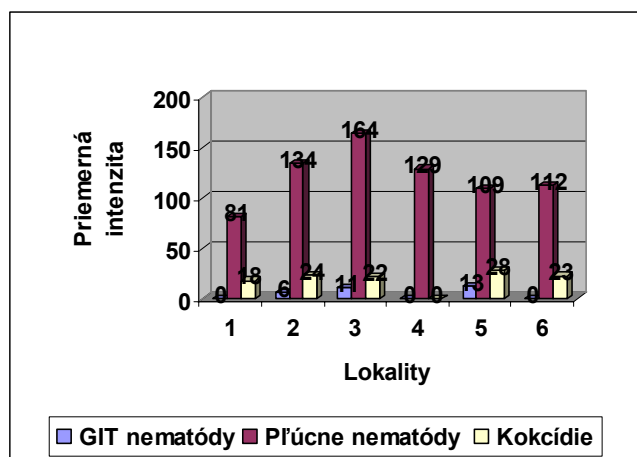
Pri zisťovaní prevalencie endoparazitov kamzíkov v Národnom parku Slovenský raj (Tab. 1) bolo zaznamenané najvyššie percento pľúcnych nematódov, 100 % -ná prevalencia vo všetkých sledovaných lokalitách, ďalej bol zaznamenaný výskyt GIT nematódov, v oblasti Kysel' až 80 % prevalencia. Kokcidiózu sme zistili v piatich z celkových šiestich sledovaných oblastí Národného parku Slovenský raj.

**Tabuľka 1.** Prevalencia endoparazitov kamzíkov (%) vo vybraných oblastiach Národného parku Slovenský raj

Lokalita	Veľký Sokol	Hladová Dolina	Suchá Belá	Stratená	Kysel'	Piecky
Druh zvierat'a	Rupicapra Rupicapra	Rupicapra rupicapra	Rupicapra rupicapra	Rupicapra rupicapra	Rupicapra rupicapra	Rupicapra rupicapra
Počet vzoriek	5	5	5	5	5	5
GIT nematódy %	0	40	20	0	80	0
Pľúčne nematódy %	100	100	100	100	100	100
Kokcidie %	20	60	40	0	20	40
Iné %	0	0	0	0	0	0

Priemerná intenzita endoparazitov kamzičej zveri (Graf č.1) bola vysoká v prípade pľúcnych nematódov vo všetkých sledovaných lokalitách. V lokalitách Hladová Dolina, Suchá Belá a Kysel' bolo zistené zastúpenie všetkých sledovaných endoparazitov.

**Graf č.1:** Priemerná intenzita endoparazitov kamzičej zveri vo vybraných oblastiach Národného parku Slovenský raj



Legenda: 1- Veľký Sokol  
2- Hladová Dolina  
3- Suchá Belá  
4- Stratená  
5- Kysel'  
6- Piecky

Na výskyt parazitóz v sledovaných populáciách kamzíkov negatívne vplyvajú predovšetkým ekologické a antropologické faktory. Kritický je pre kamzíky začiatok zimy. Samce sú vyčerpané po ruji a čerstvý namrznutý sneh im znemožňuje pohyb, potrava je prikrytá snehom. Počasie s vysokou vlhkosťou je tiež vhodné pre množenie propagačných štádií parazitov. Optimálny je pomalý príchod zimy, s malou vrstvou snehu a jasným počasím. V prípade výskytu dlhotrvajúcich fujavíc v strede zimy

kamzíky migrujú i do nižšie položených území za potravou. V oblasti Slovenského raja, niektoré stanovištia kamzíkov kolidujú s pasienkami pre ovce a kozy, čím dochádza k infikovaniu pasienkov parazitmi domácich prežúvavcov a ich prenosu na kamzíky. Podľa údajov zverostrážcov zo Slovenského raja boli kamzíky pozorované aj v rekreačných oblastiach, kde strácajú plachosť a prichádzajú (hlavne v noci) až k ľudským obydliam.

V rámci prevencie parazitárnych ochorení, ako najúčinnnejšej ochrany pri parazitózach, by sa mali zverostrážcovia zamerať na oblasti, v ktorých bola zistená zvýšená prevalencia endoparazitov, a to: Veľký Sokol, Hladová Dolina a Kysel'. Na základe nami získaných výsledkov sme vypracovali možnosti prevencie účinné proti endoparazitom kamzičej zveri, ktoré sme zhrnuli do nasledujúcich bodov:

- udržiavať únosný stav kamzičej zveri, ktorý neohrozuje ostatné pôvodné druhy flóry a fauny, v optimálnej vekovej štruktúre
- zabezpečiť populácii kamzíkov kľud, hlavne v období liahnutia mláďat a na jeseň, kedy si kamzíky musia zabezpečiť dostatok tukových zásob na zimu a taktiež prebieha ruja
- mať predpísaný počet krmelcov v lokalitách s vyhovujúcimi podmienkami (suché a presvetlené miesta), rovnomerne rozmiestnených v revíri
- v mimovegetačnom období zabezpečiť pravidelné a vhodné prikrmovanie nezávadným krmivom.

K opatreniam na úseku veterinárskej a zdravotnej starostlivosti:

- pravidelné sledovanie zdravotného stavu zveri
- pri dovoze nových jedincov dodržať karanténnu dobu
- pravidelné koprologické vyšetrenie trusu (min. od 20 % zveri populácie)
- zabezpečiť veterinárne vyšetrenie a asanáciu uhynutej zveri a kadáver zakopať.

Výsledky koprologických vyšetrení poukázali, že aj napriek prevencii sa v populácii kamzičej zveri vyskytujú infikovaní jedinci, ktorí sú zdrojom ďalšieho rozširovania endoparazitóz.

Na potvrdenie nami získaných výsledkov bude potrebný rozšírenejší prieskum kamzičej populácie z Nízkych Tatier a Slovenského raja.

*Práca bola čiastočne financovaná Národným referenčným laboratóriom pre pesticídy UVL Košice.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

- Ciberej J, Letková V, Kačúr M. Slovenský veterinársky časopis 22, 1997, 6:301-2  
Krokavec, M. Jr., Krokavec, M. Sr.: Veterinářství, 1991, 41:3-4  
Krupicer I, Merešš L, Breza M, Pačenovský J, Juriš P. Veterinářství, 1987, 37:551-3  
Krupicer I, Juriš P, Dubinský P, Vasilková Z, Papajová I, Štefančíková A. Hygienické a ekologické problémy vo vzťahu k veterinárnej medicíne, Košice, 1998, 65-70  
Mituch J. Zborník prác o Tatranskom národnom parku, 1974, 16:43-64  
Mituch J, Hovorka I, Hovorka J, Tenkáčová I. Záverečná správa, Helminthologický ústav SAV, Košice, 1989, 97s.  
Sattlerová-Štefančíková A. Helminthologia, 1982, 19:151-160  
Sattlerová-Štefančíková A. Biológia, Bratislava, 1987, 42:113-9  
Štefančíková A. J. Helminthol. 1994, 68:347-351

## KLINICKÉ ZMENY POZOROVANÉ U MYŠÍ PO APLIKÁCIÍ IMELA BIELEHO

Sabová (rod. Droppová) L.<sup>1</sup>, Sabo R.<sup>2</sup>, Šutiak V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav farmácie a farmakológie, UVL, Košice

<sup>2</sup> Ústav toxikológie, UVL, Košice

### ABSTRAKT

Skúmali sme účinky rôznych koncentrácií vodných extraktov z listov a plodov imela bieleho (*Viscum album* L.) u myši. Imelo pôsobilo po parenterálnej aplikácii ako veľmi silné fytotherapeutikum, keďže roztoky s koncentráciou vyššou ako 0,1% mali toxické účinky. Krátko po ich aplikácii nastúpila apatia, neskôr somnolencia, pozorovali sme veľmi prudký pokles telesnej teploty (na 33,44 °C v priebehu 30 min.) so sprievodným znížením frekvencie dýchania. Po objavení sa kŕčov myši uhynuli. Len 0,05% extrakt z plodov vyvolal miernu, prechodnú hypotermiu bez vážnejších vedľajších účinkov, preto ho navrhujeme použiť v ďalších pokusoch.

### ÚVOD

Imelo biele (*Viscum album* L.) je poloparazitická rastlina, ktorej ľudia od nepamäti pripisovali čarovnú moc. Okrem magických, má však aj skutočné liečivé účinky. Gautier na začiatku dvadsiateho storočia dokázal, že imelo spôsobuje zníženie krvného tlaku a že jeho podávanie pomáha aj pri liečbe arteriosklerózy, preto sa začalo používať v medicínskej praxi (Puchá a kol., 2003). Od tých čias sa mu venuje zvýšená pozornosť (Khwaja a kol., 1986; Büssing a kol., 1999 a iní) a okrem spomínaného vplyvu na kardiovaskulárny aparát vedci objavili mnoho ďalších účinkov tohto fytotherapeutika.

V posledných desaťročiach je výskum zameraný na protinádorové pôsobenie imela bieleho (Ribéreau – Gayon a kol., 1986; Jurin a kol., 1993; Stein a kol., 1999; Pevzner a kol., 2004 a iní), ktoré je pripisované kombinovanému cytotoxickému a imunologickému účinku jeho zložiek. Treba však zdôrazniť, že imelo na rozdiel od bežne používaných cytotoxických liečiv nespôsobuje u pacientov imunosupresiu (Khwaja a kol., 1986).

Keďže sa v súčasnosti používanie liečivých rastlín dostáva do popredia, rozhodli sme sa preskúmať účinky extraktov imela bieleho u myši a súčasne stanoviť takú koncentráciu roztokov, po aplikácii ktorej nastúpia čo najmiernejšie nežiadúce účinky.

### MATERIÁL A METODIKA

V pokuse sme použili myši kmeňa ICR, ktoré pochádzali zo schváleného chovného zariadenia Ústavu experimentálnej farmakológie SAV v Dobrej Vode. Myši boli pred a počas pokusu kŕmené komerčnou diétou (výrobca TOP DOVO Dobrá Voda, SR), mali neobmedzený prístup k pitnej vode a boli umiestnené v plastových boxoch s kovovým mriežkovým krytom. Živá hmotnosť myši v čase pokusu bola v rozmedzí 30 – 50g.

Pred pokusom sme si pripravili 25 %-tné roztoky z listov (VAL) a plodov (VAP) imela bieleho, ktoré pochádzalo z topoľa a agátu v pomere 1:1. Suché plody sme zmiešali s podchladeným (+ 4 °C) fyziologickým roztokom (0,9% NaCl) a rozmixovali na mixéri (ETA-KOMBI, typ 041, výrobca Elektro – Praga Hlinsko ČR). Po opätovnom podchladení sme vzniknutú zmes centrifugovali (centrifúga S – 25, H. Janetzki KG, Elgelsdorf, Leipzig, Nemecko) pri 2500ot./min. počas 30 min. Odsatý supernatant sme znovu cetrifugovali za rovnakých podmienok. Tento druhý supernatant bol až do aplikácie myšiam resp. do jeho ďalšieho riedenia (vykonané tesne pred podaním)



uskladnený v mrazničke. 25%-tný roztok z listov bol pripravený a uskladnený analogicky ako roztok z plodov.

V pokuse sme použili roztoky s nasledujúcimi koncentraciami: VAP – 25%; 0,1%; 0,05% a VAL – 25%; 0,63%; 0,1% v dávke 0,7ml/30g myš i.p. V kontrolnej skupine sme myšiam podali fyziologický roztok v dávke 0,7 ml/30g i.p. Všetky roztoky boli pred aplikáciou temperované na 37 °C vo vodnom kúpeli. Myšiam sme merali teplotu tela (TT) rektálne, pomocou maximálneho digitálneho teplomera (model 8022 Geratherm ® digital, GmbH) v časových intervaloch 0,5h pred a 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h po podaní roztoku. Okrem toho sme sledovali klinické zmeny v správaní a v prípade úhynu bola vykonaná obhliadka a pitva kadáveru. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené pomocou Studentovho t-testu s mierou štat. významnosti  $P < 0,05$ .

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Krátko po i.p. podaní 25%-tného roztoku VAP nastúpila u myši apatia, ktorá sa čoskoro prehĺbila v somnolenciu. Myši sa prestali pohybovať, stáli v kútoch boxu, postupne klesala frekvencia dychu (až na 32/min.) a nastupovalo čoraz výraznejšie dyspnoe. Objavili sa kŕče a k úhynu došlo po 8 – 10 min. od aplikácie. 25%-tný roztok VAL spôsobil podobné zmeny s výraznejšími kŕčmi.

0,63%-tný roztok VAL vyvolal hypokinézu a apatiu, postupne sa znižovala frekvencia dychu, došlo k mikcii a defekácii a pred smrťou nastúpili tónicko – klonické kŕče. Všetky myši uhynuli do 40 min. po aplikácii za výraznej hypotermie ( $P < 0,05$ ) (Tab č.1).

Po podaní 0,1%-tného roztoku VAL myši prežili s nasledujúcimi klinickými zmenami: počiatočná apatia, zníženie frekvencie dychu (118/min. po 1,5h), hypotermia (pokles TT v priemere o 4,26 °C) a hypokinéza (Graf č. 1). Po 2,5h sa začal stav upravovať (myši javili záujem o okolie, začali prijímať potravu a vodu, frekvencia dychu a TT stúpali).

0,1%-tný roztok VAP vyvolal podobné klinické zmeny ako 0,1% VAL, ale pokles TT nebol taký výrazný (v priemere o 1,79 °C). Vzostup TT bol výraznejší, ale k normalizácii nedošlo ( $P < 0,05$ ) (Graf č. 2). Ostatné klinické znaky sa upravili už po 1,5h.

0,05%-tný roztok VAP spôsobil len prechodný, mierny pokles pohybovej aktivity, frekvencie dychu a TT (v priemere o 1,28 °C). Dyspnoe nebolo pozorované. Po 2h od podania sa TT blížila k východiskovej ( $P > 0,05$ ) (Graf č. 3).

U uhynutých myši sme vykonali pitvu. Pri vonkajšej obhliadke kadáverov sme zistili cyanózu sliznice ústnej dutiny, jazyka, pyskov a ňufáčika a otvorenú ústnu dutinu. Rigor mortis nastúpil približne za 15 – 30 min. Po otvorení brušnej a hrudnej dutiny sme pozorovali prekrvenie vnútorných orgánov (najmä pľúc), krv v cievach nebola úplne zrazená a bola tmavá. Srdce bolo naplnené polotekutou krvou.

Pri pozorovaní účinkov imela bieleho (VA) sme zistili niekoľko zaujímavých úkazov. Naše výsledky však nemôžeme konfrontovať s literárnymi údajmi, pretože doteraz pravdepodobne nebol podobný experiment vykonaný, resp. nie sú dostupné takéto informácie. Závažné zmeny, ktoré aplikácia imelových extraktov vyvolala, môžeme dať do súvisu s obsahom účinných látok v imele bielom (Puchá a kol., 2003). Koncentrácia VA nad 0,1% vyvolala u myši výraznú hypotermiu, depresiu dýchania, kŕče a úhyn. Imelo obsahuje acetylcholí, ktorý má bronchokonstričný účinok (Vodrážka a kol., 1986). Podanie VA vo vyšších koncentráciách (25%; 0,63%-tné roztoky) zapríčinilo smrť myši pravdepodobne hlavne v dôsledku prítomného acetylcholínu, pôsobením ktorého (vznikla bronchokonstrikcia a dyspnoe), sa myši udusili, čomu nasvedčovali klinické príznaky tesne pred uhynutím a patologicko-anatomický nález (Bugarský a kol., 2003). Pri podaní VA sa TT normalizovala len pri koncentrácii 0,05% VAP.

0,1%-tné roztoky VAL a VAP spôsobili po 2 h od aplikácie pomalší vzostup TT, ale priemerná teplota tela po 6 h nedosiahla východiskové hodnoty ( $P < 0,05$ ). Pri znižovaní TT u myší, ktoré pokus prežili, bol účinnejší roztok listov.

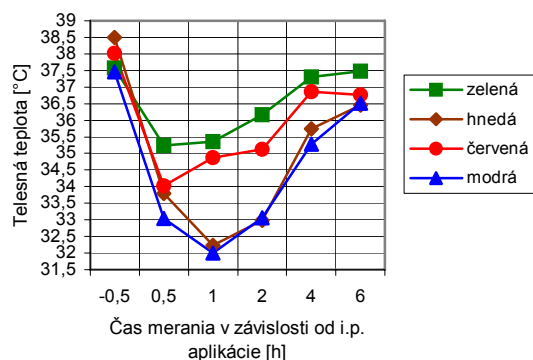
Príčinu týchto negatívnych účinkov je ťažké určiť a dostupná literatúra podobné poznatky neuvádza, no napriek tomu by sme vzhľadom na farmakologicky účinné látky, ktoré boli z imela bieleho izolované mohli depresívny vplyv na TT a dýchanie pripísať acetylcholínu (ACH). V tejto súvislosti sa vynára otázka, či by exogénne podaný ACH (v našom prípade aplikovaním roztoku VA), ktorého by tak bolo v organizme nadbytok, mohol vyvolať podobný klinický obraz ako pri predávkovaní inhibítormi ACHE (v závislosti od typu inhibítora a dávky sa pozoruje salivácia, mióza, defekácia, urinácia, svalové záškľby, tremor, pri ireverzibilných inhibítoroch aj kŕče a úhyn v dôsledku paralýzy dýchania) (Vodrážka a kol., 1986).

Pri hodnotení našich výsledkov musíme zohľadniť aj fakt, že obsah účinných látok v imele bielom varíruje najmä v závislosti od vegetačnej fázy a druhu stromu, na ktorom tento poloparazit rastie (Korbelár, Endris, 1981).

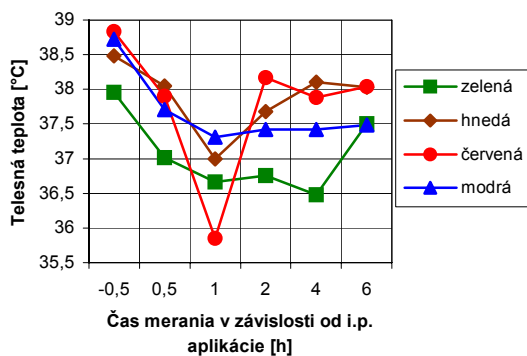
TAB. Č. 1: PRIEBEH TT U MYŠÍ S 0,63% VAL

myš:	- 0,5h	0,5h	1h
Zelená	37,63	32,71	†
Hnedá	38,21	33,32	†
červená	37,33	34,86	†
Modrá	38,19	32,86	†
Ø	37,84	33,44	-
±s	0,4334	0,9832	-
P	0	0,0011	-

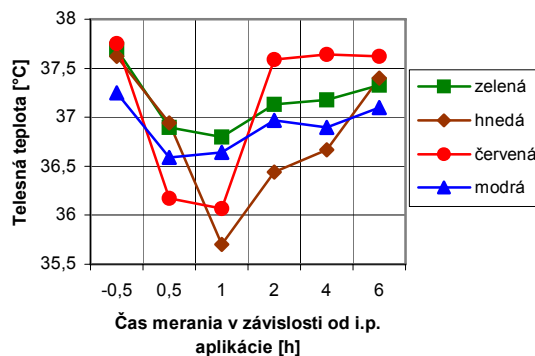
Graf č. 1: Priebeg TT u myší s 0,1% VAL



Graf č. 2: Priebeg TT u myší s 0,1% VAP



Graf č. 3: Priebeg TT u myší s 0,05% VAP



Zistili sme, že imelové extrakty s koncentráciou nad 0,1% pôsobia u myši po i.p. podaní toxicky a vedú k ich uhynutiu. Len 0,05%-tný roztok imelových plodov vyvolal najmiernejší pokles teploty tela a málo výrazné klinické zmeny s relatívne rýchlou normalizáciou sledovaných parametrov (medzi 1. a 2.h od podania). Preto až túto veľmi nízku koncentráciu môžeme považovať za vhodnú pre použitie v ďalších pokusoch.

*Príspevok vznikol za pomoci grantov VEGA č.: 1-2408-05 a KEGA č.: 3/3202/05.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Bugarský A, Beňová K, Dudriková E, a kol. Súdne veterinárske lekárstvo – základy. Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice 2003:100–1.

Büssing A, Stein G M, Wagner M, a kol. Accidental cell death and generation of reactive oxygen intermediates in human lymphocytes induced by thionins from *Viscum album* L. Eur. J. Biochem. 1999; 262:79–87.

Jurin M, Žarković N, Hrženjak M, a kol. Antitumorous and immunomodulatory effects of the *Viscum album* L. preparation Isorel. Oncology 1993; 50:393–8.

Khwaja T A, Dias C B, Pentecost S. Recent studies on the anticancer activities of mistletoe (*Viscum album*) and its alkaloids. Oncology 1986; 43:42–50.

Korbelář J, Endris Z. Naše rostliny v lékařství. Avicenum, Praha 1981:182.

Pevzner B I, Agapov I I, Hideaki N, a kol. Differences in amino acid sequences of mistletoe lectin I and III B-subunits determining carbohydrate binding specificity. Biochimica et Biophysica Acta 2004; 1675:155–164.

Puchá Z, Šutiak V, Droppová L. Využitie imela bieleho (*Viscum album*). Infovet 2003; 4:35–8.

Ribéreau-Gayon G, Jung M L, Baudino S, a kol. Effects of mistletoe (*Viscum album* L.) extracts on cultured tumor cells. Experientia 1986; 42:594–9.

Stein G M., Schaller G, Pfüller U, a kol. Thionins from *Viscum album* L.: influence of the viscotoxins on the activation of granulocytes. Anticancer Research 1999;19:1037–1042.

Vodrážka J, Arendarčík J, Bartko P, a kol. Veterinárska medicína a farmakológia. Osveta, Martin 1986:64–5, 504, 608, 616–7, 639–649.

## „BIOLOGICKÁ CENA“ PRENOSNEJ REZISTENCIE NA ANTIBIOTIKÁ

Seliga R.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV, Košice

### ABSTRAKT

Prudký nárast výskytu antibiotickej rezistencie v populáciach patogénnych baktérií patrí medzi najdiskutovanejšie problémy posledných desaťročí. Prenosná rezistencia je sprostredkovaná prítomnosťou mobilných elementov, ktoré využívajú mašinériu bakteriálnej bunky, čím pre ňu predstavujú prídavnú metabolickú záťaž. V práci sme sa zamerali na analýzu „biologickej ceny“ prenosnej rezistencie na tetracyklín u kmeňov *E. coli*. Z experimentálnych výsledkov vyplynulo, že antibiotická rezistencia, ktorá predstavuje pre bakteriálnu bunku metabolickú záťaž je značne eliminovaná inými funkciami bunky podieľajúcich sa na prenose rezistencie.

### ÚVOD

Masívne používanie antibiotík v humánnej a veterinárnej medicíne pri liečbe mnohých mikrobiálnych infekcií a chorôb, a následné šírenie antibiotickej rezistencie v populáciach patogénnych baktérií je medicínsky vážnym problémom. Vývoj antibiotickej rezistencie v patogénnych a komenzálnych mikroorganizmoch je výsledkom interakcie medzi pôsobením antibiotika a prenosom génov v rámci mikrobiálnych populácií (Guillemot, 1999). Experimentálne štúdie potvrdili, že práve selekčný tlak vyvolaný používaním antibiotík vedie k zvýšeným frekvenciám prenosu (Salysers a kol., 1995).

Predpokladá sa, že hlavným zdrojom antibioticky rezistentných kmeňov v mimonemocničnom prostredí je používanie terapeutických i sub-terapeutických dávok antibiotík pri chove hospodárskych zvierat. Dôkazom toho je vysoký výskyt kmeňov rezistentných na mnohé antibiotiká napríklad v bachore prežúvavcov (Štyriak a kol., 2002). V nedávnej dobe bol u oviec zistený výskyt plazmidmi kódovaného *tem1* génu kódujúceho rezistenciu na ampicilín (Malík a kol., 2004).

Rýchly nárast výskytu rezistentných baktérií je relatívne prekvapujúci, pretože mnohé gény antibiotickej rezistencie sú nesené pomerne veľkými mobilnými elementmi, či už plazmidmi alebo transpozónmi (Waters, 1999). Oba tieto elementy využívajú mašinériu bakteriálnej bunky pre svoje pomnoženie a zotrvanie v tejto bunke a tak predstavujú pre hostiteľské bunky prídavnú metabolickú záťaž (*metabolic biological cost*). Bakteriálne bunky bez mobilných elementov a teda bez rezistencie by tým pádom mali mať selekčnú výhodu oproti rezistentným kmeňom a v prirodzených podmienkach ich „prerásť“. Je možné predpokladať, že rezistentné bakteriálne kmene môžu byť menej životaschopné a s nižšou rýchlosťou rastu ako kmene senzitivne (Gillespie a McHugh, 1997).

Niektoré experimentálne práce však naznačujú, že táto záťaž je v skutočnosti zanedbateľná a rezistentné kmene prežívajú bez straty svojej životaschopnosti. V súčasnej dobe nemožno s určitosťou vyjadriť pre hostiteľskú bunku podmienky, pri ktorých sa uplatní alebo neuplatní „biologická cena“ rezistencie. Mobilné génové elementy totiž častokrát kódujú funkcie, ktoré výrazne znižujú metabolickú záťaž buniek, alebo im poskytujú inú selekčnú výhodu (Andersson a Levin, 1999).

Cieľom tejto práce bola identifikácia „biologickej ceny“ prenosnej rezistencie na tetracyklín u *Escherichia coli*.

## MATERIÁL A METODIKA

### *Bakteriálne kmene a spôsob ich kultivácie*

V práci sme použili kmene *Escherichia coli* získané v predchádzajúcich experimentoch (Malík a kol., 2005). Kmene sme kultivovali klasickým spôsobom v LB médiu (inokuláciou 50 µl kultúry príslušného kmeňa do 5 ml LB média) počas 16 hod. pri teplote 37°C. Pri rezistentných kmeňoch sme do rastového média pridávali tetracyklín v koncentrácií 16 µg/ml. Ako recipient v konjugačných experimentoch sme použili kmeň DH5α prirodzene rezistentný na nalidixín. Prehľad použitých kmeňov je uvedený v Tab. 1.

Kmeň	Rezistencia	Pôvod
DH5α	Nal-Tra <sup>-</sup>	laboratórny kmeň
RO/11	Tet(tetB)-Tra <sup>-</sup>	divoký izolát
R2/30	žiadna	divoký izolát
F1/1	Tet(tetB)-Tra <sup>+</sup>	divoký izolát
DH5α/F1/1	Nal-Tra <sup>-</sup> , Tet(tetB)-Tra <sup>+</sup>	transkonjugant DH5α a F1/1

Tab. 1 Pôvod a vlastnosti kmeňov *e. coli* použitých v tejto práci

### *Kokultivačné experimenty*

Identické množstvá dvoch študovaných kmeňov sme inokulovali (50 µl) do 5 ml LB média a kultivovali počas piatich dní pri 37°C s prenosom do čerstvého média každých 12 hodín. V určených intervaloch sme odoberali alikvoty a vysievali desiatinným riedením na tuhé LB médium. Pomer rezistentných a senzitívnych kolónií sme určili prepichaním celkovo 180 „single“ kolónií na LB agarové platne s príslušným antibiotikom (tetracyklín 16 µg/ml). Všetky experimenty sme opakovali najmenej 3 krát.

### *Konjugatívny prenos*

Nočnú kultúru tetracyklín rezistentných izolátov donorového kmeňa F1/1 a nalidixín rezistentného recipientného kmeňa DH5α sme zmiešali v pomere 1:1 (*colony forming unit*) a následne vysiali na LB agarové platne. Po 5 hod. inkubácii pri 37°C sme bakteriálne kultúry zmyli použitím 5 ml LB média a vysiali desiatinným riedením na LB agarové platne s prídavkom antibiotík - 16 µg/ml tetracyklínu a 100 µg/ml nalidixínu a kultivovali 16 hod. pri 37°C.

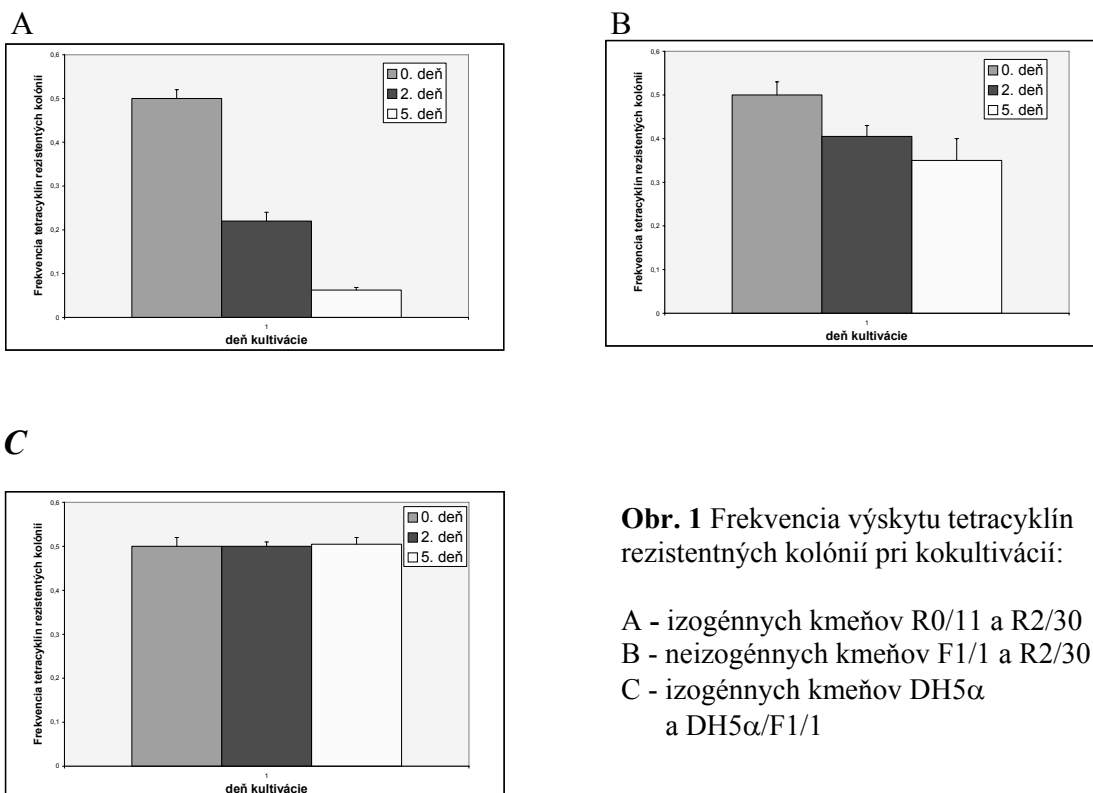
Získané transkonjuganty sa genotypicky testovali použitím ERIC-PCR metódou podľa Žatkoviča a kol., 2000.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

V predchádzajúcich experimentoch sme detegovali významnú sezónnu dynamiku vo frekvencii tetracyklín - rezistentných izolátov *E. coli* získaných z bachora a faeces ovce domácej aj napriek tomu, že zviera, z ktorého sa izolovali tieto baktérie sa chovalo v uzatvorených podmienkach a bolo kŕmené rovnakou potravou po celý čas experimentu. Hlbšia analýza rezistencie, založená na PCR, naznačila na prítomnosť potenciálnych determinantov ampicilínovej (gén *tem1bla*), kanamycínovej (gén *aphA1*) a tetracyklínovej rezistencie (gén *tetB*) u viacerých fenotypicky odlišných baktérií.

Porovnaním ERIC-PCR profilov sme potvrdili, že za pozorovanú dynamiku rezistencie je zodpovedný horizontálny prenos génov ako aj vertikálny prenos rezistentných kmeňov v tráviacom trakte ovce.

Izogénne kmene R0/11 a R2/30 líšiace sa len rezistenciou na tetracyklín sa použili v sérii kokultivačných experimentov s cieľom identifikovať metabolickú záťaž spojenú so získaním génu rezistencie. Senzitívny kmeň v týchto experimentoch preukázal vyššiu životaschopnosť a prakticky kompletne dominoval v zmiešanej kultúre po päťdňovej kultivácii (Obr. 1A).



**Obr. 1** Frekvencia výskytu tetracyklín rezistentných kolónií pri kokultivácií:

A - izogénnych kmeňov R0/11 a R2/30  
 B - neizogénnych kmeňov F1/1 a R2/30  
 C - izogénnych kmeňov DH5 $\alpha$  a DH5 $\alpha$ /F1/1

Oveľa menší vplyv tetracyklínovej rezistencie na prežívanie sme pozorovali pri kokultivácii kmeňa R2/30 s neizogénnym kmeňom F1/1, nesúcim ten istý gén rezistencie ako kmeň R0/11 (Obr. 1B).

Pre dôkladnú analýzu metabolickej záťaže vyvolanej získanou rezistenciou na tetracyklín sme konjugáciou preniesli celý tento gén do laboratórneho kmeňa *E. coli* DH5 $\alpha$ . Následné kokultivačné experimenty ukázali, že tetracyklín rezistentné transkonjuganty nie sú nijakým spôsobom atenuované v rýchlosti rastu a vykazovali prakticky identické prežívanie v porovnaní s izogénnym senzitívnym recipientným kmeňom (Obr. 1C).

Výsledky našich experimentov naznačujú, že kým samotná rezistencia sprostredkovaná *tetB* génom predstavuje výraznú metabolickú záťaž, táto záťaž je prakticky redukovaná na minimum ďalšími funkciami (génmi) nesenými mobilným génovým elementom sprostredkujúcim prenos rezistencie.

*Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA - grant č. 2/5140/25.*

## POUŽITÁ LITERATÚRA

Andersson D I, Levin B R. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2:489-93.

Gillespie S H, McHugh T D. The biological cost of antimicrobial resistance. *Trends Microbiol.* 1997; 5:337-9.

Guillemot D. Antibiotic use in human and bacterial resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2:494-8.

Malík R, Ivan J, Javorský P, Pristaš P. Seasonal dynamics of antibiotic – resistant Enterobacteriaceae in the gastrointestinal tract of domestic sheep. *Fol. Microbiol.* 2005; 50:349-52.

Malík R, Pristaš P, Javorský P. Occurrence of plasmid – mediated ampicillin resistance among Enterobacteria from the ovine rumen. *Fol. Microbiol.* 2004; 49:187-90.

Salyers A A, Shoemaker N B, Stevens A M, Li L Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 1995; 59:579.

Štyriak I, Lauková A, Ljungh A. Lectin - like binding and antibiotic sensitivity of enterococci from wild herbivores. *Microbiol. Res.* 2002; 157:293-303.

Waters V L. Conjugative transfer in the dissemination of beta – lactam and aminoglycoside resistance. *Front. Bioscience* 1999; 4:d433-56.

Žatkovič B, Molnárová V, Kmeť V, Javorský P, Pristaš P. Diversity of DNA sequences among restriction endonucleases producing *Selenomonas ruminantium* isolates detected by enterobacterial repetitive intergenic consensus based polymerase chain reaction (ERIC-PCR). *Anaerobe* 2000; 6:299-304.

# PRÍTOMNOSŤ „GENE SIZED“ CHROMOZÓMOV U PRVOKA *OXYTRICHA* SP. TT-2005

Tóthová T.

Ústav chemických vied, UPJŠ, Košice; Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, SAV,  
Košice

## ABSTRAKT

Prvok *Oxytricha* sp. TT-2005 sa izoloval z pôdy a kultivoval sa *in vitro* v tekutom médiu *Ochromonas*. Fylogenetické analýzy 18S rRNA génu ukázali, že *Oxytricha* sp. TT-2005 patrí medzi *Oligotrichia* a je najviac príbuzný prvokom rodu *Halteria*. Analýza celkovej DNA prvoka dokázala prítomnosť vysoko fragmentovanej DNA, ktorej veľkosť sa pohybovala od 500 bp až do 15 kb. Fragmenty DNA sa klonovali v *E. coli* vektore a získané rekombinanty sa sekvenčne analyzovali. Táto analýza dokázala prítomnosť „gene sized“ chromozómov. Na koncoch „gene sized“ chromozómov sa nachádzajú telomerické sekvencie 3' – dG<sub>4</sub>T<sub>4</sub> – 5', ktoré sú charakteristické pre prvoky patriace medzi spirotrichy. Klonované makronukleárne chromozómy obsahujú jeden otvorený čítací rámec, ktorý ohraničujú nekódujúce sekvencie bohaté na AT páry. PCR metódou s použitím kombinácie telomerických primérov 5' – dA<sub>4</sub>C<sub>4</sub> – 3' a interných primérov sa potvrdila prítomnosť „gene sized“ chromozómov u *Oxytricha* sp. TT-2005. Unikátna štruktúra makrojadrovej DNA tohto prvoka sa môže využiť ako vhodný model pre štúdium prenosu génov medzi organizmami.

## ÚVOD

Ciliáty (kmeň *Ciliophora*) sú pomerne veľké organizmy (od 40 do 300 μm) a okrem pôdy a vody, kde sa vyskytujú vo veľkom počte, sú stálymi obyvateľmi bachora (Regensbogenova a kol., 2004a). Okrem prítomnosti riasiniek sú ciliáty charakterizované troma hlavnými znakmi: stavbou vonkajšej vrstvy, priečnym delením a jadrovým dualizmom. V každej bunke ciliát sa súčasne vyskytujú dva typy jadier – diploidné mikrojadro a makrojadro bohaté na DNA (Prescott, 1994). Mikrojadrá sa podieľajú len na procesoch genetických výmen počas generatívneho rozmnožovania. Makrojadro predstavuje somatické jadro a je transkripčne aktívne. Makrojadrá vznikajú počas sexuálneho rozmnožovania z mikrojadier, pričom dochádza k fragmentácii mikrojadrovej DNA a u niektorých čeľadí (*Spirotrichea*, *Phyllopharyngea*) eliminácii značnej časti (až 95 %) genómu mikrojadra. U hypotrich výsledkom fragmentácie DNA sú malé molekuly DNA veľkosti génu, s rozmermi od 100 bp až do 15 kb („gene sized“ chromozómy), ktoré sú amplifikované v rôznych počtoch v závislosti od daného druhu (10<sup>3</sup> až 10<sup>6</sup>). Každá DNA molekula obsahuje jeden otvorený čítací rámec daného génu a regulačné sekvencie (≤ 150 nucleotidov). Na obidvoch stranách génu nasleduje sekvencia s nedefinovanou dĺžkou, ktorá je bohatá na AT páry (takmer 100 %). Konce „gene sized“ chromozómov sú ohraničené špecifickými telomerickými sekvenciami. U spirotrich teloméry pozostávajú z krátkych tandemových repetícií 3' – dG<sub>4</sub>T<sub>4</sub> – 5' (Prescott a Dizick, 2000).

Predmetom nášho štúdia je fylogenetická analýza a podrobná genetická charakterizácia genómu makrojadra u *Oxytricha* sp. TT-2005, ktorý sa získal z pôdy. V práci sme sa zamerali na štúdium štruktúry „gene sized“ chromozómov. Výsledky charakterizácie „gene sized“ chromozómov sa môžu využiť pri sledovaní šírení sa genetickej informácie medzi rôznymi organizmami za prírodných podmienok, napr. prenos génov rezistencie na ťažké kovy (Kišidayova a kol., 2000).



## MATERIÁL A METODIKA

### *Izolácia a kultivácia prvoka*

Protozoálne bunky sa získali z eluátu pôdy. Vzorka pôdy (5 g) sa resuspendovala v 45 ml sterilnej vody a zmes sa inkubovala pri laboratórnej teplote 7 dní. Po samovoľnej sedimentácii väčších častíc pôdy sa z eluátu odpichli pod mikroskopom individuálne protozoálne bunky. Tieto bunky sa preniesli do sterilného tekutého *Ochromonas* média (Lauhlin, 1993), a kultivovali *in vitro* staticky pri laboratórnej teplote.

### *Izolácia totálnej DNA a polymerázová reťazová reakcia*

Pre fylogenetické analýzy jedna protozoálna bunka sa premyla v kvapke sterilnej vody pod mikroskopom a vložila sa do 50  $\mu$ l 5 % roztoku Chelex-100. Do roztoku s prvokom sa pridal 1  $\mu$ l proteinázy K (20 mg/ml) a zmes sa inkubovala 5 minút pri 98°C (Regensbogenova a kol., 2004b). Po inkubácii zmes sa rýchlo ochladila na 0°C a centrifugovala sa pri 3000 g 10 minút. Takto pripravený supernatant sa použil na ďalšie PCR analýzy.

Konzervovaná oblasť eukaryotického 18S rRNA génu z *Oxytricha* sp. TT-2005 sa amplifikovala pomocou univerzálnych primérov EukRev a EukFor (Regensbogenova a kol., 2004b). PCR produkt sa ligoval do plazmidového vektora pCR®2.1 – TOPO. Plazmidy rekombinantov sa použili na sekvenčné analýzy.

Pri amplifikácii časti génu, vo veľkosti 362 bp, kódovaného na študovanom „gene sized“ chromozóme, sa použili interné priméry HaltF (5'-ggaggatgtccttaagtgtagcg-3') a HaltR (5'-caagtagttgcagttgcccc-3'). Pre potvrdenie prítomnosti telomerickkej sekvencie na konci minichromozómu sa použila kombinácia interného priméru HaltF a telomerického priméru 5' – dA<sub>4</sub>C<sub>4</sub> – 3'. Časovo-teplotný profil PCR reakcií pozostával u všetkých amplifikovaných génov z iniciačnej denaturácie (95°C; 5 minút), po ktorej nasledovalo 30 cyklov s parametrami: denaturácia 94°C 30 sekúnd; annealing 65°C 30 sekúnd; extenzia 72°C 30 sekúnd. Po prebehnutí 30 cyklov nasledovala extenzia (72°C; 10 minút) a následné ochladenie zmesi na 12°C.

Pre klonovanie makronukleárnej DNA sa 50 ml 7-dňovej kultúry *Oxytricha* sp. TT-2005 centrifugovalo pri 3000 g 10 minút a zo sedimentu sa izolovala DNA postupom podľa QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Nemecko).

### *Klonovanie protozoálnej DNA v E. coli vektore*

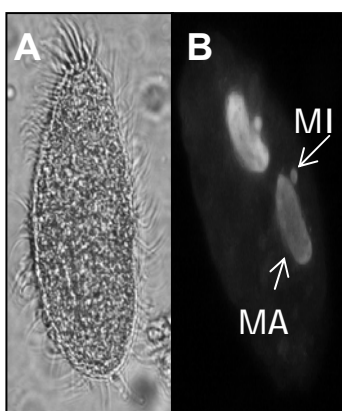
V procese klonovania časti makronukleárnej DNA sa použil klonovací vektor pUC118 štiepený HincII restričnou endonukleázou a opracovaný BAP (Takara Bio Inc., Japonsko) s neutrálnou selekciou. Protozoálna DNA sa opracovala T4 DNA polymerázou a po následnom prečistení a vyzrážaní sa ligovala použitím DNA ligačného kitu Liga Fast™ Rapid DNA Ligation System (Promega, USA). Ligačná zmes sa použila priamo na transformáciu kompetentných buniek *E. coli* ER2267. Získané transformanty sa sekvenčne analyzovali.

### *Fylogenetická a sekvenčná analýza*

Kompletné sekvencie sa získali dideoxy-terminačnou metódou a analyzovali porovnaním s databázou GenBank pomocou počítačových programov BioEdit a MEGA3.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Študovaný prvok, izolovaný zo vzorky pôdy, sa charakterizoval pod mikroskopom (obr. 1A). Morfológické znaky, ako sú tvár a prítomnosť riasiniek, poukázali na istú podobnosť s rodom *Oxytricha*, preto sme ho v tejto práci nazvali ako *Oxytricha* sp. TT-2005. Prítomnosť dvoch typov jadier v jednej bunke je typickou vlastnosťou ciliát, kde patria aj *Oxytrichy*. V bunkách tohto prvoka sú prítomné 2 mikrojadrá a 2 makrojadrá (obr. 1B) Fylogenetické analýzy sekvencie 18S rDNA prvoka naznačujú, že *Oxytricha* sp. TT-2005 je najviac príbuzný prvokom rodu *Halteria*. Prvky rodu *Halteria* patria medzi oligotrichy, u ktorých sa tiež dokázalo, že ich makronukleárna DNA je organizovaná do krátkych „gene sized“ chromozómov, charakteristických pre hypotrichy (Hoffman, 1995).

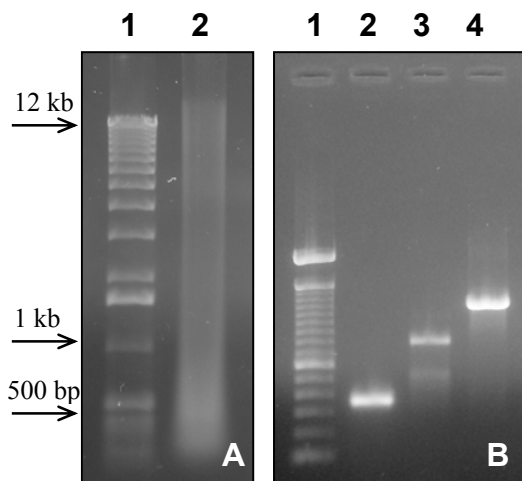


**Obr. 1.**

A – mikroskopický obraz prvoka *Oxytricha* sp. TT-2005

B – fluoromikroskopický obraz prvoka *Oxytricha* sp. TT-2005 po ofarbení s DAPI; makrojadro (MA) a mikrojadro (MI)

Elektroforetický záznam celkovej DNA (obr. 2A), vyizolovanej z *Oxytricha* sp. TT-2005 svedčí o prítomnosti malých DNA molekúl, ktorých veľkosť sa pohybuje od 500 bp až do 15 kb. Extenzívna fragmentácia totálnej DNA naznačuje prítomnosť „gene sized“ chromozómov, ktoré tvoria makrojadrovú DNA. Pre potvrdenie prítomnosti „gene sized“ chromozómov u *Oxytricha* sp. TT-2005, sa fragmenty makrojadrovej DNA klonovali v *E. coli* vektore. Výsledky sekvenčných analýz získaných rekombinantov tiež potvrdili, že makrojadrová DNA študovaného prvoka pozostáva z „gene sized“ molekúl. Konce týchto „gene sized“ chromozómov sú vybavené 20 bp repetíciami telomerického sekvencie  $(G_4T_4)_2G_4T_4$ , charakteristickými pre spirotrichy.



**Obr. 2.** Agarózová (0,8% agarózový gél) elektroforéza; A: 1- 1 kb štandard molekulovej hmotnosti, 2 – totálna DNA z prvoka *Oxytricha* sp. TT-2005; B: PCR profily naklonovaného minichromozómu, 1 - 100 bp štandard molekulovej hmotnosti, 2 – 362 bp amplicón generovaný internými primérami HaltF a HaltR, 3 – 800 bp amplicón generovaný kombináciou interného priméru HaltF a telomerického priméru  $A_4C_4$ , 4 – 1224 bp amplicón generovaný telomerickým primérom  $A_4C_4$ .

Prítomnosť „gene sized“ chromozómov sa overila pomocou PCR analýzy s použitím interných primérov špecifických k sekvencii jedného z klonovaných minichromozómov (NADH dehydrogenase 32K chain homolog). V kontrolných reakciách sa ako templát použila plazmidová DNA jedného klonu. Výsledky PCR sú dokumentované na obr. 2B. Priméry HaltF a HaltR amplifikovali časť génu pre fragment NADH dehydrogenázy, kódovaného na „gene sized“ chromozóme, o veľkosti 362 bp. Použitím terminálneho telomerického priméru  $(A_4C_4)_3$  sa amplifikoval celý „gene sized“ chromozóm o veľkosti 1224 bp. Kombináciou interného priméru HaltF a telomerického priméru  $(A_4C_4)_3$  sa generoval predpokladaný 800 bp úsek. Veľkosť získaných fragmentov presne zodpovedala teoreticky predpovedaným veľkostiam získaným analýzou nukleotidovej sekvencie tohto klonu. Identická veľkosť fragmentov sa získala aj v reakciách, v ktorých sa ako templát použila celková DNA *Oxytricha* sp. TT-2005 (dáta neuvádzame).

Získané výsledky sú jednoznačným dôkazom prítomnosti „gene sized“ chromozómov v makronukleárnej DNA prvoka *Oxytricha* sp. TT-2005, izolovaného zo vzorky pôdy a otvára tak možnosti pre využitie tohto prvoka v experimentoch zameraných na prenos génov v prirodzených ekosystémoch.

*Tento projekt bol podporovaný Vedeckou Grantovou Agentúrou VEGA-grant č. 2/6175/26.*

#### POUŽITÁ LITERATÚRA

Hoffman, C. D., Anderson, C. R., Dubois, L. M. a Prescott, D. M. Macronuclear gene-sized molecules of hypotrichs. *Nucleic acids Res.* 1995; 23: 1279-1283.

Kišidayová, S., Sviatko, p., Zelenak, I. Effect of cadmium on the rumen protozoan population in sheep. *Vet. Med. – Czech.* 2000; 45: 343-346.

Laughlin, T. J., Henry J. M., Phares E. F. Methods for large-scale cultivation of an *Oxytricha* (Ciliophora: Hypotrichida). *J. Protozool.* 1993; 30: 63-64.

Prescott, D. M. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiological Reviews.* 1994; 58: 233-267.

Prescott, D. M. a Dizick, J. S. A unique pattern of intrastrand anomalies in base composition of the DNA in hypotrichs. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28: 4679-4688.

Regensbogenova, M., Pristas, P., Javorsky, P., Moon VanDer Staay, S. Y., VanDer Staay, G. W., Hackstein, J. H., Newbold, C. J., McEwan, N. R. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. *Letters in Applied Microbiology.* 2004a; 39: 144-147.

Regensbogenova, M., Kisidayova, S., Michalowski, T., Javorsky, P., MoonVanDer Staay, S. Y., VanDer Staay, G. W. M., Hackstein, J. H. P., McEwan, N. R., Jouany, J.P., Newbold, J. C., Pristas, P. Rapid identification of rumen protozoa by restriction analysis of amplified 18S rRNA gene. *Acta Protozoologica.* 2004b; 43: 219-224.