

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

---

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ  
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE  
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

---

BRNO 2018

# *Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2018*

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

## **SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ**

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2018 financovaných z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2018

Editovali:

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM

doc. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.

doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2018

**ISBN 978-80-7305-811-1**

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

tento sborník Vám přináší příspěvky, které byly prezentovány na závěrečné konferenci Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno konané dne 10. prosince 2018.

Příspěvky prezentují výsledky projektů, které byly řešeny studenty a akademickými pracovníky VFU Brno v rámci specifického výzkumu.

Děkuji všem řešitelským týmům za inspirativní výsledky jejich práce. Dále děkuji všem členům komise IGA VFU Brno, oponentům, a dalším pracovníkům za výbornou spolupráci při zajištění zdárného průběhu letošního ročníku IGA VFU Brno.

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.  
předseda komise IGA VFU Brno

## OBSAH

### Příspěvky FVL

Cytotoxicita přírodních bioaktivních látek na myši normální vs. nádorové buněčné linie .....	2
Specifikace osteogenních funkcí pro-apoptotických kaspáz ve vztahu k vývoji dlouhých kostí.....	6
Orální tumory psa – prevalence v ČR.....	10
Metody průkazu vybraných krevních patogenů v populaci koček.....	14
Vliv GnRH agonisty deslorelinu na koncentraci testosteronu a spermatogenezi u křečka zlatého ( <i>Mesocricetus auratus</i> ).....	17
Patologie infekce <i>Angiostrongylus cantonensis</i> u modelových ptačích druhů.....	21
Výskyt četnosti papouščího cirkoviru a polyomaviru a protilátek proti aviárnímu bornaviru v chovech papoušků v ČR.....	26
Detekce mikrobiální populace kolonizující pohlavní aparát oslic .....	30
Zavedení nových laboratorních metod pro diagnostiku sarkoidu u koní a charakteristika původců na úrovni genomu.....	35
Změny vybraných biochemických parametrů ve folikulární tekutině a krvi v různých stádiích folikulárního vývoje u skotu.....	41
Účinek pegbovigrastimu na zdravotní stav mléčné žlázy a dělohy u krav po porodu.....	46
Využití pyridoxinu v produkci embryí in vitro u mléčného skotu .....	50
Změny acidobazické rovnováhy neonatálních kůzlat před a 2 hodiny po napití kolostra .....	55
Zhodnocení obsahu mykotoxinů v krmivech pro prasata v České republice.....	60
Vliv použití simethiconu a hladovění na kvalitu ultrasonografického vyšetření dutiny břišní u psů .....	64
Mechanické testování sutury šlach.....	68

## Příspěvky FVHE

Sledování dynamiky růstu <i>Yersinia enterocolitica</i> v mletém hovězím mase.....	73
Aluminum leakage from the aluminum foil to the selected food types.....	78
Vliv kombinace mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu na stravitelnost sušiny <i>in vitro</i> .....	82
Ekotoxicita nanostříbra pro zástupce půdní fauny .....	85
Optimalizace testu fagocytární aktivity u pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	89
Detekce alergenu podzemnice olejné v potravinách pomocí kvantových teček.....	93
Hodnocení mikrobiologické kvality prostředí výrobních středisek v provozovněch stravovacích služeb v návaznosti na bezpečnost připravovaných pokrmů.....	97
Charakterizace enterobakterií rezistentních k cefalosporinům a karbapenemům z odpadních vod metodou celogenomového sekvenování.....	101
Studium vlivu různých metod tepelné úpravy na obsah prvků ve vepřovém mase.....	105
Vliv minoritního mykotoxinu enniatinu B na stravitelnost sušiny <i>in vitro</i> .....	109
Stanovení bisfenolu A v krevním séru a plasmě metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s atmosférickou chemickou ionizací.....	113
Hemocytární profil včely medonosné v závislosti na věku fyziologickém stavu.....	117
Cesty přenosu a dynamika kolonizace primátů rezistentními bakteriemi v umělém ekosystému vytvořeném člověkem.....	121
Monitoring původců zoonotických onemocnění v zoologické zahradě v Brně.....	125
Prevalence <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> v klíšťatech České republiky.....	128
Posouzení toxicity polychlorovaných bifenyly pro buňky folikulů štítné žlázy s využitím 3D kultivačního systému.....	132
Vliv minoritního mykotoxinu beauvericinu na stravitelnost sušiny <i>in vitro</i> .....	136
Vliv antidepresiv kontaminujících povrchové vody na vývoj ryb a obojživelníků.....	140
Účinek antidepresiva sertralinu na pstruha duhového ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	144
Sekvenční analýza epidemických plazmidů kódujících klinicky významné beta-laktamázy z prostředí.....	148
Porovnání úrovně zdraví a welfare nosnic, brojlerových kuřat a krůt v ČR na základě nálezů při prohlídce po porážení na jatkách.....	152

## Příspěvky FaF

Vliv změny kvalitativních parametrů tablet s obsahem sodné soli warfarinu na liberaci.....	157
Využití 3D tisku v přípravě lékových forem vhodných pro individualizovanou terapii.....	161
Příprava, charakterizace, vlastnosti a využití nanočástic jako transportérů kyseliny askorbové v onkologické terapii.....	165
Vývoj syntetických metod přípravy prenylovaných stilbenoidů jako látek se širokou biologickou aktivitou.....	168
Příprava a hodnocení liquisolid tablet s obsahem kapalných rostlinných extraktů s antioxidanty.....	172
Testing of N-alkoxyphenylhydronaphthalenecarboxamide activity against intestinal sulfate reducing bacteria.....	176
Syntéza derivátů 1 <i>H</i> -indolu s fenylpiperazinovým fragmentem a testování jejich možností ovlivnění cholinergního systému.....	180
Stanovení laktulose vedle laktosy a mannitolu pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) s detektorem ELSD.....	184
Zkoumání protizánětlivého potenciálu frakcí extraktů získaných z kůry kořenů.....	188
Preklinické hodnocení kardiovaskulárně-metabolických parametrů olanzapinu na vybraném animálním modelu schizofrenie.....	192
Imunomodulační vliv flavonoidů enkapsulovaných v glukonových částicích na ex vivo izolované prasečí buňky imunitního systému.....	195
Zelená syntéza stříbrných nanočástic s protinádorovými účinky (GREEN NANO).....	198
Modifikace chitosanových nanočástic (s doxorubicinem) povrchově aktivními látkami a jejich interakce s proteinovou korunou.....	202
Vytvorení metody pre dynamickú biorelevantnú disolúciu na prístroji Golem v2.....	208
Antimikrobiálně a protizánětlivě aktivní geranylované flavonoidy izolované z plodů <i>Paulownia tomentosa</i> .....	212
Design, syntéza a <i>in vitro</i> testování aktivity potenciálních inhibitorů aminopeptidasy N.....	216

## **Příspěvky**

**Fakulty veterinárního lékařství**

# **Cytotoxicita přírodních bioaktivních látek na myši normální vs. nádorové buněčné linie**

Jaroslava Tomenendálová<sup>1</sup>, Ivana Veselá<sup>1</sup>, Zuzana Sarusi<sup>1</sup>, Erika Rajtová<sup>1</sup>, Karolína Koryntová<sup>1</sup>, Kristýna Koryntová<sup>1</sup>

*Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita  
Brno<sup>1</sup>*

## **Úvod**

Aeruginosin-865 je tetrapeptid izolovaný z terestriálních cyanobakterií rodu *Nostoc*, u kterého byl jako jediného sekundárního metabolitu cyanobakterií prokázán antiinflamatorní účinek (1). Podobné účinky byly prokázány i u dalších přírodních látek jako je například kapsaicin (přírodní alkaloid produkovaný rostlinami rodu *Capsicum*) nebo resveratrol (polyfenolická látka syntetizována různými druhy rostlin např. vinná réva, brokolice či česnek), u kterých je popisován i antikancerózní efekt (2, 3). Cílem práce bylo otestovat vliv jmenovaných látek na fyziologické a nádorové linie buněk.

## **Materiál a metodika**

**Buněčné linie:** Využity byly komerčně dodávané myši buněčné linie různého původu. Fyziologické jaterní buňky (AML12 ATCC® CRL-2254™) a nádorové buněčné linie jater a ledvin (Hepa 1-6 ATCC® CRL-1830™ a Renca ATCC® CRL-2947™). Jedná se o adherentní buněčné linie, kultivované v příslušné živném médiu s 10 % FBS, antibiotiky (penicilin, streptomycin), v 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> atmosféře.

**Přírodní látky:** Aeruginosin-865 byl získán ve spolupráci s Mikrobiologickým ústavem AV ČR v Třeboni. Kapsaicin (M2028) a resveratrol (554325) byly zakoupeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

**Experimentální design:** Jednotlivé buněčné linie byly ošetřeny Aeruginosinem-865 (Aer), kapsaicinem (Cap), resveratrolem (Res) rozpuštěnými v DMSO a ředěnými příslušným kultivačním médiem na koncentraci 25, 50, 100 resp. 200 µM. Kontrolní buňky (Ctl) byly inkubovány v DMSO, v koncentraci odpovídající koncentraci v roztocích bioaktivních látek (tzn. 0,05 %, 0,1 %, 0,2 % resp. 0,4 %). Následně byly testovány kombinace látek – kapsaicin + resveratrol (C+R), kapsaicin + aeruginosin (C+A) a resveratrol + aeruginosin (R+A) v koncentraci 25 + 25 µM, 50 + 50 µM a 100 + 100 µM testovaných látek. Buňky byly nasazeny do 96 jamkové desky v koncentraci 20×10<sup>3</sup> /jamka, po 24 hodinové inkubaci byly ošetřeny



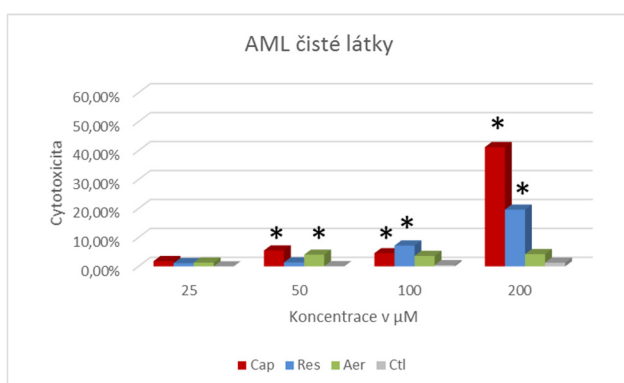
zmíněnými látkami a v jejich přítomnosti inkubovány 24 hodin. Cytotoxicita byla stanovena testem *LDH cytotoxicity assay kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Viabilita buněk a schopnost zakládat nové kolonie (test proliferace) byla testována pro koncentrace Cap, Res a Aer 100  $\mu\text{M}$ , resp. 0,1 % DMSO. Jako kontrola sloužily buňky v příslušném kompletním médiu. Po 24hodinové inkubaci v médiu (24 jamková deska,  $12 \times 10^4$  buněk/jamka) byly linie treatovány (24 hodin), následně pasážovány (stanovení počtu a viability pomocí *trypan blue exclusion test*, porovnání s nasazovaným počtem, zhodnocení morfologie kolonií) a opět nasazeny do příslušného kompletního média ve stejné koncentraci  $12 \times 10^4$  buněk/jamka, případně všechny buňky, pokud byl získaný počet nižší. Po 24 hodinách byl opět stanovovat počet a viabilita a porovnan s nasazenou koncentrací.

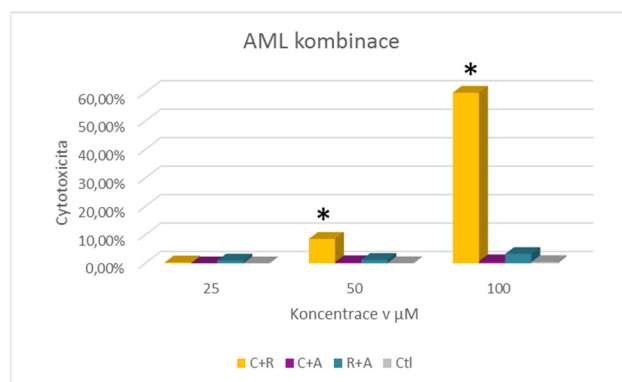
Všechny analýzy probíhaly v multiplikátech (3-5) a byly 2-3krát opakovány. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí statistického software MedCalc. Hladina významnosti byla stanovena na  $p < 0,05$ .

## Výsledky

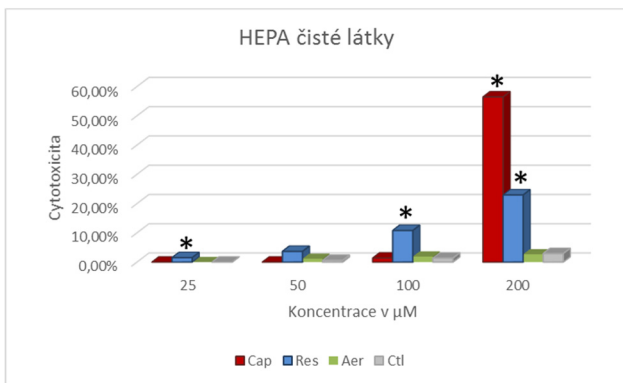
Výsledky LDH testu (cytotoxicita) jsou shrnuty v grafech 1-6 (statisticky významné rozdíly oproti kontrole jsou označeny \*), výsledky testu proliferace znázorňují grafy 7-9.



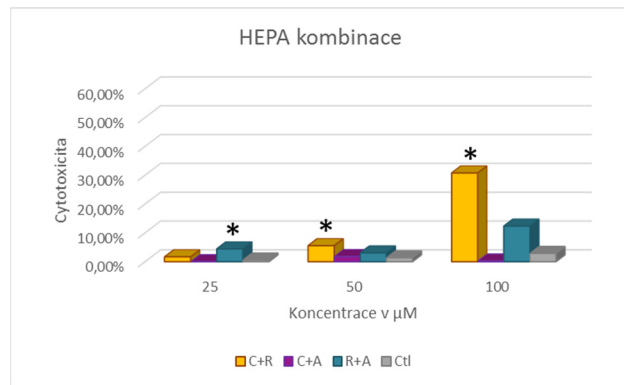
Graf 1 – Cytotoxicita kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) - fyziologické hepatocyty.



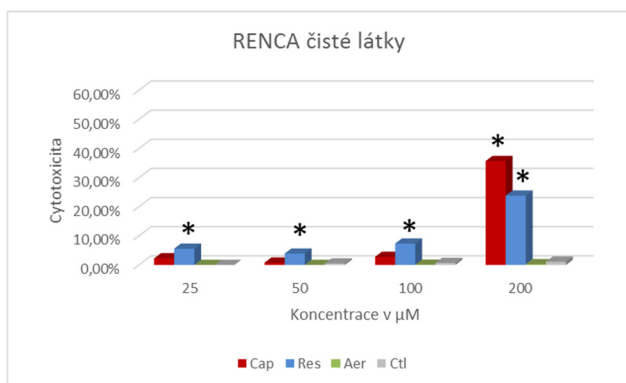
Graf 2 – Cytotoxicita kombinace kapsaicinu a resveratrolu (C+R), kapsaicinu a aeruginosinu (C+A) a resveratrolu a aeruginosinu (R+A) - fyziologické hepatocyty.



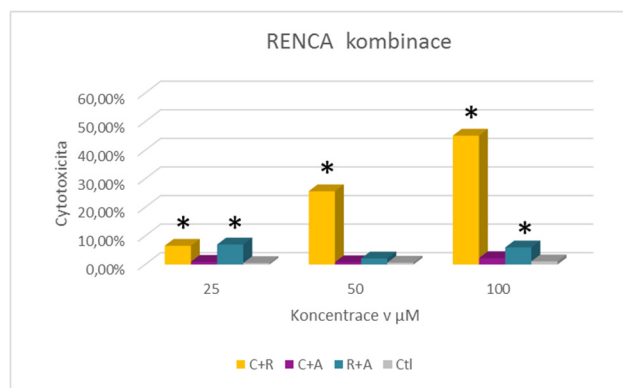
Graf 3 – Cytotoxicita kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) - nádorové hepatocyty.



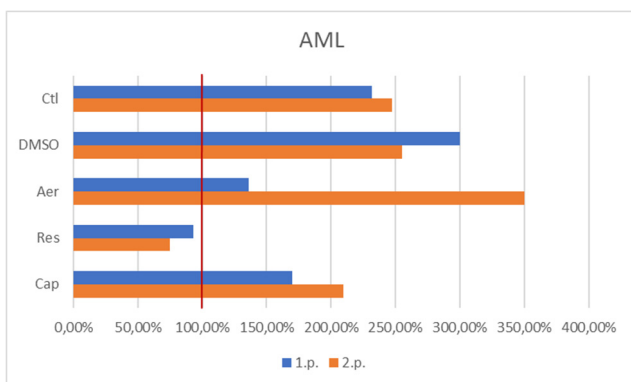
Graf 4 – Cytotoxicita kombinace kapsaicinu a resveratrolu (C+R), kapsaicinu a aeruginosinu (C+A) a resveratrolu a aeruginosinu (R+A) - nádorové hepatocyty.



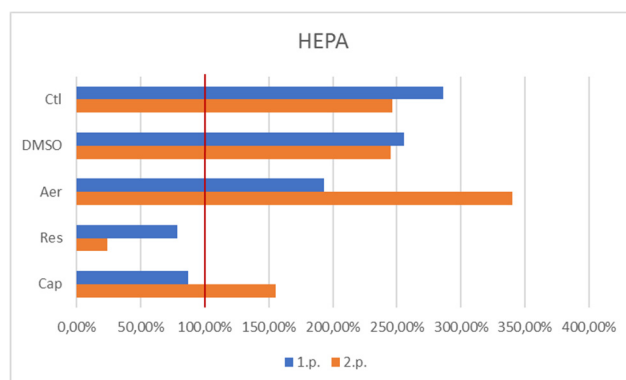
Graf 5 – Cytotoxicita kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) - nádorové buňky ledvin.



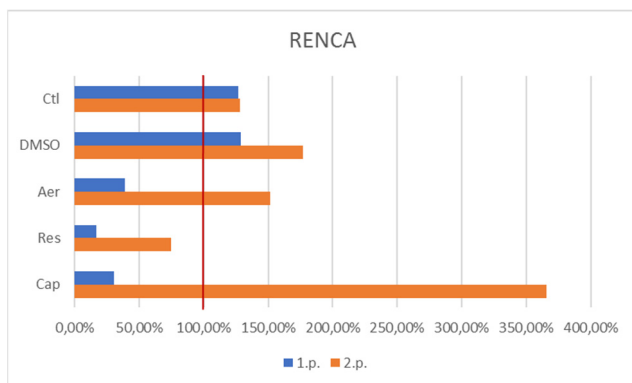
Graf 6 – Cytotoxicita kombinace kapsaicinu a resveratrolu (C+R), kapsaicinu a aeruginosinu (C+A) a resveratrolu a aeruginosinu (R+A) - nádorové buňky ledvin.



Graf 7 – Vliv kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) v koncentraci 100 µM na proliferační aktivitu fyziologických hepatocytů. Linie 100 % odpovídá počtu buněk při nasazení. DMSO (0,1 %) a Ctl (kompletní médium) slouží jako kontrola fyziologické proliferační aktivity.



Graf 8 – Vliv kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) v koncentraci 100 µM na proliferační aktivitu nádorových hepatocytů. Linie 100 % odpovídá počtu buněk při nasazení. DMSO (0,1 %) a Ctl (kompletní médium) slouží jako kontrola fyziologické proliferační aktivity.



Graf 9 – Vliv kapsaicinu (Cap), resveratrolu (Res) a aeruginosinu (Aer) v koncentraci 100  $\mu$ M na proliferační aktivitu nádorových buněk ledvin. Linie 100 % odpovídá počtu buněk při nasazení. DMSO (0,1 %) a Ctl (kompletní médium) slouží jako kontrola fyziologické proliferační aktivity.

## Diskuse a závěr

Kapsaicin v koncentraci 200  $\mu$ M vykazuje signifikantní cytotoxicitu u všech testovaných buněčných linií. Resveratrol vykazuje statisticky významnou cytotoxicitu u nádorových linií ve všech testovaných koncentracích, u fyziologické linie AML pouze v nejvyšších koncentracích (200 a 100  $\mu$ M). Signifikantní cytotoxicita aeruginosinu ve srovnání s kontrolou byla zaznamenána pouze u linie AML v koncentraci 50  $\mu$ M.

Kombinace kapsaicinu a resveratrolu vykazuje vyšší cytotoxicitu než testované látky samotné. Signifikantní cytotoxicita byla patrná u všech linií, fyziologických i nádorových. U nádorových linií Hepa a Renca se projevil i cytotoxický vliv kombinace aeruginosin + resveratrol; u fyziologických AML buněk nebyl rozdíl oproti kontrole statisticky významný. Kombinace kapsaicin + aeruginosin vykazovala nižší toxicitu než látky samotné, a to u všech testovaných linií a koncentrací.

Pokles proliferační aktivity byl patrný zejména při inkubaci buněk v 100 $\mu$ M resveratrolu. Snížena byla i následná schopnost zakládat nové kolonie po pasáži a opětovném nasazení. Kapsaicin inhiboval proliferaci u nádorových linií buněk (Hepa a Renca), aeruginosin u nádorových buněk ledviny (Renca). Inkubace buněk v přítomnosti testovaných látek, zejména kapsaicinu a resveratrolu, rovněž mění morfologii buněčných kolonií. Počet kolonií je nižší, buňky vykazují morfologické abnormality – svrašnění, vyšší obsah intracelulárních inkluzí, nižší schopnost adherovat k povrchu kultivační misky.

## Seznam literatury:

1. Kapuścik A, Hrouzek P, Kuzma M, Bártová S, Novák P, Jokela J, Pflüger M, Eger A, Hundsberger H, Kopecký J. Novel Aeruginosin-865 from *Nostoc* sp. as a potent anti-inflammatory agent. *Chembiochem*. 2013; 14:2329-2337.
2. Sharma SK, Vij AS, Sharma M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*. 2013; 720: 55-62.
3. Ferraz da Costa DC, Fialho E, Silva JL. Cancer chemoprevention by resveratrol: the p53 tumor suppressor protein as a promising molecular target. *Molecules*. 2017; 22: 1014.
4. Veselá I, Celá Kolísková P, Kuchařová V, Tomenendálová J, Kováčová V, Pikula J, Repková B, Rapekta P, Hrouzek P, Cheel J and Doubek J. Cytotoxic effect of Aeruginosin-865, resveratrol and capsaicin on mouse fibroblasts and cells derived from fallow deer. *Natural Product Communications*. 2018; 13: 205-208.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 106/2018/FVL***

# Specifikace osteogenních funkcí pro-apoptotických kaspáz ve vztahu k vývoji dlouhých kostí

Alice Ramešová<sup>1</sup>, Eva Matalová<sup>1,2</sup>

*Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita*

*Brno<sup>1</sup>,*

*Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.<sup>2</sup>*

## Úvod

V poslední době narůstá evidence o uplatnění kaspáz mimo jejich tradiční role v programované buněčné smrti a zánětových procesech (1). Nové funkce těchto cysteinových proteáz se týkají také osteogeneze. Endochondrální osifikace je typická pro dlouhé kosti končetin. Na rozdíl od intramembranózního typu osifikace, typické pro krátké a ploché kosti např. hlavy, se u dlouhých kostí vyskytuje chrupavčité stádium, na které navazuje tvorba vlastní kostní tkáně. Chrupavčitý segment se dále zachovává v růstové ploténce dlouhých kostí a umožňuje jejich růst do délky. Růstová ploténka je proto často studovanou strukturou nejenom v základním výzkumu, ale také v aplikovaném, zejména v souvislosti s defekty jako je achondroplazie.

Ve vztahu k endochondrální osifikaci byl proveden screening impaktu obecné inhibice kaspáz na expresi osteogenních molekul v chondrocytech (2). Výstupem, který se stal základem pro prezentovanou studii, byla identifikace více než 5 -ti násobné změny exprese u několika důležitých molekul ve vztahu k osteogenezi. Jde především o integriny, matrixové metaloproteinázy a kolageny, které jsou důležitou součástí extracelulární matrix tvrdých tkání, dále CD36 s vazebným místem pro kolageny a také sklerostin, který je markerem osteocytů. Cílem navazující práce byla specifikace konkrétních kaspáz, které jsou za tento efekt zodpovědné, a to se zaměřením na kaspázy pro-apoptotické. Výzkum se týkal jak iniciačních kaspáz (-8, -9), tak exekučních (-3, -6, -7).

## Materiál a metodika

Mikromasové kultury

Myši hrudní končetiny odebrané *post mortem* v prenatalní den 12 byly použity pro přípravu mikromasových kultur. Nejdříve byly rozvolněny mechanicky v roztoku PSA pufry a poté enzymaticky působením dispázy II. V dalších krocích byly buňky promývány, přefiltrovány a

nasazeny ve formě spotů (10  $\mu$ l) do kultivačních misek. Po přichycení buněk na misku bylo přidáno kultivační médium (DMEM, F12 nutrient, FBS, P/S, L-glu,  $\beta$ -GP, kyselina askorbová).

### Inhibice kaspáz

Po stabilizaci mikromas byl do kultivačního média přidán FMK inhibitor (R&D Systems) v koncentraci 100  $\mu$ M rozpuštěný v DMSO (Sigma-Aldrich) pro experimentální a pouze DMSO pro kontrolní mikromasové kultury. Mikromasové kultury byly inkubovány v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře při teplotě 37 °C po dobu 7 dní. Výměna média probíhala po 48 h. Po 7 dnech od zahájení kultivace byly mikromasové kultury odebrány s použitím RLT pufru (Qiagen) s  $\beta$ -merkaptoetanolem (Sigma- Aldrich) a připraveny pro izolaci RNA. U každé inhibice byly provedeny 3 biologické replikace.

### Izolace RNA a přepis do cDNA

Pro izolaci RNA byly použity odebrané vzorky mikromas po týdenní kultivaci, experimentální a kontrolní vzorky byly zpracovány paralelně. K izolaci byl využit postup uvedený pro komerčně dostupný RNeasy Mini Kit (Qiagen). Po izolaci RNA a kontrole koncentrace a čistoty byla RNA přepsána do cDNA s využitím komerčně vyráběného kitu SuperScript VILO (Invitrogen).

### PCR Arrays

Analýzou založenou na PCR Arrays bylo otestováno 84 genů spojených s osteogenezí použitím RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Mouse Osteogenesis (Qiagen). Data byla statisticky vyhodnocena systémem Qiagen Data Analysis Center (<https://www.qiagen.com/kr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). V souladu s tímto systémem byly hodnoceny tři biologické replikace, tedy 3 kontrolní a 3 experimentální vzorky. Jako signifikantní byla určena hranice  $P < 0.05$  a limit násobku exprese – 2/+2.

## Výsledky a závěr

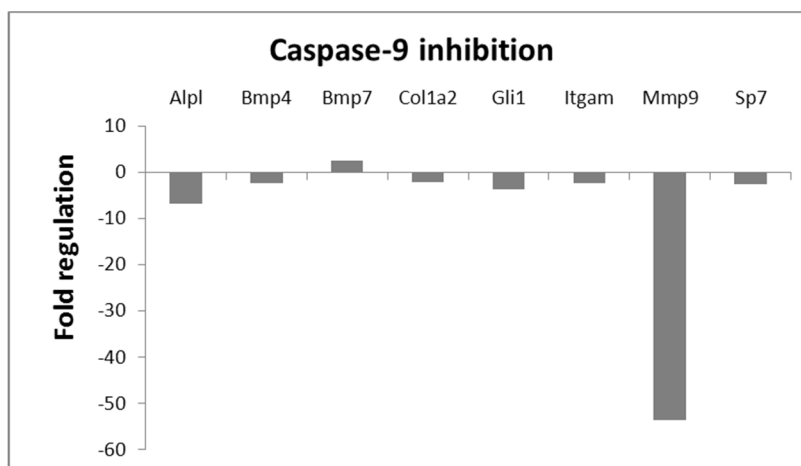
Nejvýznamnějších výsledků bylo dosaženo v případě inhibice kaspázy-9 (Graf 1), kdy byla zjištěna více než 50-ti násobná změna exprese v případě matrixové metaloproteinázy-9. Mmp-9 je markerovou molekulou aktuálně asociovanou s revmatoidní artritidou a osteoartritidou. U těchto onemocnění dochází ke zvýšení exprese Mmp-9 a tím k degradaci nekolagenních složek matrix (3). Inhibice kaspázy-9 vedla k masivnímu snížení exprese této metaloproteinázy, což

by znamenalo, že má inhibovaná kaspáza-9 protektivní účinek proti vzniku těchto momentálně velmi diskutovaných patologií.

V apoptotických procesech aktivuje kaspáza-9 kaspázu-3. Ke zjištění, zda se tento krok týká také vlivu na expresi Mmp-9, byl srovnán expresní profil osteogenních molekul v případě inhibice kaspázy-9 a kaspázy-3 (Graf 2). Výsledek inhibice kaspázy-3 ukázal, že nemá statisticky signifikantní vliv na expresi Mmp-9. Efekt kaspázy-9 na expresi Mmp-9 je tedy nezávislý na kaspáze-3 a ukazuje na nový mechanismus neapoptického uplatnění této proapoptické kaspázy.

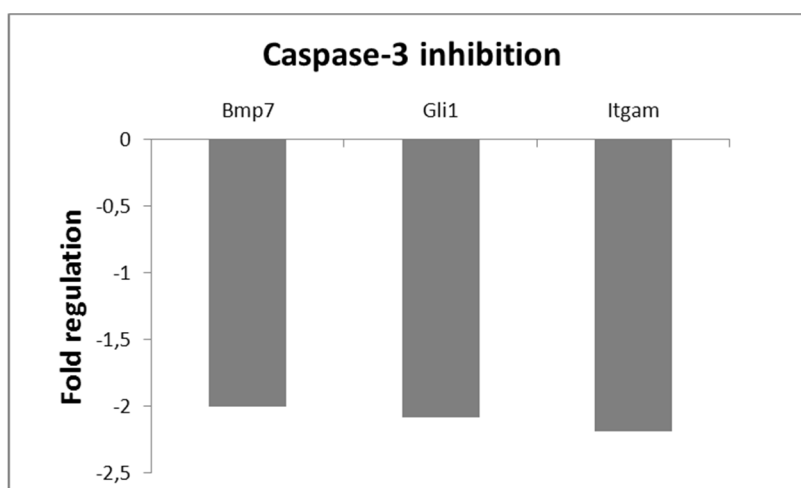
**Graf 1: Vliv inhibice kaspázy-9 na expresi osteogenních molekul v mikromasových kulturách chondrocytů.** Tabulka ukazuje přesné hodnoty násobků změny exprese.

Alpl	-6,63
Bmp4	-2,31
Bmp7	2,59
Col1a2	-1,97
Gli1	-3,7
Itgam	-2,31
Mmp9	-53,52
Sp7	-2,47



**Graf 2: Vliv inhibice kaspázy-3 na expresi osteogenních molekul v mikromasových kulturách chondrocytů.** Tabulka ukazuje přesné hodnoty násobků změny exprese.

Bmp7	-2
Gli1	-2,08
Itgam	-2,19



**Seznam literatury:**

- (1) SHALINI, S. et al. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*. 2015; **22**(4) 526-539
- (2) ADAMOVIĆ, E. et al. Caspases and osteogenic markers-in vitro screening of inhibition impact. *In vitro Cellular and Developmental Biology –Animal*. 2016; **52**(2) 144-148
- (3) OIKONOMOPOULOU, K. et al. Proteinases and their receptors in inflammatory arthritis: an overview. *Nature Reviews Rheumatology*. 2018; **14**(3) 170-181

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 110/2018/FVL*

## **Orální tumory psa – prevalence v ČR**

Barbora Putnová<sup>1</sup>, Miša Škorič<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

V léčbě veterinárních onkologických pacientů dochází v poslední době k významnému rozšíření spektra terapeutických možností obdobně, jako je tomu v humánní medicíně. Pro správné a účinné nastavení léčby nádorových onemocnění je primární přesná diagnóza, proto roste rovněž význam veterinární patologie, zejména zavádění nových diagnostických postupů založených na molekulárních metodách. Jelikož významný podíl z odebraných vzorků hodnocených veterinárními patologi tvoří biopsáty z dutiny ústní, zaměřili jsme se právě na tuto oblast.

Na ontogenezi struktur dutiny ústní se podílejí všechny tři zárodečné listy (1), a tudíž se zde můžeme setkat s velmi heterogenním spektrem primárních nádorů odvozených ze všech zárodečných listů. Nejfrekventovanějším maligním tumorem v dutině ústní psů je melanom, který se právě v této lokalizaci vyznačuje velmi agresivním biologickým chováním (2). Druhým nejčastějším nádorem v dutině ústní u psů je skvamocelulární karcinom (SCC), který je zároveň vůbec nejčastějším maligním nádorem v oblasti hlavy a krku v lidské populaci. Přetrvávajícím problémem ve veterinární patologii je nejednoznačná klasifikace novotvarů odontogenního původu, což jsou nádory etiologicky spjaté s embryonálním základem zubu (3). Tyto novotvary jsou si morfologicky velmi podobné, avšak klinicky se jejich chování může významně lišit. V současné době nejsou k dispozici ani žádné buněčné markery, které by mohly jednotlivé typy odlišit.

Vzhledem k lokalizaci jsou novotvary v dutině ústní zaznamenány majitelem nebo praktickým veterinárním lékařem často až v pokročilém stádiu onemocnění, což následně zvyšuje nároky na rychlost a přesnost diagnózy.

V rámci naší studie je statisticky vyhodnocena míra prevalence jednotlivých typů nádorů dutiny ústní u psů v České republice, přičemž jsme se zaměřili i na údaje o pohlaví a věku pacientů.

### **Materiál a metodika**

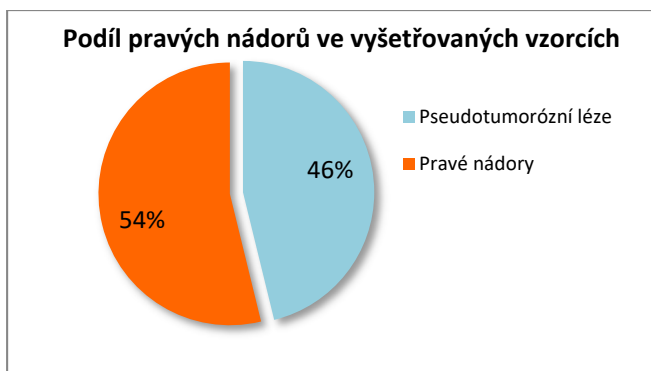
Z archivu Ústavu patologické morfologie a parazitologie VFU Brno byly získány vzorky tumorů a pseudotumorózních lézí z dutiny ústní psů, vyšetřované od roku 2006, a to ve formě parafinových bloků případně trvalých histologických preparátů. Další vzorky tkání byly shromážděny z terénních veterinárních pracovišť po celé ČR. Tyto vzorky byly dále zpracovány



běžnými histologickými technikami. U tumorů, u nichž nebylo možné stanovit jednoznačnou diagnózu jen na základě přehledného barvení, byla provedena imunohistochemická analýza diagnosticky významných buněčných markerů. Celkem bylo vyšetřeno 602 lézí z dutiny ústní psů. Získaná data byla statisticky vyhodnocena, přičemž byl zohledněn věk a pohlaví pacienta.

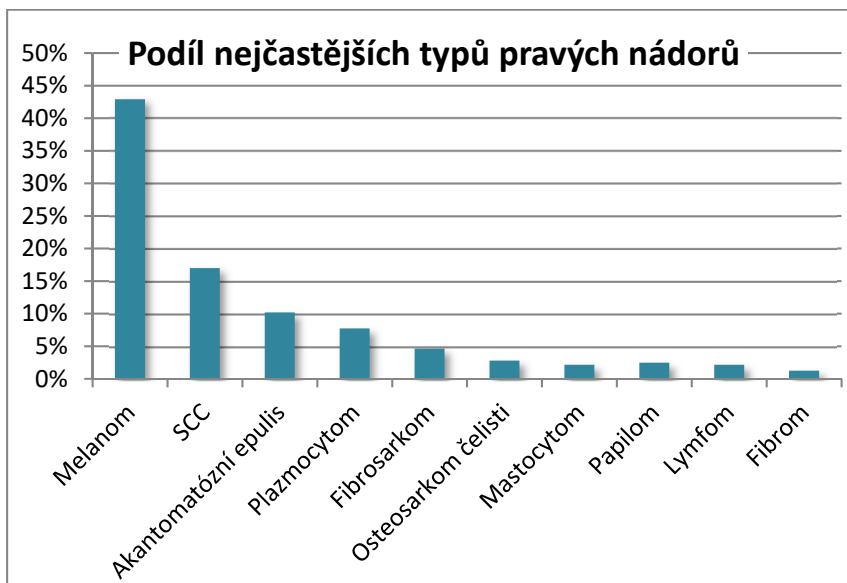
## Výsledky

Z celkového počtu 602 vyšetřených lézí z dutiny ústní u psů v ČR tvořily pravé nádory více než polovinu (Graf 1). Zbylou část tvořily nenádorové proliferativní léze (nejčastěji tzv. fibromatózní epulis), které z hlediska patogeneze nejčastěji souvisí s chronickými stomatitidami.



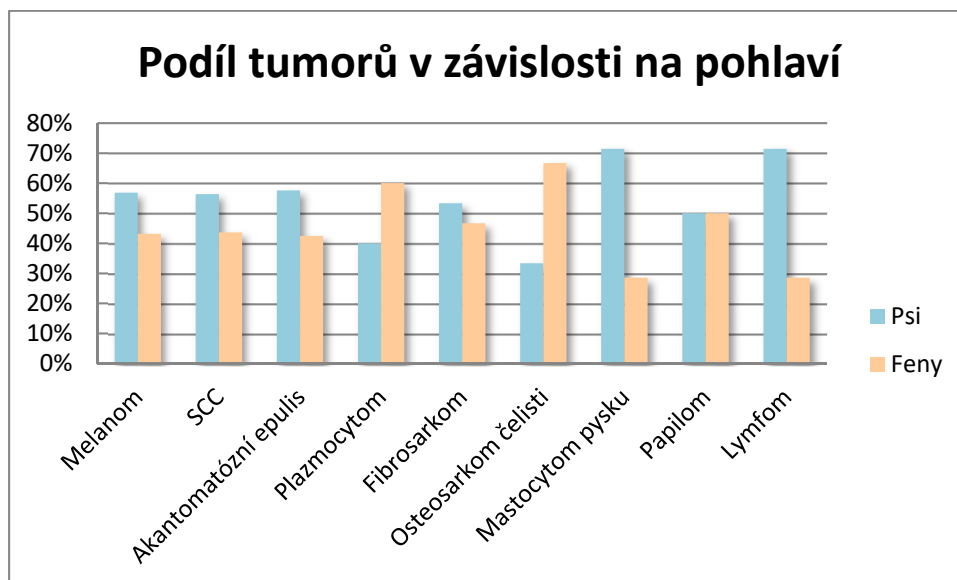
Graf 1 Podíl pravých nádorů ve vyšetřovaných vzorcích lézí dutiny ústní u psů. Pravé nádory tvořily 54% ze všech vyšetřených vzorků.

Nejčastěji diagnostikovaným pravým nádorem byl orální maligní melanom (43%), dále pak SCC (17%) (Graf 3) – v obou případech se jedná o maligní a biologicky vysoce agresivní léze. Přibližně 10% byla zastoupena benigní akantomatózní epulis (ameloblastom). V malé míře ( $\leq 1\%$ ) se vyskytovaly další typy nádorů, jako například chondrosarkom čelisti, vřetenobuněčný sarkom, nádor z granulárních buněk, rhabdomyosarkom jazyka a další.



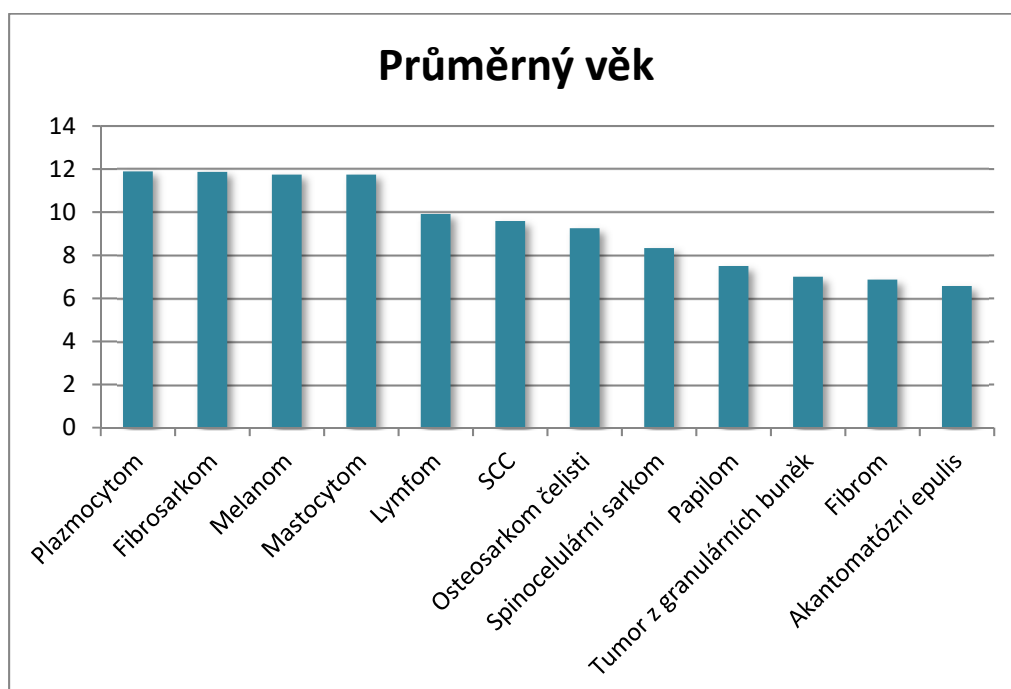
Graf 2 Procentuální zastoupení nádorů nejčastěji diagnostikovaných v rámci naší studie z celkového počtu pravých nádorů. (SCC - skvamocelulární karcinom)

Téměř u všech typů nádorů jsme zaznamenali vyšší prevalenci u psů, než u fen (Graf 3). V některých případech jsou námi získané výsledky v souladu s jinými studiemi, a to zejména v případě maligního orálního melanomu (4, 5), ale například v případě osteosarkomu čelisti bývá častější prevalence zaznamenávána u psů než u fen (6), což je v rozporu s našimi výsledky.



Graf 3  
Procentuálně vyjádřený podíl zastoupení psů a fen u jednotlivých typů nejčastěji se vyskytujících tumorů v dutině ústní.

Maligní nádorová onemocnění jsou obecně vždy častější u starších zvířat, což potvrzují i naše výsledky (Graf 4), kdy maligní a lokálně agresivní léze se častěji vyskytují u psů až kolem 12. roku - fibrosarkom, melanom, plazmocytom, mastocytom pysku. Mezi další maligní léze, které byly diagnostikovány v průměru kolem 10. roku života, patří lymfom, SCC, osteosarkom čelisti a spinocelulární sarkom. Benigní léze byly diagnostikovány většinou u mladších psů do 8. roku života (papilom, tumor z granulárních buněk, fibrom a akantomatózní epulis).



Graf 4 Průměrný věk pacientů v době diagnózy. Osa y – věk v letech.

## **Závěr**

V případě výskytu proliferativních změn v dutině ústní psa se ve více než polovině případů jedná o pravé nádory, z nichž největší podíl tvoří orální maligní melanom.

Z nejfrekventovanějších orálních nádorů byla častěji zjištěna vyšší prevalence u psů než u fen. Z našich výsledků vyplývá, že benigní léze jsou diagnostikovány spíše u mladších psů do 8. roku života, kdežto maligní a lokálně agresivní tumory jsou častěji diagnostikovány u starších jedinců.

Při zaznamenání masy v dutině ústní psa ve věku kolem 12 let existuje značné riziko, že se jedná o maligní nádorovou proliferaci (zejména maligní orální melanom) a tato skutečnost vyžaduje od praktického veterinárního lékaře rychlé a efektivní jednání. Suspektní klinická diagnóza stanovená praktickým veterinárním lékařem se ve značné míře lišila od histopatologického nálezu, což potvrzuje důležitost přesné a rychlé preoperační histologické diagnostiky.

Závěrem lze konstatovat, že využití imunohistochemických metod umožňuje přesnější diagnostiku a klasifikaci tumorů v dutině ústní u psů a tím i nastavení efektivních terapeutických postupů.

### **Seznam literatury:**

1. Thomas SW. Langmanova lékařská embryologie. Praha: Grada; 2010. 432 p.
2. Maxie MG. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals: Volume 2. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2015. 912 p.
3. Head KW. Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology; 2003.
4. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, Perlmann E, Batschinski K, Tedardi MV, et al. Comparative Aspects of Canine Melanoma. Veterinary sciences. 2016;3(1).
5. Vos JH, van der Gaag I. Canine and feline oral-pharyngeal tumours. Zentralblatt fur Veterinarmedizin Reihe A. 1987;34(6):420-7.
6. Farcas N, Arzi B, Verstraete FJ. Oral and maxillofacial osteosarcoma in dogs: a review. Veterinary and comparative oncology. 2014;12(3):169-80.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 104/2018/FVL.***

## **Metody průkazu vybraných krevních patogenů v populaci koček**

Dobromila Molinková, Jana Mariánková

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární  
a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Mezi významné hemotropní druhy bakterií vyskytujících se u koček patří *Bartonella henselae*, *Mycoplasma haemofelis* a *Mycoplasma haemominutum*. Parazitují především na erytrocytech a jsou přenášeny vektory patřícími mezi členovce. Poznatky o těchto bakteriích jsou spojeny s rozvojem molekulárně biologických metod, protože provedení kultivačního průkazu je náročné a navíc nevykazuje dostatečnou spolehlivost.

*Bartonella henselae* nevyvolává u svých přirozených hostitelů žádné nebo jen mírné klinické příznaky, může ale způsobit závažné onemocnění člověka (tzv. nemoc z kočičího škrábnutí). *Mycoplasma haemofelis* a *haemominutum* může způsobovat infekční anémii koček, zvláště u imunosuprimovaných zvířat.

### **Materiál a metodika**

Z kolekce krví koček jsme prováděli přímou i nepřímou identifikaci výše uvedených bakteriálních druhů. Vzorky kočičí krve byly získány od koček různého stáří, pohlaví, původu, pocházející z odlišných podmínek chovu a různých částí ČR. Zaměřovali jsme se především na zblešená outdoorová zvířata.

Primárně byla využita metoda PCR, které předcházela samotná izolace DNA z plné krve kitem NucleoSpin Blood DNA (Machery-Nagel). Separaci a identifikaci fragmentů DNA získaných pomocí PCR jsme provedli gelovou elektroforézou, po které následovala extrakce DNA z gelu kitem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd.). Takto získaný PCR produkt jsme připravili na odeslání do firmy MacroGen, Amsterdam, kde bylo provedeno samotné sekvenování. Výsledky zasláné firmou jsme zanalyzovali a porovnali se známými sekvencemi v databázi Gen Bank.

Další možnost diagnostiky je založena na přímém mikroskopickém vyšetření. Tato metoda slouží spíše jako vyšetření orientační a doplňkové. Zhotovili jsme soubor krevních nátěrů z krví koček, u kterých byla potvrzená pozitivita pomocí PCR nebo IFA. Nátěry jsme obarvili, bylo použito panoptické přehledné barvení nebo hotové barvicí sady – Hemacolor, a podrobili mikroskopické analýze.

Dále jsme prováděli průkaz protilátek proti *B. Henselae* metodu nepřímé imunofluorescence a stanovovali séroprevalenci v souboru vyšetřovaných sér koček. Zavedli jsme fluorescenční test, ve kterém byl antigenem na sklíčku sbírkový kmen *B. henselae*. Tato metoda nepatří

v diagnostice *B. Henselae* mezi nejspolehlivější. Analýza je náročná a zčásti subjektivní, vhodná je jako doplňková metoda.

## Výsledky

### Mikroskopie

Bartonely mohou být detekovány jako kulovité až tyčinkovité útvary atakující membránu. Mykoplazmy se v nátěru objevují jako malé modře se barvící koky až tyčinky. Infikované červené krvinky obvykle ztrácí bikonkávní tvar a stávají se z nich sférocyty nebo stomatosférocyty. Erythrocyty jsou větší a hypochromní. Typickým nálezem v průběhu akutní fáze onemocnění jsou anizocytóza a Howell-Jollyho tělíska.

### PCR, sekvenování

Vyšetřeno bylo celkem 112 vzorků od 112 koček. U 10 jedinců (8,9%) z tohoto souboru se jevila v agarózovém gelu *Bartonella hensela* jako pozitivní. Sekvenováním byla *Bartonella* potvrzena pouze u 2 (1,8%) koček. Výsledky byly tedy rozdílné. Srovnáním sekvencí s databází Genbank byl ve vzorcích prokázán druh *Mezorhizobium*, specifita PCR reakce nebyla patrně dostatečně vysoká z důvodu použitých primerů, které se pravděpodobně nespecificky vážaly na DNA tohoto druhu. V budoucnu by bylo vhodné navrhnout primery s větší specifitou.

Ze stejného souboru koček bylo pomocí PCR metody a sekvenování zachyceno 7 koček (6,3%) s pozitivní DNA *M. haemofelis* a 26 koček (23,2%) s pozitivním DNA *M. haemominutum*. Všechny pozitivní vzorky pocházely od outdoor koček nebo koček z útulků, u kterých se dala předpokládat infestace blechami.

Prokázaný druh	Počet pozitivních jedinců	Procento (%)
<i>Bartonella henselae</i>	2	1,8
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	7	6,3
<i>Mycoplasma haemominutum</i>	26	23,2

**Tabulka 1:** Průkaz *Bartonella henselae*, *M. hemofelis*, *M. hemominutum* sekvenováním ve vyšetřovaném souboru 112 koček

### Nepřímá imunofluorescence

Celkově bylo vyšetřeno 79 sér. Z tohoto souboru bylo 21 vzorků pozitivních (30%). U koček žijících trvale v domácnosti jsme opět nezaznamenali pozitivní nález. Nicméně přítomnost protilátek signalizuje předchozí kontakt s patogenem, nikoli aktivní infekci. Jejich reaktivita je navíc zkřížená s ostatními druhy a kmeny bartonel.

	Celkem	Počet pozitivních jedinců	Procento pozitivních jedinců
Počet koček	79	21	30
Outdoor	42	15	21
Indoor	14	0	0
Útulek	23	6	9

Tabulka 2: Séroprevalence *B. henselae* pomocí IFA

### Závěr

Naším cílem bylo zavést a zanalyzovat metody komplexní laboratorní diagnostiky krevních patogenů koček a snaha o zařazení do běžné laboratorní praxe. Byly testovány krve koček různých kategorií a sledována incidence výše zmíněných krevních patogenů v ČR.

### Literatura

- CHOMEL B. B., BOULOUIS H. J., BREITSCHWERDT E. B., KASTEN R. W., VAYSSIER-TAUSSAT M., BIRTLES R. J., KOEHLER J. E., DEHIO C. 2009: Ecological fitness and strategies of adaptation of Bartonella species to their host and vectors. *Vet Res* 40:1-27
- SYKES J. E. 2010: Feline hemotropic mycoplasmas. *J Vet Crit Care (San Antonio)* 20(1): 62-69
- TASKER S. 2010: Hemotropic mycoplasmas: What's their real significance in cats? *J Feline Med Surg* 12(5):369-381
- GREENE E. 2006: Bartonellosis. In: *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd edition. Elsevier Saunders. St. Louis 1387:510-523
- GREENE E. 2006: Haemotropic mycoplasmosis (Haemobartonellosis). In: *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd edition. Elsevier Saunders. St. Louis 1387:252-260
- GLAUS T., HOFMANN-LEHMANN R., GREENE C., GLAUS B., WOLFENBERGER C., LUZT H. 1997: Seroprevalence of Bartonella henselae infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 35:2883-2885

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 108/2018/FVL.***

# Vliv GnRH agonisty deslorelinu na koncentraci testosteronu a spermatogenezi u křečka zlatého (*Mesocricetus auratus*)

Kristýna Glocová<sup>1</sup>, Petr Čížek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## Úvod

Chirurgická kastrace je nejčastěji prováděnou metodou kontracepce u drobných savců (1). U fretek se předpokládá po chirurgické kastraci nárůst koncentrace gonadotropinů způsobující adrenokortikální hyperplazii a tvorbu tumorů (5). Z tohoto důvodu u fretek a možného anestetického rizika u drobných savců obecně jsou hledány k ní odpovídající alternativní metody (1). GnRH agonisté, mezi které řadíme deslorelin, ovlivňují reprodukční systém prostřednictvím hypofýzy - gonadální osy. V iničiální fázi působení dochází k přechodnému nárůstu sekrece FSH, LH a testosteronu (2). Kontinuální podávání deslorelinu způsobuje desenzibilizaci GnRH receptorů hypofýzy (3) zapříčiňující u většiny savců redukci sekrece FSH, LH, snižující se koncentraci testosteronu, zmenšení objemu varlat a prostaty, zastavení spermatogeneze na úrovni spermatogonií až spermatocytů a s tím související snížení kvality ejakulátu (4). U fretek je deslorelin používán s cílem zabránění nežádoucí fertility, k redukci mezidruhové agrese, zápachu produkovaného mazovými žlázami a k léčbě hyperadrenokorticizmu (5). U samce králíka s hypospadií ukazovaly výsledky koncentrace testosteronu a velikosti varlat slibné účinky deslorelinu po dobu 7 měsíců (6). V další studii na deseti králicích tento účinek nebyl prokázán a tudíž deslorelin nepředstavuje vhodnou alternativu k chirurgické kastraci (4). U potkanů vyvolala dávka 1,1 mg implantátu deslorelinu supresi reprodukčního systému (7). U křečků však znalosti o účinku GnRH agonistů zcela chybí. Hlavním cílem této práce proto bylo zjistit jejich účinnost u samců křečků zlatých (*Mesocricetus auratus*).

## Materiál a metodika

### Experimentální design

Dvacet čtyři pohlavně dospělých, klinicky zdravých samců křečka zlatého ve věku 2,5 - 3,5 měsíce byli rozděleni do dvou skupin. Všechna zvířata pocházela ze zájmového chovu.

První skupina představovala kontrolní skupinu (n = 4), která podstoupila všeobecné klinické vyšetření, odběr krve, kastraci s následným usmrcením v celkové anestezii.

U druhé neboli experimentální skupiny (n = 20) křečků zlatých bylo na počátku experimentu provedeno všeobecné klinické vyšetření a odběr venózní krve v celkové anestezii. Poté byl zvířatům zaveden subkutánní implantát obsahující deslorelin (Deslorelinum 4,7 mg, Suprelorin, Virbac). Všechna zvířata vždy v měsíčních intervalech podstoupila všeobecné klinické vyšetření, odběr krve a měření varlat, přičemž na závěr každé návštěvy byla u 4 zvířat provedena kastrace, po které byli usmrceni.

#### Odběr vzorků krve a stanovení koncentrace testosteronu

Ke stanovení koncentrace testosteronu byla odebírána krev z *v. cava cranialis* do plastových zkumavek. Následně byla krev odeslána k diagnostice (Synlab czech s.r.o; Praha).

#### Měření objemu varlat

Prostřednictvím digitálního posuvného měřítka byla naměřena délka (a) a šířka (b) pravého a levého varlete včetně scrota. Objem varlat (cm<sup>3</sup>) byl vypočítán podle rovnice:  $a * b^2 * 0,524$

#### Histologické posouzení varlat

Varlata byla histologicky zpracována a pozorována pod světelným mikroskopem Olympus CX41. U každého varlete bylo na devíti řezech z oblastí *margo cranialis*, centrální části a *margo caudalis* náhodně vybráno 200 příčných řezů stočenými semenotvornými kanálky. Podle nejdiferencovanější zárodečné buňky byly semenotvorné kanálky rozděleny do následujících typů: tt0 - spermatogonie, tt1 - spermatocyty, tt2 - kruhové spermatidy, tt3 - prodlužující se spermatidy, tt4 - prodloužené spermatidy. Zvířata tak byla rozdělena do pěti skupin (G0 – G4) podle přítomnosti nejfrekventovanějšího průřezu semenotvorným kanálkem.

#### Statistická analýza

Deskriptivní statistika byla vyjádřena jako průměr a SD. Ke statistické analýze byl použit software Minitab (verze 18.1). Jestliže naměřené hodnoty měly dle testu Kolmogorov-Smirnov normální rozdělení, párový t-test byl u nich použit k porovnání skupin. Neparametrický Mann-Whitney test byl použit v případě, kdy dané hodnoty neměly normální rozdělení. Vzhledem ke kontinuálnímu snižování počtu zvířat byly hladina testosteronu a objem varlat analyzovány v párech s odpovídající skupinou křečků zůstávající v experimentu. V rámci statistické analýzy byla stanovena hladina významnosti: statisticky významná (p < 0,05), statisticky vysoce významná (p < 0,01).

### **Výsledky**

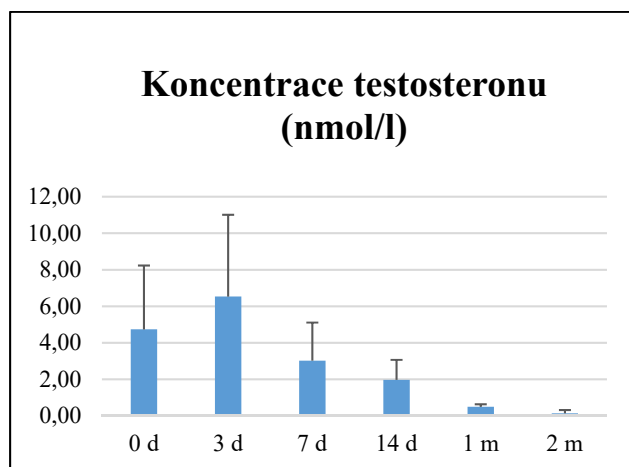
Průměrný objem varlat (cm<sup>3</sup>) byl čtrnáct dní po aplikaci implantátu v porovnání s průměrným objemem varlat před aplikací implantátu snížen o 8,9 % z  $0,79 \pm 0,32$  na  $0,72 \pm 0,18$  (p > 0,05,



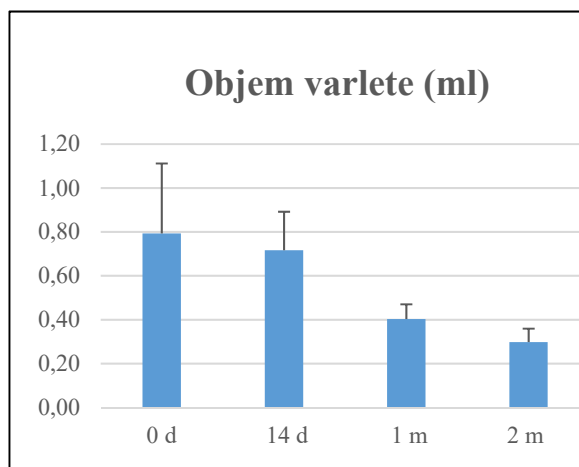
n = 20). Měsíc po aplikaci implantátu došlo k redukci o 49,3 % z  $0,79 \pm 0,32$  na  $0,40 \pm 0,07$  cm<sup>3</sup> ( $p < 0,01$ , n = 20). Druhý měsíc po aplikaci nastalo snížení o 63,9 % z  $0,83 \pm 0,33$  na  $0,30 \pm 0,06$  ( $p < 0,01$ , n = 16).

Třetí den po aplikaci implantátu se průměrná koncentrace testosteronu (T) zvýšila ze  $4,75 \pm 3,75$  na  $6,53 \pm 4,48$  nmol/l ( $p > 0,05$ , n = 20). Sedmý den po implantaci byla hodnota T redukována ze  $4,75 \pm 3,75$  na  $3,02 \pm 2,09$  ( $p > 0,05$ , n = 20). Čtrnáctý den po implantaci došlo k snížení ze  $4,75 \pm 3,75$  na  $1,97 \pm 1,10$  ( $p < 0,01$ , n = 20). Měsíc po aplikaci deslorelinu byla hladina T redukována ze  $4,75 \pm 3,75$  na  $0,49 \pm 0,15$  nmol/l ( $p < 0,01$ , n = 20). Druhý měsíc došlo ke snížení ze  $4,69 \pm 4,21$  na  $0,14 \pm 0,18$  ( $p < 0,01$ , n = 16).

Při histologické analýze příčných řezů stočenými semenotvornými kanálky varlat byly u kontrolní skupiny zvířat nejvíce (93,5 % - 97 %) zastoupené kanálky s prodlouženými spermatidami a křečci zlatí tak byli zařazeni do skupiny G4. První měsíc po aplikaci implantátu převažovaly u dvou křečků prodloužené spermatidy (59,5 % - 91,0 %) a rovněž tato zvířata byla zařazena do skupiny G4. Semenotvorné kanálky u zbývajících dvou křečků vykazovaly znaky potlačení spermatogeneze. Jeden křeček byl zařazen do skupiny G1, z důvodu nejvíce zastoupených kanálků se spermatocyty (41 %). U druhého křečka převládaly kanálky se spermatogoniemi (72 %) a tudíž byl umístěn do skupiny G1. Druhý měsíc u všech křečků došlo k zastavení spermatogeneze na úrovni spermatocytů (53,5 % - 96 %).



**Obr. 1:** Průměrná hladina koncentrace testosteronu (nmol/l) před aplikací Suprelorinu (0. den), po aplikaci 3. den, 7. den, 14. den a 1. měsíc u 20 křečků, 2. měsíc u 16 křečků



**Obr. 2:** Průměrný objem varlete před aplikací Suprelorinu (0. den), po aplikaci 14. den a 1. měsíc u 20 křečků, 2. měsíc u 16 křečků

## Závěr

Třetí den po aplikaci deslorelinu byla pozorována akutní fáze, během které došlo ke zvýšení sekrece testosteronu. Čtrnáctý den bylo zaznamenáno statisticky vysoce významné snížení sekrece, které přetrvávalo i druhý měsíc. Průměrný objem varlat byl druhý měsíc po aplikaci implantátu snížen o 63,9%. Na základě histologického posouzení byli křečci z kontrolní skupina a dva křečci měsíc po aplikaci implantátu zařazeni do skupiny G4. U dvou křečků měsíc po aplikaci a u čtyř po dvou měsících po aplikaci implantátu bylo pozorováno zastavení spermatogeneze na úrovni spermatocytů. Z těchto výsledků usuzujeme na kontraceptivní účinek GnRH agonisty deslorelinu na samce křečka zlatého.

## Seznam použité literatury

1. Schoemaker N, 2018: Gonadotropin – releasing hormone agonists and other contraceptive medications in exotic companion animals; *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 21(2):443-464
2. Herbert C.A, Trigg T.E, Renfree M.B, Shaw G, Eckery D.C, Cooper D.W, 2004: Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Implant on Reproduction in a Male Marsupial, *Macropus eugenii*; *Biol Reprod* 70:1836-1842
3. Grosset C, Peters S, Peron F, Figuera J, Navarro Ch, 2012: Contraceptive effect and potencial side- effects of deslorelin acetate implants in rats (*Rattus norvegicus*): Preliminary observations; *Can J Vet Res* 76:209-214
4. Goericke – Pesch S, Groeger G, Wehrens A, 2015: The effect of a slow release GnRH agonist implant on male rabbits; *Anim Reprod Sci* 152:83 – 89
5. Schoemaker N.J, Deijk R, Muijlaert B, Kik M.J.L, Kuijten A.M, Jong F.H, T.E. Trigg T.E, Kruitwagen C.L.J.J, Mol J.A, 2008: Use of a gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustela putorius furo*); *Theriogenology* 70:161-167
6. Arlt S, Spankowski S, Kaufmann T, Kostelnik K, Heuwieser W, 2010: Fertility control in a male rabbit using a deslorelin implant a case report. *World Rabbit Sci* 18:179-182
7. Edwards B, Smith A, Skinner D, 2013: Dose and durational effects of the gonadotropin-releasing hormone agonist, deslorelin: the male rat (*Rattus norvegicus*) as a model; *J Zoo Wildlife Med* 44(4S):S97-S101

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 121/2018/FVL.**

## **Patologie infekce *Angiostrongylus cantonensis* u modelových ptačích druhů**

Barbora Fecková, David Modrý, Barbora Putnová, Priyanka Djoehana

*Ústav patologické morfologie a parazitologie*

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Vzhledem k výraznému nárůstu popsáných případů u zvířat i lidí a zvětšující se oblasti výskytu se angiostrongylóza řadí mezi významné „emerging diseases“ s dopadem na člověka i domácí a volně žijící zvířata (Barratt et al. 2016). Infekce *Angiostrongylus cantonensis* způsobuje u ptáků závažné poškození centrální nervové soustavy. Paralýzy a parézy byly popsány u řady volně žijících druhů ptáků ve volné přírodě a v zajetí, vysoká patogenita je známa např. pro australské lelouny soví (*Podargus strigoides*) (Monks et al. 2005, Gelis et al. 2011). Cílem studie je popis patologie infekce *Angiostrongylus cantonensis* u modelových ptačích druhů, posouzení vnímavosti různých modelových druhů, zhodnocení klinických projevů, patologicko-morfologického a histopatologického nálezu ve vztahu k infekční dávce.

### **Materiál a metodika**

*Experimentální kmen Angiostrongylus cantonensis:* Na pracovišti udržujeme experimentální linii *Angiostrongylus cantonensis* získanou roku 2017 ve Francouzské Polynésii. Vývojový cyklus je realizován v laboratorních potkanech kmene Wistar a experimentálních plžích *Subulina octona*.

*Infekce:* Devět jedinců od každého z vybraných modelových druhů ptáků (andulka vlnkovaná, křepelka japonská, holub domácí a kur domácí) bylo rozděleno do tří skupin dle infekčních dávek. Skupina č. 1 (nízká dávka) byla infikována dávkou 100 infekčních larev v roztoku PBS sondou do volete. Skupina č. 2 (vysoká dávka) byla infikována dávkou 1000 infekčních larev v roztoku PBS sondou do volete. Skupina č. 3 byla infikována podáním celých infikovaných plžů *Subulina octona* v počtu tří kusů, přibližná infekční dávka 160 larev na šneka. Třem ptákům sloužícím jako negativní kontrola byl naaplikován fyziologický roztok sondou do volete. Dva potkani sloužící jako pozitivní kontrola infekčnosti použitých larev byli infikováni p.o. dávkou 40 larev každý. Po uplynutí prepatentní periody 42 dní byl vyšetřen trus kontrolních potkanů larvoskopickými metodami za účelem detekování přítomnosti L1 larev *Angiostrongylus cantonensis*.

*Klinické sledování:* Denně byl sledován celkový zdravotní stav a chování, příjem potravy, vylučování a celková tělesná kondice. V průběhu závěrečného vyšetření před euthanazií byla sledována schopnost letu, popřípadě chůze, a schopnost a rychlost vzpřímení z rekumbentní polohy.

*Hematologie a biochemie:* Ptákům byla dvakrát odebrána krev pro základní hematologické a biochemické vyšetření (přístroj Vetscan VS2). První odběr byl proveden před infekcí larvami *A. cantonensis*, druhý odběr týden po infekci.

*Pitva a histopatologické vyšetření:* Ptáci byli utraceni týden po infekci předávkováním anestetikem (xylazin + ketamin) i.m a intrakardiální aplikací přípravku T61. Ptáci byli podrobeni diagnostické pitvě, byly odebrány vnitřní orgány (srdce, plíce, játra, ledviny, slezina, GIT, pohlavní orgány, mozek, mícha) a prsní svalovina. Tkáně byly fixovány ve formaldehydu a poté standardně zpracovány, tkáňové řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem a vyšetřeny.

## Výsledky

*Klinické sledování:* Jedna z křepelek ze skupiny negativní kontroly uhynula dva dny po prvotních odběrech krve. Dvě andulky uhynuly krátce po druhém odběru krve. U všech ptáků se po infekci přechodně objevil snížený příjem potravy. Tři z infikovaných kuřat projevovala neurologické příznaky v době před euthanasií. U kuřete č. 2 (nízká dávka) se jednalo o bilaterální záškuby svaloviny stehna, jež se projevovaly po excitaci a po čase ustávaly. Kuře č. 8 (vysoká dávka) se projevovalo zhoršenou rovnováhou a ataxií. Kuře č. 12 (infekce podáním šeků) mělo výrazně prodlouženou dobu návratu z rekumbentní polohy.

*Hematologie:* Výsledky vyšetření krve andulek neukazovalo přítomnost trendů u jednotlivých experimentálních skupin. U pěti experimentálních holubů (ze skupin nízká a vysoká dávka) se projevila eozinofilie. U ostatních sledovaných parametrů se neobjevily trendy v rámci skupin. U křepelek došlo u všech infikovaných skupin ke zvýšení počtu lymfocytů a poklesu počtu heterofilů. U skupiny s vysokou infekční dávkou se dále projevila eozinofilie. U všech skupin infikovaných kuřat byla zaznamenána eozinofilie.

*Pitva:* V průběhu pitvy byla zaznamenána zvýšená fragilita jaterní tkáně u všech kuřat infikovaných podáním celých šeků. U dvou ptáků z této skupiny byly také zaznamenány

nastříknuté cévy na povrchu mozku. U křepelky č. 6 (infekce podáním šneků) byla zaznamenána hyperemie úseku střeva v oblasti jejuno-ileálního spojení o délce cca 2 cm.

U žádného ptáka ze skupin infikovaných podáním celých šneků nebyla zjištěna přítomnost ulit v GIT v době pitvy.

*Histopatologické vyšetření:* V době publikování sborníku byla zpracována polovina histologických preparátů, tj. skupiny holubů a andulek. Histologické preparáty neodhalily přítomnost larev *A. cantonensis* ve vyšetřovaných tkáních. Patologické nálezy u některých infikovaných jedinců zahrnovaly jaterní proliferaci, antrakózu plic a chronickou intersticiální pneumonii, hyperemii ledvin a reaktivní hyperplasií sleziny.

### Závěry

Infekce *Angiostrongylus cantonensis* byla popsána u druhů lelkoun soví (*Podargus strigoides*) (Monks et al. 2005, Gelis et al. 2011), kakadu přílbový (*Callocephalon fimbriatum*) (Reece et al. 2013), kakadu černý (*Calyptorhynchus funereus*) (Monks et al. 2005) a sokolík malý (*Polihierax semitorquatus*) (Burns et al. 2014). Migrace larev nervovou tkání způsobuje u náhodných hostitelů meningitidu a encefalitidu, mezi neurologické příznaky u ptáků postižených neurální angiostrongylózou patří neschopnost sedět na bidle, paralýza křídel, ztížený nebo znemožněný let, třes hlavy a neschopnost ovládat pohyby hlavy, ataxie a deprese. U většiny jedinců v našem experimentu se neprojeví žádné klinické příznaky kromě dočasně sníženého příjmu potravy. Mírné neurologické příznaky projevující se u tří infikovaných kuřat nespádají do typického spektra popisované klinické manifestace neurální angiostrongylózy, ale pravděpodobně jsou jejím projevem u tohoto ptačího druhu.

Ačkoliv je eosinofilie často považována za příznak parazitární infekce, u volně žijících ptáků s neurální angiostrongylózou nebyla dosud popsána. Naopak u nich byla zaznamenána heterofilie, lymfopenie a monocytóza (Monks et al. 2005). Tyto v literatuře popsané nálezy jsou v rozporu s našimi výsledky, kdy u infikovaných křepelk došlo ke zvýšení počtu lymfocytů a poklesu počtu heterofilů. U infikovaných holubů, křepelk a kuřat se dále vyskytovala eosinofilie. Zjistili jsme, že eosinofilie může být považována za další z možných průvodních znaků infekce *A. cantonensis* u ptáků, který lze brát v potaz při diagnostice tohoto onemocnění. Diagnóza neurální angiostrongylózy byla u publikovaných případů převážně stanovena průkazem larev *A. cantonensis* v nervové tkáni. Typickým histopatologickým nálezem byl multifokální granulomatózní zánět CNS. V případě experimentálních andulek a holubů z naší studie nebyly larvy na tkáňových řezech nalezeny a nervová tkáň se jevila bez patologických

nálezů. Nicméně histologické preparáty ze všech ptáků, zejména z kuřat projevujících neurologické příznaky, nebyly v době psaní příspěvku do sborníku zpracovány, a proto nemůžeme s jistotou říci, že léze na nervové tkáni nebyly přítomny.

U žádného z experimentálních ptáků se infekce neprojevila ve stejném rozsahu, jako u případů popisovaných v literatuře. Srovnání výsledků experimentů s publikovanými případy letálních infekcí u australských druhů ptáků naznačuje buďto významné rozdíly ve vnímavosti k infekci *A. cantonensis* mezi ptačími druhy, nebo fakt, že ptáci v tomto experimentu byli vystaveni mnohem nižším infekčním dávkám, než volně žijící druhy. Dávka 1000 L3, jež byla vystavena skupina s vysokou dávkou, je dávkou často letální pro savce o obdobné i větší tělesné hmotnosti, jako je například pískomil (*Meriones unguiculatus*) (Wei et al. 2014), nebo potkan (*Rattus norvegicus*) (Ji et al. 2017). Výsledky experimentu naznačují mnohem vyšší odolnost ptáků vůči infekci *A. cantonensis* ve srovnání s hlodavčími hostiteli.

### **Seznam literatury:**

BARRATT, Joel, Douglas CHAN, Indy SANDARADURA, et al. *Angiostrongylus cantonensis*: a review of its distribution, molecular biology and clinical significance as a human pathogen. In: *Parasitology*. Cambridge University Press, 2016, 143(9), 1087-1118. ISSN 0031-1820.

BURNS, Rachel E, Elizabeth J BICKNESE, Yvonne QVARNSTROM, Marlene DELEON-CARNES, Clifton P DREW, Chris H GARDINER a Bruce A RIDEOUT. Cerebral *Angiostrongylus cantonensis* infection in a captive African pygmy falcon (*Polihierax semitorquatus*) in southern California. In: *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 2014, 26(5), 695-698. ISSN 1040-6387.

GELIS, S, David Michael SPRATT a SR RAIDAL. Neuroangiostrongyliasis and other parasites in tawny frogmouths (*Podargus strigoides*) in south-eastern Queensland. In: *Australian veterinary journal*. Wiley Online Library, 2011, 89(1-2), 47-50. ISSN 0005-0423.

Ji, Liu, Xu YIYUE, He XUJIN, et al. Study on the tolerance and adaptation of rats to *Angiostrongylus cantonensis* infection. In: *Parasitology Research*. Springer, 2017, 116(7), 1937-1945. ISSN 0932-0113..

MONKS, Deborah J, Melissa S CARLISLE, Mark CARRIGAN, Karrie ROSE, David SPRATT, Adrian GALLAGHER a Paul PROCIV. *Angiostrongylus cantonensis* as a cause of cerebrospinal disease in a yellow-tailed black cockatoo (*Calyptorhynchus funereus*) and two tawny frogmouths (*Podargus strigoides*). In: *Journal of Avian Medicine and Surgery*. BioOne, 2005, 19(4), 289-293. ISSN 1082-6742.

REECE, Rod L, RA PERRY a David Michael SPRATT. Neuroangiostrongyliasis due to *Angiostrongylus cantonensis* in gang-gang cockatoos (*Callocephalon fimbriatum*). In: *Australian Veterinary Journal*. Wiley Online Library, 2013, 91(11), 477-481. ISSN 0005-0423.

WEI, Yongfang, Qing HONG, Daixiong CHEN, Chenjie LIANG, Haiying LIU, Xiaodong LUO a Xunmin ZHU. Permissibility of Mongolian gerbil for *Angiostrongylus cantonensis* infection and utility of this animal model for anthelmintic studies. In: *Parasitology Research*. Springer, 2014, 113(5), 1687-1693. ISSN 0932-0113..

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 123/2018/FVL***

# Výskyt četnosti papouščího cirkoviru a polyomaviru a protilátek proti aviárnímu bornaviru v chovech papoušků v ČR

Aneta Puskášová, Michaela Petříková, MVDr. Michaela Valašťanová, MVDr. Libuše Kulíková, Ph.D.

*Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## Úvod

Cirkovirová infekce (PBFD) a polyomavirové infekce jsou závažnými onemocněními v zájmových chovech papoušků.<sup>1</sup> Projevují se především chronickými poruchami opeření, ale mohou mít i závažný klinický průběh, včetně akutních úhynů. Neuropatická gastrická dilatace (NGD) je dalším závažným onemocněním papoušků, které je způsobeno aviárním bornavirem (ABV). Postihuje centrální nervový systém a gastrointestinální systém<sup>2</sup> (dysfagie, regurgitace, přítomnost nestrávených semen v trusu). Klinické příznaky se mohou vyskytovat samostatně nebo v různých kombinacích<sup>3,4</sup>. Od prvních informací z roku 1970 ze Spojených států amerických<sup>5</sup> bylo toto onemocnění zaznamenáno u více než 70 druhů papoušků na celém světě<sup>6</sup>. Cílem projektu je zjištění aktuální situace výskytu těchto onemocnění v chovech papoušků v České republice a zjistit tak riziko prevalence v našich chovech.

## Materiál a metodika

Do studie bylo zahrnuto 177 papoušků od 34 chovatelů v České republice. Jednalo se nejčastěji o papoušky rodu papoušek šedý žako (51), alexandr (44), ara (28), kakadu (18), amazoňan (10), amazónek (9) a menší počet dalších papoušků. Papouškům podle možnosti byla odebrána krev, peří nebo byly provedeny kloakální výtěry. V případech, kdy byla diagnostikována přítomnost všech tří virů, se odebírala krev z v. jugularis či z v. ulnaris. Množství odebrané krve respektovalo mezidruhové rozdíly ve velikosti jedinců. Krev (0,05ml) určená pro vyšetření cirkovirů a polyomavirů byla kápnuta do zkumavek obsahujících roztok EDETA a zbytek minimálně 0,5 ml plné krve (pro získání 0,2 ml séra potřebného pro ELISA reakci) byl určen pro vyšetření bornavirů.

Peří bylo odebráno vyškubnutím 5 až 7 kusů peří z oblasti krku a křídel. Výtěry z kloaky byly provedeny tenkými odběrovými tampóny.



Všech 177 vzorků bylo vyšetřeno na přítomnost viru PBFD a polyomaviru. Při souhlasu chovatelů s odběrem krve či s výtěry z kloaky bylo odebráno 70 vzorků na detekci přítomnosti bornavirů ABV 1, 2 a 4.

Papouščí cirkovirus a polyomavirus byl detekován metodou dvoustupňové nested-PCR ze vzorků krve či peří. Vyšetření na tyto viry probíhalo v laboratoři Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců (VFU Brno). Pro PCR diagnostiku cirkoviru a polyomaviru byla použita kapka plné krve (cca 20  $\mu$ l) smíchaná se 100  $\mu$ l roztoku EDTA nebo několik per z interskapulární oblasti. K průkazu protilátek proti nukleoproteinu aviárního bornaviru P40 byla použita metoda ELISA: naředěný maltózu-vázající protein (MBP) a nukleoprotein P40 jsou aplikovány na destičku pro ELISA test (Costar, Corning, NY) a inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Po hodině inkubace byly buňky plata vymyty pufovacím roztokem PBST (Phosphate-Buffered Saline obsahující 0,05% Tween 20). Poté bylo přidáno naředěné netučné mléko s PBST a inkubováno opět při pokojové teplotě po dobu 2 hodin. Buňky byly opět vymyty PBST a následovala inkubace po dobu 1 hodiny s 50  $\mu$ l séra naředěného v 5% mléčném proteinu s PBST. ELISA destičky byly poté opět vymyty PBST a přidán konjugát označený alkalickou fosfatázou (Macaw IgG Antibody, Cat # A 140-116AP, Bethyl Laboratories INC., Montgomery, TX, USA). Po hodinové inkubaci a dalším promytí ELISA destiček byl přidán substrát pNPP (para-Nitrophenyl-phosphate, P7998, Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, The Netherlands). Po dalších 30 minutách inkubace byly pozorovány barevné změny ve tmě při teplotě 20 °C. Nakonec byly změřeny hodnoty MBP antigenu a P40 antigenu čtecím zařízením Multiscan FC ELISA reader (Thermo Scientific, Finland). Kromě této metody – byla použita též metoda PCR. Jedná se o kvantitativní Real-time PCR, navrženou na kvantitativní detekci ABV viru typu 1,2,4. Celkem bylo vyšetřeno 177 papoušků, z toho 177 na přítomnost cirkoviru a polyomaviru; 70 papoušků na přítomnost cirkoviru + polyomaviru + bornaviru. Z celkového počtu 70 jedinců, u kterých se bornavirus prokázal, byla sérologická diagnostika použita u 33 vzorků. Zbýlých 37 vzorků bylo vyšetřeno metodou PCR z kloakálního stěru. U 107 jedinců, kdy nebyla možnost stanovit přítomnost bornavirů, se přítomnost cirkovirů a polyomavirů diagnostikovala PCR reakcí ze vzorků peří.

### Výsledky

Výsledky vyšetření papoušků jsou znázorněny v tabulce 1. Z celkového počtu 177 vyšetřených papoušků bylo zjištěno, že na cirkoviry je pozitivních 38 ptáků, to je 21,5% a 139 negativních (78,5%). Vyšetření na polyomaviry prokázalo 2 pozitivní zvířata, to je 1,1%

a 175 negativních (98,9%) z celkového počtu vyšetřených zvířat. Z celkového počtu 70 vyšetřených papoušků na bornaviry bylo pozitivních 10 zvířat (14,3%) a negativních 60 (85,7%).

Celkový počet vyšetřených papoušků	Počet pozitivních zvířat na cirkoviry	Počet negativních zvířat na cirkoviry	Počet pozitivních zvířat na polyomaviry	Počet negativních zvířat na polyomaviry	Počet pozitivních zvířat na bornaviry	Počet negativních zvířat na bornaviry
70 Cirkoviry, APV, ABV	2 (2,8%)	68 (97,2%)	0 (0%)	0 (0%)	<b>10 (14,3%)</b>	60 (85,7%)
107 Cirkoviry, APV	36 (33,6%)	71 (66,4%)	2 (1,8%)	105 (98,2%)	-	
<b>177 celkem</b>	<b>38 (21,5%)</b>	139(78,5%)	<b>2 (1,1%)</b>	175(98,9%)	-	

Tabulka 1

Výsledky vyšetření chovů jsou popsány v tabulce č.2. Celkový počet vyšetřených chovů byl 34. Dvanáct chovů (35,3%) z celkového počtu vyšetřených chovů bylo pozitivních na cirkoviry a 22 (64,7%) negativních. Dva chovy, to je 5,8% z celkového počtu vyšetřených chovů bylo pozitivní na polyomaviry a 32 negativních (94,2%). Na bornaviry bylo 6 pozitivních chovů z deseti, to je 60%, negativní 4 (40%).

Celkový počet vyšetřených chovů	Počet pozitivních chovů na cirkoviry	Počet negativních chovů na cirkoviry	Počet pozitivních chovů na polyomaviry	Počet negativních chovů na polyomaviry	Počet pozitivních chovů na bornaviry	Počet negativních chovů na bornaviry
10 (Cirkoviry, APV, ABV)	2 (20%)	8 (80%)	0 (0%)	10 (100%)	<b>6 (60%)</b>	4 (40%)
24 (Cirkoviry, APV)	10 (41,7%)	14 (58,3%)	2 (8,3 %)	22 (91,7%)	-	-
<b>34 celkem</b>	<b>12 (35,3%)</b>	22 (64,7%)	<b>2 (5,8%)</b>	32 (94,2%)	-	-

Tabulka 2

## Závěr

Z celkového počtu 177 kusů vyšetřených papoušků bylo zjištěno 38 papoušků pozitivních na cirkoviry, to je 21,5%. Nejčastěji se jednalo o papoušky z rodu alexandr (25 jedinců). Z celkového počtu 34 chovů bylo na cirkoviry 14 pozitivních, to je 46,6%. Z celkového počtu 177 zvířat byli pouze dva papoušci pozitivní na polyomaviry (1,1%). Z celkového počtu 70 vyšetřených zvířat na bornaviry jich bylo 10 pozitivních, to je 14,3% zvířat. Nejčastěji se jednalo o papouška šedého žaka (6 jedinců). Z celkového počtu 34 chovů bylo celkem 12 chovů (35,3%) pozitivních na cirkoviry, 2 chovy (5,8%) pozitivní na polyomaviry a z deseti vyšetřených chovů bylo 6 pozitivních na bornaviry (60%). Z výsledků vyplývá, že nejvyšší prevalenci u námi vyšetřených papoušků představují cirkoviry 22%, méně bornavirové infekce 14,3% a v minimální míře se v chovech vyskytují polyomavirové infekce (1,1%).

## Seznam literatury

1. Samour J. Avian Medicine, 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, St. Louis 2016, 699
2. Shivaprasad HL, Ganzady Y, Clubb S. Advanced diagnostic approaches and current management of proventricular dilatation disease. Vet.Clin Exot Anim 2010, 13:471-494
3. Gregory CR, Latimer KS, Niagro FD, Ritchie BW, Campagnoli RP, Norton TM, McManamon R, Greenacre CB. A review of proventricular dilatation syndrome, J Assoc Avian Vet 1994, 8:69-75
4. Kolářová M. Retrospektivní analýza případů neuropatické gastrické dilatace papoušků – pacientů Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců. Odborná práce. Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. 2008, 51s.
5. Clark FD. Proventricular dilatation syndrome in large psittacine birds. Avian Diseases 1984, 28:813-815
6. Hoppes SM, Tizard L, Shivaprasad HL. Avian Bornavirus and Proventricular Dilatation Disease: Diagnostics pathology, prevalence and control. Vet Clin Exot Anim 2013, 16:339-355

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 102/2018/FVL*

## **Detekce mikrobiální populace kolonizující pohlavní aparát oslic**

Eliška Horáčková, Miroslava Mráčková, Tereza Vítková, Lenka Svobodová, Markéta Sedlinská

*Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita  
Brno*

### **Úvod**

Význam studie reprodukčního aparátu u oslů je dán stoupající tendencí jejich chovu jako zájmového zvířete nejen na území ČR (ÚEK uvádí více než 1000 jedinců osla domácího, desetinasobný nárůst v průběhu posledních let), ale tuto tendenci potvrzují i studie v mezinárodním měřítku (Camillo et al. 2017). Přestože evoluční příbuznost oslů a koní je zřejmá, odlišnosti, jak v anatomickém utváření reprodukčních orgánů, tak ve fyziologii říjového cyklu, způsobují významné odchylky, které je nutné v diagnostice a terapii zohledňovat (Contri et al. 2014). Vědeckých studií ozřejmujících problematiku reprodukce klisen je mnoho, ale výzkumy zaměřené speciálně na samice osla domácího jsou stále pouze ojedinělé. Nicméně již nalezené faktory ovlivňující fertilitu klisen budou s nejvyšší pravděpodobností ovlivňovat i reprodukci u oslic.

Předmětem studie je problematika příčin infekcí reprodukčního aparátu. U subfertilních klisen často nacházíme defektní utváření perineální oblasti, nedostatečnou funkci krčku děložního, sníženou aktivitu myometria nebo také sníženou schopnost imunitní reakce na děložní kontaminaci fakultativně patogenními bakteriemi, jako například *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, nebo *Escherichia coli*. Tyto patologické vlastnosti perineální oblasti predisponují klisny k rozvoji endometritidy. Endometritida je diagnostikována u 25-60 % chovných klisen a je to jeden z hlavních důvodů snížené fertility klisen (Riddle et al. 2007, Overbeck et al. 2011). Zmapování mikrobiálního osídlení pohlavního aparátu oslic není dosud v dostatečném rozsahu publikováno. Pokud je nám známo, publikovány byly pouze studie popisující bakteriální populaci na vnějších genitáliích u samců osla domácího a studie z roku 1985 popisující experimentální infekci oslic bakterií *Haemophilus equigenitalis* (*Taylorella equigenitalis* – původce CEM) (Timoney et al. 1985).

Hlavním cílem projektu bylo zmapování mikrobiální populace kolonizující pohlavní aparát oslic v různých fázích říjového cyklu a v závislosti na utváření perineální oblasti. Dílčím cílem předkládané studie bylo ověření hypotézy, že fyziologické změny průchodnosti

pohlavních cest v estru umožňují rozsáhlejší bakteriální kolonizaci a tím představují i vyšší míru rizika rozvoje endometritid.

## **Materiál a metodika**

### **Pokusná zvířata**

Do projektu bylo zařazeno 10 pohlavně dospělých oslic ve stáří 3-12 let, ustájených u soukromých chovatelů (sedm oslic na Ekofarmě Jalový Dvůr v Heršpicích, 1 oslice na Ranči Valkýra v Hustopečích a 2 oslice na farmě Oveko v Malměřicích). Oslice byly drženy na travnaté pastvině a byl jim umožněn neomezený přístup k vodě. Projekt pokusu byl schválen rozhodnutím Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy pod číslem jednacím: MSMT-28509/2018-2.

### **Odběr vzorků**

U každé oslice bylo pečlivě provedeno a zaznamenáno gynekologické vyšetření (zevní posouzení perinea, vaginoskopie a palpace děložního krčku, rektální USG vyšetření – zhodnocení vaječnicků a dělohy). Oslice byly minimálně 2x vyšetřeny a to tak, aby se zachytily obě fáze říjového cyklu – estrus i diestrus. Po zhodnocení fáze cyklu byla perineální oblast vydezinfikována a připravena na odběr vzorků. U oslic v estru bylo odebráno 9 vzorků (3 z *fossa clitoridis*, 2 z okolí krčku děložního a 4 z endometria). U oslic v diestru bylo odebráno 5 vzorků (3 z *fossa clitoridis* a 2 z okolí krčku děložního). Odebrané vzorky byly bezprostředně po odběru transportovány v chladicím boxu do mikrobiologické laboratoře. Část odebraného materiálu byla stejný den odeslána do akreditované laboratoře SVÚ Olomouc za účelem identifikace *T. equigenitalis*. Cytologické preparáty stěrů děložních byly posuzovány mikroskopicky.

### **Mikrobiologické vyšetření**

Mikrobiologické vyšetření bylo provedeno v laboratořích Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie VFU Brno. Odebraný materiál byl paralelně kultivován na univerzálních bakteriologických půdách (Columbia Blood Agar) i na výběrově-diagnostických médiích (Rappaport- Vassiliadisovo polotuhé médium, XLD agar, McConkey agar), (vše Oxoid, Velká Británie), jak za aerobních, tak anaerobních podmínek při 37 a 42 °C 24 – 48 hodin. Získané

bakteriální kultury byly předběžně identifikovány dle charakteristické morfologie kolonií a kvantifikovány. Definitivní identifikace izolovaných mikroorganismů na úrovni druhu byla realizována analýzou hmotnostních spekter jejich proteinů metodou MALDI – TOF přístrojem Microflex LT MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Německo). Pro záchyt původce infekční metritidy klisen *Taylorella equigenitalis* byly odeslány vzorky z *fossa clitoridis* do akreditované laboratoře SVÚ Olomouc.

### Výsledky

Souhrn informací získaných zevním posouzením perineální oblasti u oslic popisuje vhodné utváření u všech oslic zařazených do projektu. Vulva byla u většiny oslic kolmo k zemi nebo dokonce ventrokránialně zkosená. Sedací kosti byly u oslic nad úrovní dorzální komisury štěrbinou stydké. Palpací děložního krčku byla u dvou oslic zjištěna neprostupnost, proto nebyly vzorky z endometria od těchto oslic získány.

Z pohlavního aparátu oslic, konkrétně z *fossa clitoridis*, okolí děložního krčku a endometria, jsme izolovali 62 různých druhů mikroorganismů náležících do 19 odlišných bakteriálních rodů. Ty zahrnovaly jednak mikroby běžně osidlující trávicí aparát a kůži zvířat, ale také potenciální urogenitální patogeny a mikroorganismy environmentálního původu. Jmenovitě byly získány tyto rody bakterií: *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Arcanobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Neisseria*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*). U všech vzorků byla vyloučena přítomnost původce infekční metritidy klisen, *T. equigenitalis*, stejně jako etiologických agens salmonelových abortů klisen.

V jednotlivých etážích pohlavního aparátu oslic jsme zaznamenali tyto posuny v kvantu izolovaných mikroorganismů: ke zvýšení počtu CFU v estru v porovnání s diestrem došlo u pěti oslic. U jedné oslice množství bakterií zůstalo stejné v obou sledovaných obdobích a u čtyř vyšetřovaných zvířat počet CFU v estru naopak klesl. Vyšší počet CFU zachycených v okolí krčku oslic v estru než v diestru byl zaznamenán u pěti oslic. U tří jedinců ke změně počtu CFU nedošlo, přesněji všechny porovnávané vzorky z oblasti krčku jak v diestru tak v estru byly bez bakteriálního nárůstu. U jednoho zvířete došlo v estru naopak ke snížení počtu CFU. Vzorky endometria byly odebírány pouze v estru, u čtyř oslic byly sterilní, u dalších čtyř obsahovaly od deseti do 50 CFU, u posledních dvou oslic se odběr nezdařil.

Cytologické vyšetření stěrů z dělohy neprokázalo u žádné oslice přítomnost zánětlivých buněk ani patogenů.

Tabulka č.1: Výsledky mikrobiologického vyšetření jednotlivých úseků pohlavního aparátu oslic v diestru a estru

Oslice	Diestrus			Estrus			
	Fossa clitoridis kvantitativně (CFU/ml)	Krček děložní kvantitativně (CFU/ml)	Vyšetření na Taylorella equigenitalis (kvalitativně)	Fossa clitoridis kvantitativně (CFU/ml)	Krček děložní kvantitativně (CFU/ml)	Endometrium (CFU/ml)	Vyšetření na Taylorella equigenitalis (kvalitativně)
Sofie	0	0	neg	40	neodebráno	neodebráno	neg
Valetýna	96	0	neg	810	20	10	neg
Mia	310	2130	neg	30	120	20	neg
Dorotka	200	30	neg	10	60	50	neg
Bobina	2570	0	neg	580	10	neodebráno	neg
Márinka	300	0	neg	1620	0	0	neg
Eliška	30	0	neg	30	0	0	neg
Lady	1840	0	neg	240	0	0	neg
Blondie	60	190	neg	730	510	40	neg
Anna	8550	0	neg	17000	20	0	neg

### Závěr

Výsledkem projektu je zmapování mikrobiálního osídlení endometria a vývodných cest pohlavních u samic osla domácího. Hypotéza, že míra kontaminace bakteriemi souvisí s utvářením perineální oblasti a fází říjového cyklu, se potvrdila pouze částečně, neboť všechny náhodně vybrané oslice do projektu měly vhodné utváření perinea, které významně snižuje riziko vzniku endometritidy. Nebylo tedy možné posoudit míru bakteriální kontaminace urogenitálního traktu u oslic s vadným utvářením perinea. U 6 oslic z 10 jsme pozorovali změny počtu CFU zachycených v okolí krčku v různých fázích říjového cyklu. U 1 oslice z 6 bylo zjištěno zvýšení počtu jednotek tvořících kolonie v diestru. U 5 oslic z 6 bylo zjištěno zvýšení počtu jednotek tvořících kolonie v estru. U oslic, kde došlo k záchytu potencionálních patogenů (*E.coli*, *Streptococcus Equi subsp. Zooepidemicus*, *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*) nebyly pozorovány žádné klinické ani cytologické příznaky endometritidy. Oslice po ukončení projektu bez obtíží zabřezly. Porovnáním nálezů gynekologického a mikrobiologického vyšetření v estru a diestru u jednotlivých oslic byly zaznamenány očekávané rozdíly, které souvisí a potvrzují teorii větší možnosti kontaminace mikroorganismy u klisen v estru. Nicméně standardně fyziologické utváření perineální oblasti u oslic na rozdíl od klisen vede k výrazně úspěšnější ochraně vnitřních pohlavních cest proti mikrobiální kontaminaci.

**Seznam literatury:**

Camilo F, Rota A, Biagini L, Tesi M, Fanelli D, Panzani D 2017: The Current Situation and Trend of Donkey Industry in Europe. J Equine Vet Sci In press.

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.11.008>

Contri A, Robbe D, Gloria A, De Amicis I, Veronesi MC, Carluccio A 2014: Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. Theriogenology 81: 657–661.

Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W 2011: Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. Theriogenology 75: 1311-1318.

Riddle WT, Leblanc MM, Stromberg AJ 2007: Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. Theriogenology 68: 395-402.

Timoney PJ, O'Reilly PJ, McArdle JF, Ward J, Harrington AM, 1985: Contagious equine metritis: experimental infection in the donkey. Vet. Microbiol. 10: 259–268.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 109/2018/FVL*



# **Zavedení nových laboratorních metod pro diagnostiku sarkoidu u koní a charakteristika původců na úrovni genomu.**

Ronen Hoikhman, Andrea Kopecká, Olga Dobešová, Petr Jahn

*Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická*

*univerzita Brno<sup>1</sup>*

## **1. Úvod**

Equinní sarkoid je lokálně agresivní fibroblastický kožní tumor a nejčastější tumor koní s celosvětovým výskytem (Regland et al. 1966, Marti et al. 1993). Tyto tumory mohou nepříznivě ovlivňovat hodnotu koně, často znemožňují jeho využití a v krajním případě mohou být příčinou eutanázie koně. Z těchto důvodů je equinnímu sarkoidu věnována pozornost ze strany chovatelů i výzkumníků na celém světě (Scott et al. 2011, Torrontegui and Reid, 1994, Knottenbelt et al. 2015).

V loňském roce byla v rámci projektu IGA provedena pilotní studie, při níž bylo vyšetřeno 524 koní pro orientační posouzení výskytu equinního sarkoidu v populaci koní v ČR. Tato studie prokázala, že prevalence equinního sarkoidu v ČR se pohybuje kolem 10 %. Kromě posouzení epizootologické situace byl vyvinut test pro posouzení prevalence bovinního papilomaviru u koní a jeho typizaci (Taylor et al. 2012, Knottenbelt et al. 2015) a dále sérologický test pro stanovení specifických protilátek. Očekává se, že tyto testy doplní a zpřesní klinickou diagnostiku sarkoidů, která je založena na klinickém posouzení kožních změn zkušeným dermatologem (Haspesslagh et al. 2018), případně kožní biopsii, která je spojena s rizikem nekontrované proliferace nádoru.

Jako vhodné diagnostické testy byla zvolena metoda real-time PCR vyšetření kožních stěrů s detekcí RNA a DNA a dále ELISA test pro průkaz protilátek proti nádorovému onkoproteinu E5. Teno onkoprotein je typem transmembránového proteinu II, který je exprimován v hlubších epiteliálních vrstvách infikované tkáně (Burnett et al. 1992, Venuti and Campo 2002) a převážně lokalizován v membránách endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu (Burkhardt et al. 1989, Pennie et al. 1993). BPV E5 je exprimován v cytoplazmě transformovaných bazálních a suprabazálních epiteliálních buněk (Bohl et al. 2001, Araibi et al. 2004). Expres tohoto onkoproteinu spolu s expresí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, která vede k neovaskularizaci pro nutriční zajištění tumoru nás vede k úvaze, že v organismu mohou být přítomny protilátky proti E5 onkoproteinu, které by bylo možno využít pro diagnostiku (Borzacchiello et al. 2008, Martano et al. 2018).

## 2. Materiál and metody

### 2.1. Odběr vzorků

Do studie byli zařazeni koně různých plemen, náhodně vybraní v několika stájích a dále pacienti Kliniky chorob koní VFU Brno. U majitelů jednotlivých koní nebo manažerů stáje byl získán souhlas s klinickým vyšetřením a případným odběrem materiálu od suspektních případů. U každého koně byla zaznamenána plemenná příslušnost a další národnosti. Majitel koně, případně manažer stáje byl dotazován na přítomnost podezřelých kožních eflorescencí u každého koně. Poté bylo provedeno klinické dermatologické vyšetření celého povrchu a hlavně predilekčních míst (hlava, krk, ventrální strana hrudníku a břicha, okolí genitálií, případně oblast se starším poraněním). U koní s klinickou diagnózou sarkoid nebo suspektní sarkoid byla pořízena fotodokumentace a byly u nich odebrány vzorky (suchý kožní stěr z místa eflorescence, dvě zkumavky srážlivé krve pro získání séra a jedna zkumavka s obsahem EDTA). U vybraných koní byly odebrány i vzorky z intaktní kůže v blízkosti léze. Naplněná zkumavka s obsahem EDTA a kožní stěr byly nejpozději do 10 hodin zmrazeny na teplotu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Srážlivá krev byla ponechána ve zkumavce přes noc v laboratorní teplotě. Druhý den byla krev centrifugována a separované sérum zmrazeno na  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2. PCR test

Z odebraných stěrů byly izolovány nukleové kyseliny DNA i RNA. Z nich byla provedena real-time PCR (v oblasti onkogenů) na průkaz DNA viru za pomoci interkalační barvy SYBR Green, která umožňuje po analýze křivky tání odlišit eventuální variabilitu kmenů viru.

Zároveň byl každý vzorek podroben real-time PCR na přítomnost buněčné DNA (gen SDHA) pro kontrolu dostatečného množství setřeného buněčného materiálu.

Vzorky pozitivní na přítomnost virové DNA byly zbaveny veškeré DNA komerčním kitem pro izolaci RNA a přešetřeny na přítomnost mRNA virového onkogenu pro odlišení pasivně (hmyzem) přeneseného viru od viru jako kauzálního agens.

Ze vzorků pozitivních na DNA byl naamplifikován pomocí konvenční PCR úsek DNA vhodný pro sekvenční odlišení BPV-1 a BPV-2 (oblast genu pro L2). Takto získaná DNA byla odeslána na sekvenování (a v současné době se čeká na získané sekvence a jejich analýzu).

### 2.3. ELISA

Ke zjištění imunologického markeru bude využita reakce případných protilátek se strukturálním onkoproteinem E5, který se objevuje během ranných stádií proliferace tumoru jako potenciální antigen. Vzorky séra pozitivních koní (koní s klinickou diagnózou equinní sarkoid) budou testovány metodou ELISA na přítomnost protilátek proti dvěma hypoteticky imunogenním částem komerčně dodaného onkoproteinu E5 (N-terminální a C-terminální oligopeptid).

### 3. Výsledky a diskuse

Celkem bylo klinicky vyšetřeno 1 107 koní z různých stájí v ČR. Počty koní v rámci jednotlivých plemen uvádí Tab. 1.

Tab. 1. Zastoupení jednotlivých plemen a počty vyšetřených koní v rámci každého plemene.

Plemeno	Počty koní		Plemeno	Počty koní
Český teplokrevník	268		Slezský norik	12
Anglický plnokrevník	233		Lipicán	11
Starokladrubský kůň	170		Kůň Kinski	11
Hannoverský kůň	105		Hafling	11
Appaloosa	66		Pony	11
Teplokrevník	35		KWPN	10
Shagya arab	29		Fríský kůň	7
Arabský plnokrevník	26		Českomoravský belgik	2
Hucul	23		Andaluský kůň	2

Kříženec	22		Angloarab	2
Klusák	20		Akhalteke	1
Paint horse	16			
Quarter horse	14			

Celkem 109 vzorků bylo vyšetřeno v laboratoři metodou real-time PCR. V 54 vzorcích, s klinickou diagnózou equinní sarkoid byl prokázán BPV. U 16 vzorků s klinickou diagnózou equinní sarkoid nebyl prokázán BPV, u 4 byl výsledek dubiozní. U 18 vzorků se suspektní klinickou diagnózou equinní sarkoid, nebo intaktní kůže či kůže po terapii nebyl prokázán BPV. U 16 vzorků s klinickou diagnózou equinní sarkoid bylo metodou real-time PCR na gen pro SDHA zjištěno nedostatečné množství DNA pro analýzu.

Výsledky potvrzují přítomnost BPV u velké části vzorků od koní s klinickou diagnózou sarkoid. Negativní výsledky u koní s klinicky suspektním sarkoidem mohly být způsobeny nedostatečným množstvím setřeného buněčného materiálu, rozpadem DNA během transportu či skladování nebo jinou metodickou chybou. Negativní výsledek u vzorků z intaktní kůže a jiných lézí s teoretickou diferencíální diagnózou equinní sarkoid podporuje myšlenku využití této metody v praxi. S přibývajícím metodickými zkušenostmi lze předpokládat standardizaci jednotlivých diagnostických kroků a vyšší shodu klinické a laboratorní diagnózy tak, aby tato metoda mohla být efektně využívána jako součást rutinního diagnostického postupu.

#### 4. Literatura

Angelos J., Oppenheim Y., Rebhun W., Mohammed H. and Antczak D. F., 1988. Evaluation of breed as a risk factor for sarcoid and uveitis in horses. *Animal Genetics*. 19: 417 – 425.

Araibi E.H., Marchetti B., Ashrafi G.H. and Campo M.S., 2004. Downregulation of major histocompatibility complex class I in bovine papillomavirus. *J. of General Virology*, 85: 2809 - 2814

Bohl J., Hull B. and Vande pol S. B., 2001. Cooperative transformation and coexpression of bovine papillomavirus type I E5 and E7 proteins. *J. of General Virology*. 75: 513 – 521.

- Borzacchiello G., Russo V., Della Salda L., Roperto S and Roperto F., 2008. Expression of the platelet derived growth factor  $\beta$  receptor and bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in equine sarcoids. *J. Comp. Path.* 139: 231 - 237
- Burkhardt A., Willingham M., Gay C., Jeang K.T. and Schlegel R., 1989. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology.* 170: 334 – 339
- Burnett S., Jareborg N. and DiMaio D., 1992. Localization of bovine papillomavirus type I E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proceedings of the national academy of science of the USA*, 89: 5665 – 5669
- Jandova V., Klukowska-Rötzler J., Dolf G., Janda J., Roosje P., Marti E., Koch C., Gerber V., Swinburne J., 2012. Whole genome scan identifies several chromosomal regions linked to equine sarcoid. *Schwartz. Arch. Tierheilk.* 154: 19 – 25.
- Knottenbelt D. C., Patterson –Kate J. C., Snalune K. L. 2015. Sarcoids. In *Clinical Equine Oncology*. Elsevier. Pp 203 – 219.
- Martano M., Poer K., Redtucci B., Pagano I., Altamura G., Borzacchiello G. and Maiolino P., 2018. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in equine sarcoid. *BMC Vet. Research*, 14: 266
- Marti E., Lazary S., Antczak D.F. and Gerber H., 1993. Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine vet. J.* 25: 397 – 407.
- Mohammed H.O., Rebhun W.C. and Antczk D.F., 1992. Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses. *Equine. Vet. J.* 24: 165 – 168.
- Pennie W.D., Grindlay G. J., Cairney M. and Campo M.S., 1993. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology*, 193: 614 – 620.
- Regland W. L., Keown G.H. and Gorham J. R., 1966. An epizootic of equine sarcoid. *Nature* 210: 1399.
- Scott D.W. and Miller W. H. J., 2011. Neoplasms, Cysts, Hamartomas and Keratoses. In *Equine Dermatology*. Elsevier. Pp 479 – 488.

Staiger E. A., Tseng C. T., Miller D., Cassano J. M., Nasir. L., Garrick D., Brooks S. A. and Antczak D. F., 2016. Host genetic influence on Papillomavirus – induced tumors in the horse. *Int. J. Cancer.* 139: 784 – 792.

Taylor S. and Haldorson G., 2013. A review of equine sarcoid. *Equine vet. Edu.* 25: 210 – 216.

Torrontegui B. O. and Reid S.W.J., 1994. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet. Edu.* 6: 85 – 88.

Venuti A. and Campo M.S., 2002. The E5 protein of papillomavirus. *Human Papillomavirus – prespectives in medical virology*, D. McCance Ed., Esevier Science B.V., Amsterdam, pp 143 - 164

Wobeser B.K., Davies J. L., Hill J. E., Jackson M. L., Kidney B. A., Mayer M. N, Townsend H.G.G., Allen A. L., 2010. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. *Can. Vet. J.*, 51: 1103 – 1108.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 115/2018/FVL***

## **Změny vybraných biochemických parametrů ve folikulární tekutině a krvi v různých stádiích folikulárního vývoje u skotu.**

Eva Indrová<sup>1</sup>, Ivana Šimková<sup>1</sup>, Ivo Tejnil<sup>1</sup>, Vanessa Zaalof<sup>2</sup>

*Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, student 5. ročníku, Fakulta veterinárního lékařství<sup>2</sup>*

### **Úvod**

Folikulární tekutina (FT) je exsudát séra a také je částečně složena z látek, které souvisejí s metabolickou aktivitou folikulárních buněk. Folikulární tekutina může sloužit jako dobrý index funkčního stavu ovariálního folikulu, neboť má velmi těsný kontakt s kumulárními buňkami oocyty (1). Současně také hraje hlavní roli v autokrinní a parakrinní regulaci a také ve fyziologických, biochemických a metabolických aspektech jaderného a cytoplasmatického zrání oocytů a procesu ovulace. Jakékoliv změny ve folikulární tekutině mohou tedy mít výrazný vliv na tyto procesy (2). Většina pokusů zabývajících se složením FT zkoumá právě negativní vlivy působící na její složení. Výsledky popisující fyziologické hodnoty biochemických parametrů ve folikulární tekutině nejsou příliš ucelené. Ve většině studií zkoumajících fyziologické hodnoty biochemických parametrů ve FT u skotu bývají vzorky odebírány z vaječníků na jatkách, což může přinášet zkreslené výsledky. Cílem naší práce bylo zjistit fyziologické hodnoty vybraných biochemických parametrů ve FT u jalovic v různých stádiích folikulárního vývoje (říjový folikul, dominantní folikul, říjový superovulovaný folikul) odebírané pomocí transvaginální aspirace in vivo, porovnat hodnoty těchto parametrů s krví a současně zjistit případné rozdíly mezi složením FT ve sledovaných stádiích folikulárního vývoje.

### **Materiál a metodika**

Pokus byl proveden na 5 jalovicích (450 kg  $\pm$  30 kg) ustájených v prostorách Kliniky chorob přežvýkavců a prasat VFU Brno. Všechna zvířata byla krmena stejnou krmnou dávkou o přesně definovaném složení a senem ad libitum. Krev byla odebírána prostou venepunkcí v. *jugularis*, FT byla odebírána transvaginální punkcí vaječníků modifikovaným aspiračním zařízením po předchozím epidurálním znecitlivění 3,5 ml lidokainu (Lidocaine 2% inj., Fatro). První vzorky FT byly odebírány z říjového a dominantního folikulu. Byla provedena předsynchronizace aplikací cloprostenolu (Clop) v dávce 500  $\mu$ g pro toto i.m. (Estrumate inj., MSD Animal Health). Za 11 dnů byla aplikace Clop opakována a za 48 hodin byla provedena aspirace

říjového folikulu a odebrána krev. Následně byl 7. den po říji aspirován dominantní folikul a odebrána krev. Výše popsáný postup, již bez předsynchronizace, byl 1x opakován. Následně prošly jalovice jedním přirozeným cyklem a byla provedena předsynchronizace, po níž následovala indukce superovulace aplikací FSH/LH v celkové dávce 345 µg FSH i.m., *pro toto* (Pluset, Calier SA) v osmi klesajících dávkách ve dvanáctihodinových intervalech, den 0 (D0 = den zahájení indukce superovulace) až den 3 (D3), a současně byla indukována říje aplikací Clop v D2. V čase říje (D4) byl odebrán vzorek folikulární tekutiny a periferní krev. Proces předsynchronizace a superovulace s odběry byl následně 1x opakován. Vzorky FT byly ihned odstředěny, sérum a supernatant FT byly následně vyšetřovány na vybrané biochemické ukazatele: celková bílkovina, urea, kreatinin, bilirubin, alkalická fosfatáza (ALP), aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT) gamaglutamyltransferáza (GMT), laktátdehydrogenáza (LDH), glukóza, neesterifikované mastné kyseliny (NEMK), betahydroxybutyrát (BHB), triglyceridy, cholesterol, sodík (Na), draslík (K), vápník (Ca), fosfor (P) a hořčík (Mg). Celkem bylo vyšetřováno 10 vzorků FT z říjového folikulu, 10 vzorků FT z dominantního folikulu a 10 vzorků z říjového superovulovaného folikulu spolu s příslušnými vzorky krve.

### Výsledky

V pokusu byly nejprve porovnávány hodnoty vybraných metabolických ukazatelů v krvi a FT v různých stádiích folikulárního vývoje (tab. 1). Statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí Studentova t- testu. Dále byly vyhodnocovány rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi folikulů (tab. 2), pro vyhodnocení byla použita dvoufaktorová analýza rozptylu (ANOVA) a následně Tukey HSD test. Současně byly vyhodnoceny i závislosti mezi krví a FT u jednotlivých parametrů pomocí lineární regrese. Statisticky signifikantní ( $p \leq 0,05$ ) korelační koeficient mezi krví a FT byl zjištěn u bilirubinu, urey a GMT u všech kategorií folikulů. Dále byla zjištěna statisticky signifikantní korelace mezi krví a FT říjového folikulu u kreatininu, ALP, Ca, Mg, cholesterolu a BHB. Hodnoty celkové bílkoviny, kreatininu, ALP, AST, LDH, P, cholesterolu, BHB signifikantně korelovaly mezi krví a FT dominantního folikulu.



**Tab. 1. :** Výsledky všech vyšetřovaných biochemických parametrů v krvi a folikulární tekutině v říjovém, dominantním a říjovém-superovulovaném folikulu.

	říjový folikul		říjový - superovul. folikul		dominantní folikul	
	krev	FT	krev	FT	krev	FT
<b>CB (g/l)</b>	78,47 ± 4,40	61,87 ± 4,76***	78,25 ± 4,14	59,10 ± 2,74***	76,18 ± 4,36	59,15 ± 4,00***
<b>Bil (μmol/l)</b>	3,23 ± 2,57	2,31 ± 2,47**	6,90 ± 5,75	5,86 ± 4,75*	3,34 ± 1,20	2,29 ± 0,95***
<b>Krea (μmol/l)</b>	139,98 ± 31,53	128,23 ± 30,74**	149,64 ± 31,13	140,48 ± 17,91	111,74 ± 29,05	97,70 ± 27,71***
<b>Glu (mmol/l)</b>	4,07 ± 0,36	4,16 ± 0,44	4,19 ± 0,22	3,61 ± 0,62*	4,15 ± 0,27	4,67 ± 0,27***
<b>Urea (mmol/l)</b>	2,18 ± 0,62	2,00 ± 0,57*	2,16 ± 0,49	2,33 ± 0,55	2,13 ± 0,50	1,97 ± 0,60
<b>ALP (μkat/l)</b>	2,25 ± 0,90	1,27 ± 0,57***	2,67 ± 0,71	1,32 ± 0,29**	2,65 ± 0,65	2,28 ± 1,43
<b>ALT (μkat/l)</b>	0,49 ± 0,09	0,58 ± 0,26	0,59 ± 0,09	0,53 ± 0,08	0,42 ± 0,03	0,48 ± 0,11
<b>AST (μkat/l)</b>	1,20 ± 0,19	1,39 ± 0,37	1,20 ± 0,21	1,20 ± 0,18	1,20 ± 0,20	1,18 ± 0,26
<b>GGT (μkat/l)</b>	0,36 ± 0,06	0,25 ± 0,05***	0,33 ± 0,05	0,22 ± 0,03***	0,38 ± 0,11	0,27 ± 0,06**
<b>LDH (μkat/l)</b>	16,09 ± 5,00	12,91 ± 4,18	26,24 ± 12,66	13,53 ± 2,94*	18,77 ± 3,75	14,07 ± 2,15***
<b>Na (mmol/l)</b>	141,27 ± 3,77	144,27 ± 4,43	140,88 ± 3,09	156,75 ± 20,84	144,82 ± 2,36	142,09 ± 6,38
<b>K (mmol/l)</b>	4,31 ± 0,29	4,10 ± 0,18	4,28 ± 0,36	4,11 ± 0,93	4,53 ± 0,45	4,34 ± 0,44
<b>Ca (mmol/l)</b>	2,41 ± 0,13	2,19 ± 0,15***	2,41 ± 0,15	2,75 ± 0,70	2,31 ± 0,10	2,42 ± 0,26
<b>P (mmol/l)</b>	2,19 ± 0,25	2,50 ± 0,15**	2,14 ± 0,31	2,45 ± 0,33*	2,41 ± 0,33	2,74 ± 0,20**
<b>Mg (mmol/l)</b>	0,82 ± 0,05	0,72 ± 0,05***	0,79 ± 0,05	0,80 ± 0,13	0,78 ± 0,04	0,77 ± 0,08
<b>Chol (mmol/l)</b>	2,11 ± 0,55	0,69 ± 0,12***	2,33 ± 0,42	0,76 ± 0,18***	1,93 ± 0,35	0,78 ± 0,19***
<b>TG (mmol/l)</b>	0,20 ± 0,07	0,12 ± 0,16	0,22 ± 0,06	0,03 ± 0,01***	0,19 ± 0,05	0,16 ± 0,20
<b>BHB (mmol/l)</b>	0,27 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,05*	0,26 ± 0,05	0,34 ± 0,07***
<b>NEMK(mmol/l)</b>	0,32 ± 0,29	0,16 ± 0,11	0,26 ± 0,15	0,08 ± 0,03**	0,33 ± 0,27	0,17 ± 0,05

celková bílkovina (CB), kreatinin (Krea), bilirubin (Bil), alkalická fosfatáza (ALP), alaninaminotransferáza (ALT) aspartát aminotransferáza (AST), gamaglutamyltransferáza (GMT), laktátdehydrogenáza (LDH), glukóza (Glu), neesterifikované mastné kyseliny (NEMK), betahydroxybutyrát (BHB), triglyceridy (TG), cholesterol (Chol)

\*\*\* p ≤ 0,0001, \*\* p ≤ 0,01, \*p ≤ 0,05

Pro lepší přehlednost výsledků jsou statisticky signifikantní rozdíly mezi krví a FT barevně odlišeny.

**Tab. 2:** Porovnání všech biochemických parametrů folikulární tekutiny v říjovém, dominantním a říjovém-superovulovaném folikulu.

	říjový	superovulace-říje	dominantní
CB(g/l)	61,87 ± 4,76	59,10 ± 2,74	59,15 ± 4,00
Bil (μmol/l)	2,31 ± 2,47 <sup>a</sup>	5,86 ± 4,75 <sup>a,b</sup>	2,29 ± 0,95 <sup>b</sup>
krea(μmol/l)	128,23 ± 30,74 <sup>a</sup>	140,48 ± 17,91 <sup>b</sup>	97,70 ± 27,71 <sup>a,b</sup>
Glu(mmol/l)	4,16 ± 0,44 <sup>a,b</sup>	3,61 ± 0,62 <sup>a,c</sup>	4,67 ± 0,27 <sup>b,c</sup>
Urea(mmol/l)	2,00 ± 0,57	2,33 ± 0,55	1,97 ± 0,60
ALP(μkat/l)	1,27 ± 0,57 <sup>a</sup>	1,32 ± 0,29	2,28 ± 1,43 <sup>a</sup>
ALT(μkat/l)	0,58 ± 0,26	0,53 ± 0,08	0,48 ± 0,11
AST(μkat/l)	1,39 ± 0,37	1,20 ± 0,18	1,18 ± 0,26
GGT(μkat/l)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,27 ± 0,06
LDH(μkat/l)	12,91 ± 4,18	13,53 ± 2,94	14,07 ± 2,15
Na(mmol/l)	144,27 ± 4,43	156,75 ± 20,84 <sup>a</sup>	142,09 ± 6,38 <sup>a</sup>
K(mmol/l)	4,10 ± 0,18	4,11 ± 0,93	4,34 ± 0,44
Ca(mmol/l)	2,19 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,75 ± 0,70 <sup>a</sup>	2,42 ± 0,26
P(mmol/l)	2,50 ± 0,15	2,45 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,74 ± 0,20 <sup>a</sup>
Mg(mmol/l)	0,72 ± 0,05	0,80 ± 0,13	0,77 ± 0,08
Chol(mmol/l)	0,69 ± 0,12	0,76 ± 0,18	0,78 ± 0,19
TG(mmol/l)	0,12 ± 0,16	0,03 ± 0,01	0,16 ± 0,20
BHB(mmol/l)	0,30 ± 0,07	0,26 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,34 ± 0,07 <sup>a</sup>
NEMK(mmol/l)	0,16 ± 0,11	0,08 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,05 <sup>a</sup>

stejná písmena u hodnot v jednom řádku značí signifikantní rozdíl ( $p \leq 0,05$ )

### Diskuse a závěr

Z výsledku jasně vyplývá, že většina parametrů ve FT ve srovnání s krví dosahuje stejných případně statisticky nižších hodnot, což se shoduje s dřívějšími pracemi jiných autorů (1, 3, 4). Významným zjištěním byla vyšší hladina P a BHB ve FT ve všech sledovaných kategoriích folikulů ve srovnání s krví. Obdobný výsledek, dle našich zjištění, nebyl dosud nikde publikován. Pokud jsme porovnávali FT v jednotlivých kategoriích folikulů mezi sebou bylo zjištěno, že dominantní folikul měl statisticky signifikantně nejvyšší koncentraci glukózy a říjový-superovulovaný nejnižší. Současně měl dominantní folikul signifikantně vyšší koncentraci fosforu, BHB a NEMK ve srovnání s říjovým-superovulovaným folikulem. Složení říjového a dominantního folikulu se vyjma glukózy lišilo pouze v aktivitě ALP, kdy v dominantním folikulu byla vyšší. Ve složení říjového a říjového superovulovaného byl statisticky signifikantní rozdíl, vyjma glukózy, v nižší koncentraci vápníku v říjovém folikulu. Současně byl ve FT říjového-superovulovaného folikulu pozorován nárůst hladin kreatininu a bilirubinu. Toto zvýšení však bylo pozorováno i v krvi a přisuzujeme to tudíž lehké metabolické imbalance.

V pokusu tedy byly prokázány jasné vztahy mezi krví a FT. Při srovnání jednotlivých kategorií folikulů byly pozorovány největší rozdíly v biochemickém složení FT mezi dominantním a říjovým superovulovaným folikulem. Z výsledků vyplývá, že superovulace ovlivňuje především hladiny energetických zdrojů ve FT (nejnižší hladiny glukózy i BHB), což může mít negativní dopad na oocyt.

### **Použitá literatura**

1. EDWARDS R. G. Follicular fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1974, 37, 189–219.
2. GOSDEN R. G., HUNTER R. H. F., TELFER E., TORRANCE C., BROWN N. Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fert.*, 1988, 82, 813–825.
3. COLLINS A., PALMER E., BÉZARD J., BURKE J., DUCHAMP G., BUCKLEY T. A comparison of biochemical composition of equine follicular fluid and serum at four different stages of the follicular cycle. *Equine Veterinary Journal*, 1997, 25, 12–16.
4. GÉRARD N., LOISEAU S., DUCHAMP G., SEGUIN F. Analysis of the variations of follicular fluid composition during follicular growth and maturation in the mare using proton nuclear magnetic resonance (1H MNR). *Reproduction*, 2002, 124, 241–248.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 120/2018/FVL***

## **Účinek pegbovigrastimu na zdravotní stav mléčné žlázy a dělohy u krav po porodu**

MVDr. Josef Tabery, Monika Mizeráková, Kateřina Švédová, MVDr. Tomáš Páleník, Ph.D.

**Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno**

### **Úvod**

Imrestor® je nový preparát obsahující účinnou látku pegbovigrastim (pegylovaný bovinní faktor stimulující kolonie granulocytů, PEG bG-CSF). Pegbovigrastim zvyšuje tvorbu neutrofilů v kostní dřeni a podporuje jejich baktericidní funkci (1). Podpora jednotlivých dílčích funkcí granulocytů byla in vitro prokázána u fagocytózy, uvolnění myeloperoxidázy a oxidativního vzplanutí (2). Pegbovigrastim působí nezávisle na stupni negativní energetické bilance, tedy i za obtížných životních podmínek zvířat (3). V prvních publikovaných studiích je prokázán klinický efekt pegbovigrastimu zejména na snížení výskytu klinických mastitid v prvním měsíci po porodu o 25 - 35% (1, 3). Nicméně působení pegbovigrastimu je nespecifické, mělo by být účinné proti celému spektru bakterií vyskytujících se ve stájovém prostředí a atakujících nejen mléčnou žlázu, ale i pohlavní orgány. Cílem projektu proto bylo přesné kvantitativní vyhodnocení vlivu pegbovigrastimu na zdravotní stav mléčné žlázy a dělohy u mléčných krav do 60. dne po porodu.

### **Materiál a metodika**

Pokus byl proveden v podmínkách komerčních mléčných farem. Do sledování bylo zařazeno 122 krav, které byly seřazeny podle data očekávaného porodu a postupně rozděleny do pokusné a kontrolní skupiny tak, aby v nich byly stejně zastoupeny 4 podskupiny podle pořadí laktace (1., 2., 3., 4. a další laktace). Krávy v kontrolní skupině byly postupně ošetřovány přípravkem Imrestor® 7 dní před a jeden den po porodu, kontrolní skupina zůstala bez ošetření. U krav bylo po porodu prováděno základní sledování zdravotního stavu pozorováním (odchod lůžka, příjem krmiva, celkový zdravotní stav, výtok z vulvy). Byl sledován výskyt klinických mastitid a počet somatických buněk v mléce (Milk Profit Data) v období 3 měsíců po porodu. Ve dvou rozhodných obdobích (3. týden po porodu, 8. týden po porodu) bylo provedeno klinické vyšetření mléčné žlázy a dělohy - palpáce, vaginální vyšetření, rektální vyšetření. Rovněž bylo provedeno laboratorní vyšetření - bakteriologické vyšetření mléka, bakteriologické a cytologické (jen 8. týden) vyšetření dělohy. Bakteriologické vyšetření mléka v obou odběrech

a bakteriologické vyšetření dělohy 8. týden po porodu bylo provedeno on farm metodou a potvrzeno v laboratoři.

Odběr vzorků z dělohy k bakteriologickému vyšetření dělohy byl proveden použitím komerční soupravy Metricult ve třetím a osmém týdnu po porodu. Tři dny před vyšetřením v osmém týdnu bylo provedeno ošetření krav cloprostenolem (500 µg pro toto i.m., Estrumate<sup>®</sup>, MSD) pro unifikaci fáze pohlavního cyklu a usnadnění odběru vzorků. Štěr po odběru byl otisknut na on farm kultivační misku a pak uložen do zkumavky s transportním médiem pro laboratorní vyšetření. Odběr vzorků z dělohy k cytologickému vyšetření dělohy byl proveden v osmém týdnu po porodu bezprostředně po bakteriologickém vyšetření pomocí nástroje Cytobrush (Minitube) v modifikaci používané na našem pracovišti. Po nanesení štěru na podložní sklíčko byla provedena fixace a barvení preparátu. Vlastní cytologické vyšetření bylo provedeno počítáním 300 buněk z každého štěru a vyčíslením podílu neutrofilních granulocytů.

### Výsledky

Výskyt klinické endo/metritidy ve 3. a 8. týdnu po porodu v pokusné a kontrolní skupině se nelišil (45,8% vs 42,4%; 3,8% vs 5,3%). Výskyt subklinické endometritidy nebyl doposud kompletně vyhodnocen, z doposud vyšetřených cytologických štěrů vykazala pokusná skupina pozitivitu 50%, kontrolní skupina 16,7%. Bakteriologické vyšetření dělohy rovněž nevykázalo signifikantní rozdíly u pokusné a kontrolní skupiny krav. Přítomnost původců endo/metritidy ve 3. a 8. týdnu po porodu u pokusné a kontrolní skupiny (41,4% vs 39,1%; 15,1% vs 9,1%) jakož i negativní bakteriologický nález ve 3. a 8. týdnu po porodu u pokusné a kontrolní skupiny (39,7% vs 39,1%; 79,2% vs 87,3%) byla podobná (tabulky 1 – 4).

Tabulka 1: Výskyt klinické endo/metritidy u pokusných a kontrolních krav ve 3. a 8. týdnu po porodu

	3. týden			8. týden		
	Vyšetřeno	Klin. metritis		Vyšetřeno	Klin. endometritis	
	n	n	%	n	n	%
Pokus	59	27	45,76	53	2	3,77
Kontrola	66	28	42,42	57	3	5,26

Tabulka 2: Cytologický nále z na děloze u pokusné a kontrolní skupiny krav 8. týden po porodu

	Vyšetřeno		Subklinická endometritis	
	n		n	%
Pokus	14		7	50,00
Kontrola	6		1	16,67

Tabulka 3: Bakteriologický nále z původců endo/metritidy v děloze u krav v pokusné a kontrolní skupině 3. a 8. týden po porodu

	3. týden			8. týden		
	Vyšetřeno	Infekce		Vyšetřeno	Infekce	
	n	n	%	n	n	%
Pokus	58	24	41,4	53	8	15,1
Kontrola	64	25	39,1	55	5	9,1

Tabulka 4: Negativní bakteriologický nále z u krav v pokusné a kontrolní skupině 3. a 8. týden po porodu

	3. týden			8. týden		
	Vyšetřeno	Negat		Vyšetřeno	Negat	
	n	n	%	n	n	%
Pokus	58	23	39,7	53	42	79,2
Kontrola	64	25	39,1	55	48	87,3

Výskyt klinické a subklinické mastitidy u krav v pokusné a kontrolní skupině se nelišil (22% vs 17%; 23,2% vs 31,3%). Rovněž výskyt pozitivních bakteriologických nálezů v mléce v pokusné a kontrolní skupině se nelišil. Byl hodnocen celkový počet pozitivních krav (49,1% vs 47,3%) a zvláště pozitivita v odběru 3. týden po porodu, 8. týden po porodu a v obou odběrech (14,5% vs 16,4%; 10,9% vs 10,9%; 23,6% vs 20%) (tabulky 5 – 7).

Tabulka 5: Výskyt klinické mastitidy u krav do 3 měsíců po porodu

	Vyšetřeno		Klin. mastitis	
	n		n	%
Pokus	59		13	22
Kontrola	65		11	17

Tabulka 6: Výskyt subklinické mastitidy do 3 měsíců po porodu

	Vyšetřeno	Subklin. mastitis	
	n	n	%
Pokus	56	13	23,2
Kontrola	58	18	31,3

Tabulka 7: Bakteriologický nález významných původců mastitidy v mléce ve 3. a 8. týdnu po porodu

	Vyšetřeno	Pozitivních							
		Celkem		3. týden		8. týden		3. i 8. týden	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Pokus	55	27	49,1	8	14,5	6	10,9	13	23,6
Kontrola	55	26	47,3	9	16,4	6	10,9	11	20

Výsledky projektu nepotvrdily předpokládaný pozitivní efekt pegbovigrastimu na zdraví mléčné žlázy a dělohy u dojených krav.

#### Seznam literatury:

1. Canning P., Hassfurth R., TerHune T., Rogers K., Abbott S., Kolb D. (2017): Efficacy and clinical safety of pegbovigrastim for preventing naturally occurring clinical mastitis in periparturient primiparous and multiparous cows in commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 100, 6504 – 6515.
2. McDougall S., LeBlanc S. J., Heiser A. (2017): Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 100, 7478 – 7492.
3. Ruiz R., Tedeschi L. O., Sepulveda A. (2017): Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds. *J. Dairy Sci.* 100, 3305 – 3317.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 116/2018/FVL*

## Využití pyridoxinu v produkci embryí *in vitro* u mléčného skotu

Zuzana Čierniková, Veronika Stařecká, Miloslava Lopatářová

*Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Oddělení reprodukce, Fakulta veterinárního lékařství,  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Produkce embryí *in vitro* (*in vitro* embryo production, IVP) u dojeného skotu je v současnosti pevnou součástí programů chovatelských organizací s cílem maximálně urychlit nárůst genetické hodnoty šlechtěné populace. Oocyty jsou získávány z jatečných vaječnicků v laboratoři nebo od živých dárců nejčastěji cestou transvaginální sonografické aspirace vaječnicků (ovum pick-up, OPU)(1). Tyto oocyty jsou zastaveny ve vývoji ve fázi zárodečného vajíčka a musí po odběru podstoupit maturaci (*in vitro* maturation, IVM) aby dosáhly vývojové fáze metafáze II. Pak mohou být oocyty oplozeny (*in vitro* fertilization, IVF) a dále kultivovány až do fáze blastocysty (*in vitro* culture, IVC). Nicméně kvantita a vlastnosti těchto embryí jakož i telat po narození zůstávají hlavním problémem IVP (2). Proces IVM je klíčový pro získání meiotické kompetence oocytů, proto byla zkoumána řada substancí podporujících maturaci oocytů, s další návazností na procento zisku blastocyst včetně jejich morfologických a fyziologických vlastností a úroveň kryotolerance. Patří mezi ně skupina inhibitorů cathepsinu B (CTSB), významné proteázy, jejíž aktivita negativně ovlivňuje vývojovou kompetenci bovinních oocytů (3). Mezi tyto látky se řadí i pyridoxin, přírodní inhibitor CTSB, jehož pozitivní vliv na oocyty během IVM byl popsán na úrovni míry rýhování, podílu blastocyst i exprese vybraných genů. Pyridoxin rovněž snížil aktivitu CTSB v kumulárních buňkách a v oocytech (4). Tento efekt byl prokázán u IVP využívající oocyty z jatečných vaječnicků, vliv na oocyty pocházející z OPU zatím nebyl publikován.

Cílem předkládaného projektu bylo ověřit vliv pyridoxinu použitého při *in vitro* maturaci u oocytů pocházejících z jatečných vaječnicků nebo z OPU, na maturaci *in vitro* v průběhu IFOT a na následný vývoj embryí do fáze blastocysty a jejich kryotoleranci.

### Materiál a metodika

Projekt hodnotil vliv pyridoxinu (2 různé zdroje pyridoxinu) obsaženého v maturačním médiu na další vývoj IVP embryí. Byly hodnoceny 2 pokusné a 2 kontrolní skupiny oocytů.

K manipulaci byly využity oocyty odebrané z jatečných vaječnicků (dodávky vaječnicků byly zajištěny smluvně v Masokombinátu Polička). Vaječnický byly transportovány do laboratoře ve



fyziologickém roztoku zahřátém na 39°C. K získání oocytů byla využita metoda rozřezání povrchu vaječnicků žiletkovým nožem (slicing).

Oocyty byly po promytí v promývacím a maturačním médiu přeneseny do čtyřjamkových kultivačních misek (4well) s maturačním médiem, převrstveným parafinovým olejem. Maturace oocytů probíhala 22 – 24 hodin v inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO<sub>2</sub>, 39°C, 100% vlhkost).

Oocyty v pokusné skupině byly maturovány v médiu za přítomnosti 250 μM pyridoxinu. V první části řešení projektu byl použit Pyridoxine HCl (vitamin B6) solution, Sigma-Aldrich 10-900010V-018 (pokusná skupina pyridoxine liquid, PL, n=477). Kontrolní skupinu tvořilo 491 oocytů. Ve druhé části řešení projektu byl použit Pyridoxine hydrochloride powder, Sigma-Aldrich P 6280-10G (pokusná skupina pyridoxin powder, PP, n=591). Kontrolní skupinu tvořilo 624 oocytů. Celkem bylo použito 2183 oocytů získaných z jatečných vaječnicků. Maturované oocyty byly promyty a přeneseny do 4well misek s fertilizačním médiem. Příprava inseminační dávky probíhala metodou swim-up. Koinkubace oocytů se spermii probíhala 20 – 22 hodin v inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO<sub>2</sub>, 39°C, 100% vlhkost).

Odstranění kumulárních buněk oocytů bylo provedeno pomocí vortexování. Očištěné zygoty byly po promytí přeneseny do 4well misek s připraveným kultivačním médiem, převrstveným parafinovým olejem. Kultivace probíhala 6 – 9 dní v inkubátoru s řízenou atmosférou (5% CO<sub>2</sub>, 8% O<sub>2</sub>, 39°C, 100% vlhkost).

U získaných blastocyst byla hodnocena morfologie. Polovina blastocyst ze skupiny PP byla ponechána v kultivaci až do vyklubání (hodnocení hatching rate). Zbylé blastocysty ze skupiny PP byly zmrazeny v 1,5M etylenglykolu a následně rozmrazeny. Byla posouzena úroveň přežívání embryí, rychlost a kvalita reexpanze a kvantita hatchingu.

## Výsledky

Byla hodnocena úroveň maturace oocytů, četnost rýhování embryí, dosažení fáze blastocysty, četnost vyklubaných blastocyst a viabilita blastocyst po rozmrazení. Úroveň maturace oocytů ve skupině PP vykazala podobné hodnoty u pokusných i kontrolních krav (94,6% vs. 95,8%). Četnost rýhování embryí, dosažení fáze blastocysty a četnost vyklubaných blastocyst ve skupině PL vykazaly signifikantně nižší hodnoty u pokusných krav ve srovnání s kontrolními (48,8% vs. 60,9%; 7,3% vs. 18,7%, 1,9% vs. 7,1%, p<0,05). Četnost rýhování embryí ve skupině PP byla u pokusných krav signifikantně nižší ve srovnání s kontrolními (51,3% vs. 60%, p<0,05), dosažení fáze blastocysty a četnost vyklubaných blastocyst vykazaly nevýraznou

tendenci k nižším hodnotám u pokusných krav ve srovnání s kontrolními (11,8% vs. 14,7%, 7,1% vs. 7,4%). Přežívání embryí po rozmrazení ve skupině PP vykazovalo tendenci k nižším hodnotám u pokusných krav ve srovnání s kontrolními (33,3% vs. 39,2%).

Tabulky:

Tabulka 1: Úroveň maturace oocytů v pokusné a kontrolní skupině PP

	Pokus			Kontrola		
	Oocyty celkem	Oocyty maturované		Oocyty celkem	Oocyty maturované	
Kvalita oocytů	n	n	%	n	n	%
I	293	284	96,9	290	284	97,9
II	256	239	93,4	250	240	96
III	30	25	83,3	30	22	73,3
Celkem	579	548	94,6	570	546	95,8

Tabulka 2: Podíl blastocyst v D6/7 v pokusné a kontrolní skupině PP (pyridoxine powder)

		Oocyty celkem	Rýhování embryí		Blastocysty	
		n	n	%	n	%
	Pokus	591	303	51,3 a	70	11,8
	Kontrola	624	374	60 b	92	14,7
Kvalita oocytů						
I	Pokus	312	173	55,4	39	12,5
I	Kontrola	345	222	64,3	54	15,7
II	Pokus	251	120	47,8	28	11,2
II	Kontrola	254	136	53,5	36	14,2
III	Pokus	28	10	35,7	3	10,7
III	Kontrola	25	16	64	2	8,0

Tabulka 3: Podíl vyklubaných blastocyst v D8 v pokusné a kontrolní skupině PP (pyridoxine powder)

		Oocyty celkem	Vyklubané blastocysty	
		n	n	%
	Pokus	591	42	7,1
	Kontrola	624	46	7,4
Kvalita oocytů				
I	Pokus	312	20	6,4
I	Kontrola	345	24	7

II	Pokus	251	19	7,6
II	Kontrola	254	20	7,9
III	Pokus	28	3	10,7
III	Kontrola	25	2	8

Tabulka 4: Podíl blastocyst v D6/7 v pokusné a kontrolní skupině PL (pyridoxine liquid)

		<b>Oocyty celkem</b>	<b>Rýhování embryí</b>		<b>Blastocysty</b>	
		n	n	%	n	%
	Pokus	477	233	48,8 a	35	7,3 a
	Kontrola	491	299	60,9 b	92	18,7 b
<b>Kvalita oocytů</b>						
I	Pokus	236	123	52,1 a	11	4,7 a
I	Kontrola	228	140	61,4 b	50	21,9 b
II	Pokus	241	110	45,6 a	24	10,1 a
II	Kontrola	263	159	60,5 b	42	16 b

Tabulka 5: Podíl vyklubaných blastocyst v D8 v pokusné a kontrolní skupině PL (pyridoxine liquid)

		<b>Oocyty celkem</b>	<b>Vyklubané blastocysty</b>	
		n	n	%
	Pokus	591	9	1,9
	Kontrola	624	35	7,1
<b>Kvalita oocytů</b>				
I	Pokus	312	2	0,9
I	Kontrola	345	13	5,7
II	Pokus	251	7	2,9
II	Kontrola	254	22	8,4

## Závěr

Předpokládaný pozitivní efekt suplementace pyridoxinu na produkci embryí *in vitro* nebyl experimentálně potvrzen.

## Seznam literatury

1. Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G (2014): Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: from the research laboratory to clinical practice. *Theriogenology* 81, 138 – 151.
2. Lonergan P, Fair T (2008): In vitro produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 69, 17 – 22.
3. Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Hegab AO, Zaabel SM, Takahashi M (2010): Cathepsin B activity is related to the quality of bovine cumulus complexes and its inhibition can improve their developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.*, 77, 439 – 448.
4. Aboelenain M, Balboula AZ, Kawahara M, El-Monem Montasser A, Zaabel SM, Kim S-W, Nagano M, Takahashi M. (2017): Pyridoxine supplementation during oocyte maturation improves the development and quality of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 91, 127 – 133.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 117/2018/FVL***

## Změny acidobazické rovnováhy neonatálních kůzlat před a 2 hodiny po napití kolostra

Zdenka Bezděková<sup>1</sup>, Karolína Píšťková<sup>2</sup>, Martin Pleško<sup>1</sup>, Romana Kadek<sup>2</sup>, Josef Illek<sup>2</sup>

1. *Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

2. *Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Mláďata se rodí s omezenými zásobami energie a potřebují ji co nejrychleji doplnit, aby udržela homeotermii a mohla tak podpořit rozvoj metabolismu. Zkoumáním acidobazické rovnováhy u novorozených jehňat byla výrazná metabolická acidóza ihned po porodu a nadále přetrvávala i 1 hodinu po porodu. U neonatální acidózy navíc dochází ke zvýšení koncentrace iontů  $\text{Ca}^{2+}$  a během 6 hodin po kompenzaci acidózy se  $\text{Ca}^{2+}$  sníží. To svědčí o tom, že pH a  $\text{Ca}^{2+}$  jsou 2 na sobě závislé parametry ovlivňující neonatální acidózu (Varga et al., 2001). Významným parametrem v acidobazické rovnováze hraje roli laktát, který představuje složku respirační a metabolické acidózy. Laktát je u acidózy zvýšený a trvá delší dobu, než se v těle eliminuje, oproti  $\text{CO}_2$ , který se z těla dýcháním vyloučí rychle (Bleul et al., 2013; Homerovsky et al., 2017). U přežvýkavců jako jsou kůzlata, nebyla doposud známa referenční rozmezí acidobazické rovnováhy. Je to ale pro veterinární medicínu a vědu velice důležité. Byla stanovena referenční rozmezí u kůzlat během prvního týdne života a potom u kůzlat v době odstavu u 6 týdenních kůzlat (Piccione et al., 2006; Redlberger et al., 2017). Z důvodu stále většího zájmu záchrany života mláďat po porodu je dobré znát fyziologické hodnoty acidobazické rovnováhy. Proto jsme se v našem projektu zaměřili na stanovení referenčních rozmezí acidobazické rovnováhy těsně po porodu plemene Koza bílá krátkosrstá, což je nejčastěji chované plemeno v České republice.

### Materiál a metodika

#### Materiál

Pro řešení projektu byl vybrán velkochov mléčného plemene Koza bílá krátkosrstá s velmi dobrou užitkovostí. Bylo vybráno 33 novorozených kůzlat od 16 matek. Kůzlata se rodila v zimním období leden až únor. Byla ustájena ve stodole, kde měla slámovou podestýlku. Teplota vzduchu ve stodole se pohybovala okolo  $10^\circ\text{C}$ . Porody probíhaly spontánně bez zásahu

člověka. Jednotlivým kůzlatům byla odebírána krev před napojením kolostra, tedy zhruba 10 min po porodu. Poté jim bylo poskytnuto kolostrum od vlastní matky a 2 hodiny po napití jim byl odebrán druhý vzorek krve. Krev se odebírala z vena jugularis do zkumavky pomocí žluté jehly 20G. Na acidobazické vyšetření se krev odebírala do speciálních anaerobních zkumavek na acidobazickou rovnováhu s heparinem S-Monovette® (Sarstedt AG and Co. KG). Vzorky krve byly vyšetřeny hned na místě. U každého kůzlete bylo provedeno základní klinické vyšetření a ošetření - zda je vyvinut sací reflex, zda nedošlo při porodu k asfyxii nebo k aspiraci plodové tekutiny, ošetření pupečního pahýlu jodovým roztokem a ponecháno matce k osušení. Dále byl každé koze po porodu oddojen vzorek kolostra, který byl následně vyšetřen v laboratoři.

## Metodika

Krev byla vyšetřována bezprostředně po odběru za použití acidobazického analyzátoru EpocBlood Analysis Systém (Epocal, CAN). Byl stanoven kompletní acidobazický profil – pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, cHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, BE, cSO<sub>2</sub>, TCO<sub>2</sub>, sodík, draslík, vápník, chloridy, Hct, Hgb, glukóza, laktát a creatinin. Kolostrum se vyšetřovalo v Klinické laboratoře velkých zvířat na VFU. U mleziva se měřily imunoglobuliny IgG pomocí ELISA Goat IgG ELISA Quantitation set Bethyl Laboratories, Inc. a měrná hmotnost se stanovila na digitálním refraktometru PAL-M. Získané výsledky byly testovány na homogenitu odchylek (test Hartley-Cochran-Bartlett) a normální distribuce (Shapiro-Wilkův test). Data byla statisticky analyzována jednosměrnou analýzou rozptylu (ANOVA) a následně post-hoc testem Fisher LSD. Všechny výsledky byly vyjádřeny jako průměr ± standartní odchylka.

## Výsledky

### Tabulka 1

*Průměr (±SD) acidobazických parametrů u kůzlat ihned po porodu a 2 hodiny po napití kolostra (n=33)*

Parametr	Před napitím kolostra (BF)	Po napití kolostra (AF)
<b>pH</b>	7,31 ± 0,06***	7,40 ± 0,04***
<b>pCO<sub>2</sub>(mmHg)</b>	51,38 ± 7,13***	43,95 ± 6,08***
<b>pO<sub>2</sub>(mmHg)</b>	18,23 ± 4,80	17,10 ± 5,40
<b>cHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mmol/L)</b>	25,67 ± 2,83	27,05 ± 2,89

<b>cTCO<sub>2</sub>(mmol/L)</b>	27,25 ± 2,93	28,40 ± 3,01
<b>BE (mmol/L)</b>	-0,62 ± 3,33***	2,23 ± 3,07***
<b>cSO<sub>2</sub>(%)</b>	23,38 ± 9,29	24,98 ± 12,75
<b>Hct (%)</b>	31,57 ± 5,36*	28,85 ± 4,82*
<b>cHgb (g/L)</b>	107,36 ± 17,97*	98,12 ± 16,41*

SD – směrodatná odchylka, \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001

Před napitím kolostra (BF) = ihned po porodu, po napití kolostra (AF) = 2 hodiny po napití kolostra

### Tabulka 2

*Průměr (±SD) elektrolytů u kůzlat ihned po porodu a 2 hodiny po napití kolostra (n=33)*

Parametr	Před napitím kolostra (BF)	Po napití kolostra (AF)
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	141,36 ± 4,8	142,18 ± 3,70
<b>K<sup>+</sup> (mmol/L)</b>	4,56 ± 0,71	4,32 ± 0,53
<b>Ca<sup>2+</sup> (mmol/L)</b>	1,19 ± 0,27	1,17 ± 0,21
<b>Cl<sup>-</sup> (mmol/L)</b>	108,68 ± 4,38***	106,64 ± 3,25***

SD – směrodatná odchylka, \*\*\* P < 0,001

Před napitím kolostra (BF) = ihned po porodu, po napití kolostra (AF) = 2 hodiny po napití kolostra

### Tabulka 3

*Průměr (±SD) dalších biochemických parametrů u kůzlat ihned po porodu a 2 hodiny po napití kolostra (n=33)*

Parametr	Před napitím kolostra (BF)	Po napití kolostra (AF)
<b>Glukóza (mmol/L)</b>	3,04 ± 1,67***	5,75 ± 2,42***
<b>Laktát (mmol/L)</b>	4,83 ± 2,15**	3,57 ± 0,98**
<b>Creatinin (μmol/L)</b>	201,50 ± 45,47*	179,71 ± 44,18*

SD – směrodatná odchylka, \* P < 0,05 \*\* P < 0,01 \*\*\* P < 0,001

Před napitím kolostra (BF) = ihned po porodu, po napití kolostra (AF) = 2 hodiny po napití kolostra

### Tabulka 4

*Průměr (± SD) imunoglobulinů IgG a měrná hmotnost v kolostru u koz*

	Imunoglobuliny IgG (mg/ml)	Měrná hmotnost (%)
<b>Kolostrum ihned po porodu</b>	24,88 ± 15,50	20,81 ± 3,58

SD – směrodatná odchylka

V Tab. 1,2,3 a 4 jsou výsledky všech měřených parametrů vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka. V Tab. 1 u skupiny AF jasně vidíme zvyšující se pH do fyziologické hodnoty. Hodnota pH byla vyhodnocena jako statisticky významná (  $P < 0,001$ ). Dále je také jasné zvýšení BE u skupiny AF ze záporných hodnot do kladných, hodnota BE byla vyhodnocena také jako statisticky významná (  $P < 0,001$ ). U skupiny AF dochází ke snížení hodnoty parametru  $pCO_2$ , která byla také vyhodnocena jako statisticky významná (  $P < 0,001$ ). U ostatních acidobazických parametrů jako  $pO_2$ ,  $cHCO_3^-$ ,  $cTCO_2$ ,  $cSO_2$  nebyly žádné statisticky významné rozdíly. V Tab. 2 měřené elektrolyty  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  byly statisticky nevýznamné. U jediného elektrolytu  $Cl^-$  dochází u skupiny B ke snížení a tato hodnota je statisticky významná (  $P < 0,001$ ). U dalších měřených biochemických parametrů jako Lac a Crea dochází u skupiny AF ke snížení a jsou opět statisticky významné Lac (  $P < 0,01$ ) a Crea (  $P < 0,05$ ). Naopak u Glu dochází u skupiny AF ke značnému zvýšení a je to opět statisticky významné (  $P < 0,001$ ). Hladina imunoglobulinů IgG v kolostru ihned po narození byla v průměru 24,88 mg/ml a měrná hmotnost byla v průměru 20,81 %.

#### Seznam literatury:

1. Piccione, G., Costa, A., Bertolucci, C., Borruso, M., Pennisi, P, Caola,G. 2006. Acid-base balance modifications in the lamb and goat kids during the first week of life. *Small Ruminant Research*, 63, 304-308
2. Gokce, E., Atakisi, O., Kirmizigul, A.H., Unver, A., Erdogan, H.M. 2014. Passiveimmunity in lambs: Serumlactoferrin concentrations as a predictor of IgG concentration and itsrelation to health status birth to 12 weeks of life. *Small Ruminant Research*, 116, 219-228
3. Andrén, B. 1982. Arterial acid-balance measurements in 1-3 days old piglets. *Acta Vet.Scand.* 23, 581-591
4. Redlberger, S., Fischer, S., Köhler, H., Diller, R., Reinhold, P.2017. Age-dependentphysiologicaldynamics in acid-base balance, electrolytes, and bloodmetabolites in growing goats. *The Veterinary Journal*, 229, 45-52
5. Nowak, R., Portet, R.H., Lévy, F., Orgeur, P., Schaal, B. 2000. Role of mother-younginteractions in the survival of offspring in domesticmammals. *Reviews of reproduction*, 5, 153-163



6. Vannucchi, C.I., Rodruques, J.A., Silva, L.C.G., Lúcio, C.F., Veiga, G.A.L. 2012. A clinical and hemogasometricsurvey of neonatal lambs. *Small Ruminant Research*, 108, 107-112
7. Nowak, R., Poindron, P. 2006. From birth to colostrum: early steps leading to lambsurvival. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 431-446
8. Varga, J., Mester, L., Börzsönyi, L., Lekeux, P., Szenci, O. 2001. Improvedpulmonaryadaptation in newborn calveswithpostnatalacidosis. *The Veterinary Journal*, 162, 226-232
9. Homerovsky, E.R., Caulkett, N.A., Timsit, E., Pajor, E.A., Kastelic, J.P., Windeyer, M.C. 2017. Clinicalindicators of bloodgasdisturbances, elevated L-lactate concentrations and otherabnormalblood parameters in newborn beefcalves. *The Veterinary Journal*, 219, 49-57
10. Bleul, U., Götz, E. 2013. The effect of lacticacidosis on the generation and compensation of mixedrespiratory-metabolicacisosis in neonatal calves. *Veterinary Record*, 172(20), 528-532
11. Bleul,U., Lejeune, B., Schwantag, S., Kähn, W. 2007. Bloodgas and acid-base analysis of arterialblood in 57 newborn calves. *Veterinary Record*, 161, 688-691
12. Antunović, Z., Šperanda, M., Novoselec, J., Didara, M., Mioč, B., Klir, Ž., Samac, D. 2017. Bloodmetabolic profile and acid-balance of dairy goats and their kids duringlactation. *Vet.archiv* 87(1), 43-55
13. Elnageeb, M.E., Abdelatif A.M. 2013. Growth, Thermoregulation and Hematological Responses of Lambs in Relation to Age and Maternal NutritionalSupplementation. *J. Biol. Sci.* 13(5), 323-331
14. Herosimczyk, A., Lepczyński, A., Dratwa-Chalupnik, A., Kurpińska, A., Klonowska, A., Skrzypczak, W.F. 2011. Age-related Changes of Selectedblood Biochemical Indicators in DairyCalvesduringTheir First WeekifLife. *Folia Biol (Krakow)* 59, 25-30
15. Kurz, M.M., Willet, L.B. 1991. Carbohydrate, enzyme and haematologydynamics in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 74, 2109-2118
16. Seifter, J.L., Chang, H.Y. 2016. Disorder of acid-base balance: New perspectives. *Kidney Dis.* 2,170-186

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 112/2018/FVL***

## Zhodnocení obsahu mykotoxinů v krmivech pro prasata v České republice

Martin Svoboda<sup>1</sup>, Jana Blahová<sup>2</sup>, Alena Honzlová<sup>3</sup>, Jana Kalinová<sup>4</sup>, Pavla Macharáčková<sup>5</sup>, Jan Rosmus<sup>6</sup>, Vít Mejzlík<sup>1</sup>, Patrik Kúkol<sup>1</sup>, Veronika Vlasáková<sup>7</sup>, Karolína Píšťková<sup>8</sup>

*Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>2</sup>, Státní veterinární ústav Jihlava<sup>3</sup>, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský<sup>4</sup>, Státní veterinární ústav Olomouc<sup>5</sup>, Státní veterinární ústav Praha<sup>6</sup>, Oddělení bezpečnosti potravin, odbor veterinární hygieny a ochrany veřejného zdraví, Ústřední veterinární správa v Praze<sup>7</sup>, Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>8</sup>.*

### Úvod

Kontaminace krmiv mykotoxiny představuje závažný problém v současných chovech prasat. Ke kontaminaci plísněmi dochází za příznivých podmínek během růstu rostlin, sklizně a jejich skladování. Růst plísní je ovlivněn hlavně teplotou a vlhkostí (Binder et al. 2007).

Krmivo kontaminované mykotoxiny může mít u hospodářských zvířat za následek špatnou konverzi krmiva, snížení hmotnostních přírůstků, pokles imunity a zhoršení reprodukčních schopností (Oswald and Comara, 1998; Griessler et al. 2010). Prasata patří mezi druhy zvířat, která jsou k působení mykotoxinů nejvímavější. Mezi nejvýznamnější mykotoxiny, které mohou negativně ovlivňovat zdraví prasat, patří aflatoxiny, deoxynivalenol, ochratoxin a zearalenon (Chaytor et al. 2011).

Ze současných studií vyplývá, že největší problém představují tzv. smíšené kontaminace. To znamená, že se v krmivu vyskytuje několik druhů mykotoxinů současně (Smith et al. 2016). Interakce mezi mykotoxiny mohou být antagonistické, aditivní nebo synergické (Montbaliu et al. 2010).

Oblastí, která si vyžádá další výzkumy, je působení různých kombinací mykotoxinů na organismus prasat.

V dostupné literatuře je poměrně málo informací týkajících se výskytu mykotoxinů v krmivech prasat. Údaje publikované z Evropy pocházejí např. z monitoringu provedeného v Chorvatsku (Pleadin et al. 2012). Další studie byla uskutečněna v jižní Evropě, tj. Itálii, Portugalsku, Řecku a Španělsku (Griessler et al. 2010). Počet pozitivních vzorků byl vysoký (např. 73% pro

trichoteceny typu B, 37% zearalenon, 40% pro fumonisiny). Dvacet pět procent vyšetřených vzorků bylo kontaminováno více než jedním druhem mykotoxinu. Zachariašová et al. (2014) publikovali výsledky zjištěné v České republice v období 2008–2012. Mykotoxiny v této studii byly stanovovány převážně v krmných komponentech a ve velkoobjemových krmivech.

Cílem předkládané studie bylo získat a zpracovat všechny dostupné údaje týkající se výskytu mykotoxinů v kompletních krmných směsích pro jednotlivé kategorie prasat a v surovinách používaných pro jejich výrobu v České republice.

## **Materiály a metodika**

V průběhu řešení projektu jsme shromažďovali údaje týkající se výskytu mykotoxinů v krmivech prasat a v surovinách používaných pro jejich výrobu na území České republiky. Naší snahou bylo získat a zpracovat všechny dostupné údaje týkající se výskytu mykotoxinů v kompletních krmných směsích pro jednotlivé kategorie prasat. Potřebné údaje jsme získali ve spolupráci s Ústředním kontrolním a zkušebním ústavem zemědělským, Státním veterinárním ústavem v Jihlavě, Státním veterinárním ústavem v Olomouci, Státním veterinárním ústavem v Praze a Oddělením bezpečnosti potravin, odboru veterinární hygieny a ochrany veřejného zdraví Ústřední veterinární správy v Praze.

Vyšetřovány byly vzorky kukuřice, obilovin, sóji, řepky a kompletních krmných směsí pro jednotlivé kategorie prasat. Stanovovány byly následující mykotoxiny: aflatoxin B<sub>1</sub>, deoxynivalenol, zearalenon, ochratoxin A, fumonisin, T-2 a H-2 toxiny. Při analýzách byly použity metody ELISA, kapalinová chromatografie a multireziduální analýza mykotoxinů (LC-MS/MS).

Naše sledování zahrnovalo období posledních pěti let (2013–2017). Pomocí statistického programu byla provedena analýza a zpracování dat. Získané údaje byly porovnány s legislativními limity obsahu mykotoxinů v krmivech platnými v Evropské unii. Jedná se o Nařízení Komise č. 32/2002/EC a Nařízení Komise č. 574/2011/ EU, které stanovuje legislativně závazné limity pro aflatoxin B<sub>1</sub> v krmných surovinách a kompletních krmivech. Dále Doporučení Komise č. 576/2006/EC, o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat a Doporučení Komise č. 165/2013/EU týkající se výskytu T-2 and HT-2 toxinů obilovinách a krmivech. Součástí projektu bylo také vyhledání a zpracování aktuálních údajů týkajících se problematiky mykotoxinů u prasat.

## Výsledky

Nejčastěji zjišťovaným mykotoxinem ve vzorcích kukuřice a obilovin byl deoxynivalenol. Devadesát čtyři procent vzorků kukuřice a 53 % vzorků obilovin bylo pozitivních na tento toxin. Deoxynivalenol byl také nejčastěji prokázaným mykotoxinem ve všech typech krmiv prasat.

Z celkového množství vzorků byly nacházeny nejčastěji následující kombinace mykotoxinů DON + ZEA (56,63 %), DON + OTA (11,61 %) a DON + SUM-T2/HT2 (9,76 %).

Maximální hodnoty koncentrace mykotoxinů v krmivech a surovinách používaných pro jejich výrobu stanovené a doporučené Evropskou komisí byly překročeny v případě aflatoxinu B<sub>1</sub>, deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A and T-2/ H-2 toxinů.

0,3 % vzorků kukuřice a 1,47 % vzorků krmiva pro prasata ve výkrmu bylo kontaminováno aflatoxinem B<sub>1</sub> v množství přesahující limit EU.

5,66 % vzorků kukuřice, 0,21 % vzorků obilovin, 1,24 % vzorků krmiva pro odstávčata, 1,61 % vzorků startérového krmiva, 3,66 % vzorků krmiva pro prasata v předvýkrmu a 1,91 % vzorků krmiva pro prasata ve výkrmu, 2,92 % vzorků krmiva pro březí prasnice, 2,92 % vzorků krmiva pro laktující prasnice a 1,20 % vzorků krmiva pro kance bylo kontaminováno deoxynivalenolem v množství přesahující doporučený limit EU.

0,53 % vzorků kukuřice, 0,27 % vzorků obilovin, 3,03 % vzorků krmiva pro odstávčata, 0,77 % vzorků startérového krmiva, 0,88 % vzorků krmiva pro prasata v předvýkrmu a 1,42 % vzorků krmiva pro prasata ve výkrmu, 0,36 % vzorků krmiva pro březí prasnice a 1,77 % vzorků krmiva pro laktující prasnice bylo kontaminováno zearalenonem v množství přesahující doporučený limit EU.

1,41 % vzorků krmiva pro prasata ve výkrmu bylo kontaminováno ochratoxinem A v množství přesahující doporučený limit EU.

0,89 % vzorků kukuřice, 0,47 % vzorků obilovin, 2,63 % vzorků krmiva pro prasata v předvýkrmu a 1,52 % vzorků krmiva pro prasata ve výkrmu bylo kontaminováno T-2/H-2 toxiny v množství přesahující doporučený limit EU.

Naše výsledky ukazují na nutnost provádění dalšího monitoringu.

## **Seznam literatury**

Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2007; 137, 265–282

Chaytor AC, Hansen JA, van Heugten E, Todd See M, Kim SW. Occurrence and decontamination of mycotoxins in swine feed. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2011; 24, 723–738

Griessler K, Rodrigues I, Handl J, Hofstetter U. Occurrence of mycotoxins in Southern Europe. *World Mycotoxin J.* 2010; 3, 301–309

Montbaliu S, Van Poucke C, Detavernier C, Dumoulin F, Van De Velde M, Schoeters E, Van Dyck S, Averkieva O, Van Peteghem C, De Saeger S. Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method. *J. Agr. Food Chem.* 2010; 58, 66–71

Oswald IP, Comara C. Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 1998; 149, 585–590

Pleadin J, Zadavec M, Perši N, Vulić A, Jaki V, Mitak M. Mould and mycotoxin contamination of pig feed in northwest Croatia. *Mycotoxin Research*, 2012; 28, 157–162

Smith MC, Madec S, Coton E, Hymery N. Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins (Basel)*, 2016; 8, E94

Zachariasova M, Dzuman Z, Veprikova Z, Hajkova K, Jiru M, Vaclavikova M, Zachariasova A, Pospichalova M, Florian M, Hajslova J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals *Anim. Feed Sci. Technol.* 2014; 193, 124–140

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 111/2018/FVL*

## **Vliv použití simethiconu a hladovění na kvalitu ultrasonografického vyšetření dutiny břišní u psů.**

Michaela Paninárová<sup>1</sup>, Zina Beznáková<sup>2</sup>, Ladislav Stehlík<sup>1</sup>, Dominik Komenda<sup>1</sup>

*Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>*

*Magisterský studijní program - 5. ročník (student), Fakulta veterinárního lékařství,  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>2</sup>*

### **Úvod**

Ultrazvukové (USG) vyšetření se stalo ve veterinární medicíně rutinním a nepostradatelným krokem v diagnostice mnohých onemocnění dutiny břišní. Důvodem může být snadnost jeho provedení a nízká cena.<sup>1</sup> Diagnostická kvalita vyšetření závisí od mnoha faktorů, včetně technického vybavení, zkušeností operátora, přítomnosti artefaktů produkovaných plynem v gastrointestinálním traktu a celkového vnějšího vzhledu a výživného stavu pacienta.<sup>1,2</sup> Hladovka je doporučována mnohými autory jako nedílná součást přípravy na USG vyšetření. Na druhou stranu existují i studie, které vliv hladovky na množství intraluminálního plynu popírají.<sup>3,4,5</sup> V humánní medicíně je zdokumentováno použití přípravných metod jako hladovka v kombinaci s laxativy a deflatulenciemi podávanými perorálně pro snížení množství plynu v gastrointestinálním traktu a následné zvýšení kvality USG vyšetření.<sup>1,6</sup> Studie vlivu látek ze skupiny polymerizovaných metylsilikonů (simethiconu, dimethiconu) byla rovněž použito u skupiny králíků, u kterých kombinace hladovky a perorální aplikace simethiconu zvýšila vizualizaci jejunu.<sup>7</sup> Rozsáhlejší studie vlivu simethiconu na kvalitu USG vyšetření u psů chybí.

### **Materiál a metodika**

Do prospektivní studie byli zařazeni klinicky zdraví psi zaměstnanců Kliniky chorob psů a koček. Všechna vyšetření a aplikace byly provedeny u zvířat s písemným informovaným souhlasem majitelů. Pacienti byli vyšetřeni opakovaně a vyšetření byla rozdělena do 4 skupin, dle přípravy pacienta před samotným vyšetřením (Tabulka 1). U všech jedinců byl zhotoven boční rentgenový (RTG) snímek dutiny břišní pro kvantifikaci množství plynu a potravy v gastrointestinálním traktu. Všechny RTG snímky byly zhotoveny přístrojem Proteus XR/a

(GE Helthcare, Wisconsin, USA). Následovalo USG vyšetření dutiny břišní v pravé a levé boční poloze. USG vyšetření bylo provedeno na přístroji Vivid 7 (GE Vingmed Ultrasound AS, Norsko) mikrokonvexní sondou o rozsahu 4 - 8 MHz. Všechna USG vyšetření byla provedena stejným operátérem. Mezi jednotlivými vyšetřeními, kterým předcházela příprava pacienta (hladovka, perorální aplikace simethiconu), byl dodržen rozestup minimálně 24 hodin. Vyšetření bylo provedeno se zaměřením na vizualizaci jednotlivých částí gastrointestinálního traktu (pylorus, duodenum, jejunum, ileum, ileokolické spojení) a menších, obtížně dostupných orgánů dutiny břišní (žlučový měchýř, slinivka břišní, extrahepatální žlučové cesty, nadledviny, portální vena, mízní uzliny). Vizualizace orgánů byla hodnocena subjektivně na stupnici 1 až 3, a to následovně - výborné zobrazení (1), akceptovatelné zobrazení (2) a neakceptovatelné zobrazení (3). Výborná kvalita (1) zobrazení znamená získání snímků, které přesně zobrazují anatomii jednotlivých orgánů s jasností vhodnou pro publikaci. Akceptovatelná kvalita (2) zobrazení znamená získání diagnostických snímků zachycujících anatomii orgánů bez potřeby opakovat vyšetření. Neakceptovatelná kvalita (3) zobrazení znamená technické selhání a pacient pro zhodnocení anatomie jednotlivých orgánů musí být vyšetřen opakovaně.

Tabulka 1. Skupiny pacientů dle přípravy pacienta před vyšetřením dutiny břišní.

<b>1. skupina</b>	pacienti bez předchozí hladovky a bez podání přípravků ovlivňujících obsah plynu v gastrointestinálním traktu
<b>2. skupina</b>	pacienti po 12 hodinové hladovce a bez podání přípravků ovlivňujících obsah plynu v gastrointestinálním traktu
<b>3. skupina</b>	pacienti bez předchozí hladovky a po podání simethiconu (100 mg/ml, Espumisan kapky, Berlin-Chemie, Menarini) v dávce 1 ml 3 x denně, den před vyšetřením a 1 ml ráno v den vyšetření
<b>4. skupina</b>	pacienti po 12 hodinové hladovce a po podání simethiconu (100 mg/ml, Espumisan kapky, Berlin-Chemie, Menarini) v dávce 1 ml 3 x denně, den před vyšetřením a 1 ml ráno v den vyšetření

Hodnoty byly zaznamenány a podrobeny statistické analýze pomocí komerčního programu Minitab, verze 16 (Minitab Inc., Coventry, Velká Británie). Pro stanovení vlivu hladovky (skupina 2), perorální aplikace simethiconu (skupina 3) a kombinace obou těchto faktorů (skupina 4) na vizualizaci orgánů dutiny břišní byla použita ordinální logistická regrese ( $p < 0,05$ ).

## Výsledky

Do klinické studie bylo zařazeno 16 klinicky zdravých psů zaměstnanců Kliniky chorob psů a koček. Dva jedinci byli ze studie vyřazeni z důvodu temperamentní povahy netolerující manipulaci a polohu na boku. Pacienti byli vyšetřeni opakovaně a vyšetření byla rozdělena do 4 skupin (Tabulka 1, Materiál a metodika). Celkem bylo provedeno 64 vyšetření dutiny břišní.

Průměrný věk pacientů byl 5,95 let (SD 2,898). Zastoupeno bylo 8 nekastrovaných samic, 3 kastrované samice, 1 nekastrovaný samec a 2 kastrovaní samci. Průměrná váha psů byla 18,89 kg (SD 13,121). Zastoupeno bylo 9 různých plemen. Vizualizace duodena, žlučového měchýře a iliakálních mediálních mízních uzlin nebyla statisticky významně ovlivněna ani jednou z metod přípravy pacienta (hladovka, simethicon a kombinace faktorů) ( $p < 0,05$ ). Hladovka (skupina 2) zlepšila vizualizaci pyloru, ileokolického spojení, pravé a levé větve slinivky břišní ( $p < 0,05$ ). Perorální aplikace simethiconu (skupina 3) zlepšila vizualizaci ilea, ileokolického spojení, levé a pravé nadledviny, portální vény, extrahepatálních žlučvodů, jejunálních mízních uzlin, těla a pravé větve slinivky břišní ( $p < 0,05$ ). Kombinace hladovky a perorální podání simethiconu zlepšila vizualizaci pyloru, jejunu, ilea, ileokolického spojení, slinivky břišní (tělo, pravá a levá větev), nadledvin, portální vény a jejunálních mízních uzlin ( $p < 0,05$ ). Vizualizace duodenální papily byla zlepšena jednou z uvedených metod (skupina 2, 3 a 4), ale z dostupných dat nebylo možné určit, který z faktorů se na zlepšení vizualizace podílel ( $p < 0,05$ ).

## Závěr

Vizualizace orgánů je ovlivněna konstitucí (hmotnost, váha, tvar hrudního koše) vyšetřovaných jedinců.<sup>2</sup> Rovněž kvalita vyšetření závisí od dalších faktorů, včetně technického vybavení a zkušeností operátora. Z důvodu maximálně minimalizovat vliv těchto faktorů na vizualizaci orgánů jsme psy, zařazené do této studie, vyšetřovali opakovaně, aby byla zaručena stejnoměrná distribuce pacientů ve všech skupinách. A ze stejného důvodu byla všechna USG vyšetření provedena na jednom USG přístroji jedním operátorem.

V humánní medicíně nebyl pozorován vliv aplikace laxativ a deflatulencií na vizualizaci orgánů dutiny břišní při USG vyšetření.<sup>1,6</sup> Kombinace hladovky a perorální aplikace simethiconu zvýšila vizualizaci jejunu při USG vyšetření dutiny břišní Novozélandských králíků.<sup>7</sup>



V předkládané studii měla aplikace simethiconu v kombinaci s hladovkou vliv na zlepšení vizualizace pyloru, jejunu, ilea, ileokolického spojení, slinivky břišní (tělo, pravá a levá větev), nadledvin, portální vény a jejunálních mízních uzlin ( $p < 0,05$ ).

Příprava pacienta před samotným USG vyšetřením (12 hodinová hladovka, perorální aplikace simethiconu a kombinace obou faktorů) by měla být zvažena u pacientů, kteří jsou vyšetřováni opakovaně a v minulosti bylo USG vyšetření dutiny břišní obtížně interpretovatelné z důvodu přítomnosti velkého množství plynu v gastrointestinálním traktu.

### **Seznam literatury:**

1. PINTO, PN, CHOJNIK, R, COHEN, MP, YU LS, QUEIROZ-ANDRADE, M, BITENCOURT, AG. Comparison of three types of preparation for abdominal sonography. *J Clin Ultrasound*, 2011. **39**, 203-208.
2. BARBERET, V, SCHREURS, E, RADEMACHER, N, NITZL, D, TAEYMANS, O, DUCHATEAU, L, SAUNDERS, JH. Quantification of the effect of various patient and image factors on ultrasonographic detection of select canine abdominal organs. *Vet Radiol Ultrasound*, 2008. **49**(3), 273-276.
3. GARCIA, DA, FROES, TR. Importance of fasting in preparing dogs for abdominal ultrasound examination of specific organs. *J Small Anim Pract*, 2014. **55**, 630-634.
4. OHLERTH, S. Principles of the ultrasound examination. In: Barr, F, Gaschen, L, (Eds.): *BSAVA Manual of canine and feline ultrasonography*, pp. 21-23, British small animal veterinary association, Gloucester, England, 2011.
5. PENNINCK, D. Gastrointestinal tract. In: Penninck, D, (Eds.): *Atlas of small animal ultrasonography*, pp. 259-308, Wiley Blackwell Publishing, Ames, IA, USA 2015.
6. HELDWEIN, W, SOMMERLATTE, TH, HASFORD, J, LAHNERT, P, LITTIG, G, MULLER-LISSNER, S. Evaluation of the usefulness of dimethicone and/or senna extract in improving the visualization of abdominal organs. *J Clin Ultrasound*, 1987. **15**, 455-458.
7. DA SILVA, KG, DE ANDRADE, C, SOTOMAIOR, CR. Influence of simethicone and fasting on quality of abdominal ultrasonography in New Zealand white rabbits. *Acta Vet Scand*, 2017. **59**, 48.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 113/2018/FVL***

## MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ SUTURY ŠLACH

Robert Srnec<sup>1</sup>, Karolína Michalčáková<sup>2</sup>, Andrea Nečasová<sup>3</sup>, Marilena Georgiou<sup>3</sup>, Alois Nečas<sup>1</sup>

*Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>*

*Magisterský studijní program (student), Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>2</sup>*

*Doktorský studijní program (postgraduální student), Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>3</sup>*

### Úvod

Dlouhodobá tendence klinických i výzkumných prací zaměřených na suturu šlach je zaměřena zejména na optimalizaci použité techniky a volbu vhodného materiálu. Hlavní faktory ovlivňující výsledek reparace šlachy suturou jsou výsledná silová odolnost, odolnost vůči vytvoření štěrbiny mezi šlachovými pahýly (*gapping*), zachování hladkého povrchu šlachy a rehabilitace (Rawson 2013, Singh 2015, Trail 1989). Zohlednění biologických vlastností šlachy má podstatný vliv na výsledek hojení (Docheva 2015). Poranění šlach jsou stále aktuální problematikou ve veterinární i humánní medicíně. Traumata postihují zejména končetiny v oblasti flexorů (Butler 1965). Některé typy stehů jsou historicky používány po dlouhou dobu a stále si zachovávají praktické využití. Moderní pojetí sutur šlach se naopak snaží využít pevnější sutury s více longitudinálními segmenty, nové materiály a koncepce ukotvení (Justan 2010). Oddělení chirurgie a ortopedie KCHPK VFU Brno se již několik let věnuje výzkumu v oblasti nových materiálů a preklinickým testováním mechanických vlastností (Fedorová 2014, Fedorová 2015, Harazinová 2016, Srnec 2017). I nadále jsou data z bazálního výzkumu základním podkladem pro optimalizace a modifikace vyvíjených materiálů. V současné době v návaznosti na probíhající projekt AZV „Hojení rozsáhlých defektů kostí, šlach a vazů s využitím nových biomateriálů“ (ID pro CEP: NV16-28637A) hodláme použít výstupy z projektu IGA pro dokončení vývoje nového šicího materiálu pro reparaci šlach.

## Materiál a metodika

Studie mechanických vlastností sutury šlach byla provedena jako *ex vivo* experiment na modelech šlach extenzorů/flexorů prstů hrudní a pánevní končetiny získaných z mladých jatečných prasat. Z čerstvě poražených zvířat byl odebrán segment šlachy přibližně 10cm dlouhý a byl v gáze vlhčené NaCl uložen při -20°C až do doby měření. Tím byly získány modelové preparáty šlach s uniformními vlastnostmi. Po rozmražení vzorků při pokojové teplotě byla imitována totální ruptura šlachy ostrým přetnutím celého průměru šlachy v centrální části skalpelem. Následně byla šlacha reparována chirurgickou rekonstrukcí suturou (Srnc 2017). Byly zvoleny dva typy sutury šlachy s ohledem na konzervativní nebo moderní techniky. Prvním stehem byla sutura dle Kesslera se dvěma longitudinálními segmenty. Tato sutura byla po dlouhou dobu využívána jako základní technika sutury šlach v humánní i veterinární medicíně. Druhým typem sutury byl steh se čtyřmi longitudinálními segmenty – Adelaide, v současném moderním pojetí jako zlatý standard sutur šlach v humánní rekonstrukční chirurgii. Bylo využito samotné core sutury nebo v kombinaci s epitendinózní zámkovou matracovou suturou. Pro suturu jádra šlachy (*core*) bylo využito třech různých materiálů stejné síly 2 metric (3/0) – splétaný polyester (Ethibond) a monofilamentní polypropylen (Prolene) a polydioxanon (PDS). Pro epitendinózní suturu bylo použito dvou monofilamentních materiálů stejné síly 1 metric (5/0) – polypropylen (Prolene) a polydioxanon (PDS). V každé testovací skupině bylo měřeno 10 vzorků. Sutura byla testována v tahu na trhacím stroji FP 10 s postupným zatěžováním až do selhání sutury. Byly sledovány a měřeny dvě hodnoty. První hodnota zatížení šlachy v tahu byla zaznamenána v okamžiku vytvoření okem viditelného oddálení pahýlů s vytvořením štěrbiny (*gapping*) a druhá dosažená hodnota maximálního zatížení sutury v tahu při jejím selhání. Získaná data byla statisticky vyhodnocena základní deskriptivní statistikou a z hlediska významnosti posouzena neparametrickým Wilcoxon (Mann-Whitney) testem pro nepárová data (KyPlot version 2.0 beta 15 – 32 bit).

## Výsledky

Ve všech případech použitých materiálů, stehů a kombinace s epitendinózní suturou byla zaznamenána tvorba štěrbiny mezi pahýly šlachy v průběhu zatěžování (*gapping*) výrazně dříve než byly dosaženy maximální hodnoty zatížení. Dle jednotlivých variant sutur hodnoty zatížení při rozestoupení konců šlachy dosahovaly 1,59 % až 28,02 % maximálního zatížení.

Vytvoření štěrbin mezi pahýly šlachy již brání průběhu hojení a kvalitu sutury tak více odráží právě tyto naměřené hodnoty. Průměrné dosažené hodnoty u jednotlivých variant provedené reparace modelu šlachy jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1.

síla (N)	Adelaide (Prolene 3/0)		Adelaide (Prolene 3/0) + EPI (Prolene 5/0)		Adelaide (Ethibond 3/0)		Adelaide (Ethibond 3/0) + EPI (Prolene 5/0)		Kessler (PDS 3/0)		Kessler (Prolene 3/0)		Kessler (Prolene 3/0) + EPI (Prolene 5/0)		Kessler (Prolene 3/0) + EPI (PDS 5/0)	
	max	gap	max	gap	max	gap	max	gap	max	gap	max	gap	max	gap	max	gap
průměr	20,76	3,63	30,21	5,5	25,78	0,41	77,28	15,74	46,43	3,42	17,66	4,44	40,6	11,37	54,38	13,14
% max	x	17,51	x	18,22	x	1,59	x	20,37	x	7,36	x	25,15	x	28,02	x	24,16
sd	4,02	2,55	12,28	3,33	5,57	0,33	18,25	4,39	12,95	2,26	13,86	2,35	19,73	3,72	16,03	3,07
min	16	0,21	9,81	0,21	13,52	0,1	43,72	6,11	17,03	0,76	1,67	0,39	8,88	5,23	38,71	9,26
max	28,37	8,47	46,31	10,61	32,08	1,03	105,3 6	21,08	62,26	7,73	38,85	6,3	60,59	17,98	86,06	18,57

## Závěr

Zhodnocením mechanických vlastností sutur bylo pozorováno rozdílné chování epitendinózní sutury v závislosti na typu a materiálu *core* sutury, ale bez výraznějšího vlivu volby materiálu pro epitendinózní steh. Obdobně tendence k vytvoření *gappingu* je závislá na dané kombinaci materiálu, stehu a epitendinózní sutury. I když byly hodnoty u sutury dle Kesslera a Adelaide v některých variacích velmi podobné, u sutury se čtyřmi longitudinálními segmenty *core* sutury (Adelaide) byly hodnoty v rámci skupiny více kompaktní a vyrovnané. Pro praktické využití je podstatné, že tvorba *gappingu* byla ve všech případech testovaných modelů v průběhu zatěžování výrazně dříve než byly dosažené maximální hodnoty zatížení. Na druhou stranu odolnost sutury vůči *gappingu* v procentuálním poměru k rezistenci maximální zátěže sutury byla velmi variabilní. Přímým výsledkem projektu bude zhodnocení získaných poznatků formou publikace v časopise s IF.

### **Seznam literatury:**

1. Butler HC 1965: Tendons, muscles, and fascia. In: Archibald J: Canine surgery. 1st ed. American Veterinary Publications, INC, California, pp. 726-743.
2. Docheva D, Müller SA, Majewski M, Evans CHH 2015: Biologics for tendon repair. Adv Drug Deliv Rev 84: 222-239.
3. Fedorová P, Srnec R, Pěňčík J, Schmid P, Amler E, Urbanová L, Nečas A 2014: Mechanical testing of newly developed biomaterial designed for intra-articular reinforcement of partially ruptured cranial cruciate ligament: ex vivo pig model. Acta Vet Brno 83(1): 55-60
4. Fedorová P, Srnec R, Pěňčík J, Dvořák M, Krbec M, Nečas A 2015: Intra-Articular Reinforcement of a Partially Torn Anterior Cruciate Ligament (ACL) Using Newly Developed UHMWPE Biomaterial in Combination with Hexalon ACL/PCL Screws: Ex-Vivo Mechanical Testing of an Animal Knee Model. Acta Chir Ortop Traumatol Czech 82(3): 222-228
5. Harazimová K 2016: Hodnocení mechanických vlastností sutury šlachy. Odborná práce, VFU Brno, 56 p.
6. Justan I, Veselý J, Bistoni G 2010: Současný pohled na suturu flexorů ruky. Acta Chir Ortop Traumatol Czech 77(1): 65-69
7. Rawson S, Cartmell S, Wong J 2013: Suture techniques for tendon repair; a comparative review. Musc Ligament Tend J 3(3): 220-228.
8. Singh R, Rymer B, Theobald P, Thomas PBM 2015: A review of current concepts in flexor tendon repair: physiology, biomechanics, surgical technique and rehabilitation. Orthop Rev 7(6125): 101-105.
9. Srnec R, Michalčáková K, Nečasová A, Snášil R, Nečas A 2017: Mechanické testování šlach po sutuře nově vyvinutými biomateriály. Sborník konference Interní grantové agentury VFU Brno, 63-66.
10. Trail IA, Powell ES, Noble J 1989: An evaluation of suture materials used in tendon surgery. J Hand Surg 14(B): 422-427.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 122/2018/FVL***

## **Příspěvky**

**Fakulty veterinární hygieny a ekologie**

## Sledování dynamiky růstu *Yersinia enterocolitica* v mletém hovězím masu

Šárka Bursová<sup>1</sup>, Lenka Necidová<sup>1</sup>, Haruštiaková Danko<sup>2</sup>, Iveta Vaňová<sup>1</sup>, Veronika Čurečková<sup>1</sup>,

Matej Tkáč<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; <sup>2</sup>Masarykova univerzita, Brno

### Úvod

Na základě informací European Food Safety Authority (EFSA) je yersinióza třetí nejčastěji hlášenou zoonózou v Evropské unii (EFSA a ECDE, 2017). Hlavním rezervoárem patogenních kmenů jsou prasata, ve kterých se bakterie vyskytují jako komenzálové, a to ve střevě nebo v hltanu, kde jsou izolovány z tonzil (Bhunia, 2008). Potraviny jsou často označovány za hlavní zdroj infekce *Y. enterocolitica*, a to i přesto, že jsou z nich patogenní kmeny izolovány zřídka (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006). Obecně je uváděno, že primárním zdrojem *Y. enterocolitica* jsou vepřové maso a výrobky z něj. K přenosu dochází zřejmě častěji prostřednictvím vařeného masa či masných výrobků, které jsou buď nedovařené, nebo s nimi bylo nesprávně nakládáno (Cupáková a Necidová, 2013).

Cílem práce bylo hodnocení růstu *Y. enterocolitica* v mletém hovězím masu bez přídavku a s přídavkem NaCl uchovávaném po dobu 14 dní při různých teplotách (2, 4 a 8 °C). Za použití vhodného matematického modelu byly vytvořeny růstové křivky a hodnocena dynamika růstu sledované bakterie.

### Materiál a metodika

V rámci studie bylo použito mleté hovězí maso zakoupené v tržní síti a pomleté přímo v provozovně. K zaočkování masa byla použita směs 2 sbírkových kmenů *Y. enterocolitica* CCM 5671 a CCM 7204 získaných z České sbírky mikroorganismů (Brno, ČR) a dále izolát *Y. enterocolitica* z kance (sbírka Ústavu hygieny a technologie masa, VFU Brno, ČR). Ve výsledné směsi byly kmeny zastoupeny v poměru 1:1:1. Mleté maso bylo naváženo v množství 10 g do sterilních homogenizačních sáčků a následně zaočkováno připravenou suspenzí kmenů *Y. enterocolitica* tak, aby bylo dosaženo výchozí koncentrace  $10^2 - 10^3$  KTJ/g masa. Pro každou ze

sledovaných teplot byly připraveny 3 paralelní sady vzorků (každá sada obsahovala 8 dílčích vzorků) + kontrola (nezaočkované vzorky).

Část mletého masa byla obohacena přídavkem NaCl na koncentraci cca 1 a 2 % a zaočkována výše uvedeným způsobem. Opět byly pro každou teplotu připraveny 3 paralelní sady vzorků a kontrola.

Připravené vzorky masa byly uchovávány při teplotě 2, 4 a 8 °C po dobu 14 dní. Odběr vzorků pro stanovení počtu *Y. enterocolitica* byl prováděn 0., 1., 2., 5., 7., 9., 12. a 14. den skladování. Počet *Y. enterocolitica* byl stanoven na CIN agaru (HiMedia), inkubace probíhala při 30 °C / 48 hodin.

Získaná experimentální data (hodnoty KTJ.g<sup>-1</sup>) byla pomocí logaritmické transformace s použitím dekadického logaritmu převedena na hodnoty log KTJ.g<sup>-1</sup>. Ze tří paralelních stanovení byla spočítána průměrná hodnota a směrodatná odchylka (program Unistat 5.1, Unistat Ltd., VB). Růst bakterií *Y. enterocolitica* při různých skladovacích teplotách byl vyhodnocen Baranyi-Robertsovým modelem (Baranyi a Roberts, 1994) pomocí aplikace DMFit ComBase Combined Database for Predictive Microbiology ([www.combase.cc](http://www.combase.cc)).

## Výsledky

*Yersinia enterocolitica* byla schopna růstu a množení v mletém hovězím mase při všech sledovaných teplotách. Růstové křivky vytvořené pomocí Baranyi-Robertsova modelu pro jednotlivé teploty skladování jsou uvedeny v obrázku 1.

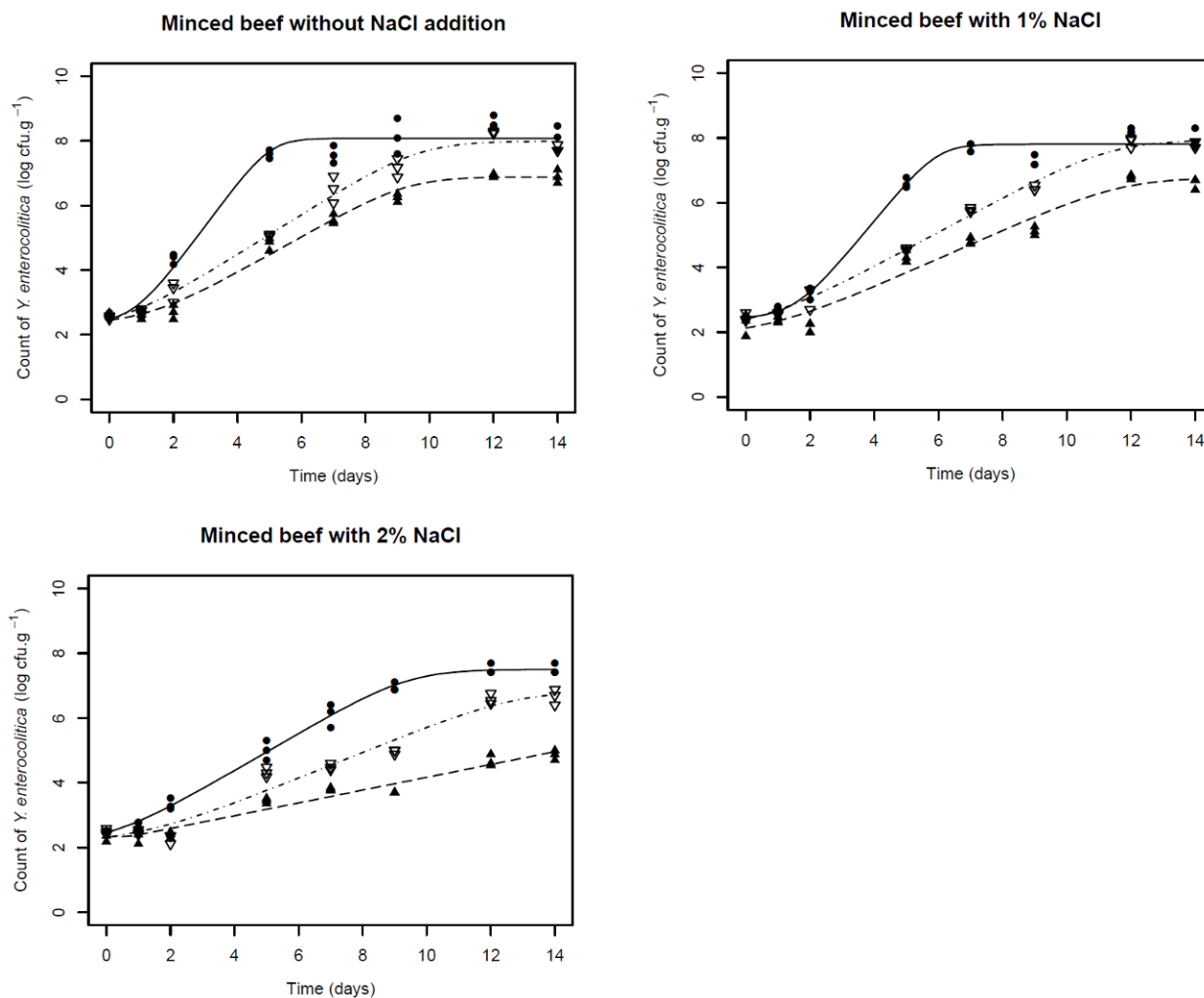
U masa bez přídavku NaCl a s přídavkem 1 % NaCl byl při všech teplotách skladování vytvořený růstový model kompletní, zahrnoval lag fázi, exponenciální i stacionární fázi růstu. Doba trvání lag fáze se pohybovala, v závislosti na teplotě skladování, mezi přibližně 20 – 35 hodinami. Stejně tak byly patrné rozdíly i v maximálním dosaženém počtu *Y. enterocolitica* po 14 dnech skladování.

Oproti tomu v případě mletého masa obohaceného přídavkem přibližně 2 % NaCl došlo k vytvoření kompletní růstové křivky pouze při teplotě 4 a 8 °C (obrázek 1). Zjištěný maximální počet *Y. enterocolitica* po 14 dnech skladování dosahoval řádově 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>. Při teplotě skladování 2 °C postrádala vytvořená růstová křivka stacionární fázi růstu a nebylo tedy za sledované období dosaženo maximálního možného počtu *Y. enterocolitica*. Je zajímavé, že oproti předpokladu, zvýšená koncentrace neměla výrazný vliv na dobu trvání lag fáze.

Ve všech kontrolních vzorcích bylo stanovené množství *Y. enterocolitica* < 5.10<sup>1</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>, tj. pod mezí detekce použité plotnové metody.



Pokud hovoříme o alimentárním onemocnění způsobeném *Y. enterocolitica*, není infekční dávka přesně stanovena. Předpokládá se, že je třeba více než  $10^4$  KTJ.g<sup>-1</sup>, aby bylo vyvoláno onemocnění (Robins-Browne, 2013). Bhunia (2008) však uvádí, že k vyvolání onemocnění je třeba vysoká infekční dávka ( $10^7$  –  $10^9$  buněk *Y. enterocolitica*). Vytvořené růstové modely byly využity k odhadu doby potřebné k namnožení *Y. enterocolitica* na hodnoty  $10^7$  a  $10^9$  KTJ ve 100 gramech masa (tedy v jedné porci) – viz tabulka 1.



Obrázek 1. Růst *Y. enterocolitica* v mletém hovězím masu uchovávaném 14 dní při teplotě 2, 4 a 8 °C. Stanovená hodnota (symbol) a predikovaný Baranyi-Robertsův model (linie). - - - ▲ vzorky inkubované při 2 °C, · · · · · ▽ vzorky inkubované při 4 °C, — ● vzorky inkubované při 8 °C.

Přídavek NaCl	Teplota skladování	Rizikové množství YE	
		10 <sup>7</sup> KTJ v 100 g (10 <sup>5</sup> KTJ.g <sup>-1</sup> )	10 <sup>9</sup> KTJ v 100 g (10 <sup>7</sup> KTJ.g <sup>-1</sup> )
Bez přídavku NaCl	2 °C	6,0	> 14
	4 °C	4,8	8,2
	8 °C	2,7	4,3
Přídavek 1 % NaCl	2 °C	7,7	> 14
	4 °C	5,8	9,8
	8 °C	3,6	5,4
Přídavek 2 % NaCl	2 °C	> 14	> 14
	4 °C	8,2	> 14
	8 °C	5,1	8,9

Tabulka 1. Odhad doby (dny) potřebné k dosažení rizikového množství *Y. enterocolitica* v mletém hovězím masu (100 g) skladovaném při teplotě 2, 4 a 8 °C po dobu 14 dní.

Je nutné vzít na vědomí, že pokud by výchozí koncentrace masa opravdu dosahovala hodnot 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> KTJ.g<sup>-1</sup>, existovalo by reálné riziko pomnožení bakterií na hodnotu schopnou vyvolat alimentární onemocnění v poměrně krátkém čase (především v případě skladování při 8 °C). V případě vyšší počáteční koncentrace by tato doba byla ještě výrazně kratší. Je tedy třeba dodržovat teplotu stanovenou Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 (2 °C, příp. 4 °C), maso zpracovat co možná nejrychleji a důkladně tepelně ošetřit.

### Závěr

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že mleté hovězí maso je vhodným prostředím pro růst *Y. enterocolitica*, a to i při nízkých teplotách. Přídavek NaCl v množství do 1 % je schopen omezit, nikoli však zcela zastavit růst *Y. enterocolitica*. Za bezpečné lze tedy považovat skladování mletého masa ideálně při teplotě nepřesahující 2 °C a pouze po dobu několika dnů. Toto by měli mít na paměti zejména spotřebitelé, kteří mnohdy nesprávně skladují mleté maso při teplotách blízkých se 8 °C. Současně je nezbytné výrobek následně dostatečně tepelně opracovat a zamezit jeho případné sekundární kontaminaci.

### **Seznam literatury:**

- 1) BARANYI, J., ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, vol. 23, no. 3-4, p. 277–294.
- 2) BHUNIA, A.K. *Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis*. 1<sup>st</sup> ed. New York, USA: Springer Science+Bussines Media, 2008, p. 227–235.
- 3) CUPÁKOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L. *Yersinia enterocolitica* – významný původce onemocnění z potravin. *Maso*. 2013, roč. 24, č. 2, s. 45–48.
- 4) EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 2017, vol. 15(12):5077, p. 1–228.
- 5) FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A., KORKEALA, H. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2006, vol. 47, no. 3, p. 315–329.
- 6) NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/5004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu. *Úřední věstník Evropské unie*. 2004, L. 139, s. 14–74.
- 7) ROBINS-BROWNE, R. M. *Yersinia enterocolitica*. In M. P. Doyle & R. L. Buchanan (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2013, p. 339–376.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno projekt 209/2018/FVHE***

## **Aluminum leakage from the aluminum foil to the selected food types**

Dani Dordevic<sup>1</sup>, Buchtova Hana<sup>2</sup>, Blanka Macharackova<sup>3</sup>, Monika Jarosova<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology*, <sup>2</sup>*Department of Meat Hygiene and Technology*, <sup>3</sup>*Department of Gastronomy, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*, <sup>4</sup>*Centre of Region Hana for Biotechnological research, Central Laboratories and Research Support, Faculty of Science, Palacky University*

### **Introduction**

The main path of humans' exposure to aluminum is diet. It means that humans' diet, same as culinary preparation of food influence the most aluminum intake. Consumers' socio demographic attributes and eating habits play the important role in aluminum daily intake (Yokel, 2012). The intake aluminum limit in diet ranged from 7 mg/kg (in 1989) of body weight to 1 mg/kg of body weight (in 2006). In 2011 the estimated limit calculated on kg of body weight is 2 mg/kg (WHO, 1989; Center for Food Safety, 2009; World Health Organization, 2011). There were found relationships between aluminum intake and Alzheimer's disease, Parkinson's disease and diseases like dialysis encephalopathy, bone disorder and other disorders (Al Zubaidy et al., 2011; Al Juhaiman et al., 2014; Rittirong and Saenboonruang, 2018). Aluminum foil is broadly used in culinary preparation of different food types due to its easiness to use, disposability and properties such as that it transfers heat twice quicker than regular metal (Bassioni et al., 2012). The aim of the study was to evaluate the leakage of aluminum to food that was baked in aluminum foils.

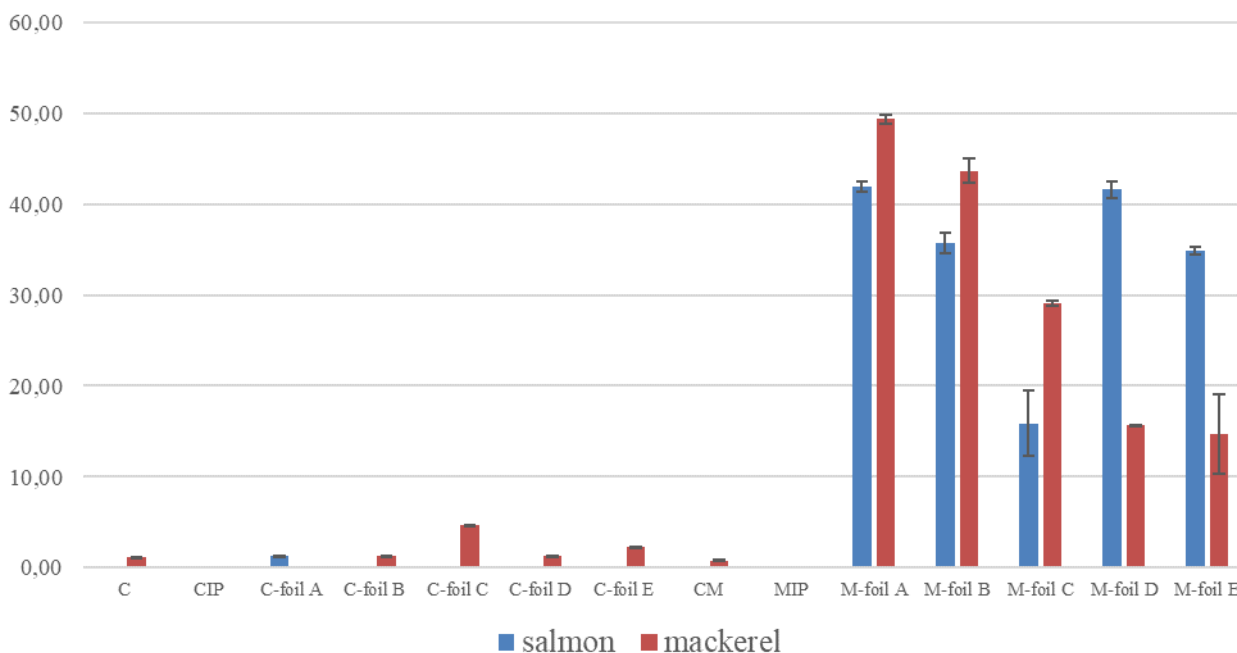
### **Material and methods**

The material used in the research consisted out of food samples (salmon: *Salmo salar*; mackerel: *Scomber scombrus*; and duck breasts) that were baked in aluminum foils. Following aluminum foils were used in the research: Foil A (Grill Aluminium Foil, Melitta ČR s.r.o., Praha 5, Czech Republic), Foil B (Grill Alu Foil Fino, Sarantis Czech Republic, Praha 3, Czech Republic), Foil C (Grand Maximo, Kaufland Czech Republic, v.o.s., Praha 6, Czech Republic), Foil D (Vi-Go! Live Good, Quickpack, Jdrzejow, Poland) and Foil E (Super strong Aluminium Foil, Sarantis, Praha 3, Czech Republic). The samples were baked without marinades and also with marinades (ingredients of recapture included: olive oil, salt, black peper, garlic, lemon). The baking was done during the 40 minutes at 220 °C in the oven (Professional Ovens GARB-IN, Model: 23 GM UMI).

Following aluminum foils were used in the research: Foil A (Melitta ČR s.r.o., Praha 5, Czech Republic), Foil B (Sarantis Czech Republic, Praha 3, Czech Republic), Foil C (Kaufland Czech Republic, v.o.s., Praha 6, Czech Republic), Foil D (Quickpack, Jedrzejow, Poland), Foil E (Super strong Aluminium Foil, Sarantis, Praha 3, Czech Republic). The laboratory analysis included determination of pH, salt, fat and aluminum contents. pH were measured using the WTW GmbH, Germany. The salt (NaCl) content was determined by precipitation titration with silver nitrate – Volhard Mohr’s method (Standard Operating Procedure, potassium chromate indicator ČSN ISO 1841-1:1999). The lipid (L) content was determined quantitatively (ČSN ISO 1443:1973) using Soxtec 2055 SoxCap 2047 (both FOSS Tecator, Höganäs, Sweden). The quantitative analysis of aluminium was carried out using a 7700x ICP-MS (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with a quadrupole mass analyser and an ASX-520 auto-sampler.

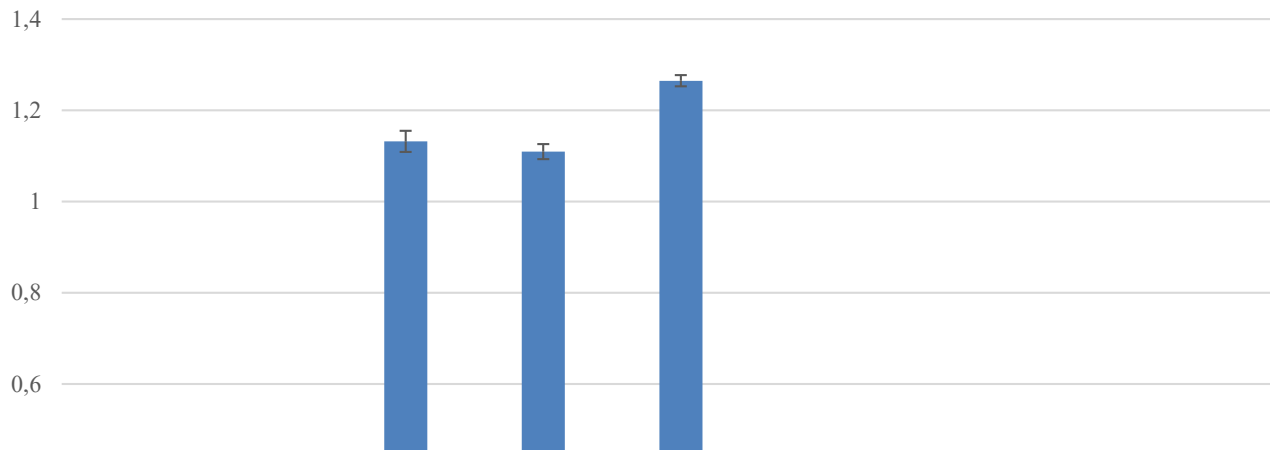
## Results

Aluminum contents in analysed samples are shown in Figure 1, 2, 3 and 4.



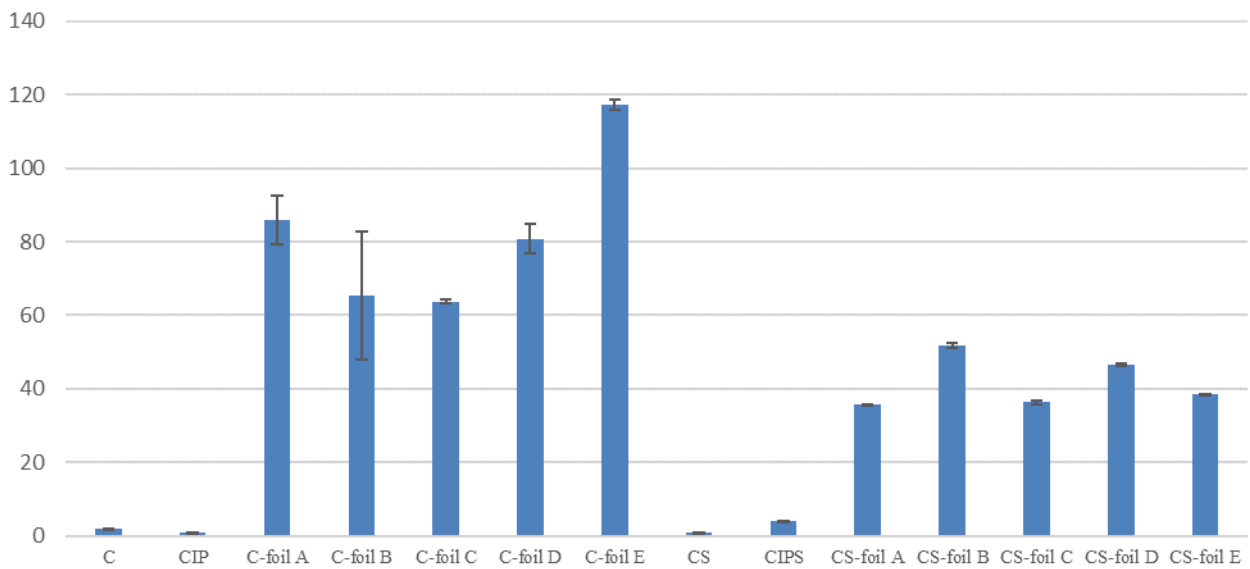
\*C: control; CIP: control packed in inert packaging; C-foilA, C-foilB, C-foilC, C-foilD, C-foilE: samples packed in different foils CM: control marinade; MIP: samples in marinade packed in inert packaging; M-foilA, M-foilB, M-foilC, M-foilD, M-foilE: samples in marinade packed in different foils

Figure 1. Aluminum content in baked salmon and mackerel fish (marinated and not marinated)



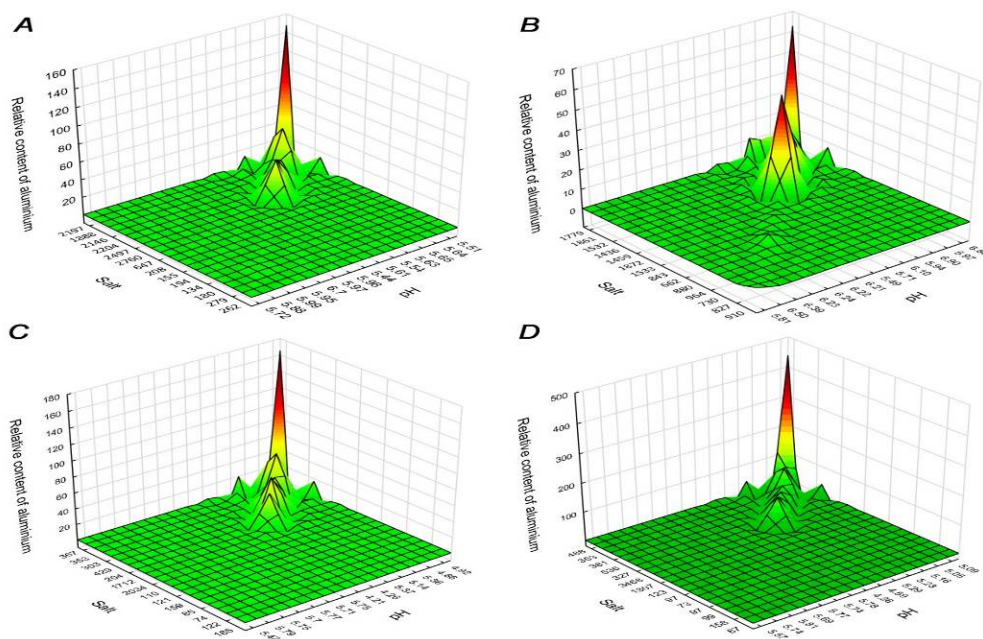
\*C: control without skin; CIP: control packed in inert packaging without skin; C-foilA, C-foilB, C-foilC, C-foilD, C-foile: samples packed in different foils without skin; CS: control marinade with skin; CIPS: samples in marinade packed in inert packaging with skin; CS-foilA, CS-foilB, CS-foilC, CS-foilD, CS-foile: samples in marinade packed in different foils with skin

Figure 2. Aluminum content in baked duck breast samples (with skin and without skin)



\*C: control without skin; CIP: control packed in inert packaging without skin; C-foilA, C-foilB, C-foilC, C-foilD, C-foile: samples packed in different foils without skin; CS: control marinade with skin; CIPS: samples in marinade packed in inert packaging with skin; CS-foilA, CS-foilB, CS-foilC, CS-foilD, CS-foile: samples in marinade packed in different foils with skin

Figure 3. Aluminum content in marinated baked duck breast samples (with skin and without skin)



\*A: Salmon; B: Mackerel; C: duck breasts with skin; D: duck breasts without skin

Figure 4. Response surface graphs for pH, aluminum and salt content in analyzed samples

## REFERENCES:

- Al Juhaiman, L.A., Al-Shihry, R.A. and Al-Hazimi, H.M., 2014. Effect of Cardamom Extract on Leaching of Aluminum Cookware. *International Journal of Electrochemical Science*, 9, pp.1055-1070.
- Al Zubaidy, E.A.H., Mohammad and F.S., Bassioni G., 2011. Effects of pH, salinity and temperature on aluminum cookware leaching during food preparation. *Int. J. Electrochem. Sci.* 6: 6424-6441.
- Bassioni, G., Mohammed, F.S., Al Zubaidy, E. and Kobrsi, I., 2012. Risk assessment of using aluminum foil in food preparation. *Int. J. Electrochem. Sci*, 7(5), pp.4498-4509.
- Center for Food Safety. 2009. Risk Assessment Studies Report No. 35: Chemical Hazard Evaluation: Aluminum in Food. The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, Hong Kong.
- Rittirong, A. and Saenboonruang, K., 2018. Quantification of aluminum and heavy metal contents in cooked rice samples from Thailand markets using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and potential health risk assessment. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(5): 372-380.
- World Health Organization. 1989. *FAO/WHO Expert Committee Report on Food Additives: 33rd Report*. WHO Technical Report Series. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization. 2011. *FAO/WHO Expert Committee Report on Food Additives: 47rd Report*. WHO Technical Report Series. World Health Organization, Geneva.
- Yokel, R.A., 2012. Aluminum in food—the nature and contribution of food additives. In *Food Additive*. InTech.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 223/2018/FVHE*

## Vliv kombinace mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu na stravitelnost sušiny *in vitro*

Marie Dvořáková, Vendula Stoklasová, Adam Málek, Ludmila Křížová

*Ústav výživy zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Minoritní mykotoxiny jsou skupina strukturně různorodých sekundárních metabolitů některých vláknitých hub. Řadí se mezi kontaminanty krmiv, převážně cereálních produktů, a mohou mít vážný vliv na zdraví zvířat i lidí. Mezi tyto mykotoxiny se řadí i námi studované enniantiny (dále jen ENN) a beauvericin (dále jen BEA).

Podle EFSA (2014) se chronická expozice BEA pro přežvýkavce pohybuje mezi 0,44 a 0,86  $\mu\text{g}/\text{kg}$  živé váhy na den, přičemž akutní expozice dosahuje 1,72  $\mu\text{g}/\text{kg}$  živé váhy na den. V případě ENN je akutní expozice stanovena mezi 32,5 a 32,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  živé váhy na den. Tyto údaje však byly stanoveny na základě výskytu minoritních mykotoxinů v jaderných krmivech, takže celková expozice bude vyšší.

BEA i ENN mají antimikrobiální účinky a podle řady studií jsou charakterizovány jako toxické. Mají cytotoxickou aktivitu k různým druhům somatických buněk již při nízkých koncentracích (např. Ivanova et al., 2006; Meca et al., 2011, Lu et al., 2013). Studie zabývající se vlivem těchto látek na diverzitu bachorové mikroflóry dosud nejsou k dispozici. Cílem práce proto bylo pomocí *in vitro* metod zjistit vliv kombinace minoritních mykotoxinů enniatinu B a beauvericinu v hladinách odpovídajících akutní expozici a jejímu dvojnásobku na stravitelnost sušiny směsné krmné dávky objemného a jaderného typu.

### Materiál a metody

Beauvericin (Sigma-Aldrich) byl nejprve rozpuštěn v methanolu (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a poté naředěn destilovanou vodou na koncentrace 0,5 a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , enniatin B (Sigma-Aldrich) byl rovněž rozpuštěn v methanolu (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a poté naředěn destilovanou vodou na koncentrace 10 a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Mykotoxiny pak byly přidávány do inkubací dle níže uvedeného schématu pokusu (tab. 1) v množstvích 1 ml.

Bachorová tekutina byla odebrána hodinu před nakrmením od dojnice (ŠZP Nové Dvory) krmené směsnou krmnou dávkou složenou z kukuřičné siláže (22 kg), vojtěškové senáže (12 kg), lučního sena (3 kg), krmné slámy (1,5 kg), doplňkové krmné směsi (6,7 kg) a minerálního lizu (0,1 kg). K odběru byla použita jícnová sonda s ruční podtlakovou pumpou. Bachorová tekutina byla převezena v předehřátých odběrových lahvích v termoboxu do laboratoře Ústavu výživy zvířat. Bezprostředně poté bylo u bachorové tekutiny změřeno pH, tekutina byla pomixována půl minuty v mixéru na nejvyšší otáčky a přefiltrována přes čtyři vrstvy gázy.



Inkubace byly prováděny v silnostěnných skleněných tubách o objemu 90 ml, do nichž bylo naváženo 0,5 g vzorku krmiva, které obsahovalo stejné složky jako krmná dávka dojníc, pouze poměr objemné a jaderné složky byl upraven na 60:40 (objemný typ KD) a 40:60 (jaderný typ KD). Vzorky krmiv byly usušeny a pomlety na velikost 1 mm. Vzorky krmiv byly zalaty 40 ml pufru (McDougall, 1948) vyhřátého na 39 °C a 10 ml bachorové tekutiny. Do takto připravené směsi byl přidáván roztok enniatinu B, beauvericinu, popř. methanolu v množstvích 1 ml podle schématu pokusu v tabulce 1.

Tabulka 1. Schéma pokusu

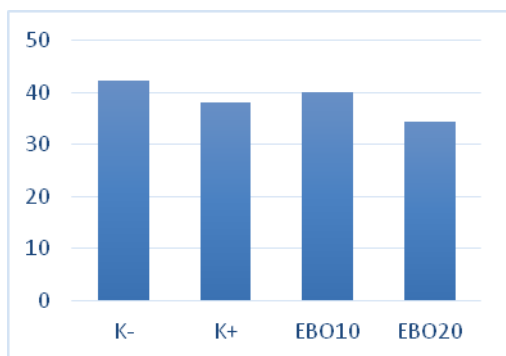
Označení skupin	Zásah
KO-	Negativní kontrola (pouze inokulum)
KO+	Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)
EBO10	inokulum + Enn B 10 µg/ml+Bea 0,5 µg/ml
EBO20	inokulum + Enn B 20 µg/ml+ Bea 1 µg/ml
KJ-	Negativní kontrola (pouze inokulum)
KJ+	Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)
EBJ10	inokulum + Enn B 10 µg/ml+Bea 0,5 µg/ml
EBJ20	inokulum + Enn B 20 µg/ml+ Bea 1 µg/ml

Tuby byly profouknuty dusíkem a uzavřeny gumovými zátkami opatřenými zpětným (Bunsenovým) ventilem, promíchány a inkubovány v termostatu 24 hodin při teplotě 39 °C.

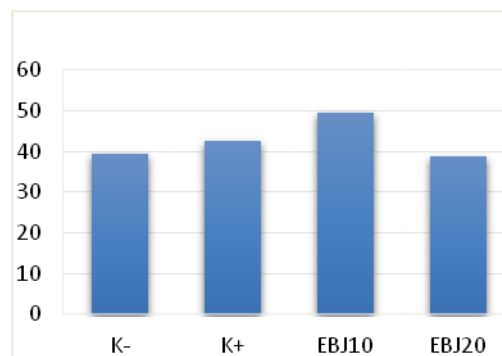
Po uplynutí inkubační doby byly tuby zchlazeny v ledové vodě a bylo změřeno pH. Následně byly tuby odstředovány po dobu 5 minut při 4000 otáček/min. Supernatant byl odsát a rezidua krmiv byla analyzována na obsah sušiny. Ze získaných dat byla vypočtena stravitelnost sušiny. Každá kombinace faktorů byla provedena v pěti opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou variance (ANOVA) na hladině průkaznosti  $P < 0,05$ .

### Výsledky

Stravitelnost sušiny je uvedena v grafech 1 a 2. Graf 1 ukazuje stravitelnost sušiny in vitro v objemném typu krmné dávky. U kontrolní skupiny KO- jsme stanovili stavitelnost sušiny po 24 hodinách inkubace na 36,93 %. U kontrolní skupiny K+ byl výsledek 40,13%, což je hodnota vyšší než u K-. Přídavek kombinace mykotoxinů ENN B a BEA, který odpovídal akutní expozici, neměl vliv na stravitelnost sušiny (40,40 %,  $P > 0,05$ ). Dvojnásobná koncentrace se ale už projevila snížením stravitelnosti až na 35,11% ( $P < 0,05$ ). Tyto výsledky korespondují s mnoha jinými pracemi, které prokázaly inhibiční účinky minoritních mykotoxinů na různé druhy bakterií. V grafu 2 vidíme, že při inkubaci krmiva jaderného typu byla stavitelnost sušiny ve skupině KJ- 39,32 %, zatímco u KJ+ vzrostla na 42,62 %. Ve skupinách EBJ10 a EBJ20 klesla stravitelnost sušiny na 38,00 a 38,88 %.



Graf 1: Objemná krmiva



Graf 2: Jadrná krmiva

### Závěr

Z výsledků je patrné, že vyšší hladiny ENNI a BEA v krmivech mohou mít inhibiční vliv na bachorový mikrobiom. Je ovšem nutné provést další studie, které se budou zabývat jejich vlivem na rozmanitost bachorové mikroflóry.

### References

EFSA (2014): Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal, 12, 3802.

Ivanova L., Uhlig S., Devreese M., Croubels S., Faeste Ch. K. (2017): Biotransformation of the mycotoxin enniatin B1 in pigs: A comparative in vitro and in vivo approach. Food and Chemical Toxicology. 105, 506–517.

Mc Dougall E. I. (1948): Studies on ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. Biochemical Journal, 43, 99–109.

Meca G., Sospedra I., Valero M. A., Manes J., Font G., Ruiz M. J. (2011): Antibacterial activity of the enniatin B, produced by *Fusarium tricinctum* in liquid culture, and cytotoxic effects on Caco-2 cells. Toxicology Mechanisms and Methods, 21, 503–512.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 219/2018/FVHE*

## **Ekotoxicita nanostrříbra pro zástupce půdní fauny**

Daniela Hlávková, Barbora Havelková, Miroslava Beklová

*Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,*

*Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Stříbrné nanočástice se dnes používají v široké škále produktů především z důvodu jejich antibakteriálního účinku. Zaujímají významné místo v lékařství, kosmetice, farmacii, textilním průmyslu, elektrotechnice a další (1, 2). Je zřejmé, že se zvyšující se produkcí a spotřebou stříbrných nanočástic se zvýší i jejich environmentální koncentrace. Výzkumy potvrzují jejich přítomnost ve všech složkách životního prostředí. Bylo prokázáno, že dochází k uvolňování stříbra z výrobků během praní (3). V čističkách odpadních vod dochází k sorpci sloučenin stříbra na čistírenský kal. Ten je využíván v zemědělství, při rekultivacích, případně je ukládán na skládky, čímž se zvyšuje potenciální nebezpečí pro půdní ekosystém.

Předpokládá se, že se environmentální koncentrace stříbra v životním prostředí pohybuje v rozmezí od 0,01–0,43  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , avšak tato koncentrace stříbra v půdě vzroste každoročně o 1,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (4, 5).

Je k dispozici několik studií, které zkoumaly ekotoxikologický efekt stříbrných nanočástic na vodní organismy, avšak údaje o ekotoxikologických efektech na půdní biotu jsou jen velmi sporadické. Tyto údaje je nutné doplnit zejména proto, že neznáme spolehlivou odpověď na otázku, zda stříbrné nanočástice díky stále se zvyšující produkci nemohou závažným způsobem poškodit půdní ekosystém, zejména ekologické funkce půdních organismů.

### **Materiál a metodika**

Cílem projektu bylo objasnit vliv nanostrříbra pro organismy půdního prostředí. Pomocí vybraných ekotoxikologických testů byl zjištěn vliv nanočástic stříbra na reprodukci půdních organismů a posouzen toxický účinek z hlediska velikosti částic stříbra. Ekotoxikologické testy byly provedeny s významnými zástupci půdního edafonu.

Pro provádění testů byly syntetizovány metodou vodné chemické redukce s použitím kyseliny gallové jako redukčního a stabilizačního činidla nanočástice stříbra s průměrnou velikostí částic 2,7 nm a 6,5 nm. Pro objasnění toxických účinků stříbra byly provedeny testy i se stříbrnou solí kyseliny dusičné ( $\text{AgNO}_3$ ). Koncentrační řada nanočástic stříbra se stanovila na základě předběžných testů.

Pro posouzení vlivu nanostříbra na půdní organismy byly provedeny testy chronické toxicity na roupicích *Enchytraeus crypticus* a chvostoskocích *Folsomia candida*. Metodicky se postupovalo dle příslušných norem: OECD 220 [ČSN EN ISO 16387 (2014) Kvalita půdy – Vliv znečišťujících látek na *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Stanovení vlivu na reprodukci] a OECD 232 [ČSN ISO 11267 - Kvalita půdy - Inhibice reprodukce chvostoskoků (*Folsomia candida*) látkami znečišťujícími půdu].

Podstatou testu inhibice reprodukce roupic je vystavení deseti zdravých dospělých jedinců roupic *Enchytraeus crypticus* s viditelným opaskem (clitellum) působení směsi zkoušeného vzorku s umělou půdou. Po 28 dnech se vyhodnotí mortalita dospělců a reprodukce na základě počtu vylíhnutých juvenilů. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou pro zkoušenou směs a pro kontrolu (obojí ve 3 opakováních) se vyjádří jako procento inhibice reprodukce roupic.

Podstatou zkoušky inhibice reprodukce chvostoskoků je vystavení deseti zdravých juvenilních jedinců ve stáří 10-12 dnů působení směsi zkoušeného vzorku s umělou půdou. Po 28 dnech se vyhodnotí mortalita dospělých jedinců a reprodukce. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou pro zkoušenou směs a pro kontrolu (obojí ve 3 opakováních) se vyjádří jako procento inhibice reprodukce chvostoskoků.

Na základě výsledných hodnot 28dEC50 byla porovnána citlivost obou testovacích organismů a posouzen toxický účinek nanočástic stříbra z hlediska jejich velikosti.

## Výsledky

U testů s *Folsomia candida* i *Enchytraeus crypticus* bylo prokázáno snížení reprodukce juvenilů s rostoucí koncentrací nanočástic stříbra a zároveň byl prokázán vliv na mortalitu dospělců. Reprodukce se projevila u obou organismů jako citlivější parametr než mortalita. Reprodukci roupic nejvíce ovlivnil dusičnan stříbrný a nanočástice stříbra s menší velikostí částic (2,7 nm). Efektivní koncentrace (28dEC50)  $\text{AgNO}_3$  byla stanovena na 97,12  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  a pro AgNPs2 na 124,13  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Sledované parametry (reprodukci, mortalitu) nejméně ovlivnily nanočástice s průměrnou velikostí částic 6,5 nm. Toxický efekt stříbrné soli kyseliny dusičné ( $\text{AgNO}_3$ ) se projevil více u dospělých než u juvenilních jedinců. Validací podmínky u všech provedených zkoušek byly splněny.

Výsledné hodnoty EC pro hodnocené nanočástice stříbra i dusičnan stříbrný jsou uvedeny v tabulce číslo 1.

Tab. 1: Hodnoty LC<sub>50</sub> a EC<sub>50</sub> pro chvostoskoky a roupice

Testovací organismy	Nanočástice stříbra - velikost (d.nm)		
	AgNPs1 (6,5)	AgNPs2 (2,7)	AgNO <sub>3</sub>
<i>Enchytraeus crypticus</i> (reprodukce) 28dEC <sub>50</sub> mg.kg <sup>-1</sup> )	a	124,13	97,12
<i>Enchytraeus crypticus</i> (mortalita) 28dEC <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	637,37	500,2	74,14
<i>Folsomia candida</i> (reprodukce) 28dEC <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	205,44	156,58	211,52
<i>Folsomia candida</i> (mortalita) 28dEC <sub>50</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	a	105,78	66,82

a - nestanoveno

### Závěr

Naše zjištěné hodnoty EC<sub>50</sub> (LC<sub>50</sub>) potvrzují toxické účinky nanočástic stříbra na půdní organismy při dlouhodobé expozici. Pro roupici se reprodukce jevila jako citlivější parametr než mortalita. Získané hodnoty efektivních koncentrací nanočástic stříbra umožňují predikovat ekotoxické riziko pro zástupce půdní biocenózy, a i když tyto hodnoty jsou vyšší než v současnosti známé environmentální koncentrace, nelze v souvislosti s jejich rostoucím průmyslovým využíváním vyloučit potenciální toxické riziko.

Z výsledků řešeného projektu je patrné, že inhibice reprodukce chvostoskoků a roupic je vhodným ukazatelem působení nanočástic stříbra.

Na základě dosažených výsledků se prokázalo, že nanočástice s menší velikostí částic jsou více toxické a naopak.

## Seznam literatury

1. ASGHARI S., JOHARI S. A., LEE J. H., KIM Y. S., JEON Y. B., CHOI H. J., MOON M. CH., YU I. J. (2012) Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*. Vol. 10, p. 1–11.
2. GOPINATH P. M., RANJANI A., DHANASEKARAN D., THAJUDDIN N., ARCHUNAN G., AKBARSHA M. A., GULYÁS B., PADMANABHAN P. (2016) Multi-functional nano silver: A novel disruptive and theranostic agent for pathogenic organisms in real-time. *Scientific Reports* 6 (34058) p. 1–16.
3. TIEDE K., HASSELLOV M., BREITBARTH E., CHAUDHRY Q., BOXALL A.B. (2009) Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of chromatography A*. Vol. 1216, p. 503–509.
4. SCHLICH K., KLAWONN T., TERYTZE K., HUND-RINKE K. (2013) Hazard assessment of silver nanoparticle in soil applied via sewage sludge. *Environmental sciences Europe*. Vol. 25:17.
5. WAALEWIJN/KOOL P.L., KLEIN K., FORNIÉS R.M., VAN GESTEL C.A.M. (2014) Bioaccumulation and toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to the soil arthropod *Folsomia candida*. *Ecotoxicology*. Vol. 23, p. 1629–1637.

***Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 218/2018/FVHE***

## **Optimalizace testu fagocytární aktivity u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)**

Kateřina Kobelková (Járová)<sup>1</sup>, Hana Minářová<sup>1,2</sup>, Petra Ondráčková<sup>2</sup>, Jan Mareš<sup>3</sup>, Miroslava Palíková<sup>1</sup>, Martin Faldyna<sup>2</sup>

*Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.<sup>2</sup>, Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita v Brně<sup>3</sup>*

### **Úvod**

Společně s celosvětovým rozvojem akvakultury se zvyšují i požadavky na diagnostiku a prevenci chorob ryb. Vhodným způsobem posouzení imunitního systému ryb a jeho schopnosti reagovat na podněty jsou funkční imunologické metody, mezi které patří i test fagocytární aktivity (pohlcování částic). Principem tohoto testu je inkubace fagocytů s fluorescenčně značenými mikročásticemi (zymosan); po inkubaci je intenzita fagocytární aktivity změřena pomocí průtokové cytometrie. Výhodou této metody je rychlé vyšetření velkého množství buněk a snadné rozlišení jednotlivých buněčných populací (Korytář et al. 2013). Pro účely tohoto testu lze leukocyty izolovat z plné krve hemolýzou v hypotonickém prostředí – tento způsob je rychlý a finančně výhodný (Crippen et al. 2001). Na rozdíl od savců byla u ryb fagocytární aktivita zaznamenána i u B lymfocytů (Øverland et al. 2010), navíc je nutné zohlednit velkou mezidruhovou variabilitu. V rámci tohoto testu je třeba optimalizovat především délku inkubace, inkubační teplotu a koncentraci mikročástic.

### **Materiál a metodika**

Ryby a podmínky chovu, odběr vzorků

Pstruzi duhová (*Oncorhynchus mykiss*) o průměrné hmotnosti  $514,78 \pm 152,90$  g a celkové délce  $317,56 \pm 27,97$  cm byli odchováni v nádrži o objemu 1000 l na Mendelově univerzitě v Brně. Voda byla nasycena kyslíkem na průměrnou hodnotu 8,67 mg/l (tj. 93,5 %), průměrná teplota byla 17,9 °C, pH 7,12, N-NH<sup>4+</sup> 0,55 mg/l, N-NO<sup>2-</sup> 0,11 mg/l a Cl<sup>-</sup> 133,23 mg/l. Ryby byly krmeny dvakrát denně krmivem BioMar EFICO Enviro 920 Advance. Krev byla odebrána z ocasní žíly do heparinizované stříkačky, pro jednotlivé experimenty byly odebrány vzorky vždy z osmi ryb.

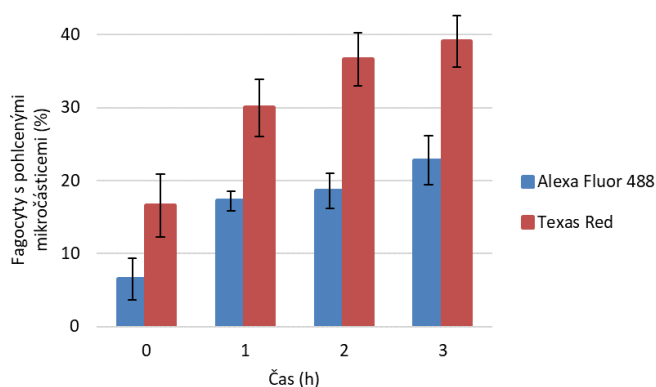
Test fagocytární aktivity

Plná krev (50 µl) byla inkubována s mikročásticemi (5 µl) zymosanu Alexa Fluor 488 (1 mg/ml) a Texas Red (2 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific). Inkubace probíhala při 15 °C (4 °C, 22 °C) v inkubátoru bez CO<sub>2</sub> po dobu 0 (kontrola) až 3 hodiny. Použitý objem krve zahrnoval 10, 50 a 100 µl. Po uplynutí inkubační doby byla k buňkám přidána EDTA (Sigma-Aldrich; 5 µl) a leukocyty izolovány hemolýzou v hypotonickém prostředí (destilovaná voda). Izolované buňky byly

propláchnuty odstředěním v PBS (5 min, 300 g) a fixovány (Cell Wash). V druhém případě byly buňky hemolyzovány předem (100 µl plné krve) a inkubovány s opsonizovaným zymosanem (5 µl), HBSS (40 µl) a fetálním bovinním sérem (10 µl). Rovněž bylo provedeno srovnání s komerčním testem fagocytózy určeným pro humánní účely (Phagotest, Glycotope). Pomocí průtokového cytometru (BD LSRFortessa) byly vyhodnoceny počty fagocytujících buněk a intenzita fagocytární aktivity. U každého vzorku bylo změřeno nejméně 70 000 „events“. Byly identifikovány neutrofilů, monocytů a lymfocytů. Na základě fluorescence (zelená – Alexa Fluor 488, červená – Texas Red) byly určeny buňky s fagocytovanými mikročásticemi.

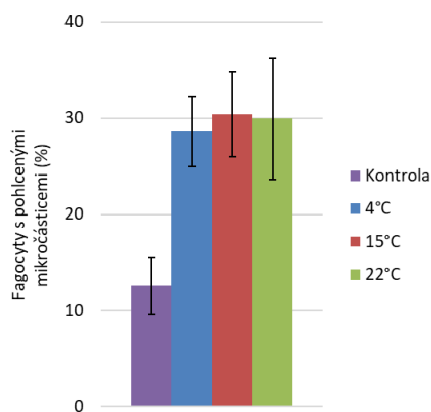
## Výsledky

Test fagocytární aktivity bývá prováděn za různých podmínek – inkubační doba se mezi autory pohybuje od 30 min (Sierosławska et al. 2007) do 18 h (Thuvander et al. 1987, Chilmonczyk et al. 1999). V našem experimentu byla u obou typů mikročástic zaznamenána vyšší fagocytární aktivita při použití dlouhé doby inkubace – 3 h (Obr. 1). Mezi inkubačními teplotami nebyly zjištěny výrazné rozdíly, při teplotě 15 °C byly výsledky optimální (Obr. 2). Podobné teploty bývají užívány i v jiných studiích (Chilmonczyk et al. 1999). Nejvyšší hodnoty fagocytární aktivity byly dosaženy při použití nízkého objemu krve – 10 µl (Obr. 3). Po naředění mikročástic byla fagocytární aktivita nižší (data neuvedena). Vyšší hodnoty byly zaznamenány u zymosanu Texas Red, vyšší však byly i hodnoty kontrolní, což je pravděpodobně způsobeno uchycením částic na povrch buněk. Z tohoto důvodu byl rovněž vypočítán poměr fagocytujících a kontrolních buněk. Při inkubaci izolovaných leukocytů byly zjištěny nejlepší výsledky (Obr. 4), procento fagocytujících buněk bylo třikrát vyšší (63 %) než při inkubaci plné krve. Komerční Phagotest se v našem experimentu neosvědčil, kontroly dosahovaly hodnot až 100 % (Obr. 5).

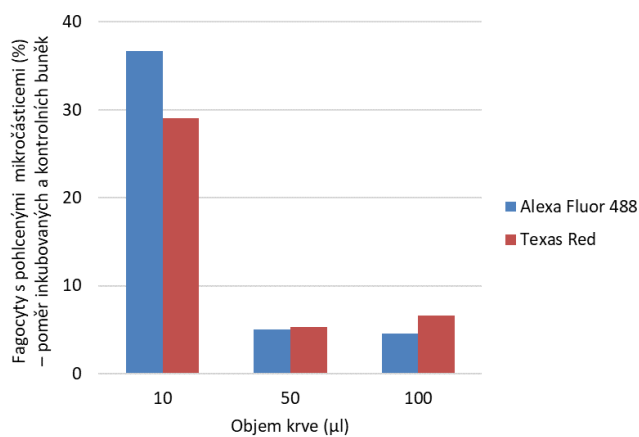


Obrázek 1. Fagocyty s pohlcenými mikročásticemi zymosanu Alexa Fluor 488 a Texas Red (%) v závislosti na délce inkubace (0 = kontrola, 1, 2 a 3 h; 15 °C, n = 8).

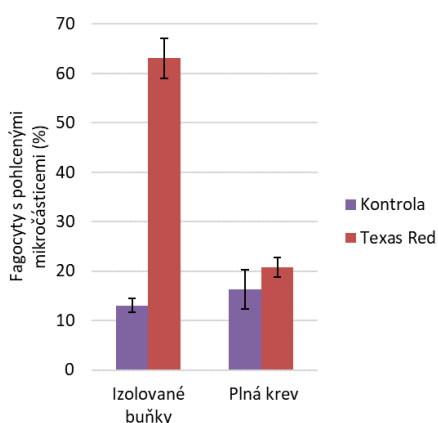




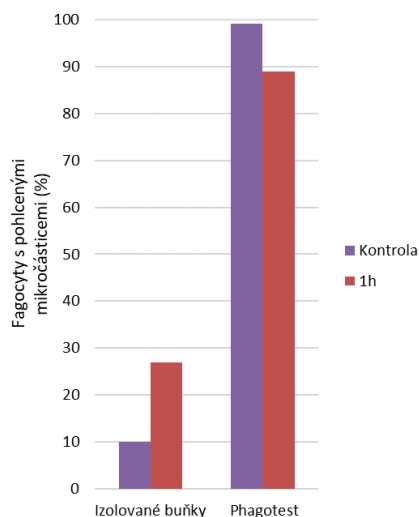
Obrázek 2. Fagocyty s pohlcenými mikročásticemi zymosanu Texas Red (%) v závislosti na inkubační teplotě (4, 15 a 22 °C; 3 h, kontrola = 0 h, n = 8).



Obrázek 3. Fagocyty s pohlcenými mikročásticemi zymosanu Alexa Fluor 488 a Texas Red (poměr inkubovaných a kontrolních buněk) v závislosti na objemu krve (10, 50 a 100 µl; 3 h, 15 °C, n = 8).



Obrázek 4. Fagocyty s pohlcenými mikročásticemi zymosanu Texas Red (%), inkubace izolovaných buněk a plné krve (1 h, kontrola = 0 h, n = 8).



Obrázek 5. Fagocyty s pohlcenými mikročásticemi zymosanu Texas Red (%), inkubace izolovaných buněk ve srovnání s komerčním testem (Phagotest; 1 h, kontrola = 0 h, n = 8).

### Závěr

Test fagocytární aktivity za použití zymosanu (Alexa Fluor 488, Texas Red) byl optimalizován a nabízí nové možnosti zhodnocení zdravotního stavu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*).

### Seznam literatury:

- Chilmonczyk, S., Monge, D. 1999. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(4): 319–333.
- Crippen, T.L., Bootland, L.M., Leong, J.C., Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., Vella, A.T. 2001. Analysis of salmonid leukocytes purified by hypotonic lysis of erythrocytes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 234–245.
- Korytář, T., Dang Thi, H., Takizawa, F., Köllner, B. 2013. A multicolour flow cytometry identifying defined leukocyte subsets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35: 2017–2019.
- Øverland, H.S., Pettersen, E.F., Rønneseth, A., Wergeland, H.I. 2010. Phagocytosis by B-cells and neutrophils in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 28: 193–204.
- Sierosławska, A., Rymuszka, A., Bownik, A., Skowroński, T. 2007. The influence of microcystin-LR on fish phagocytic cells. *Human & Experimental Toxicology*, 26: 603–607.
- Thuvander, A., Norrgren, L., Fossum, C. 1987. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. *Journal of Fish Biology*, 31: 197–208.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 220/2018/FVHE***

## **Detekce alergenu podzemnice olejn  v potravinách pomocí kvantových teček**

Zdeňka Jav rkov , Ludmila Luňakov , Matej Pospiech, Marie Bartlov , Hana B halov 

* stav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Veterinární a farmaceutick  univerzita Brno*

### ** vod**

Z pohledu veřejného zdraví se výskyt potravinových alergií nestále zvyšuje. Ve světě je alergiemi postiženo zhruba 4 – 8 % d t  a 2 % dospělých. Mezi potraviny způsobující více neŹ 90 % potravinových alergií patří mimo jiné i podzemnice olejn . Tato alergie patří nejen mezi ty nej ast jř , a zároveň i nejnebezpe n jř  alergie, kter  mohou končit aŹ anafylaktick m šokem, potenci ln  smrtelnou reakcí (Sitton et al., 2018). Jedno jádro podzemnice olejn  obsahuje asi 200 mg bílkovin. Subjektivn  symptomy byly stanoveny u d vky 100 µg a objektivn  příznaky byly u 2 mg alergenu (Al-Muhsen et al., 2003). Alergenn  proteiny podzemnice olejn  patří zejména mezi z sobn  proteiny semene. Př icemŹ alergenní protein Ara h 1 zaujímá z celkového obsahu bílkovin podzemnice olejn  12 – 16 % (Palladino and Breiteneder, 2018). Jako prevence osob postižených alergií na jádra podzemnice olejn  je striktn  vyhýbání se konzumaci produktů obsahující arař dy či arař dov  proteiny či potravinám s jejich potenciálním výskytem (Sitton et al., 2018). Spotřebitel často nespr vn  označuje arař dy také jako such  skoř pkov  plody, coŹ je zavádějící pro alergického spotřebitele. Nařízení č. 1169/2011 vřak spr vn  rozliřuje tyto dvě skupiny alergenů zvl řt'.

Cílem projektu byla detekce přítomnosti jader podzemnice olejn  v potravinách imunohistofluorescen n  metodou s využitím kvantových teček (IHF - QD).

### **Materiál a metodika**

Projekt byl zaměřen na vývoj nové metody detekce antigenu Ara h1 podzemnice olejn  v potravinách.. Byly testovány 3 barven  – c len  barven  PAS Calleja (PC), Lugol Calleja (LC) a přehledn  barven  Hematoxylin Eosin (HE) dle metodiky Pospiech et al (2011). Dalř m krokem byla výroba modelových vzorků pečiva obsahujících podzemnici olejnou. Vzorky byly př praveny s přídavkem 0,0001 %; 0,001 %; 0,01 %; 0,1 %; 0,5 %; 1 %; 2,5 %; 5 % a 10 % podzemnice olejn . Koncentrační řada byla pouŹita pro stanoven  detekčního limitu vyvř jen  metody.

Sendvi ov  imunohistochemick  metoda (IHC) a imunohistofluorescen n  metoda byla za pouŹit  kvantových teček (IHF-QD). Byla pouŹita polyklonální prim rn  protilátka kr l i ho původu anti - Ara h1 (INDOOR biotechnologies, USA) v řed n  1:1500; 1:1000 a 1:500. Pro zna en  prim rn  protilátky u IHC metody byl pouŹit VECTASTAIN Elite ABC KIT (VectorLaboratories, USA)

a chromogen HistoGreen (Linaris GmbH., DK). Pozadí řezu bylo dobarveno Jádrou červení. Pro značení primární protilátky byl použit konjugát sekundární protilátky proti králičímu Fc fragmentu s navázanými CdSe/ZnS QDs s emisemi 525, 585 a 655 nm (Invitrogen, JPN). Křížová reaktivita s příbuznými proteiny dalších potenciálně alergenních surovin byla ověřena na suchých skořápkových plodech, sóji, mléku a pšenici.

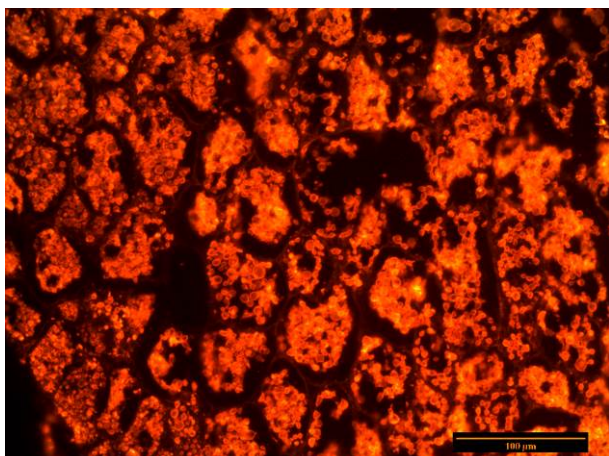
Obnova antigenu byla testována s citrátovým pufrem, pufrem Citrát EDTA a pufrem chloridu hlinitého.

Pro možnosti stanovení specifity a senzitivity bylo testováno 30 vzorků z tržní sítě. Vzorky z tržní sítě byly, stejně jako vzorky modelové zpracovány technikou parafinových řezů.

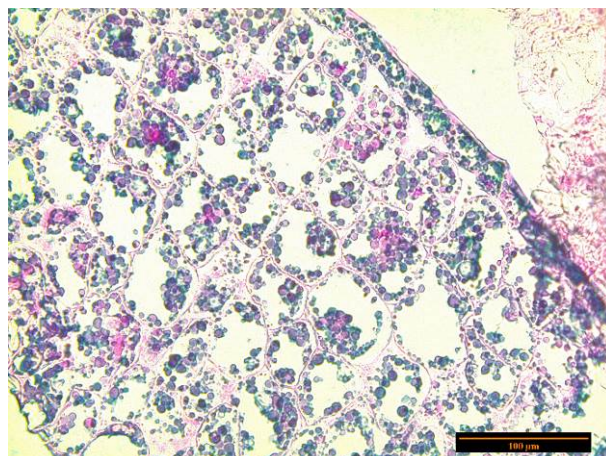
### Výsledky

Na základě porovnání výsledků histochemických barvení bylo jako nejvhodnější zvoleno barvení PAS – Calleja, které nejlépe zvýraznilo jednotlivé struktury podzemnice a suchých skořápkových plodů. Obecná mikroskopická struktura jader podzemnice olejné a suchých skořápkových plodů si je velmi blízká. Všechny tyto struktury obsahují v kotyledonech v parenchymatické vrstvě zejména škrobová zrna, bílkovinná tělíska a tuk. Rozlišení jednotlivých druhů skořápkových plodů a podzemnice olejné je tedy na základě jejich mikroskopických struktur pro nezkušeného hodnotitele velmi obtížné. Zároveň je složitá i identifikace jader, která jsou dále technologicky zpracovávána (např. mělnění) (Luňáková et al., 2018; Hohmann, 2007; Young and Schadel, 1990). Proto bylo třeba rozvíjet další metody detekce podzemnice olejné v potravinových matricích, což bylo také hlavním cílem tohoto projektu. Dosažené znalosti struktury jednotlivých druhů jader byly využity pro kontrolu správného postupu použitých metod z pohledu specifického navázání protilátek na proteinová tělíska arašídů. V rámci projektu byla testována a modifikována IHC metoda a vytvořena nová IHF-QD metoda pro průkaz podzemnice olejné. Výsledky získané imunofluorescenční metodou s kvantovými tečkami (Obrázek 1) byly srovnávány s výsledky imunohistochemické metody za využití chromogenu HistoGreen (Obrázek 2) pro značení alergenu a barvení pozadí pro získání vhodného kontrastu pomocí barvení Jádrou červení. Dále byl testován kvantový výtěžek tří komerčně dostupných CdSe/ZnS QD s emisemi 525, 585 a 655 nm (Byers et al., 2011). Jako nejvhodnější pro využití v imunofluorescenčním průkazu podzemnice olejné byl konjugát s QDs o vlnové délce 585 nm. Metoda s použitím QDs byla u modelových vzorků vhodnější z důvodů nespecifické vazby HistoGreenu na tukové částice. U obou metod (IHC I IHF-QD) nebyla potvrzena křížová reakce s jinými druhy alergenů a jako nejvhodnější koncentrace ředění polyklonální primární protilátky králičího původu anti - Ara h1 bylo ředění 1:500. Co je ve shodě s ředěním primárních protilátek pro další rostlinné alergeny. (Pospiech et al., 2009; Řezáčová

Lukášková et al., 2010) Dále byly testovány tři druhy pufrů sloužících pro obnovu antigenu. Jako nejvhodnější pufr byl pufr s obsahem chloridu hlinitého.



**Obrázek 1:** IHF-QD metoda (585 nm) - modelový vzorek s obsahem 1 % jader podzemnice olejné.(Protein – oranžová)



**Obrázek 2:** IHC metoda - modelový vzorek s obsahem 1 % jader podzemnice olejné.(Protein – zelená)

Na základě vyšetření modelových vzorků a vzorků z tržní sítě byly analyzovány parametry, jako je detekční limit, senzitivita a specifita metody ve shodě s ověřováním kvalitativních metod (Pospiech et al., 2014). Aby bylo možné analyzovat senzitivitu a specifitu metody bylo vyšetřováno 15 vzorků z tržní sítě s deklarovaným obsahem podzemnice olejně a 15 vzorků bez jejího deklarovaného obsahu. Detekční limit byl hodnocen na základě vytvořených modelových vzorků s definovaným obsahem alergenní složky - jader podzemnice olejně. Detekční limit byl stanoven na 0,0001 %. Správnost neboli senzitivita testu je schopnost pomocí metody rozpoznat skutečně pozitivní vzorky. Senzitivita IHF- QD metody dosahovala hodnoty 0,93. To znamená, že výsledek IHF-QD analýzy byl pozitivní v případě, že výrobek skutečně obsahoval alergen podzemnici olejnou. Specifita metody je její schopnost rozpoznat vzorky, které skutečně neobsahují alergen podzemnici olejnou, tzn., že výsledek analýzy se projevil jako negativní. Specifita metody IHF-QD dosahovala hodnoty 1. Všechna validační kritéria byla vyhodnocena po anonymní analýze vzorků.

### Závěr

Podzemnice olejná je přidávána do široké škály potravinářských výrobků, a proto je z pohledu jejího alergenního potenciálu kladen důraz na vývoj detekčních metod. V tomto projektu byla vyvinuta a implementována nová imunohistofluorescenční metoda s využitím kvantových teček pro značení alergenního proteinu Ara h1.

Nejlepšího kontrastu bylo dosaženo při koncentraci primární protilátky 1:500, přičemž nejvyšší kvantový výtěžek (nejsilnější kontrast) vykazovali QDs o vlnové délce 585 nm. S ohledem

na hodnocení výsledků z analýzy modelových vzorků a vzorků z tržní sítě, můžeme říci, že se jedná o velmi senzitivní a specifickou metodu s detekčním limitem 0,0001 %. Vyvinutou metodu bude možné po modifikaci některých kroků využít pro analýzu dalších potravinových alergenů.

### **Seznam literatury:**

AL-MUHSEN, S., CLARKE, A. E., KAGAN, R. S. Peanut allergy: an overview. *Canadian Medical Association Journal*, 2003, 168(10), p. 1279-1285.

BYERS, R. J., HITCHMAN, E. R. Quantum dots brighten biological imaging. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2011, vol. 45(4), p. 201-237.

EVROPSKÁ UNIE. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011, o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. In: Úřední věstník Evropské unie L 304, 22/11/2011, s. 18-63.

HOHMANN, B. Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel und Futtermittel: Der Gassner. Hamburg: B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 2007, 770 p. ISBN: 987-389947-256-1

LUŇÁKOVÁ, L., JAVŮRKOVÁ, Z., POSPIECH, M., BARTLOVÁ, M., BĚHALOVÁ, H., TREMLOVÁ, B. Mikroskopická stavba semen podzemnice olejné (*Arachis hypogaea* L.). *Hygiena a technologie potravin XLVIII. Lenfeldovy a Höklovy dny. Sborník abstraktů*, 2018, p. 228-231. ISBN: 978-80-7305-808-1.

PALLADINO, C., BREITENEDER, H. Peanut allergens. *Molecular immunology*, 2018, vol. 100, p. 58-70.

POSPIECH M., TREMLOVÁ B., RENČOVÁ E., RANDULOVÁ Z. Immunohistochemical detection of soya protein – optimisation and verification of the method. *Czech journal of food science*, 2009, č. 1, r. 27, p. 11-19.

POSPIECH, M., TREMLOVÁ, B., RENČOVÁ, E., RANDULOVÁ, Z., ŘEZÁČOVÁ LUKÁŠKOVÁ, Z. POKORNÁ, J. Comparison of the Results of the ELISA, Histochemical, and Immunohistochemical Detection of Soya Proteins in Meat Products. *Czech J. Food Sci.*, 2011, vol. 29 (5), p. 471-479.

POSPIECH, M., TALANDOVÁ, M., TREMLOVÁ, B., RANDULOVÁ, Z. Detection of native starches in meat products using histochemical lugol calleja method. Průkaz nativních škrobů histochemickou metodu Lugol Calleja v masných výrobcích. *Potravinářstvo*, 2014, vol. 8, no. 1, p. 77-81.

ŘEZÁČOVÁ LUKÁŠKOVÁ Z., TREMLOVÁ B., POSPIECH M., RENČOVÁ E., RANDULOVÁ Z. Immunohistochemical detection of wheat protein in model samples *Czech journal of food sciences*, 2010, vol. 28, issue 6, p.514-519

SITTON, C., TEMPLES, H. S. Practice Guidelines for Peanut Allergies. *Journal of Pediatric Health Care*, 2018, vol. 32(1), p. 98-102.

YOUNG, C. T., SCHADEL, W. E. Microstructure of peanut seed: a review. *Food structure*, 1990, vol. 9 (4), p. 317-328.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 224/2018/FVHE***

# Hodnocení mikrobiologické kvality prostředí výrobních středisek v provozovnách stravovacích služeb v návaznosti na bezpečnost připravovaných pokrmů

Josef Kameník, Kateřina Bogdanovičová, Simona Křepelová, Jan Strejček, Jana Šustová

*Ústav gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita  
Brno*

## Úvod

Provozovny stravovacích služeb, jako jsou restaurace, kantýny nebo školní jídelny, patří v Evropě hned po domácnostech na druhé místo vzniku hromadných onemocnění z potravin (EFSA, 2015; EFSA, 2017; Schlinkmann et al., 2017). Nejčastější příčinou hromadných alimentárních onemocnění jsou bakteriální původci, příp. bakteriální toxiny, pokud se podaří epidemiologickým šetřením průvodce prokázat (EFSA 2016; EFSA 2017). V roce 2016 patřili mezi nejčastější bakteriální původce hromadných alimentárních onemocnění v EU zástupci rodu *Salmonella*, *Campylobacter* a STEC (EFSA, 2017). Podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2003/99/ES o sledování zoonóz a jejich původců patří mezi sledované zoonózy včetně jejich původců v členských státech EU mimo jiné kampylobakterióza, listerióza, salmonelóza a jejich původci a verotoxigenní *E. coli*. Cílem studie bylo zhodnotit výskyt bakterií *E. coli* se zaměřením na STEC, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes* ve vybraných provozovnách stravovacích služeb.

## Materiál a metodika

### Odebírané vzorky

Byla sledována mikrobiologické kontaminace 11 provozoven stravovacích služeb. Vzorky byly odebrány technikou stěrů za použití abrazivních houbiček z prostředí výrobního střediska provozovny (n = 151) a rukou pracovníků (n = 125). Vzorky z prostředí provozoven představovaly stěry z pracovních ploch, zařízení přicházejících do přímého styku s potravinami nebo madel přístrojového vybavení ad., povrch rukou pracovníků byl monitorován prostřednictvím tzv. glove-juice testu (Waterman et al., 2006). Bylo odebráno rovněž 21 vzorků hotových pokrmů. Celkem bylo mikrobiologicky hodnoceno 297 vzorků.

### Mikrobiologické vyšetření

Detekce *E. coli* byla prováděna dle ISO 16649 - 2, a to po pomnožení vzorku v pufrované peptonové vodě (Oxoid, Hampshire, UK) při 37 °C po dobu 24 hodin s následnou kultivací na TBX agaru (44 °C, 24 h) (Oxoid, Hampshire, UK). Z každého pozitivního vzorku byly do studie zařazeny 1 - 3 izoláty suspektních *E. coli*. Konfirmace suspektních izolátů spočívala v detekci

oxidázy (OXItest, Erba-Lachema, Brno, CZ) a v posouzení tvorby indolu (COLItest, Erba-Lachema, Brno, CZ).

K detekci genů kódujících vybrané faktory virulence - *eaeA*, *hly*, *stx1* a *stx2* byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Reakční objem činil 25 µl a k amplifikaci byla použita taq - Purple DNA polymeráza s MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, Vestec, CZ). Detekce faktorů virulence byla provedena pomocí multiplex PCR podle autorů Fagan et al. (1999), v 25 µl reakční směsi byl použit PCR QIAGEN Master mix (Qiagen, Hilden, GE). Produkty PCR byly analyzovány gelovou elektroforézou ve 2% agaróze (Serva, Heidelberg, GE) s následnou vizualizací na transiluminátoru po obarvení ethidium bromidem (MERCK, Darmstadt, GE).

Pro stanovení *B. cereus* bylo použité živné médium obsahující selektivní složku inhibující růst doprovodných mikroorganismů, MYP-Mannitol Yolk Polymyxine B agar (ČADERSKÝ-ENVITEK, Brno, CZ). Stanovení probíhalo dle ISO 7932. Po pomnožení při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin následovala kultivace s použitím výše uvedeného média, při 30 °C po dobu 24 hodin. Identifikace izolátů byla provedena pomocí sledování úplné hemolýzy na krevním agaru (BioRad, California, USA) a konfirmace suspektních kmenů *B. cereus* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), a to detekcí genu *gyrB* kódujícího podjednotku B DNA gyrasy (Yamada et al., 1999).

Přítomnost bakterie *S. aureus* byla prováděna podle ISO 6888 - 1. Po pomnožení při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin následovala kultivace s použitím média Baird - Parker (Oxoid, Hampshire, UK). Identifikace izolátů byla provedena pomocí biochemického testu volné koagulázy a konfirmace suspektních kmenů *S. aureus* byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR), a to detekcí specifického úseku SA442 (Martineau et al., 1998).

Přítomnost bakterie *L. monocytogenes* byla stanovena podle ISO 11290 - 1, primárním pomnožením v polovičním Fraser médiu (Oxoid, Hampshire, UK) při 30 °C po dobu 24 hodin s následným vyočkováním do plného Fraser média (Oxoid, Hampshire, UK) při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin. Vyočkování bylo provedeno na ALOA Agar (BioRad, California, USA) a kultivace probíhala při 37 °C po dobu 24 - 48 hodin.

*Salmonella* spp. byla detekována podle ISO 6579. Po pomnožení v pufrované peptonové vodě (Oxoid, Hampshire, UK), proběhlo selektivní pomnožení v médiích RVS a MKTTN (Oxoid, Hampshire, UK) při teplotě 42 °C a 37 °C po dobu 24 hodin. Poté následovalo vyočkování na média RAMBACH (MERCK, Darmstadt, GE) a XLD (Oxoid, Hampshire, UK).

## Výsledky

Výsledky mikrobiologického vyšetření jsou uvedeny v tabulce.



Typ provozovny	charakter vzorku	n	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> spp.
závodní stravování (n=8)	prostředí	94	46 (48,9%)	18 (19,1%)	15 (16,0%)	0
	personál	72	13 (18,1%)	13 (18,1%)	9 (12,5%)	0
	pokrmy	17	8 (47,1%)	3 (17,6%)	3 (17,6%)	0
školní stravování (n=2)	prostředí	50	29 (58,0%)	23 (46,0%)	4 (8,0%)	1
	personál	49	22 (44,9%)	19 (38,8%)	3 (6,1%)	0
	pokrmy	4	2	2	1	0
restaurace (n=1)	prostředí	7	3 (42,9%)	3 (42,9%)	1 (14,3%)	0
	personál	4	1	3	0	0
celkem (n=11)	prostředí	151	78 (51,7%)	44 (29,1%)	20 (13,2%)	1 (0,7%)
	personál	125	36 (28,8%)	35 (28,0%)	12 (9,6%)	0
	pokrmy	21	10 (47,6%)	5 (23,8%)	4 (19,6%)	0

Z prostředí osmi provozoven stravovacích služeb kategorie závodního stravování (n=94) byl nejčastěji izolován *B. cereus* (48,9 % vzorků), dále potom *S. aureus* (19,1 % vzorků) a *E. coli* (16,0 %). Personál těchto provozoven (celkem vyšetřeno 72 vzorků povrchů rukou) byl kontaminován bakteriemi *B. cereus* v menší míře, než tomu bylo u vzorků prostředí. V případě *S. aureus* a *E. coli* (12,5 %) byly izoláty uvedených bakterií získány v přibližně shodných podílech, jako tomu bylo ze vzorků prostředí. V žádném vzorku nebyla prokázána *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* nebo STEC.

V případě prostředí dvou školních kuchyní (n=50) bylo 58 % vzorků pozitivních na přítomnost *B. cereus*, 46 % pozitivních na *S. aureus* a 8 % na *E. coli*. V jednom případě byla izolována *Salmonella* Agona (stěr rukojeti ocílky v hrubé přípravě masa; opakovaný stěr po 20 dnech byl již negativní). Ruce personálu poskytly nepatrně nižší podíly záchytu izolátů ve srovnání s prostředím. *L. monocytogenes* nebo STEC nebyly zjištěny v žádném odebraném vzorku.

Relativně vysoké záchyty *B. cereus* i *S. aureus* odpovídaly nálezům těchto bakterií v odebraných vzorcích hotových pokrmů (*B. cereus* 47,6 %; *S. aureus* 23,8 %), i když kvantitativně byly oba sledované druhy prakticky na úrovni detekce a nepředstavovaly pro konzumenty žádné bezprostřední ohrožení.

Přínosem tohoto projektu bylo získání údajů o aktuálním výskytu potenciálních původců alimentárních onemocnění v prostředí stravovacích služeb. Zjištění úrovně kontaminace a zejména zjištění zdrojů této kontaminace v prostředí provozoven stravovacích služeb může být významné pro zavedení preventivních opatření v praxi.

### **Seznam literatury:**

EFSA (2015): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015; 13 (12): 4329.

EFSA (2016): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. EFSA Journal 2016; 14 (12): 4634.

EFSA (2017): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017; 15 (12): 5077.

Schlinkmann, K. M., Razum, O., Werber, D. (2017): Characteristics of foodborne outbreaks in which use of analytical epidemiological studies contributed to identification of suspected vehicles, European Union, 2007 to 2011. *Epidemiology and Infection*, 145, 1231-1238.

Waterman, T. R., Smeak, D. D., Kowalski, J., Hade, E. M. (2006): Comparison of bacterial counts in glove juice of surgeons wearing smooth band rings versus those without rings. *American Journal of Infection Control*, 34, 421-425.

Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N., Venkateswaran, K. (1999): Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 1483-1490.

***Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 233/2018/FVHE***

## Charakterizace enterobakterií rezistentních k cefalosporinům a karbapenemům z odpadních vod metodou celogenomového sekvenování

Iva Kutilová<sup>1,2</sup>, Pimlapas Leekitcharoenphon<sup>3</sup>, Valeria Bortolaia<sup>3</sup>, Sünje Johanna Pamp<sup>3</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>

*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>; Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno (CEITEC VFU BRNO)<sup>2</sup>; Research Group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark<sup>3</sup>*

### Úvod

Beta-laktamová antibiotika, především cefalosporiny a karbapenemy, se řadí mezi nejvýznamnější antimikrobiální látky současné medicíny. Narůstající výskyt bakterií z čeledi Enterobacteriaceae produkujících širokospektré beta-laktamázy (enzymy hydrolyzující peniciliny, cefalosporiny (první, druhé a třetí generace) a aztreonam) a karbapenemázy (enzymy hydrolyzující beta-laktamový kruh již zmíněných skupin antibiotik a navíc i karbapenemů), stojí za zvyšující se nemocností a úmrtností jak lidí, tak zvířat. Mezi nejčastější skupiny beta-laktamáz řadíme enzymy TEM, SHV, OXA a CTX-M, i když ne všechny jejich varianty mají širokospektrální aktivitu. Mezi významné karbapenemázy patří serinové karbapenemázy (zejména KPC, skupina OXA-48) a metalo-beta-laktamázy (VIM, IMP, NDM).<sup>1,2,3</sup>

Velmi alarmující je zvyšující se prevalence bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám v životním prostředí během posledních let. Čistírny odpadních vod (ČOV) představují místo, kde se mísí odpadní vody různého původu (městské, nemocniční, průmyslové či zemědělské). Díky faktorům jako je vhodná teplota, vysoké množství bakterií, obsah organických látek, reziduí antibiotik, těžkých kovů a apod., poskytují ČOV vhodné podmínky pro horizontální přenos genů rezistence. Nedávné studie dokumentují zvyšující se výskyt rezistentních bakterií v odpadních vodách a to i na odtoku z ČOV, což poukazuje na nedostatečnou účinnost procesů používaných při čištění odpadních vod pro odstranění patogenních mikroorganismů.<sup>2,4,5,6</sup>

Tato studie byla zaměřena na rezistentní gramnegativní bakterie získané z brněnských odpadních vod. V rámci projektu bylo charakterizováno 78 izolátů *Escherichia coli* produkujících širokospektré beta-laktamázy (ESBL, z anglického Extended-Spectrum Beta-Lactamase) a AmpC beta-laktamázy metodou celogenomového sekvenování, byla určena prevalence enterobakterií produkujících karbapenemázy a tyto rezistentní izoláty byly dále typizovány fenotypovými a genotypovými metodami.

## Materiál a metodika

Na podzim roku 2016 bylo odebráno šest různých vzorků vod. Tři vzorky pocházely z Fakultní nemocnice Brno Bohunice: 1) přítok z nemocniční ČOV – odpadní voda především z infekčních klinik, 2) přečištěná voda na odtoku z nemocniční ČOV, 3) surová odpadní voda z nemocnice vedená kanalizací do ČOV Brno Modřice. Dále byly odebrány dva vzorky na přítoku a odtoku ČOV Brno Modřice a jeden vzorek z řeky Svratky nad výpustí přečištěné odpadní vody z ČOV Brno Modřice. Ze vzorků vod byly selektovány enterobakterie rezistentní k cefalosporinům a karbapenemům. Na základě rozdílné příbuznosti izolátů, detekovaného genu rezistence a spektru citlivostí k různým antimikrobiálním látkám (data získána v rámci jiného projektu) byl vybrán reprezentativní soubor 78 izolátů *E. coli* produkující ESBL nebo AmpC beta-laktamázy, které byly celogenomově sekvenovány na přístroji MiSeq nebo NextSeq (Illumina). Získaná data byla bioinformaticky zpracována za použití software Trimmomatic-0.36, SPAdes 3.11.0 a nástroji ResFinder 3.0 a MLST 1.8 volně dostupnými na <http://www.genomicepidemiology.org>. Příbuznost izolátů byla stanovena analýzou jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) v core genomu<sup>7</sup> za použití referenčního genomu *E. coli* ABWA45 (accession nr. PRJNA391287) a fylogenetický strom byl vizualizován softwarem iTOL v4.

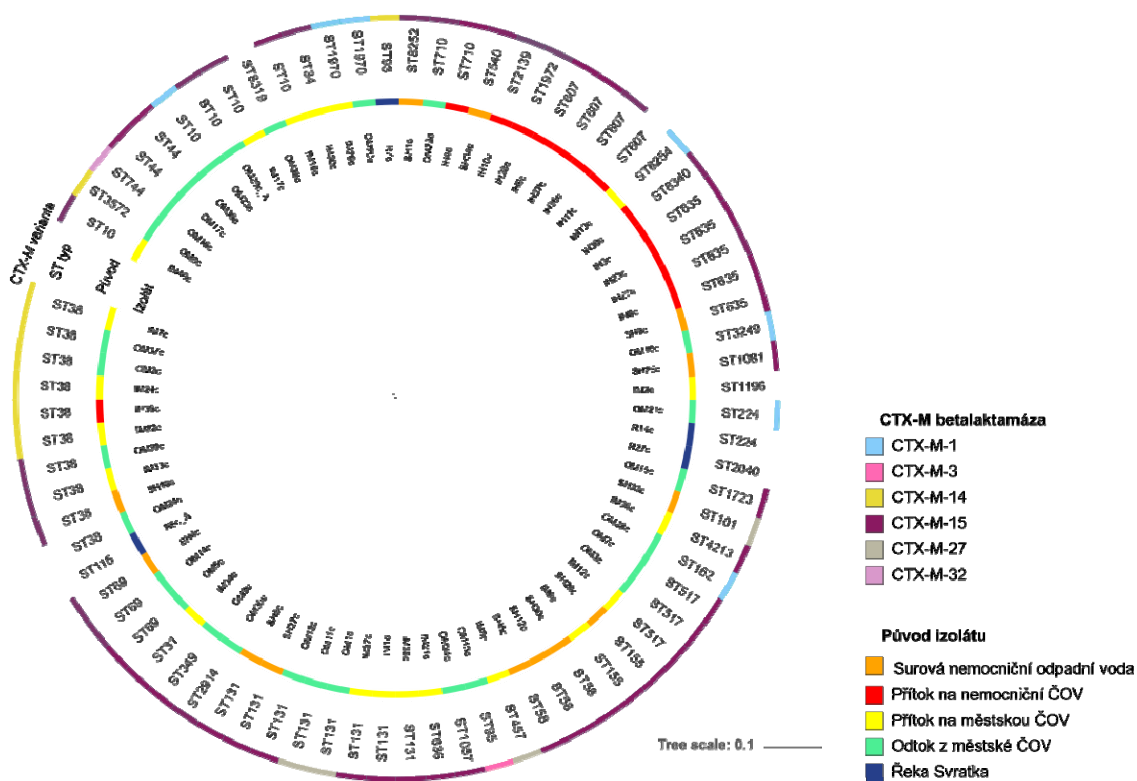
U izolátů se sníženou citlivostí k meropenemu byla provedena detekce genů rezistence pro produkci karbapenemáz (*bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMI</sub>*) metodou PCR<sup>8</sup> a sekvenací amplikonů. U izolátů nesoucí výše zmíněný gen rezistence byla testována karbapenemázová aktivita<sup>9</sup> a určena příbuznost izolátů metodou pulzní gelové elektroforézy za použití enzymu XbaI.

## Výsledky

Z celkového počtu 158 izolátů *E. coli* produkujících ESBL nebo AmpC beta-laktamázy bylo 78 izolátů celogenomově sekvenováno. Tyto izoláty pocházely ze všech typů vzorkovaných vod až na odtok z nemocniční ČOV, kde je do procesu čištění zařazena chlorová dezinfekce, která účinně eliminuje bakterie. 71 izolátů neslo gen *bla<sub>CTX-M</sub>* (91 %; n=78; z toho 49 izolátů variantu *bla<sub>CTX-M-15</sub>*), dále byl u 41 izolátů detekován gen *bla<sub>TEM-1</sub>* (53 %; n=78) a u 27 izolátů gen *bla<sub>OXA</sub>* (varianty *bla<sub>OXA-1,-2,-10</sub>*). Z AmpC beta-laktamáz byl u 5 izolátů detekován gen *bla<sub>CMY-2</sub>* a u dvou izolátů gen *bla<sub>DHA-1</sub>*. Izoláty nesly další geny rezistence ke skupinám antibiotik, jako jsou aminoglykosidy, sulfonamidy, tetracykliny, fluorochinolony, makrolidy, trimethoprim a amfenikoly. Nejčastějším sekvenčním typem byl ST131 detekovaný u 8 izolátů (10 %; n=78). Fylogenetický strom prokázal vysokou genetickou variabilitu sekvenovaných izolátů. Fylogenetický strom a detailnější charakteristika izolátů je uvedena na Obrázku č. 1.

Z celkového počtu 180 izolátů se sníženou citlivostí k meropenemu byl u 3 kmenů *Enterobacter asburiae* detekován gen *bla<sub>VIM-1</sub>* (1,7 %; n=180), tyto kmeny byly producenty karbapenemáz a velmi variabilní (příbuznost 88,4 % a 59,2 %; viz Obrázek č. 2). Zastoupení genů rezistence je shrnuto v Tabulce č. 1.

Obrázek č. 1 – Fylogenetický strom izolátů *E. coli* s vyznačeným původem, ST typem a variantou CTX-M-beta-laktamázy



Tabulka č. 1 – Molekulární charakterizace izolátů *Enterobacter asburiae* nesoucích gen *bla<sub>VIM-1</sub>*

Izolát	Původ izolátu	PFGE *	Geny rezistence**
<i>E. asburiae</i> BP16m/1	přítok ČOV nemocnice	1	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>ACT-6</sub></i> , <i>strA</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>qnrB1</i> , <i>fosA</i> , <i>mph(A)</i> , <i>sul1</i>
<i>E. asburiae</i> MP4m/4	přítok ČOV město	2a	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>CMY-16</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>ACT-6</sub></i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3')-VIb</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aadA1</i> , <i>qnrB1</i> , <i>fosA</i> , <i>mph(A)</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA14</i>
<i>E. asburiae</i> MO13m/20	odtok ČOV město	2b	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-10</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>ACT-6</sub></i> , <i>aadA8b</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-II</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> , <i>qnrS2</i> , <i>fosA</i> , <i>catB4</i> , <i>sul1</i>

\*Kmeny s příbuzností PFGE profilů  $\geq 85\%$  jsou zařazeny do stejné skupiny značené číslem (1, 2). Kmeny ze stejné skupiny s příbuzností PFGE profilů  $< 100\%$  jsou označeny písmeny (1a, 1b,...); \*\*Šedá barva písma značí shodu sekvence genu s referencí  $< 100 - 95\%$ .

**Obrázek č. 2 – Dendrogram příbuznosti izolátů *E. asburiae* nesoucích gen *bla*<sub>VIM-1</sub>**



### Závěr

Studie upozorňuje na odpadní vody jako významný zdroj multirezistentních kmenů *E. coli* produkující ESBL i enterobakterií nesoucí geny udělující rezistenci ke karbapenemům. Je zde zdokumentována nedostatečná eliminace rezistentních bakterií během čistírenských procesů a jejich následné šíření do životního prostředí. Ve studii byla detekována vysoká prevalence klonu *E. coli* ST131, který je celosvětově považován za humánní patogen způsobující závažné infekce. Nejčastějším detekovaným genem zodpovědným za produkci ESBL byl gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, především jeho varianta *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Záchyt 5 multirezistentních izolátů *Enterobacter asburiae* nesoucích gen *bla*<sub>VIM</sub> je velmi znepokojivý, neboť karbapenemy jsou považovány za antibiotika poslední volby v boji proti bakteriálním infekcím způsobených enterobakteriemi.

### Seznam literatury:

- <sup>1</sup>EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. *EFSA Journal*, 2013, **11**(12):3501, 70 pp.
- <sup>2</sup>Alouache, S. et al. Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*. 2014, **20**(1), p. 30-38.
- <sup>3</sup>Paterson, L. P. and Bonomo, R. A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, **18** (4), p 657-686.
- <sup>4</sup>Reinthaler, F. F. et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research*. 2010, **44**(6), p. 1981-1985.
- <sup>5</sup>Amos, G. C. A. et al. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014, **69**(7), p. 1785-1791.
- <sup>6</sup>Lood, R. et al. *Frontiers in Microbiology*. 2017, vol. 8, p. 1-8
- <sup>7</sup>Rolf, S. K. et al. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. *PLoS ONE*, 2014, **9**(8), e104984.
- <sup>8</sup>Dolejska, M. et al. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, **71**(1), p. 63–70.
- <sup>9</sup>Rotova, V. et al. Comparison of imipenem and meropenem antibiotics for the MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity. *Journal of Microbiological Methods*. 2017, **137**, p. 30-33.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 204/2018/FVHE*

## **Studium vlivu různých metod tepelné úpravy na obsah prvků ve vepřovém mase**

Blanka Macharáčková<sup>1</sup>, Pavel Groh<sup>1</sup>, Josef Kameník<sup>1</sup>, Jiří Bednář<sup>1</sup>, Veronika Abrahámová

*Ústav gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita*

*Brno<sup>1</sup>*

### **Úvod**

Dostupnost živin z potravin může ovlivňovat mnoho faktorů. Různé tepelné procesy úpravy potravin zahrnují různé podmínky, jako je čas, teplota a médium vaření, proto tyto technologie mohou mít vliv na bioaktivitu živin. Kulinářský postup *sous vide* je tepelná úprava surovin nebo surovin a přísad balených vakuově v termostabilní fólii za kontrolovaných podmínek teploty a času (Baldwin, 2012). V technologii *sous vide* jsou používány nižší teploty oproti tradičním technologiím, přibližně 60° C, s delším časovým intervalem (2 – 48 hod). Vaření potravin je důležitým postupem vedoucím ke zlepšení vlastností potravin, jako je textura, měkkost a chuť, avšak může vést ke změně chemické formy živin, a tím i ke změně jejich dostupnosti pro absorpci lidským tělem. Během tepelného zpracování je urychlena degradace bílkovin, ale dochází ke ztrátě hmotnosti a vody, které mění fyzikálně chemické a výživové vlastnosti potravin (Domingo, 2011). Cílem naší práce bylo stanovit obsah vybraných prvků (Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn a Cu) ve vepřovém mase a ve šťávě z vepřového masa po přípravě technologií *sous vide* v porovnání s obsahem prvků po přípravě tradičními kulinárními technologiemi. Při přípravě technologií *sous vide* byly porovnávány různé teplotní režimy v rozsahu 53° C až 70° C a různá doba přípravy - 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 12 hod a 18 hod. Cílem práce bylo také zhodnotit vliv různé tepelné úpravy na zachování živin ve vepřovém mase.

### **Materiál a metodika**

Vzorky vepřové pečeně bez kosti byly připraveny technologií *sous vide* při teplotních režimech 53° C, 55 ° C, 60 ° C, 65 ° C a 70 ° C, doba přípravy byla 2 hod, 3 hod, 4 hod, 6 hod, 12 hod a 18 hod. K přípravě vzorků byla použita i tradiční tepelná úprava – vaření (100 ° C, 1 hod), grilování (200° C, 6 min), pečení (160 ° C, 1,5 hod). Takto upravené vzorky byly dále ihned zpracovávány, a nebo hluboce zamrazeny při teplotě -18 ° C. Před mineralizací na mokré cestě byly připraveny homogenizované vzorky. Mineralizace probíhala v uzavřeném systému směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Tlakový rozklad probíhal ve dvou stupních s maximem teploty 200° C a mikrovlnou silou až do 1 000 W. Obsah jednotlivých prvků byl stanoven metodou atomové absorpční spektrometrie na přístroji ContrAA 700 (Analytik Jena AG, Jena, Německo). Obsah Na,

K, Mg, Zn byl stanoven metodou plamenové atomizace FAAS s plamenem acetylen-vzduch, obsah vápníku metodou FAAS s plamenem acetylen-oxid dusný, obsah Cu a Fe byl stanoven metodou elektrotermické atomizace ETA-AAS. Obsah jednotlivých prvků byl stanoven ve vzorcích vepřové pečeně a také ve vzorcích šťávy z vepřové pečeně upravenými uvedenými kulinárními technologiemi a dále ve vzorcích čerstvého masa. Ze standardních roztoků prvků o koncentraci 1 g/l byly pro jednotlivé prvky připraveny řady 4 až 5 kalibračních roztoků. Kalibrace pro stanovení vápníku byla připravena v prostředí roztoku lanthanu 1 g/l. Správnost metody byla ověřena pomocí standardního referenčního materiálu 1566 b (Oyster tissue, National Institute of Standards and Technology U.S.). Referenční materiál byl rozložen a proměřen stejnou metodou jako vzorky. Deklarované obsahy v referenčním materiálu jsou Na ( $0,3297 \pm 0,0053$  %), K ( $0,652 \pm 0,009$  %), Mg ( $0,1085 \pm 0,0023$  %), Ca ( $0,0838 \pm 0,0020$  %), Cu ( $71,6 \pm 1,6$  mg/kg), Zn ( $1\,424 \pm 46$  mg/kg) a Fe ( $205,8 \pm 6,8$  mg/kg).

## Výsledky

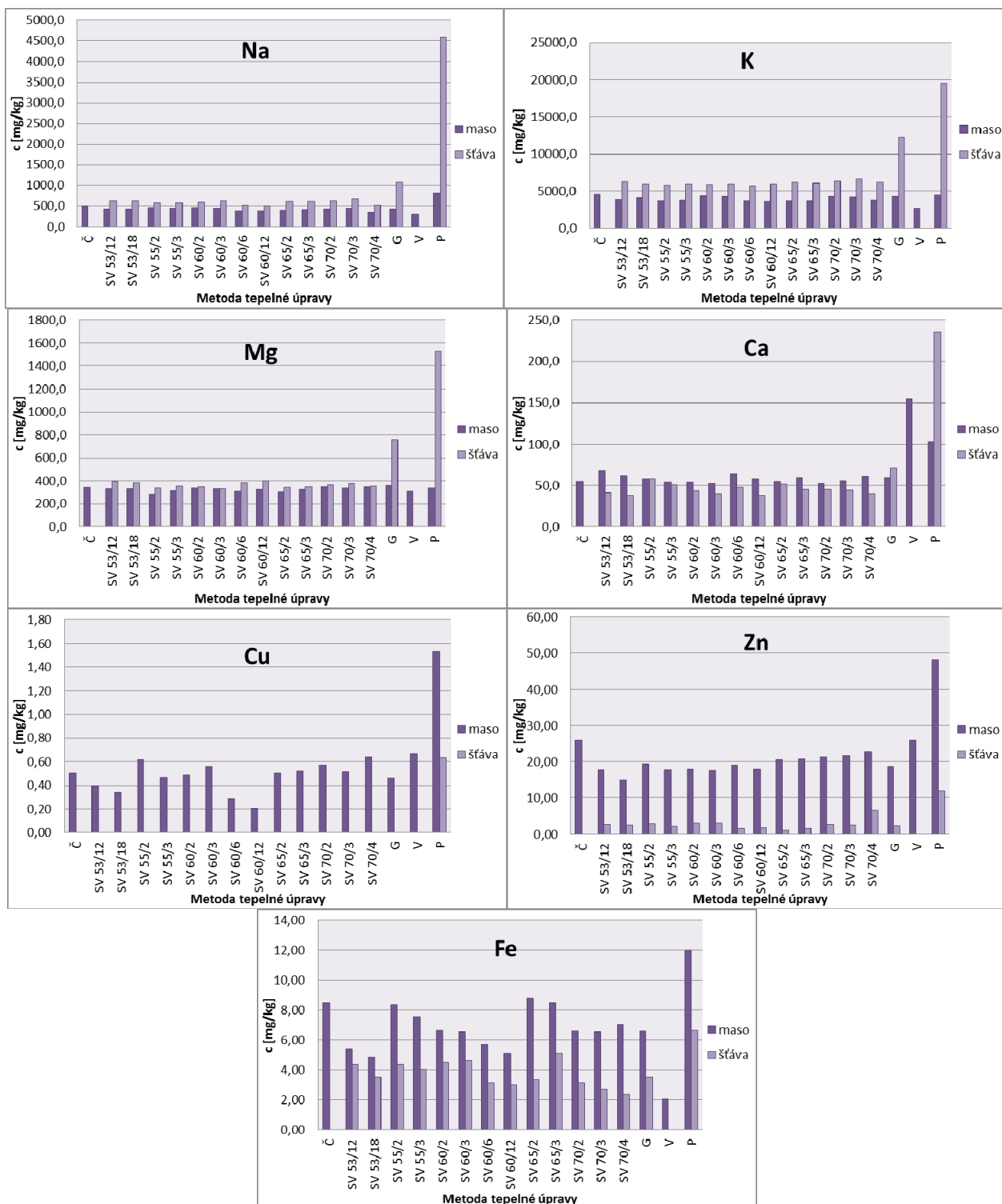
V tabulce 1 jsou uvedeny vlnové délky, při kterých probíhala analýza, dosažené limity a citlivosti stanovení jednotlivých prvků.

<i>Prvek</i>	<i>Vlnová délka <math>\lambda</math> (nm)</i>	<i>Limit detekce LOD (mg.l<sup>-1</sup>)</i>	<i>Limit stanovení LOQ (mg.l<sup>-1</sup>)</i>	<i>Citlivost stanovení (mg.l<sup>-1</sup>)</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Regresní rovnice <math>y = a + bx</math></i>
<i>Na</i>	589,592	0,1493	0,5505	0,4457	0,9919	$y = 0,0300 + 0,4457x$
<i>K</i>	769,897	0,4173	1,549	0,2802	0,9878	$y = 0,0417 + 0,2802x$
<i>Mg</i>	202,582	0,4363	1,686	0,0261	0,9978	$y = 0,0022 + 0,0261x$
<i>Ca</i>	422,673	0,1345	0,5077	0,2563	0,9949	$y = 0,0143 + 0,2563x$
<i>Cu</i>	324,754	$1,647 \cdot 10^{-3}$	$6,189 \cdot 10^{-3}$	$0,0034 \cdot 10^{-3}$	0,9987	$y = 0,0029 + 0,0034x$
<i>Zn</i>	213,857	0,0627	0,2535	0,3178	0,9971	$y = 0,0005 + 0,3178x$
<i>Fe</i>	248,327	$3,631 \cdot 10^{-3}$	$14,63 \cdot 10^{-3}$	$0,0147 \cdot 10^{-3}$	0,9962	$y = 0,1463 + 0,0147x$

Tabulka 1 Stanovené parametry a podmínky měření u jednotlivých prvků

Srovnání koncentrací jednotlivých prvků (Na, K, Mg, Ca, Cu, Zn a Fe) ve vepřovém mase a ve šťávě z vepřového masa je uvedeno v grafech (obrázek 1). Obsah sodíku a draslíku byl vyšší ve šťávě v porovnání s hodnotami obsaženými v mase. Prvky zinek a měď přecházely do šťávy omezeně, stanovení Zn a Cu ve šťávě bylo proto provedeno metodou elektrotermické atomizace. A i touto metodou bylo stanovení Cu bylo pod mezí detekce. Nejvyšší koncentrace všech prvků byla stanovena v pečeném mase, stejně tak i ve šťávě z pečeného masa. Koncentrace sodíku se pohybovala v rozmezí 304,8 – 820,4 mg/kg, nejnižší koncentrace byla u masa vařeného, nejvyšší u masa pečeného.





Obrázek 1. Závislost koncentrace prvků na metodě tepelné úpravy (Č = čerstvé maso, SV = sous vide – teplotní režim/čas, G = grilování, V = vaření, P = pečení)

Statistické vyhodnocení všech teplotních režimů a doby přípravy technologií sous vide je uvedeno v tabulce 2. Nejnižší koncentrace Na (355,3 mg/kg) byla u teplotního režimu 70° C s dobou přípravy 4 hod, nejvyšší koncentrace Na (473,2 mg/kg) u režimu 60° C po dobu 2 hod. Obsah draslíku se pohyboval v rozmezí 2 643,2 – 4 524,7 mg/kg. U technologie sous vide se obsah

draslíku v mase pohyboval v rozmezí 3 630,4 – 4 360,2 mg/kg, ve šťávě 5 705,3 – 6 646,3 mg/kg. Průměrný obsah hořčíku v mase připraveném technologií sous vide při různých teplotních režimech byl 325,5 mg/kg, ve šťávě 363,4 mg/kg, podobně tomu bylo i u masa čerstvého (340,0 mg/kg). Obsah vápníku se pohyboval v mase v rozmezí 52,4 – 154,2 mg/kg, ve šťávě 37,6 – 235,8 mg/kg, u technologií sous vide to bylo u masa 52,4 – 67,4 mg/kg, ve šťávě pak 37,6 – 58,0 mg/kg. Nejnižší koncentrace mědi byla u masa připraveného technologií sous vide při teplotě 60° C po dobu přípravy 12 hod (0,21 mg/kg), nejvyšší koncentrace u pečeného masa (1,53 mg/kg), u technologie sous vide byla stanovena nejvyšší koncentrace mědi u přípravy při 70° C po dobu 4 hod (0,64 mg/kg). Ve šťávě byly hodnoty pod mezí detekce. Koncentrace zinku se pohybovala v rozmezí 14,89 – 48,19 mg/kg u masa, prvek zinek přecházel do šťávy omezeně (1,01 – 11,85 mg/kg). Obsah železa byl v rozmezí 2,07 – 12,01 mg/kg v mase, ve šťávě 2,37 – 6,65 mg/kg. U technologií sous vide byl obsah železa v rozmezí 4,84 – 8,83 mg/kg v mase, 2,37 – 5,11 mg/kg ve šťávě.

	Na [mg/kg]		K [mg/kg]		Mg [mg/kg]		Ca [mg/kg]		Cu [mg/kg]		Zn [mg/kg]		Fe [mg/kg]	
	maso	šťáva	maso	šťáva	maso	šťáva	maso	šťáva	maso	šťáva	maso	šťáva	maso	šťáva
<b>Průměr</b>	429,1	595,0	3943,0	6086,6	325,5	363,4	57,9	44,9	0,47	pod mezí detekce	19,2	2,6	6,75	3,71
<b>SD</b>	35,8	52,4	258,9	249,8	18,3	23,2	4,7	5,9	0,13		2,2	1,3	1,29	0,85
<b>Rozptyl</b>	1180,6	2532,6	61867,5	57607,7	307,9	498,9	20,2	32,0	0,02		4,3	1,6	1,55	0,66
<b>Medián</b>	439,6	611,8	3809,4	6008,2	331,2	355,1	57,8	44,5	0,50		19,2	2,6	6,58	3,52
<b>MIN</b>	355,3	503,1	3630,4	5705,3	286,8	332,5	52,4	37,6	0,21		14,9	1,0	4,84	2,37
<b>MAX</b>	473,2	676,7	4360,2	6646,3	348,6	402,6	67,4	58,0	0,64		22,9	6,5	8,83	5,11
<b>Rozpětí</b>	117,9	173,6	729,8	941,0	61,8	70,1	15,1	20,4	0,43		8,0	5,5	3,99	2,74

Tabulka 2 Statistické vyhodnocení prvků v mase a ve šťávě – technologie sous vide s různými teplotními režimy a dobou přípravy

## Závěry

Byly porovnány různé technologie přípravy potravin – vaření, grilování, pečení a technologie sous vide s různými teplotními režimy a dobou přípravy. Nejnižší obsah prvků Na, K a Fe byl při přípravě masa vařením, nejvyšší obsah byl u všech zastoupených prvků v pečeném mase, stejně tomu bylo i ve šťávě z pečeného masa. Rozdílný teplotní režim a doba přípravy u technologie sous vide také ovlivňoval obsah prvků v mase a ve šťávě. Obsah prvků sodíku a draslíku ve šťávě byl vyšší než v mase, naopak zinek do šťávy přecházel omezeně a měď ve šťávě byla dokonce pod mezí detekce přístroje.

## Seznam literatury:

- Baldwin, D. E. (2012). Sous vide cooking: A review. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(1), 15-30.
- Domingo, J. L. (2010). Influence of cooking processes on the concentrations of toxic metals and various organic environmental pollutants in food: a review of the published literature. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51(1), 29-37.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 208/2018/FVHE*

## Vliv minoritního mykotoxinu enniatinu B na stravitelnost sušiny *in vitro*

Adam Málek, Vendula Stoklasová, Marie Dvořáková, Ludmila Křížová

*Ústav výživy zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita  
Brno*

### Úvod:

Enniatiny patří mezi cyklické hexapeptidové mykotoxiny a jsou syntetizovány mnohými plísněmi ze skupiny *Fusarium spp.* (Stepien a Waskiewicz, 2013). Zejména pak *Fusarium subglutinans*, *F. proliferatum* a *F. tricinctum*. Doposud bylo identifikováno 27 enniatinů (Cuomo et al., 2013). Mezi nejvýznamnější patří enniatiny A, A1, B a B1, protože bývají nejčastěji detekovány v potravinách nebo krmivech (Jestoi, 2008).

Enniatiny vykazují antibiotický (proti *Bacillus subtilis*, *Mycobacterium spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*), antimykotický, insekticidní, fytotoxický a cytotoxický efekt. Dokáží se totiž inkorporovat do buněčných membrán, kde vytvářejí pasivní kation-selektivní kanály (Sebastia et al., 2011, Prosperini et al., 2013, Ivanova et al., 2017). Přes indukci apoptózy mitochondriální cestou, či nekrózou spojenou s lysozomálním poškozením mají též cytotoxický efekt a to již při nízkých koncentracích.

Akutní expozice u přežvýkavců se pohybuje mezi 32,5 µg/kg a 32,6 µg/kg. Expozice chronická byla stanovena v rozmezí 3,30 µg/kg a 8,26 µg/kg. (EFSA, 2014). Tyto hodnoty byly stanoveny na základě výskytu enniatinů v jadrných krmivech. Vzhledem k tomu, že byl zaznamenán i jejich výskyt v objemných krmivech (např. Zachariášová et al., 2014), lze předpokládat, že akutní expozice bude vyšší. Cílem práce proto bylo pomocí *in vitro* metod zjistit vliv minoritního mykotoxinu enniatinu B v hladinách odpovídajících akutní expozici a jejímu dvojnásobku na stravitelnost sušiny směsné krmné dávky objemného a jaderného typu.

### Materiál a metodika

Enniatin B (Sigma-Aldrich) byl rozpuštěn v methanolu (100 µg/ml) a poté naředěn destilovanou vodou na koncentrace 10 a 20 µg/ml, které byly přidávány do inkubací a které odpovídaly hladině akutní expozice u přežvýkavců a jejímu dvojnásobku.

Bachorová tekutina byla odebrána hodinu před nakrmením od dojnice (ŠZP Nové Dvory) krmené směsnou krmnou dávkou složenou z kukuřičné siláže (22 kg), vojtěškové senáže (12 kg), lučního sena (3 kg), krmné slámy (1,5 kg), doplňkové krmné směsi (6,7 kg) a minerálního lizu (0,1 kg).

K odběru byla použita jícnová sonda s ruční podtlakovou pumpou. Bachorová tekutina byla převezena v předehřátých odběrových lahvích v termoboxu do laboratoře Ústavu výživy zvířat. Bezprostředně poté bylo u bachorové tekutiny změřeno pH, tekutina byla pomixována půl minuty v mixéru na nejvyšší otáčky a přefiltrována přes čtyři vrstvy gázy.

Inkubace byly prováděny v silnostěnných skleněných tubách o objemu 90 ml, do nichž bylo naváženo 0,5 g vzorku krmiva, které obsahovalo stejné složky jako krmná dávka dojníc, pouze poměr objemné a jadrné složky byl upraven na 60:40 (objemný typ KD) a 40:60 (jadrný typ KD). Vzorky krmiv byly usušeny a pomlety na velikost 1 mm. Vzorky krmiv byly zality 40 ml pufru (McDougall, 1948) vyhřátého na 39 °C a 10 ml bachorové tekutiny. Do takto připravené směsi byl přidáván roztok enniatinu B, popř. methanolu v množstvích 1 ml (viz schéma pokusu tab. 1).

Tabulka 1: Schéma pokusu

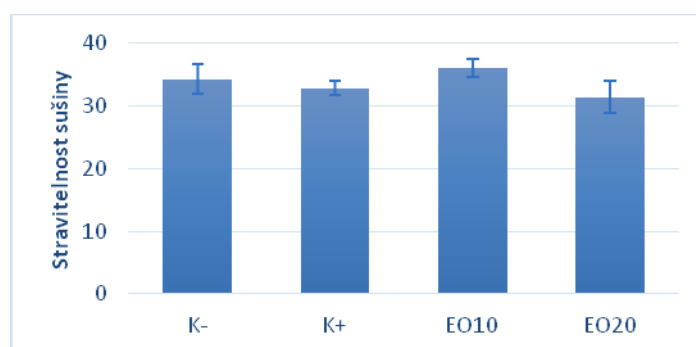
Označení skupin	Zásah
<b>KO-</b>	<b>Negativní kontrola (pouze inokulum)</b>
<b>KO+</b>	<b>Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)</b>
<b>EO10</b>	<b>inokulum + Enn B 10 µg/ml</b>
<b>EO20</b>	<b>inokulum + Enn B 20 µg/ml</b>
<b>KJ-</b>	<b>Negativní kontrola (pouze inokulum)</b>
<b>KJ+</b>	<b>Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)</b>
<b>EJ10</b>	<b>inokulum + Enn B 10 µg/ml</b>
<b>EJ20</b>	<b>inokulum + Enn B 20 µg/ml</b>

Tuby byly profouknuty dusíkem a uzavřeny gumovými zátkami opatřenými zpětným (Bunsenovým) ventilem, promíchány a inkubovány v termostatu 24 hodin při teplotě 39 °C.

Po uplynutí inkubační doby byly tuby zchlazeny v ledové vodě a bylo změřeno pH. Následně byly tuby odstředovány po dobu 5 minut při 4000 otáček/min. Supernatant byl odsát a rezidua krmiv byla analyzována na obsah sušiny. Ze získaných dat byla vypočtena stravitelnost sušiny. Každá kombinace faktorů byla provedena v pěti opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou variance (ANOVA) na hladině průkaznosti  $P < 0,05$ .

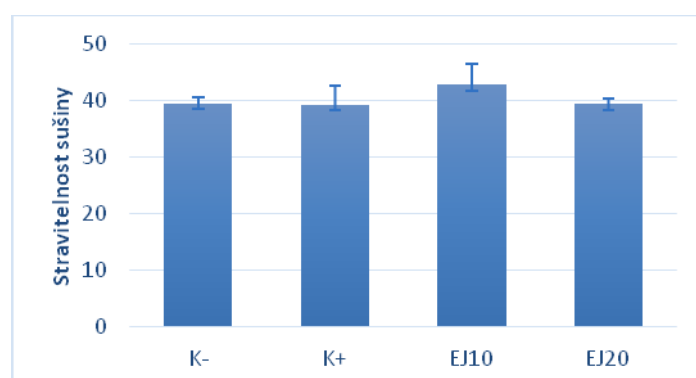
## Výsledky

Stravitelnost sušiny v jednotlivých skupinách u objemného typu KD je znázorněna v grafu 1. U kontrolní skupiny KO- po 24 hod. inkubace byla hodnota stravitelnosti sušiny 34,3 %, (sd = 2,30). Stravitelnost sušiny u KO+ (32,8 %, sd = 1,10) byla numericky nižší v porovnání s kontrolní skupinou KO- ( $P > 0,05$ ), toto srovnání pokazuje na možný inhibiční efekt methanolu na bachorové mikroorganismy. Přídavek enniatinu B do objemného krmiva v množství odpovídající akutní expozici (EO10) neměl vliv na stravitelnost sušiny in vitro (36,1 %, sd = 1,37,  $P > 0,05$ ), zatímco vyšší přídavek enniatinu B odpovídající dvojnásobku akutní expozice (EO20) se projevil snížením stravitelnosti sušiny až na 31,4 % (sd = 2,61,  $P < 0,05$ ).



Graf 1: Stravitelnost sušiny in vitro v jednotlivých skupinách u objemného typu KD

Stravitelnost sušiny v jednotlivých skupinách jadrného typu KD je znázorněna v grafu 2. U kontrolní skupiny KJ- byla stravitelnost sušiny po 24 hod. inkubace 39,5 %, (sd = 1,1). Stravitelnost sušiny u KJ+ byla obdobná, 39,4 % (sd = 3,4). Přídavek enniatinu B v množství odpovídající akutní expozici (EJ10) a jejímu dvojnásobku (EJ20) neměl průkazný vliv na stravitelnost sušiny, která byla 42,8 % (sd = 3,8) resp. 39,5 % (sd = 0,9).



Graf 2: Stravitelnost sušiny v jednotlivých skupinách u jadrného typu KD

## Závěr

Zjistili jsme, že hladiny enniatinu B odpovídající úrovni akutní expozice pro přežvýkavce neměly vliv na stravitelnost sušiny směsné krmné dávky bez ohledu na její typ. Inhibiční vliv enniatinu B byl ale prokázán při koncentraci odpovídající dvojnásobku akutní expozice u objemného typu krmné dávky.

## Seznam literatury:

Cuomo V., Randazzo A., Meca G., Moretti A., Cascone A., Eriksson O., Novellino E., Ritieni A. (2013): Production of enniatins A, A1, B, B1, B4, J1 by *Fusarium tricinctum* in solid corn culture: Structural analysis and effects on mitochondrial respiration. *Food Chemistry*. 140, 784–793.

EFSA (2014): Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*, 12, 3802.

Ivanova L., Uhlig S., Devreese M., Croubels S., Faeste Ch. K. (2017): Biotransformation of the mycotoxin enniatin B1 in pigs: A comparative in vitro and in vivo approach. *Food and Chemical Toxicology*. 105, 506–517.

Jestoi M. (2008): Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8, 21–49.

Mc Dougall E. I. (1948): Studies on ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43, 99–109.

Prosperini A., Meca G., Font G., Ruiz M.-J. (2013): Bioaccessibility of enniatins A, A 1 , B, and B 1 in different commercial breakfast cereals, cookies, and breads of Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 456–461.

Sebastia N., Meca G., Soriano J. M., Manes J. (2011): Antibacterial effects of enniatins J1 and J3 on pathogenic and lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 2710–2717.

Stepien L., Waskiewicz A. (2013): Sequence divergence of the enniatin synthase gene in relation to production of beauvericin and enniatins in *Fusarium* species. *Toxins*, 3, 537–555.

Zachariášová M., Dzuman Z., Vepriková Z., Hajkova K., Jiru M., Vaclavikova M., Zachariasova A., Pospichalova M., Florian M., Hajslova J. (2014): Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124–140.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 219/2018/FVHE***

# Stanovení bisfenolu A v krevním séru a plasmě metodou kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií s atmosférickou chemickou ionizací

Petr Maršálek<sup>1</sup>, Simona Kovaříková<sup>1</sup>, Monika Habánová<sup>1</sup>

*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## Úvod

Bisfenol A je široce užívaná chemická látka. Jako kontaminant byl identifikován téměř ve všech testovaných vodních i suchozemských prostředích [1]. K expozici může dojít orálně, transdermálně a pravděpodobně i inhalací, nicméně perorální způsob je ten primární [2]. Bisfenol A se běžně používá při výrobě plastů, mezi jinými i k výrobě výstelky plechovek, která má bránit korozi a tak zachovávat kvalitu a chuť krmiva. Z této výstelky se bisfenol A bohužel může do krmiva uvolňovat. Určitá souvislost mezi hypertyreózou koček a krmením konzervovaného krmiva již byla prokázána, nicméně v této studii nebyl hodnocen vliv konkrétně bisfenolu A [3]. Hypertyreóza koček byla poprvé popsána v roce 1979 a od té doby se její prevalence dramaticky zvyšuje. V současnosti se jedná o nejčastější endokrinopatii koček, celosvětově se její výskyt udává u přibližně 10 % koček středního a vyššího věku. Etiologie je navzdory četnému výskytu stále nejasná. Předpokládá se multifaktoriální původ, kde se uplatňují vlivy složení krmiva a faktory prostředí. Mezi nimi je zmiňován bisfenol A, který je v současnosti řazen do skupiny endokrinních disruptorů a může negativně ovlivňovat činnost štítné žlázy [4]. Ke stanovení BPA v krevním séru, plasmě, ale i dalších matricích existuje celá řada metod založených většinou na kapalinové chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií [5]. Stanovení BPA sebou nese zásadní komplikaci v jeho širokém rozšíření ve výrobě plastů. Díky tomu je obtížné eliminovat signál BPA v slepém pokusu a někteří autoři proto přistoupili ke korekci výsledků na signál BPA v slepém pokusu [6].

## Materiál a metoda

Standard BPA, izotopicky značený standard BPA, hydroxid sodný, hydrogen uhličitán sodný, dansyl chlorid byly zakoupeny u Sigma–Aldrich (USA). Metanol, aceton a toluen byly LC/MS čistoty (Chromservis, s.r.o., CZ), deionizovaná voda byla vyrobena přístrojem Milli-Q (Milipore, USA). Zásobní roztoky standardů o koncentraci 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství v metanolu. Pracovní roztoky standardů o koncentraci 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  použité pro optimalizaci hmotnostního spektrometru a kalibrační roztoky standardů byly připraveny ředěním zásobních roztoku s metanolem.

Do vzorku krevního séra, nebo plasmy ve skleněné zkumavce (0,5ml) bylo přidáno 1,5ml toluenu, vzorek byl extrahován na třepačce (10x10s) a organická vrstva (1ml) byl odebrán do zkumavky. Poté bylo ke vzorku přidáno opět 1,5 ml toluenu, vzorek byl extrahován (10x10s) a 1,3 ml organické vrstvy bylo odebráno opět do zkumavky. Tento krok byl ještě jednou zopakován. Všechny tři frakce odebrané vrstvy toluenu byly zkombinovány ve skleněné zkumavce a odpařeny pod proudem dusíku (55 °C). Poté bylo do zkumavky přidáno 0,25 ml hydrogenuhličitanového pufru (pH=10,5) a 0,25 ml roztoku dansyl chloridu v acetonu a vzorek byl 5 min derivatizován při 60 °C. Poté byl roztok odpařen pod proudem dusíku (55 °C) a vzorek byl rekonstituován v 0,5 ml metanolu a použit k LC/MS analýze. LC/MS analýza byla provedena s využitím chromatografické pumpy Accela 1250 a hmotnostního spektrometru TSQ Quantum Access MAX (Thermo Scientific, USA) vybaveným sondou pro atmosférickou chemickou ionizaci (APCI). K chromatografické separaci byla využita kolona Thermo Scientific Hypersil C18 (2,1 mm × 100 mm, 1,9 μm) a gradient mobilní fáze složený z acetonitrilu a vody.

### Výsledky a diskuze

Vzhledem k tomu, že ionizace samotného BPA neumožňovala dosáhnout dostatečných detekčních limitů, byla zvolena derivatizace dansyl chloridem v alkalickém prostředí (pH=10.5). Tímto způsobem se podařilo dostatečně snížit přístrojový detekční limit, tak aby bylo možno stanovit koncentrace nižší, než je 1ng/ml BPA v krevním séru, nebo plasmě. Metodou flow injection byla studována hmotnostní spektra BPA i izotopicky značeného standardu BPA (d16BPA). Větší ionizace bylo dosaženo v pozitivním módu a v obou způsobech ionizace dominovaly protonované pseudomolekulové ionty  $[M+H^+]$ . Jako vhodnější technika ionizace se ukázala APCI, která umožnila dosáhnout nižší meze detekce jak díky vyšší citlivosti, tak i díky nižší hladině šumu a z toho vyplývající hodnoty poměru signál/šum. K chromatografické separaci na reverzní fázi byla zvolena kolona, která spolu s gradientem mobilní fáze složeným z vody a acetonitrilu poskytovala dostatečnou retenci a ostrost píku BPA (Obr. 1.).

Zásadní komplikací při stanovení BPA hraje jeho široké rozšíření při výrobě plastů. Tato skutečnost po provedených testech vedla k vytvoření pracovního postupu bez použití plastového laboratorního materiálu a využívajícího především laboratorního skla. I přes tato opatření se ovšem zcela nepodařilo zcela eliminovat signál BPA ze slepého pokusu, který tak musí být započítán při vyhodnocení meze detekce metody.

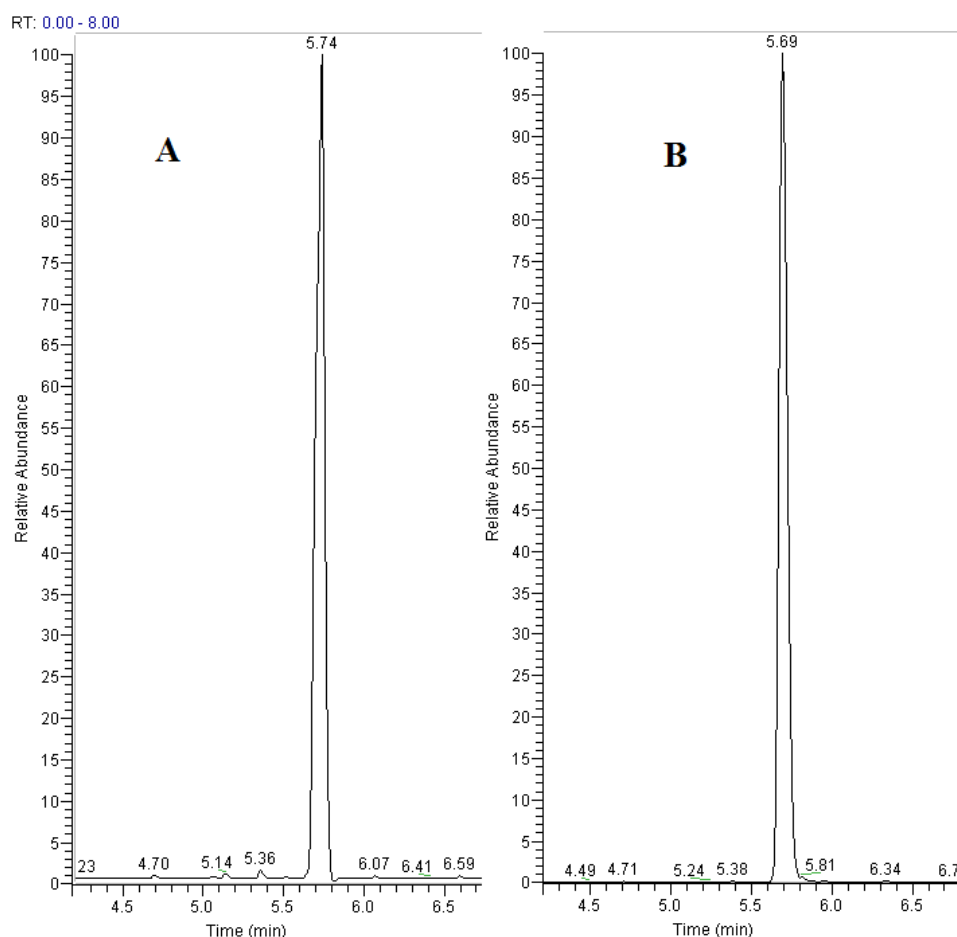
Přístrojová mez detekce stanovená jako hodnota poměru signál/šum 3:1 je 0,0043 ng/ml, v absolutní hodnotě potom 0,043 pg. Mez detekce metody, stanovená jako trojnásobek hodnoty směrodatné odchylky slepého pokusu (n=10), je 0,063 ng/ml. Metoda je lineární v rámci



testovaného rozmezí očekávaných koncentrací 0,1 – 20 ng/ml ( $r = 0,999$ ). Procesní účinnost metody je 86%, výtěžnost extrakce je 94% a matriční efekt je 9,2%. Přesnost metody, stanovená jako relativní směrodatná odchylka měření 10 vzorků doplněných standardním přídatkem, je 11,5%. Správnost (9,8%) byla (stanovena na základě stejných měření jako přesnost) vyhodnocena jako odchylka průměru měření od hodnoty standardního přídatku.

## Závěr

Výše popsaná metoda umožňuje provádět stanovení BPA v krevním séru a plasmě v koncentracích nižších, než je 1 ng/ml s tím, že mez detekce je pod hranicí 0,1 ng/ml. Teoretická detekční schopnost je ještě o jeden řád níže, nicméně je limitovaná přítomností signálu BPA v slepém pokusu. Metoda je v současné době využívána ke stanovení BPA ve vzorcích krevního séra koček v souvislosti s hypertyreóza koček.



**Obr.1.** Chromatogram standardního roztoku BPA (A; 0,1 ng/ml) a vzorku krevního séra kočky (B; 1,7 ng/ml).

### **Seznam literatury:**

- [1] R.K. Bhandari, S.L. Deem, D.K. Holliday, C.M. Jandegian, C.D. Kassotis, S.C. Nagel, D.E. Tillitt, F.S.V. Saal, C.S. Rosenfeld, Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 alpha-ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species, *General and Comparative Endocrinology*, 214 (2015) 195-219.
- [2] M. Lorber, A. Schecter, O. Paepke, W. Shropshire, K. Christensen, L. Birnbaum, Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposures, *Environment International*, 77 (2015) 55-62.
- [3] C.H. Edinboro, J.C. Scott-Moncrieff, E. Janovitz, H.L. Thacker, L.T. Glickman, Epidemiologic study of relationships between consumption of commercial canned food and risk of hyperthyroidism in cats, *Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224 (2004) 879-886.
- [4] M. Peterson, Hyperthyroidism in cats: what's causing this epidemic of thyroid disease and can we prevent it?, *J Feline Med Surg*, 14 (2012) 804-818.
- [5] J. Vitku, T. Chlupacova, L. Sosvorova, R. Hampf, M. Hill, J. Heracek, M. Bicikova, L. Starka, Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid, *Talanta*, 140 (2015) 62-67.
- [6] Z.L. Koestel, R.C. Backus, K. Tsuruta, W.G. Spollen, S.A. Johnson, A.B. Javurek, M.R. Ellersieck, C.E. Wiedmeyer, K. Kannan, J.C. Xue, N.J. Bivens, S.A. Givan, C.S. Rosenfeld, Bisphenol A (BPA) in the serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA, *Science of the Total Environment*, 579 (2017) 1804-1814.

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 230/2018/FVHE**

## Hemocytární profil včely medonosné v závislosti na věku fyziologickém stavu

Ivana Papežíková, Eva Syrová, Kristýna Rädischová, Miroslava Palíková

*Ústav ekologie, chorob zvířet, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Imunitní systém hmyzu má podobně jako u obratlovců humorální a buněčnou složku. Převážnou část buněčné imunity tvoří buňky cirkulující v hemolymfě (hemocyty), které zajišťují fagocytózu, nodulaci a enkapsulaci cizorodého materiálu (Lavine a Strand, 2001). O hemocytech včely medonosné je zatím k dispozici málo informací a výsledky různých autorů se liší. Marringa a kol (2014) uvádí, že v hemolymfě včely medonosné se nacházejí minimálně tři typy buněk - kromě převládajících plazmatocytů jsou to dvě populace morfologicky odlišných permeabilizovaných buněk (propustných pro barviva, procházející poškozenou plazmatickou membránou) neznámého původu. Dále se zde nacházejí drobné částice o rozměrech 2 - 3  $\mu\text{m}$ , které pravděpodobně nejsou plnohodnotnými buňkami. Hystad a kol. (2017) uvádí, že kromě plazmatocytů jsou v hemolymfě přítomny i granulocyty a prohemocyty. Richardson a kol. (2018) popisuje pouze dva typy buněk – granulocyty a plazmatocyty. Fyziologie imunitního systému včelích dělnic závisí na tom, ve které fázi života se právě nacházejí a jakou funkci zastávají. Mimo to se jejich fyziologie liší i v závislosti na ročním období. V klimatických podmínkách střední Evropy se ve včelstvu na jaře a v létě líhnou krátkověké "letní" dělnice, které žijí jen několik týdnů. Od poloviny léta se začínají líhnout dlouhověké "zimní" včely, které žijí několik měsíců a které na jaře vychovávají novou mladou generaci (Amdam a kol., 2005; Münch a Amdam, 2010). Vzhledem k rozdílné fyziologii letních a zimních včel lze předpokládat nejen rozdíly v počtech hemocytů, ale i v zastoupení jednotlivých typů buněk.

Hlavním cílem této práce bylo získání nových poznatků o morfologii včelích hemocytů a stanovení počtů a zastoupení jednotlivých typů hemocytů v hemolymfě včelích dělnic v závislosti na věku a fyziologickém stavu.

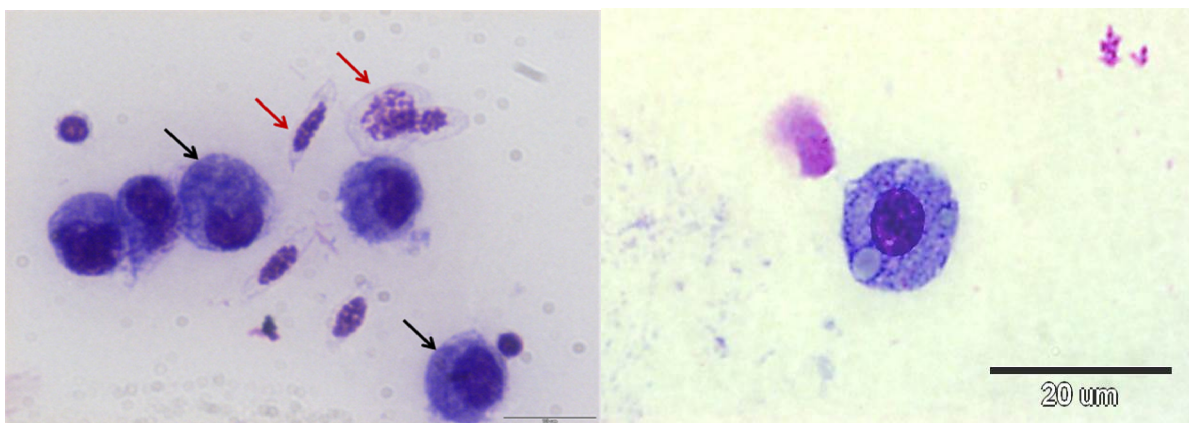
## **Materiál a metodika**

K experimentu byly využity dělnice ze dvou oddělků, vytvořených na jaře 2018. Mezi první a druhý nástavek každého oddělků byla vložena mateří mřížka, která omezila pohyb matky a kladení vajíček na dolní nástavek (plodiště). Poté, co matka zakladla plásty v plodišti, byl v každém včelstvu jeden zakladený rámeček převěšen do horního nástavku nad mateří mřížku, aby bylo matce zabráněno v kladení dalších vajíček. Před počátkem líhnutí dospělých včel byly plásty v horních nástavcích umístěny do izolátorů. Izolátory byly denně kontrolovány a čerstvě vylíhlé včely byly barevně označeny (každý den jinou barvou) a vpuštěny do včelstva. Tímto způsobem byly získány dělnice známého stáří. První část experimentů byla provedena na včelách, vylíhlých v červnu. Druhá část byla provedena na včelách, vylíhlých v srpnu a třetí část na včelách, vylíhlých v září. Včely byly odebírány těsně po vylíhnutí, dále ve věku 9 dnů, kdy zastávají funkci krmiček nejmladšího plodu a ve věku 23 dnů, kdy vyletují z úlu za snůškou. Včelám byla odebrána hemolymfa, která byla využita ke stanovení počtu hemocytů a k provedení diferenciálního rozpočtu hemocytů. Jako antikoagulant byla využita 0,1% phenylthiourea ve fosfátovém pufru. Hemocyty byly počítány bez obarvení v Bürkerově komůrce. Pro provedení diferenciálního rozpočtu bylo 0,5  $\mu$ l hemolymfy rozetřeno na malé ploše podložního skla a roztěr byl obarven kitem Hemacolor. Bylo provedeno také speciální barvení AB-PAS na přítomnost polysacharidů. Pro průtokovou cytometrii byla použita hemolymfa, ošetřená 0,1% phenylthiourea a naředěná v roztoku Cell Wash.

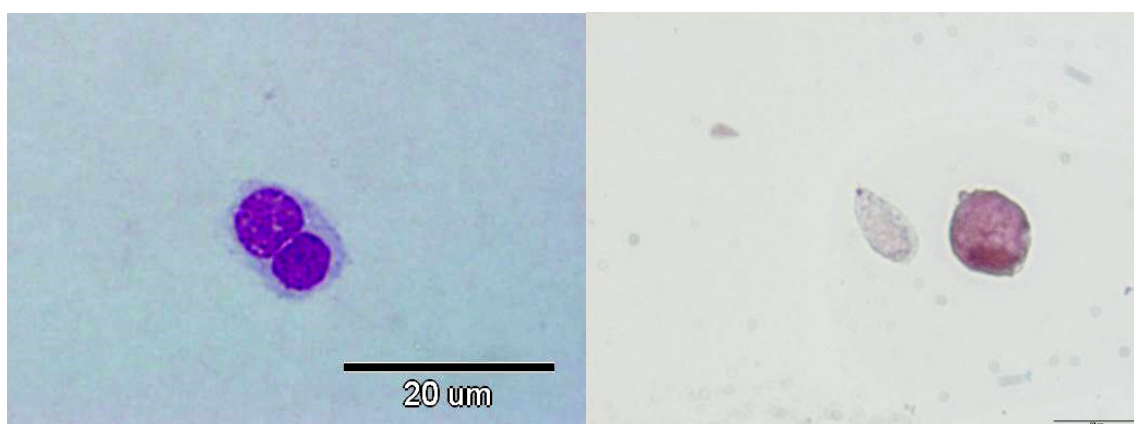
## **Výsledky a diskuze**

Při prvních analýzách hemocytů na průtokovém cytometru bylo zjištěno, že jednotlivé typy buněk netvoří jasně oddělené populace, nelze je tedy odlišit pouze na základě forward scatteru a side scatteru. Analýzu fluorescenčně značených hemocytů komplikuje fakt, že značení buněk zahrnuje promývání a centrifugaci, při níž se buňky snadno rozpadají. Vzniklý buněčný detritus je na dot plotu obtížně odlišitelný od nepoškozených buněk, protože nejmenší hemocyty včel mají velikost jen okolo 3  $\mu$ m. Proto jsme se zaměřili spíše na počty buněk a na jejich morfologii.

V hemolymfě byly nalezeny dva typy buněk – granulocyty a plazmatocyty. Granulocyty jsou kulovité buňky o velikosti 5 – 15  $\mu$ m, s kulovitým jádrem a s velkým množstvím bazofilní cytoplazmy, která je u některých buněk vakuolizovaná (Obrázky 1, 2). Plazmatocyty mají velikost 3 - 8  $\mu$ m, oválný, vřetenovitý nebo nepravidelný tvar a centrálně umístěné denzní nebo granulované jádro (Obrázek 1).

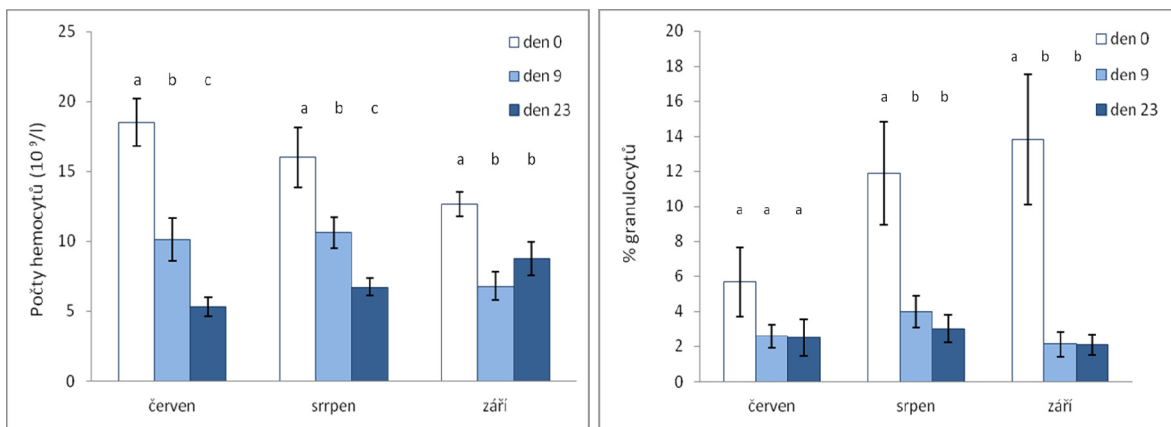


Obrázek 1. (vlevo): granulocyty a plazmatocyty v roztěru hemolymfy čerstvě vylíhlé včely. Granulocyty jsou označeny černými šipkami, plazmatocyty červenými šipkami. Obrázek 2. (vpravo): granulocyt s vakuolizovanou cytoplazmou. Zvětšeno 1000x.



Obrázek 3 (vlevo): mitotický plazmatocyt. Obrázek 4 (vpravo): AB-PAS negativní plazmatocyt a AB-PAS pozitivní granulocyt. Zvětšeno 1000x.

Kromě těchto dvou typů byly nalezeny i buňky v různých stádiích rozpadu, u nichž nebylo možno určit příslušnost k některému typu. Hemocyty se tedy po skončení životnosti rozpadají přímo v oběhu. U všech věkových kategorií včel byly v roztěru nalezeny mitotické buňky (granulocyty i plazmatocyty), včely jsou tedy schopny doplňovat počty buněk mitózou cirkulujících hemocytů (obrázek 3). V cytoplazmě granulocytů byla zjištěna přítomnost velkého množství polysacharidů (silná AB-PAS pozitivita), plazmatocyty byly AB-PAS negativní anebo jen velmi slabě pozitivní (Obrázek 4). U jednotlivých věkových kategorií včel se lišil poměr granulocytů a plazmatocytů. Nejvyšší podíl granulocytů byl nalezen u čerstvě vylíhlých včel (Obrázek 6). S věkem počet granulocytů klesal a zvyšoval se podíl plazmatocytů.



Obrázek 5 (vlevo): Počty hemocytů v hemolymfě včel různého věku. Obrázek 6 (vpravo): podíl granulocytů na 100 buněk. Statisticky významné rozdíly mezi včelami různého stáří v rámci každého měsíce jsou označeny různými písmeny.

Celkové počty hemocytů byly nejvyšší u čerstvě vylíhlých včel. U devítidenních včel byly počty hemocytů významně nižší než u novorozených; nejnižší počty byly zjištěny u včel, starých 23 dnů, s výjimkou zářijových odběrů, kde mezi včelami starými 9 dnů a 23 dnů nebyl statisticky významný rozdíl (Obrázek 5). Snižování počtu hemocytů u starších včel bylo patrné u všech tří odběrů (červen, srpen, září), ale v průběhu roku (červen až září) se zmenšovaly rozdíly v počtech hemocytů mezi nejmladšími a nejstaršími jedinci (Obrázek 5). To je pravděpodobně dáno vyšším podílem dlouhověkových včel ve vzorcích ze srpna a ze září. Dlouhověké zimní včely mají odlišnou fyziologii než letní, zůstávají po několik měsíců fyziologicky mladé a lze předpokládat, že u nich zůstanou zachovány vysoké počty hemocytů, typické pro nejmladší dospělé dělnice.

Citovaná literatura je k dispozici u autorů.

***Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 231/2018/FVHE***

## **Cesty přenosu a dynamika kolonizace primátů rezistentními bakteriemi v umělém ekosystému vytvořeném člověkem**

Ivana Jamborová<sup>1,2</sup>, Kateřina Řeháková<sup>1,2</sup>, Adam Valček<sup>1,2</sup>, Kateřina Kachlíková<sup>1</sup>, Ivo Papoušek<sup>1,2</sup>,  
Monika Dolejská<sup>1,2</sup>, Ivan Literák<sup>1,2</sup>

*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno (CEITEC VFU Brno)<sup>2</sup>*

### **Úvod**

V posledních desetiletích došlo k prudkému nárůstu antibiotické rezistence ke klinicky významným skupinám antimikrobiálních látek, což velmi komplikuje léčbu život ohrožujících bakteriálních onemocnění<sup>1</sup>. Mezi nejčastěji používaná antibiotika v humánní i veterinární medicíně patří fluorochinolony a cefalosporiny, avšak s narůstající rezistencí je jejich účinnost kriticky ohrožena<sup>1</sup>. Bakterie vykazující rezistenci k různým skupinám antibiotik byly již v minulosti identifikovány u zoo zvířat a bylo zjištěno, že zvířata chovaná v zajetí jsou kolonizována rezistentními bakteriemi s vyšší prevalencí než volně žijící zvířata stejného druhu<sup>2,3</sup>. Nicméně v současné době nejsou dostatečně známy rizikové faktory, které mohou přispívat k rozvoji antibiotické rezistence u komenzálních druhů bakterií, k jejich perzistenci v gastrointestinálním traktu a k jejich následnému zoonotickému přenosu na ošetřující personál. Právě umělý ekosystém významně ovlivněný člověkem může objasnit potencionální zdroje a cesty šíření rezistentních bakterií a může sloužit jako modelový systém aplikovatelný na další ekosystémy. Cílem této studie bylo identifikovat nejvýznamnější zdroje rezistentních bakterií pro kolonizaci gastrointestinálního traktu (GIT) primátů a sledovat stěžejní faktory, které mohou potencionálně ovlivňovat incidenci bakterií v GIT jako je prodělaná antibiotická terapie nebo přítomnost rezistentních bakterií v potravě anebo u ošetřovatelů.

### **Materiál a metodika**

V roce 2012 byly v ostravské Zoo v měsíčních intervalech odebírány vzorky trusu čtyř šimpanzů (*Pan troglodytes*) a jejich ošetřovatelek. Vzorkována byla také potrava, kterou jsou šimpanzi krmeni (zelenina, granulované krmivo, kuřata), a se kterou ošetřovatelky denně nakládají. Vzorkování probíhalo po dobu 6 měsíců a celkově bylo odebráno 24 fekálních stěrů od šimpanzů, 6 od ošetřovatelek a 6 vzorků potravy šimpanzů. K dispozici jsou také záznamy onemocnění, která zvířata prodělala, a je známa jejich antibiotická a další terapie v průběhu léčby. Vzorky trusu byly pomnoženy v peptonové vodě a inokulovány na MacConkey agar s přídatkem cefotaximu (2 mg/l)

nebo ciprofloxacinu (0,05 mg/l) a do další analýzy byly zahrnuty pouze izoláty vykazující rezistenci k těmto antibiotikům. Z každé misky bylo odebráno pět morfologicky odlišných kolonií pro rámcové zhodnocení klonální variability izolátů. K druhové identifikaci izolátů byla použita MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a u izolátů byl testován profil citlivosti k 15 antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou<sup>4</sup>. Izoláty rezistentní k cefotaximu byly testovány pomocí MASTDISCS ID AmpC a ESBL test na produkci širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) a AmpC beta-laktamáz<sup>4</sup>.

Geny pro rezistenci k cefalosporinům a geny pro plazmidově kódovanou rezistenci k fluorochinolonům byly identifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce<sup>4</sup>. Klonální příbuznost izolátů byla stanovena restrikčním štěpením a separací genomové DNA metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE) s následnou analýzou makrorestrikčních profilů a tvorbou dendrogramů softwarem BioNumerics 6.6<sup>4</sup>. Horizontální přenos plazmidů s geny ESBL, AmpC a PMQR byl testován metodou konjugace a transformace do různých druhů recipientních bakterií a velikost a počet přenesených plazmidů byla stanovena pomocí S1-PFGE<sup>4</sup>. U transformantů a transkonjugantů nesoucích jeden plazmid se zájmovými geny byla testována přítomnost genů rezistence k dalším antibiotikům, geny virulence, a plazmidy byly zařazeny do skupin inkompatibility<sup>4</sup>.

U reprezentativního souboru 36 izolátů byla zjištěna kompletní sekvence genomu s využitím platformy Illumina MiSeq. Získané sekvence byly analyzovány a anotovány s využitím bioinformatických nástrojů a databází (Trimmomatic, SPAdes, BWA-MEM, RAST, Prokka, Roary, RAxML) a vloženy do databáze GenBank<sup>5,6,7</sup>. Celogenomová data byla analyzována pomocí volně přístupných (PlasmidFinder, ResFinder, MLSTFinder, PlasmidFinder, pMLST, VirulenceFinder) a vlastních databází, a izoláty tak byly zařazeny do sekvenčního typu, identifikovány byly geny rezistence a chromozomální mutace kódující rezistenci k antimikrobiálním látkám, geny virulence a nesené replikony včetně jejich zařazení do sekvenčního typu. Na základě jednotlivých polymorfizmů nukleotidů (SNP) v genomu bakterií byl vytvořen fylogenetický strom odrážející příbuznost izolátů s využitím programu RAxML<sup>5,6</sup>. Abundance faktorů virulence u jednotlivých izolátů byla graficky znázorněna pomocí heat mapy softwarem ARIBA. Heat mapa i fylogenetický strom byly vizualizovány pomocí Phandango<sup>3,4</sup>. Plazmidové sekvence získané z celogenomových sekvencí byly analyzovány vytvořením sítě interakcí plazmidu a chromozomu pomocí softwarů Unicycler a Circlator a struktura plazmidů byla vizualizována softwarem BRIG<sup>5,6,7</sup>.

## Výsledky

Selektivní kultivací bylo získáno 120 izolátů *Escherichia coli* (58 rezistentních k cefotaximu/62 se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu) z celkového počtu 37 odebraných vzorků. Pro rámcové



zhodnocení klonální variability izolátů bylo z každé misky odebráno pět morfologicky odlišných kolonií, avšak pouze izoláty vykazující unikátní pulzotyp byly zařazeny do další analýzy. Celkově bylo získáno 25 izolátů rezistentních k cefotaximu, z čehož 21 (84 %) neslo ESBL gen (*bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, a *bla*<sub>SHV-12</sub>) a tři (12 %) gen *bla*<sub>CMY-2</sub> pro AmpC-betalaktamázu. Dva izoláty z celkového počtu 23 analyzovaných izolátů se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu neslo gen *qnrS1*. Identifikovány byly klinicky významné sekvenční typy *E. coli* ST69 (n = 9) a ST117 (2), které jsou zodpovědné za závažné infekce a lidí i zvířat. Izoláty vykazovaly vysokou míru rezistence a nesly geny virulence zodpovědné za patogenitu a efektivní kolonizaci hostitele. Z analýzy celogenomových dat a následné fylogenetické analýzy vyplývá, že izoláty pocházející z různých zdrojů se liší pouze o malé množství SNPů v core genomu, navíc byly tyto izoláty distribuovány v rámci celého fylogenetického stromu, což poukazuje na jejich mezidruhový přenos, zoonotický potenciál a ekologickou adaptaci na více hostitelů. Z výsledků analýz je také patrné, že primáti jsou dlouhodobě kolonizováni identickými bakteriálními klony a že tyto izoláty také sdílí s ošetřujícím personálem.

### ***E. coli* izoláty nesoucí ESBL a AmpC geny**

Dvacet jedna ESBL-pozitivních izolátů *E. coli* neslo geny *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (13), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (7), a *bla*<sub>SHV-12</sub> (1). U tří ze čtyř izolátů vykazujících AmpC fenotyp, byl detekován gen *bla*<sub>CMY-2</sub>; přičemž zbývající izolát měl chromozomální mutaci v AmpC promotoru (C→T na pozici -42). Izoláty vykazovaly rezistenci k různým antimikrobiálním látkám, především sulfonamidům a tetracyklinům. Gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> byl majoritně nesen na konjugativním multirezistentním plazmidu inkompatibilní skupiny II (16 plazmidů), zatímco gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> byl asociován s plazmidem IncK (7). Nejvíce zastoupený plazmid IncII/ST3 (13 plazmidů) byl nalezen u všech zdrojových skupin (lidé, primáti, potrava) a různých sekvenčních typů *E. coli*, což naznačuje jeho efektivní šíření mezi geneticky odlišnými bakteriemi a hostitelskými skupinami.

### ***E. coli* izoláty se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu**

Celkově bylo analyzováno 23 izolátů se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu, přičemž rezistence byla způsobena především mutací GyrA S83L v QRDR oblasti určující rezistenci k chinolonům. Pouze dva izoláty nesly PMQR gen *qnrS1* na konjugativním plazmidu IncX1, který dále kódoval gen pro úzkospektrou beta-laktamázu (*bla*<sub>TEM-1B</sub>).

## **Závěr**

Výsledky naší studie prokázaly významnou genetickou shodu mezi bakteriemi a jejich mobilními elementy získanými ze šimpanzů, chovatelů a ze zkrmované potravy, což naznačuje možný alimentární přenos klinicky významných *E. coli* prostřednictvím potravního řetězce, stejně jako

zoonotický přenos mezi primáty a lidmi. Komparativní genomika a následná fylogenetická analýza izolátů odhalila nízkou genetickou variabilitu izolátů v rámci každého klastru (max. 19 SNP v core genomu) přičemž izoláty z různých zdrojů byly distribuovány v rámci celého fylogenetického stromku, což poukazuje na jejich mezidruhový přenos, zoonotický potenciál a ekologickou adaptaci na více hostitelů. Vzhledem k tomu, že šíření MDR bakterií má významný dopad na lidské zdraví, zamezení takového přenosu (zvířata na člověka naopak) a eliminace rezervoárů by mělo být prioritou v oblasti veřejného zdraví. Na základě výsledků této studie budou navržena preventivní opatření, které mají přispět k zamezení šíření MDR bakterií mezi primáty samotnými a také mezi primáty a ošetřujícím personálem.

### Seznam literatury:

1. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARD (BIOHAZ). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals [online]. *EFSA Journal*. 2011, 9(8):2322. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>
2. DOBIASOVA, Hana, Monika DOLEJSKA, Ivana JAMBOROVA, et al. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2013, 85(3), 604-611
3. WANG, Yang, Tao HE, Jing HAN, et al. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Veterinary Microbiology*. 2012, 159(1-2), 53-59
4. JAMBOROVA, Ivana, Monika DOLEJSKA, Ludek ZUREK, et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environmental Microbiology*. 2017, 19(5), 2025-2036
5. PAPOUSEK, Ivo, Costas C. PAPAGIANNITSIS, Matej MEDVECKY, et al. Complete nucleotide sequences of two VIM-1-encoding plasmids from *Klebsiella pneumoniae* and *Leclercia adecarboxylata* isolates of Czech origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, 61(5), e02648-16
6. SCHAUFLER, Katharina, Torsten SEMMLER, Lothar H. WIELER, et al. Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410 - another successful pandemic clone? *FEMS Microbiology Ecology*. 2016, 92(1)
7. EICHHORN, Inga, Torsten SEMMLER, Alexander MELLMANN, et al. Microevolution of epidemiological highly relevant non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serogroups O26 and O111. *International Journal of Medical Microbiology*. 2018, 308(8), 1085-1095

**Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 215/2018/FVHE**

## Monitoring původců zoonotických onemocnění v zoologické zahradě v Brně

Pavčina Pittermannová, Jiřina Marková, Eva Bártová

*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Volně žijící savci a ptáci hrají důležitou roli při udržování zoonóz nejenom v přírodě, ale také u zvířat žijících v zajetí. Stejně tak klíšťata mohou být významnými rezervoáry infekcí a zároveň vektory onemocnění označované jako „vector-borne disease“. K původcům takovýchto zoonotických onemocnění patří např. *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia chaffeensis* a *Rickettsia sp.* Lymeská borelióza je v České republice nejčastější infekce přenášená klíšťaty a podle zprávy Státního zdravotního ústavu se výskyt onemocnění v roce 2016, proti předchozímu roku, zvýšil o 61%. Širmarová et al. (2014) detekovali protilátky proti *B. burgdorferi s.l.* u 60% zoo zvířat. U klíšťat rodu *Ixodes ricinus* byly metodou PCR/ESI-MS detekovány bakterie *B. burgdorferi s.l.* (21%) a *Rickettsia sp.* (4%) (Honig et al., 2017). *Anaplasma phagocytophilum*, způsobující u lidí granulocytární ehrlichiozu, byla v České republice detekována metodou PCR u 7% klíšťat (Kybicová et al., 2017). Další významné zoonotické onemocnění je toxoplazmóza. Protilátky proti *T. gondii* byly zjištěny metodou IFAT u 37% zvířat ze 13 zoologických zahrad z České republiky a Slovenska a to u 72 živočišných druhů (Sedlák a Bártová, 2006); a u 31% (IFAT) a 52% (ELISA) exotických přežvýkavců a velbloudovitých (Bártová et al., 2017). Zdrojem infekce jsou oocysty vylučované trusem kočkovitých šelem, tkáňové cysty *T. gondii* v syrovém mase, ale rovněž volně žijící ptáci a drobní savci, kteří se mohou stát kořistí pro kočkovité šelmy. Informace o prevalenci některých zoonotických onemocnění u drobných savců a klíšťat jsou dostupné, tyto informace ale chybí v případě zoologických zahrad, kde je přítom riziko infekcí mnohem vyšší díky druhovému spektru, vyšší koncentraci zvířat a přímému kontaktu zvířat a lidí.

### Materiál a metodika

Celkem bylo odchyceno 122 drobných savců a nasbíráno 166 klíšťat v zoologické zahradě Brno. Hlodavci byli odchyceni pomocí sklapovacích pastí ve venkovním prostranství a v zázemí jednotlivých pavilónů, následovala pitva, během které byly odebrány tkáně do mikroskopických typů Eppendorf (játra, mozek, srdce byla dána do 0,5 ml PBS). K serologickému vyšetření byly po zpracování použity výplachy srdce. Byly stanoveny protilátky proti *B. burgdorferi s.l.*, *C. burnetii* a *F. tularensis* pomocí enzymové imunoanalýzy (ELISA). Z tkání byla vyizolována DNA izolační

sadou DNeasy Blood & Tissue Kit. Ve vzorcích mozku byla detekována *T. gondii* metodou PCR na pomoci primerů TGR1 EI a TGR1 EII. Dále ve vzorcích jater byl detekován *E. cuniculi* pomocí nestedPCR za použití primerů MSP1, MSP2A a MSP3 a MSP4. Vzorky DNA pozitivní na *T. gondii* budou zaslány na genotypizaci pomocí multiplex PCR s využitím 15 mikrosatelitových markerů (Toxoplasma-Laboratoire de Parasitologie univerzity, Limoges, Francie). Vzorky DNA pozitivní na *E. cuniculi* budou sekvenovány formou služeb v komerční firmě MacroGen (Nizozemsko). Získané sekvence srovnáme se sekvencemi dostupnými v genetických databázích (GenBank).

Klíšťata byla nasbírána metodou vlajkování v areálu zoo, byla rozdělena do 70 vzorků (166 jedinců) dle pohlaví- samci, samice a vývojového stadia- nymfy. Ze vzorků klíšťat byla izolována tkáň izolačním kitem NucleoSpin Tissue. Bakterie *Rickettsia sp.* byla detekována metodou PCR pomocí primerů CS 78 a CS 323. Dále bude probíhat i detekce dalších zoonotických infekčních agens (*B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*).

### Výsledky

V rámci projektu bylo odchyceno v ZOO Brno 122 drobných savců. Protilátky proti *B. burgdorferi s.l.* byly detekovány u 6 (4,9%) jedinců, protilátky proti *C. burnetii* u 5 (4,1%) a protilátky proti *F. tularensis* nebyly detekovány. Tkáně (mozek, játra) těchto jedinců byly vyšetřeny pomocí PCR k detekci *T. gondii*, detekováno 18 (14,8%) pozitivních jedinců a *E. cuniculi*, detekováno 23 (18,9%) pozitivních jedinců. Dále bylo vyšetřeno 70 vzorků klíšťat, což zahrnovalo 166 jedinců (samci, samice a stadium nymfy). Ze vzorků klíšťat byla vyizolována DNA k detekci bakterií rodu *Rickettsia sp.*, detekovali jsme 5 pozitivních (7,1%) vzorků. V krátké době bude dokončena i detekce dalších zoonotických infekčních agens (*B. burgdorferi s.l.*, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*).

### Závěr

Získali jsme aktuální data o prevalenci vybraných původců zoonotických onemocnění u rezervoárů (drobných savců) a vektorů (klíšťat) v zoologické zahradě Brno s možností vyhodnocení rizika pro zoo zvířata a lidi (zaměstnanci a návštěvníci). Výsledky této studie jsou přínosné jak pro vlastní zoo, tak mohou být využity pro porovnání a vyhodnocení rizik v jiných zoologických zahradách.

**Seznam literatury:**

Bartova, E., Kobedova, K., Lamka, J., Kotrba, R., Vodička, R., Sedlak, K. (2017) Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in exotic ruminants and camelids in the Czech Republic. *Parasitology Research*, 116, 1925-1929.

Honig, V. et al. (2017) Broad-range survey of vector-borne pathogens and tick host identification of *Ixodes ricinus* from Southern Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017, 93, 129.

Kybicová et al. (2017) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing ticks *Ixodes ricinus* from the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8, 483-487.

Sedlák, K., Bártová, E. (2006) Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*, 136, 223-231.

Širmarová, J., Tichá, L., Golovchenko, M., Salát, J., Grubhoffer, L., Rudenko, N., Nowotny, N., Ruzek, D. (2014) Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and tick-borne encephalitis virus in zoo animal species in the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5, 523-527.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 229/2018/FVHE***

## Prevalence *Candidatus Neohrlichia mikurensis* v klíšťatech České republiky

Jaroslav Ondruš<sup>1,2</sup>, Dana Rymešová<sup>1</sup>

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>, CEITEC, VFU Brno<sup>2</sup>

### Úvod

*Candidatus Neohrlichia mikurensis* (CNM) je klíšťaty přenášená intracelulární bakterie napadající zvířata i člověka. V současnosti je řazena do rodu *Neohrlichia*, rodiny Anaplasmataceae, řádu Rickettsiales. V infikovaných jedincích je schopná vyvolat život ohrožující zdravotní komplikace, a ačkoliv je na ni v určitých lokalitách sousedních států pozitivních až 24 % klíšťat [1,2], ucelená data o prevalenci CNM v klíšťatech v České republice nejsou zatím k dispozici.

Rezervoárem CNM jsou pravděpodobně malí hlodavci [2] a klíšťata, která mají zároveň funkci vektora. Ohrožení infekcí jsou tedy hostitelé klíšťat, mezi která patří i domestikovaná zvířata [3] a člověk [4]. Symptomy „neohrlichiozy“ jsou velmi různorodé. Nejzávažnější dopady má infekce na jedince s narušeným imunitním systémem. Rizikovým faktorem je také splenektomie [4]. Infekce může způsobit vysokou horečkou, intenzivní bolest svalů a kloubů, trombózu s možnou embolií a tranzitorní ischemická ataka [4].

Jediným současným způsobem detekce CNM je molekulární metoda polymerázová řetězová reakce (PCR). Sérologické testy nejsou k dispozici z důvodu neznalosti povrchových antigenních struktur, neboť bakterie CNM nebyla do dnešního dne kultivována. Je tedy pravděpodobné, že případy „neohrlichiozy“ nejsou diagnostikovány, a pacienti tak podstupují neefektivní léčbu.

Tato nebezpečná bakterie je přenášena klíšťaty, jejichž výskyt je v České republice omezen zejména nadmořskou výškou. V posledních letech dochází k odbourávání této limitace vlivem globálního oteplování a klíšťata se nalézají ve stále vyšších nadmořských výškách dosahujících až 1300 m n. m. [5]. S rozšiřujícím se územím výskytu klíšťat roste i oblast možného kontaktu s patogeny přenášenými klíšťaty. Z těchto faktů vyplývá naléhavá potřeba zmapovat prevalenci této bakterie *Candidatus N. mikurensis* v klíšťatech na území České republiky.

### Materiál a metodika

Sběr klíšťat a příprava vzorků

Ze 169 lokalit rozmístěných po celé České republice bylo během let 2016-18 sesbíráno metodou vlajkování 15 300 klíšťat *Ixodes ricinus*. Klíšťata z jednotlivých lokalit byla rozdělena do skupin: nymfy, dospělci samčího pohlaví a dospělci samičího pohlaví, vždy po pěti jedincích a z 2762 těchto pětic byla izolována deoxyribonukleová kyselina (DNA) kitem NucleoSpin Tissue

(MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG). Její koncentrace ve vzorcích byla změřena pomocí spektrofotometru a vzorky byly uskladněny při -20 °C až do detekce CNM pomocí PCR. Výtěžnost DNA z pěti samic se pohybovala okolo 15 µg, v případě samců 6 µg a v případě nymf 2 µg.

#### Detekce CNM pomocí PCR

Pro detekci CNM byly vytvořeny protokoly popisující postup amplifikace úseků genů *groEL* (654 bazí) a 16S rRNA (444 bazí), které byly optimalizovány pro vhodnou nasedací teplotu primerů pomocí gradientové PCR. Primery byly navrženy pomocí programu Geneious 11.1.4 (BIOMATTERS Ltd., USA) podle již publikovaných sekvencí CNM a příbuzných druhů bakterií. Reakce probíhala v objemu 25 µl. Koncentrace látek v PCR reakci byla 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.01% Tween 20, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy (kit PPP Master Mix, TOP-BIO, s.r.o.) a 500 nM primery. Na jednu reakci bylo použito přibližně 150 ng templátové DNA v případě samic, 70 ng v případě samců, a 30 ng v případě nymf. PCR produkty byly nanášeny na 1,5 % agarózové gely a elektroforeticky rozděleny.

#### Sekvenování

PCR specifické produkty byly vyřezány z 1,5% agarózového gelu a přečištěny pomocí kitu Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (GENEAID BIOTECH Ltd.). Sekvenování bylo provedeno firmou MACROGEN Inc. Sangerovou metodou.

#### Fylogenetická analýza

U nalezených kmenů CNM byla provedena fylogenetická analýza algoritmem Maximum likelihood pomocí programu Geneious 11.1.4. Fylogenetický strom zobrazující vztahy vybraných zástupců nalezených kmenů CNM s vybranými příbuznými druhy bakterií byl zkonstruován na základě 599 bazí dlouhého úseku genu *groEL*.

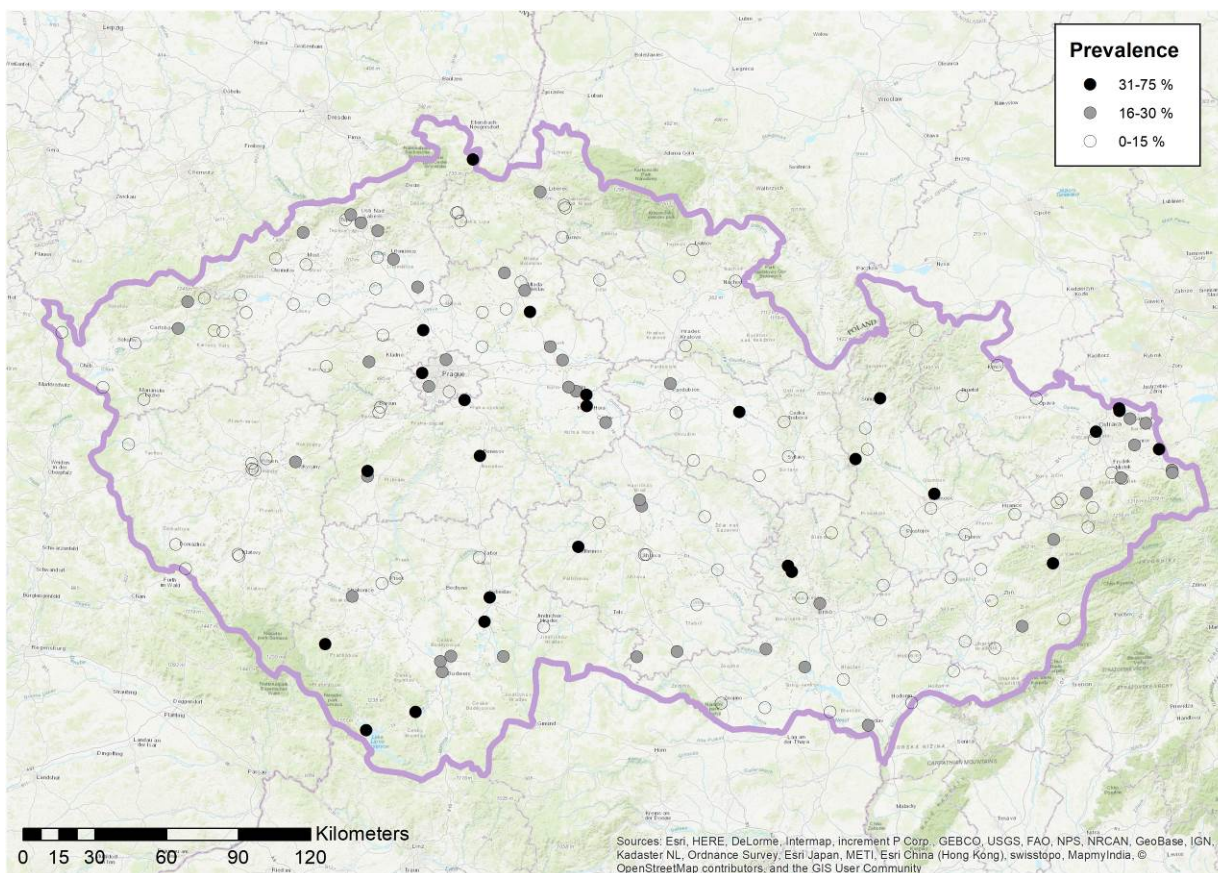
#### Tvorba mapy

Data o poloze lokalit sběru klíšťat a frekvenci výskytu CNM ve vyšetřovaných pětících klíšťat *Ixodes ricinus* na jednotlivých zkoumaných lokalitách byla dále zpracována pomocí geografických informačních systémů QGIS 2.14 (QGIS Development Team, 2009) a ArcGIS 10.1 (Esri).

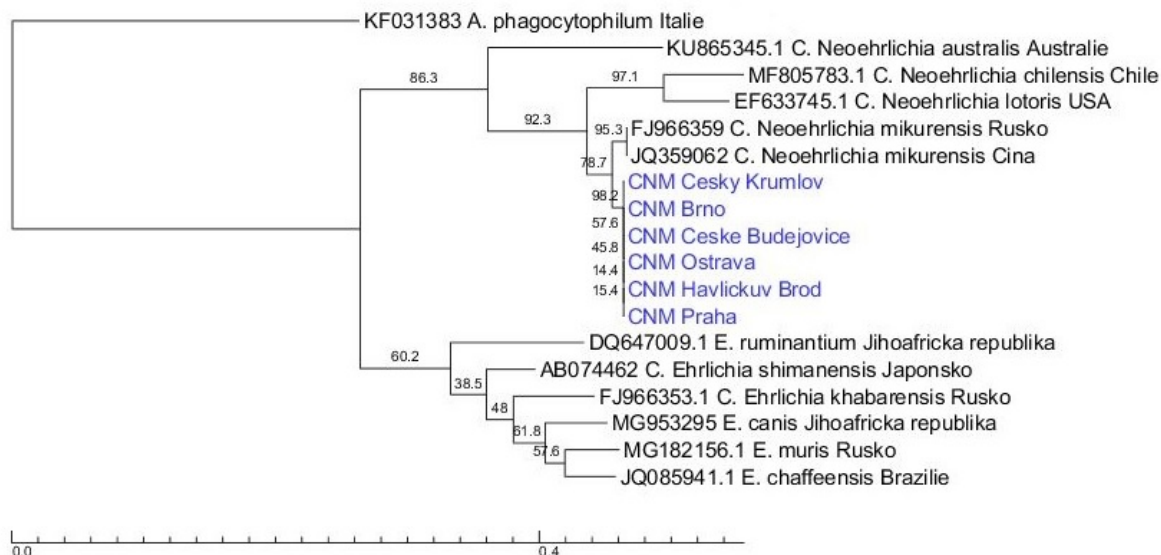
### Výsledky

Výsledkem projektu je první systematické zmapování výskytu bakterie *Candidatus N. mikurensis* v klíšťatech *Ixodes ricinus* v České republice. Vyšetřované lokality rozdělené do tří kategorií dle procentuálního podílu pětic klíšťat s alespoň jedním klíštětem infikovaným CNM ze všech vyšetřovaných pětic na lokalitě jsou zobrazeny na mapě (Obr. 1). Fylogenetický strom popisující

fylogenetické vztahy kmenů CNM nalezených v klíšťatech *Ixodes ricinus* v ČR vůči vybraným zástupcům příbuzných bakterií zobrazuje Obr. 2.



Obrázek 1. Mapa České republiky s vyznačením lokalit sběru klíšťat *Ixodes ricinus* a znázorněním frekvencí výskytu CNM ve vyšetřených pěticích klíšťat.



Obrázek 2. Fylogenetický strom kmenů CNM nalezených v klíšťatech *Ixodes ricinus* v ČR a vybraných zástupců příbuzných bakterií, založený na 599 bazí dlouhém úseku genu groEL. (Sekvence získané v rámci tohoto projektu jsou popsány „CNM \*název města původu\*“ a jsou zvýrazněny modře).



## Závěr

V rámci projektu byla vyšetřena klíšťata *Ixodes ricinus* sbíraná na 169 lokalitách v rámci České republiky na bakterii *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* pomocí metody PCR. Největší množství infikovaných klíšťat bylo nalezeno v okolí měst: Český Krumlov, Lipno nad Vltavou, Terezín, Vysoké Mýto, Pelhřimov, Ostrava a Bohumín, kde obsahovala nadpoloviční většina analyzovaných vzorků infikovaná klíšťata. Zatímco v zemích sousedících s Českou republikou byl vysoký podíl klíšťat infikovaných CNM detekován již v minulosti, systematická data z ČR doposud chyběla. Nyní je potvrzeno, že i v ČR bude žádoucí počítat s možností infekce touto bakterií při vyšetřování pacientů - a to nejen v okolí zmíněných měst.

## Seznam literatury

1. DERDÁKOVÁ, Markéta, VÁCLAV, Radovan, PANGRÁCOVA-BLAŇAROVÁ, Lucia, SELYEMOVÁ, Diana, KOČI, Juraj, WALDER, Gernot a ŠPITALSKÁ, Eva. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* and its co-circulation with *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks across ecologically different habitats of Central Europe. *Parasites & Vectors*. 2014, 7: 160. ISSN: 1756-3305.
2. SILAGHI, Cornelia, WOLL, Dietlinde, MAHLING, Monia, PFISTER, Kurt a PFEFFER, Martin. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* in rodents in an area with sympatric existence of the hard ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*, Germany. *Parasites & Vectors*. 2012, 5: 285. ISSN: 1756-3305.
3. DINIZ, Pedro, Paulo, SCHULZ, Bianka, HARTMANN, Katrin a BREITSCHWERDT, Edward. 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' infection in a dog from Germany. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49(5): 2059–62. ISSN: 0095-1137.
4. GRANKVIST, Anna, ANDERSSON, Per-Ola, MATTSSON, Mattias, SENDER, Monica, VAHT, Krista, HÖPER, Liennea, SAKINIENE, Egidija, TRYSBURG, Eestelle, STENSON, Martin, FEHR, Jan, PEKOVÁ, Sona, BOGDAN, Cristian, BLOEMBERG, Guido a WENNERÅS, Cristine. Infections with the tick-borne bacterium 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases. *Clinical Infectious Diseases*. 2014, 58(12): 1716–22. ISSN 1537-6591.
5. DANIEL, Milan, MATERNA, Jan, HONIG, Vaclav a GRUBHOFFER, Libor. (2009) Vertical distribution of the tick *Ixodes ricinus* and tick-borne pathogens in the northern moravian mountains correlated with climate warming (Jeseniky MTS Czech Republic). *Central European Journal of Public Health*. 2009, 17(3): 139–45. ISSN: 1210-7778.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 205/2018/FVHE***

# Posouzení toxicity polychlorovaných bifenylnů pro buňky folikulů štítné žlázy s využitím 3D kultivačního systému

Ehdaa E.E. Abdelsalam, Hana Band'ouchová, Zuzana Picková, Lucie Břoušková, Sandra Martinková, Jana Sedláčková

*Ústav ekologie a chorob zvířet, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## Úvod

Štítná žláza představuje jednu z hlavních funkčních jednotek nereprodukční složky endokrinního systému obratlovců. Primárně ovlivňuje prostřednictvím hormonů tyroxinu (T4) a trijodtyroninu (T3), které produkuje, úroveň bazálního metabolismu, syntézu a degradaci proteinů. Expozice environmentálním toxinům, zejména dioxinům a dioxinům podobným látkám, je prokázána coby faktor zvyšující frekvenci výskytu poruch funkce štítné žlázy u lidí (Brent, 2010). V případě expozice PCB se zdá být vliv na produkci hormonů, metabolismus a funkci štítné žlázy závislý na dávce a délce expozice. Vliv byl ve studiích na hlodavcích a primátech po expozici nízkým i vyšším dávkám PCB již dříve hodnocen pomocí stanovení hladiny T4 (Collins Jr. & Capen, 1980). V této studii jsme vytvořili primární buněčné kultury tyreocytův trojdimenzionálním systému. Buněčné kultury byly odvozené z tkáně štítné žlázy tří druhů lovné zvěře; *daňka evropského, muflona a srnce obecného*. Cílem studie pak bylo posouzení vlivu různých koncentrací PCB 138 (jeden z nejčastějších PCB kongenerů v prostředí - indikátorový) přímo na zdraví a funkci buněk folikulů štítné žlázy výše zmíněných druhů při různé délce expozice.

## Materiál a metodika

### *Izolace buněk, 3D kultivace a příprava PCB 138*

Samostatné folikuly byly úspěšně vyizolovány z tkáně štítné žlázy jednotlivých zvířat pomocí enzymatického trávení kolagenázou a dispázou a následně byly kultivovány v kultivačních lahvičkách potažených kolagenem, v médiu které obsahovalo NuSerum (Corning® Nu-Serum™ IV) v koncentraci 25% a somatostatin v koncentraci 10 ng/ml (Jeker et al., 1999) v atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37°C. Poté byly buňky ošetřené gelovým kolagenem (ECM675 Chemicon® Int.) přeloženy na jamkové destičky pro provádění testů. Indikátorový kongener PCB 138 byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a byla vytvořena koncentrační řada v kultivačním médiu (0,3; 3; 30; 300 a 3000 ng PCB 138/ml média). Dále byly to studie zařazeny dvě kontrolní skupiny (s médiem s DMSO a bez DMSO).

### *Životaschopnost buněk a cytotoxicita*

Buňky byly kultivované v rozsahu  $2,5 - 3 \times 10^5$ /ml v 3D systému v 96 jamkových destičkách po dobu 24, 48 a 72 hodin vystaveny působení PCB kongeneru 138 v koncentraci 0 ng až 3000 ng/ml (viz výše). Životaschopnost buněk byla posouzena na základě metabolické aktivity živých buněk s použitím RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay. Intenzita luminescence byla vyhodnocena pomocí Cytation 3. Zároveň byla cytotoxicita posouzena dle změny membránové integrity, které se vyskytují v důsledku smrti buněk, zapoužití CellTox™ Green Cytotoxicity Assay. Intenzita fluorescence byla opět vyhodnocena pomocí Cytation 3.

### *Zhodnocení oxidativního stresu (ROS)*

Produkce ROS byla hodnocena na základě stanovení hladiny superoxidu, přičemž buňky byly kultivovány ve stejném počtu a za stejných podmínek jak bylo již dříve zmíněno a délka expozice byla 24, 48 a 72 hodin pro koncentraci 30 ng/ml ve srovnání s kontrolou. K hodnocení byl použit ROS Detection Cell-Based Assay Kit (DHE). Intenzita fluorescence byla hodnocena pomocí Cytation 3.

### *Příjem jódu buňkami*

Hodnocení schopnosti buněk přijmout jód bylo provedeno pomocí kolorimetrického testu (Walt et al., 2010). Buňky byly kultivované v stejných podmínkách a po dobu 24, 48 a 72 hodin exponované koncentraci 30 ng/ml ve srovnání s kontrolou. Jodid sodný v koncentraci  $10 \mu\text{M}$  byl k buňkám přidán na konci každé expozice na dobu 60 minut. Principem stanovení pak byla Sandell-Kolthoffova reakce. Absorbance byla hodnocena pomocí Cytation 3.

### *ELISA test pro hodnocení tyroxinu (T4)*

Schopnost buněk vylučovat T4 byla hodnocena pomocí ELISA Competitive T4 Kit po době expozice 24, 48 a 72 hodin ke koncentraci 30 ng/ml ve srovnání s kontrolou. Buňky ve všech skupinách byly kultivované ve stejných podmínkách s drobnými modifikacemi, simulujícími podmínky potřebné při produkci hormonů štítné žlázy (Dickson et al., 1980; Marshall, 1986). Absorbance byla přečtena pomocí ELISA readeru ELx808.

### *Organizace cytoskeletu*

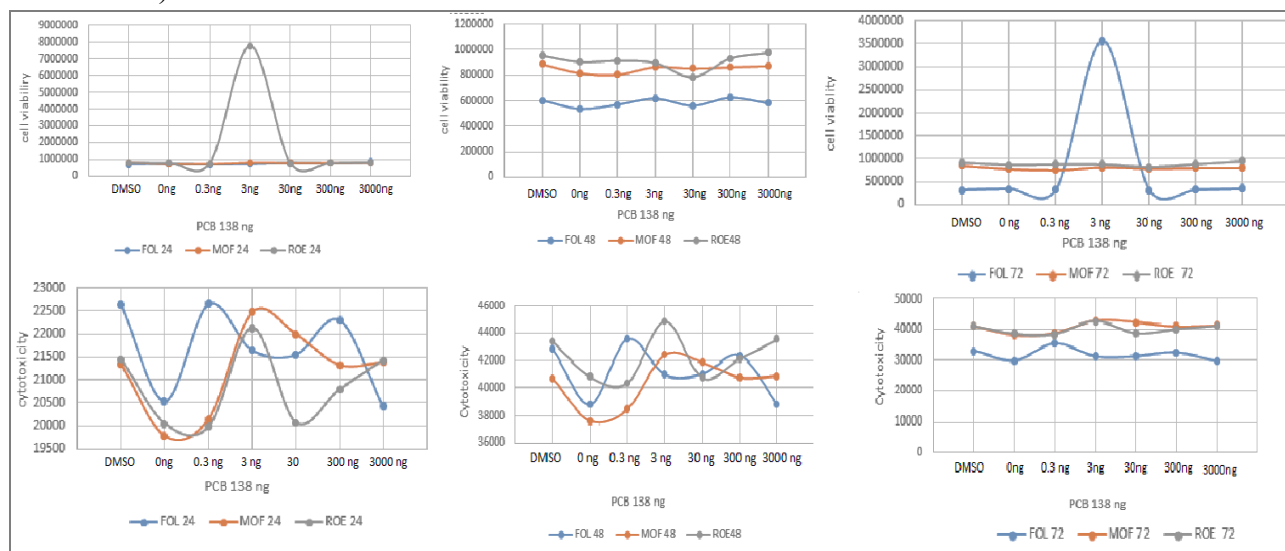
Pro posouzení vlivu PCB 138 na organizaci buněčného cytoskeletu byly buňky kultivovány ve stejných podmínkách na povrchu sklíčka potaženého kolagenem. Po době expozice 24, 48 a 72 hodin byly buňky exponované koncentraci 30 ng/ml porovnány s kontrolou. Po uplynutí expozičního času byly buňky zafixované a barvené fluorescenčními barvami (Phalloidin i-

Fluorescence microscopy (Fluor488) for actin-F and (DAPI) in nuclei. Cell imaging was performed using a fluorescence microscope Olympus BX51.

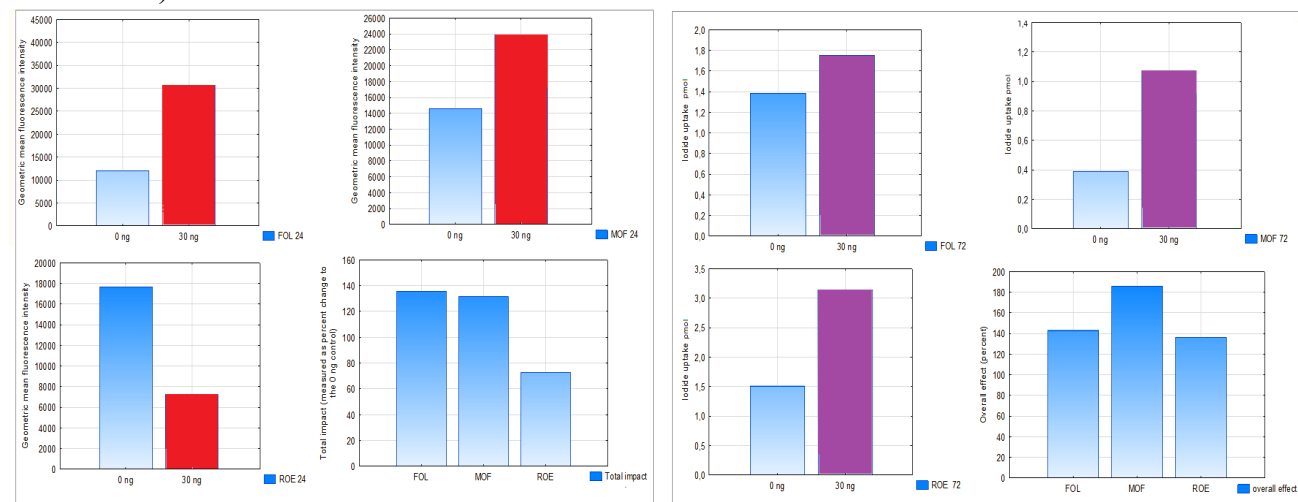
## Výsledky

Cells from the thyroid gland of individual animals were successfully isolated and subsequently cultured as follicular cells. Viability and cytotoxicity were evaluated after exposure to 0.3, 3, 30, 300 and 3000 ng PCB138/ml media concentrations, oxidative stress, iodine uptake by cells, T4 production and cytoskeleton disruption were evaluated at a concentration of 30 ng/ml media. Based on preliminary statistical analysis, there is no significant effect on cell viability, while cytotoxicity is more pronounced at lower concentrations and in guinea pig and rat, where we see dependence on exposure duration. There is also a clear effect of PCB 138 on iodine uptake, T4 production and cytoskeleton organization of thyroid gland cells. In conclusion, it can be said that PCB 138 disrupts thyroid gland function directly at the cellular level.

Graf. 1 Výsledky hodnocení viability a cytotoxicity (FOL= daněk, MOF=muflon, ROE=srnc)



Graf. 2 Výsledky hodnocení ROS a příjmu jódu buňkami (FOL= daněk, MOF=muflon, ROE=srnc)



**Seznam literatury:**

- Brent, G. A. (2010). Environmental exposures and autoimmune thyroid disease. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 20(7), 755–761.
- Collins Jr., W. T., & Capen, C. C. (1980). Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rats exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *Am J Pathol*, 99(1), 125–142.
- Dickson, J. G., Pian, S. H. E., Fayet, G., & Lissitzky, S. (1980). Follicleformation and iodide metabolism in cultures of human thyroid cells. *Journal of Endocrinology*, 90 (1), 113–124.
- Jeker, L. T., Hejazi, M., Burek, C. L., Rose, N. R., & Caturegli, P. (1999). Mouse thyroid primary culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(2), 511–515.
- Marshall N.J., E. P. A. (1986). Recent Developments in the in vitro Bioassay of TSH and Thyroid-Stimulating Antibodies. In A. M. McGregor (Ed.), *Immunology of Endocrine Diseases. Immunology and Medicine*, vol 3. (pp. 25–49). Springer, Dordrecht.
- Waltz, F., Pillette, L., & Ambroise, Y. (2010). A nonradioactive iodide uptake assay for sodium iodide symporter function. *Analytical Biochemistry*, 396(1), 91–95.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 226/2018/FVHE***

## Vliv minoritního mykotoxinu beauvericinu na stravitelnost sušiny *in vitro*

Vendula Stoklasová, Marie Dvořáková, Adam Málek, Ludmila Křížová

Ústav výživy zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita

Brno

### Úvod

Beauvericin (BEA) je cyklický hexapeptid izolován z hub *Beauverina bassiana*, může být ale také produkována některými plísněmi rodu *Fusarium spp.* (*F. subglutinans*, *F. bulbicola*) (Santini et al. 2012). BEA se převážně objevuje v zrninách a jejich produktech (Svingen et al. 2017, Uhlig et al. 2006, 2007), ale byly také nalezeny v objemných krmivech (McElhinney et al. 2016, Zachariášová et al. 2014). Podle EFSA (2014) se chronická expozice BEA u přežvýkavců pohybuje mezi 0,44 až 0,86 µg/kg živé hmotnosti za den, zatímco vypočítaná akutní expozice je 1,72 µg/kg živé hmotnosti za den. Cílem práce proto bylo pomocí *in vitro* metod zjistit vliv minoritního mykotoxinu beauvericinu v hladinách odpovídajících akutní expozici a jejímu dvojnásobku na stravitelnost sušiny směsné krmné dávky objemného a jadrného typu.

### Materiál a metodika

Beauvericin (Sigma-Aldrich) byl nejprve rozpuštěn v methanolu (50 µg/ml) a poté naředěn destilovanou vodou na koncentrace 0,5 a 1 µg/ml, které byly přidávány do inkubací a které odpovídaly hladině akutní expozice u přežvýkavců a jejímu dvojnásobku.

Bachorová tekutina byla odebrána hodinu před nakrmením od dojnice (ŠZP Nové Dvory) krmené směsnou krmnou dávkou složenou z kukuřičné siláže (22 kg), vojtěškové senáže (12 kg), lučního sena (3 kg), krmné slámy (1,5 kg), doplňkové krmné směsi (6,7 kg) a minerálního lizu (0,1 kg). K odběru byla použita jícnová sonda s ruční podtlakovou pumpou. Bachorová tekutina byla převezena v předehřátých odběrových lahvích v termoboxu do laboratoře Ústavu výživy zvířat. Bezprostředně poté bylo u bachorové tekutiny změřeno pH, tekutina byla pomixována půl minuty v mixéru na nejvyšší otáčky a přefiltrována přes čtyři vrstvy gázy.

Inkubace byly prováděny v silnostěnných skleněných tubách o objemu 90 ml, do nichž bylo naváženo 0,5 g vzorku krmiva, které obsahovalo stejné složky jako krmná dávka dojníc, pouze poměr objemné a jadrné složky byl upraven na 60:40 (objemný typ KD) a 40:60 (jadrný typ KD). Vzorky krmiv byly usušeny a pomlety na velikost 1 mm. Vzorky krmiv byly zality 40 ml pufru (McDougall, 1948) vyhřátého na 39 °C a 10 ml bachorové tekutiny. Do takto připravené směsi byl přidáván roztok beauvericinu, popř. methanolu v množstvích 1 ml podle schématu pokusu v tabulce 1.

Tabulka 1: Schéma pokusu (O – objemný typ krmné dávky, J – jadrný typ krmné dávky)

Označení skupin	Zásah
KO-	Negativní kontrola (pouze inokulum)
KO+	Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)
BO0,5	inokulum + BEA 0,5 µg/ml
BO1	inokulum + BEA 1 µg/ml
KJ-	Negativní kontrola (pouze inokulum)
KJ+	Pozitivní kontrola (inokulum + methanol)
BJ0,5	inokulum + BEA 0,5 µg/ml
BJ1	inokulum + BEA 1 µg/ml

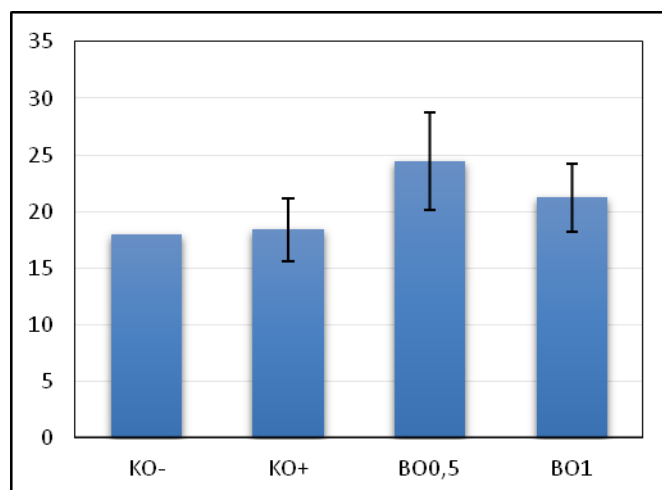
Tuby byly profouknuty dusíkem a uzavřeny gumovými zátkami opatřenými zpětným (Bunsenovým) ventilem, promíchány a inkubovány v termostatu 24 hodin při teplotě 39 °C.

Po uplynutí inkubační doby byly tuby zchlazeny v ledové vodě a bylo změřeno pH. Následně byly tuby odstředovány po dobu 5 minut při 4000 otáček/min. Supernatant byl odsát a rezidua krmiv byla analyzována na obsah sušiny. Ze získaných dat byla vypočtena stravitelnost sušiny. Každá kombinace faktorů byla provedena v pěti opakováních. Výsledky byly vyhodnoceny analýzou variance (ANOVA) na hladině průkaznosti  $P < 0,05$ .

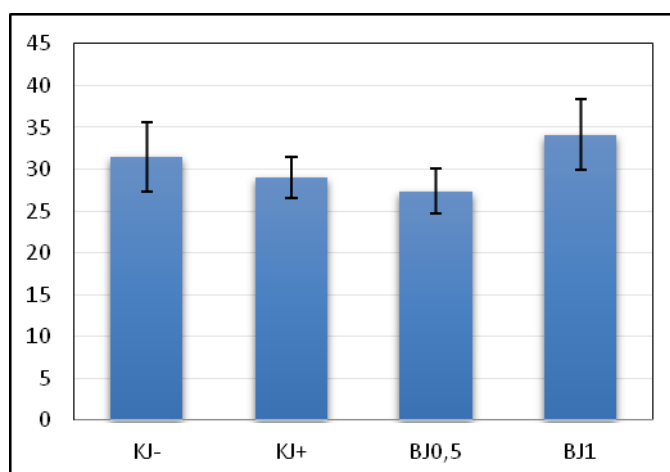
### Výsledky

Stravitelnost sušiny u objemného typu krmné dávky byla v kontrolních skupinách obdobná ( $P > 0,05$ ). U koncentrace 0,5 µg/ml (BO0,5) byla zjištěna vyšší stravitelnost sušiny 24,4 % (sd = 4,3,  $P < 0,05$ ), což nejspíše poukazuje na vliv BEA na nežádoucí mikroflóru. U koncentrace 1 µg/ml (BO1) se projevil již i mírný inhibiční účinek na žádoucí mikroflóru v bacheru, protože oproti skupině BO0,5 došlo ke snížení stravitelnosti na 21,2 % (sd = 3,0), nicméně i tato hodnota je stále vyšší než u kontrolních skupin.

U jadrného typu krmné dávky byla stravitelnost sušiny ve skupině KJ- numerický vyšší (31,5 %, sd = 4,1) než u KJ+ (29,0 %, sd = 2,4), rozdíly však nebyly statisticky průkazné ( $P > 0,05$ ). Zde se nejspíše projevil negativní vliv methanolu na bacherové mikroorganismy. U skupiny BO0,5 došlo k poklesu stravitelnosti sušiny až na 27,4 % (sd = 2,7) naproti tomu ve skupině BO1 jsme zaznamenali stravitelnost vyšší (34 %, sd = 4,2). Bude proto v budoucnu potřeba provést ještě další experimenty pro ověření těchto výsledků.



Graf 1: Stravitelnost sušiny v jednotlivých skupinách u objemného typu KD



Graf 2: Stravitelnost sušiny v jednotlivých skupinách u jadrného typu krmné dávky

### Závěr

Zjistili jsme, že za výše definovaných podmínek nebyl vliv minoritního mykotoxinu beauvericinu na stravitelnost sušiny směsné krmné dávky jednoznačný. Bude potřeba v budoucnu provést ještě další studie podobného zaměření, které by pomohly objasnit vliv beauvericinu na diverzitu bachorové mikroflóry a stravitelnost živin.

### Seznam literatury:

EFSA (2014): Scientific opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal, 12, 3802.

Gruber-Dorninger Ch., Novak B., Nagl V., Berthiller F. (2016): Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65, 7052–7070.



- Ivanova L., Uhlig S., Devreese M., Croubels S., Faeste Ch. K. (2017): Biotransformation of the mycotoxin enniatin B1 in pigs: A comparative in vitro and in vivo approach. *Food and Chemical Toxicology*. 105, 506–517.
- Jestoi M. (2008): Emerging fusarium-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 8, 21–49.
- Mc Dougall E. I. (1948): Studies on ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal*, 43, 99–109.
- Meca G., Sospedra I., Valero M. A., Manes J., Font G., Ruiz M. J. (2011): Antibacterial activity of the enniatin B, produced by *Fusarium tricinctum* in liquid culture, and cytotoxic effects on Caco-2 cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 21, 503–512.
- Patterson J. A., Ricke S. C. (2015): Effect of ethanol and methanol on growth of ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50, 62–67.
- Prosperini A., Meca G., Font G., Ruiz M.-J. (2013): Bioaccessibility of enniatins A, A1, B, and B1 in different commercial breakfast cereals, cookies, and breads of Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61, 456–461.
- Righi F., Simoni M., Foskolos A., Beretti V., Sabbioni A. Quarantelli A. (2017): In vitro ruminal dry matter and neutral detergent fibre digestibility of common feedstuffs as affected by the addition of essential oils and their active compounds. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 26, 204–212.
- Roig, M., Meca G., Marín R., Ferrer E., Mañes J. (2014): Antibacterial activity of the emerging *Fusarium* mycotoxins enniatins A, A1, A2, B, B1, and B4 on probiotic microorganisms. *Toxicon*, 85 C: 1–4.
- Sebastia N., Meca G., Soriano J. M., Manes J. (2011): Antibacterial effects of enniatins J1 and J3 on pathogenic and lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. 49, 2710–2717.
- Stepien L., Waskiewicz A. (2013): Sequence divergence of the enniatin synthase gene in relation to production of beauvericin and enniatins in *Fusarium* species. *Toxins*, 3, 537–555.
- Weinberg Z. G., Shatz O., Chen Y., Yosef E., Nikbahat M., Ben-Ghedalia D., Miron J. (2007): Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. *Journal of Dairy Science*, 90, 4754–4762.
- Zachariášová M., Dzuman Z., Veprikova Z., Hajkova K., Jiru M., Vaclavikova M., Zachariasova A., Pospichalova M., Florian M., Hajslova J. (2014): Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, 193, 124–140.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 219/2018/FVHE***

## Vliv antidepresiv kontaminujících povrchové vody na vývoj ryb a obojživelníků

Monika Urbanová<sup>1</sup>, Petr Chloupek<sup>1</sup>, Nikola Hodkovicová<sup>2,3</sup>, Pavla Schonová<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Česká republika

<sup>3</sup>Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

### Úvod

Dle Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj stoupla ve světě spotřeba antidepresiv od roku 2000 několikanásobně (OECD, 2015). Stejně jako u ostatních skupin léčiv, psychoaktivní látky nejsou zcela metabolizovány v lidském organismu, ale částečně se vylučují z těla buď nezměněné, nebo ve formě metabolitů (Heberer, 2002). Nízká účinnost odstranění léčiv v čistírnách odpadních vod je následně příčinou výskytu těchto látek v podzemních a povrchových vodách. I když se rezidua těchto látek vyskytují v odpadních a povrchových vodách v poměrně nízkých koncentracích (okolo 300 ng/l pro amitriptylin a venlafaxin – Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013; 100 ng/l pro sertraline – Connors et al., 2009) jedná se o bioaktivní látky, které mohou mít nezanedbatelné účinky na organismy vodního prostředí. Cílem studie bylo posoudit vliv antidepresiv, jejichž rezidua se vyskytují v povrchových vodách, na necílové organismy – ryby a obojživelníky za pomoci celé řady sledovaných endpointů včetně změn v expresi genů zodpovědných za vývoj orgánových soustav.

### Materiál a metodika

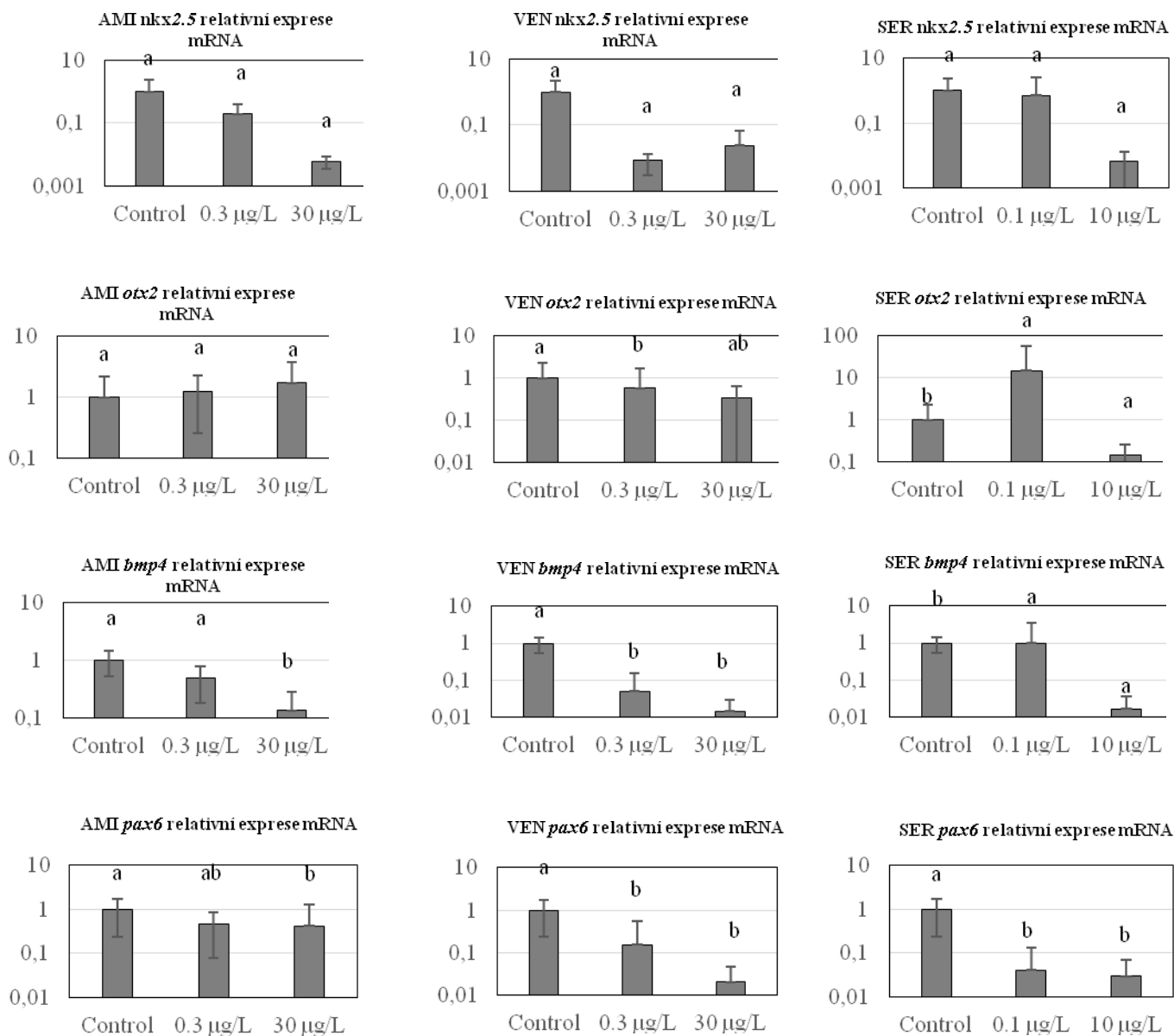
V průběhu roku 2017 byly provedeny testy toxicity vybraných antidepresiv na embrya ryb *Danio rerio* a žab *Xenopus tropicalis*. Pro testování byli zvoleni zástupci antidepresiv s různými mechanismy účinku, jejichž rezidua se v povrchových vodách nejčastěji vyskytují – amitriptylin, venlafaxin a sertralin. Látky byly testovány v environmentálně-relevantní koncentraci (300 ng/l pro amitriptylin a venlafaxin; 100 ng/l pro sertralin) a v koncentraci stonásobně vyšší. Testy byly ukončeny před započítáním larválního stádia – 48 hodin po oplození v případě *Xenopus tropicalis* a 144 hodin po oplození v případě *Danio rerio*. Na konci testu byly u obou organismů a všech 3 testovaných látek odebrány z každé testované a kontrolní skupiny vzorky pro kvalitativní polymerázovou řetězovou reakci.

Vzorky embryí *D. rerio* a *X. tropicalis* byly fixovány v RNA lateru a uchovány při -80 °C, před analýzou byly vyjmuty z RNA-lateru a homogenizovány. Následně byla provedena izolace RNA za pomoci RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Německo). Koncentrace a čistota RNA byla ověřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Německo), následovala reverzní transkripce mRNA do cDNA. Polymerázové řetězové reakce byly u všech vzorků provedeny v triplicátu za použití přístroje LightCycler 480 (Roche, Německo). Cílem stanovení bylo posoudit vliv vybraných látek na expresi následujících genů: bone morphometric protein 4 (*bmp4* – vývoj kostí), NK2 homeobox 5 (*nkx2.5* – vývoj srdce, orthodenticle homeobox 2 (*otx2* – vývoj oka a mozku) a paired box 6 (*pax6* – vývoj oka a mozku). Získaná data byla statisticky zpracována za účelem publikace výsledků na odborných konferencích a ve vědeckém časopise.

## Výsledky

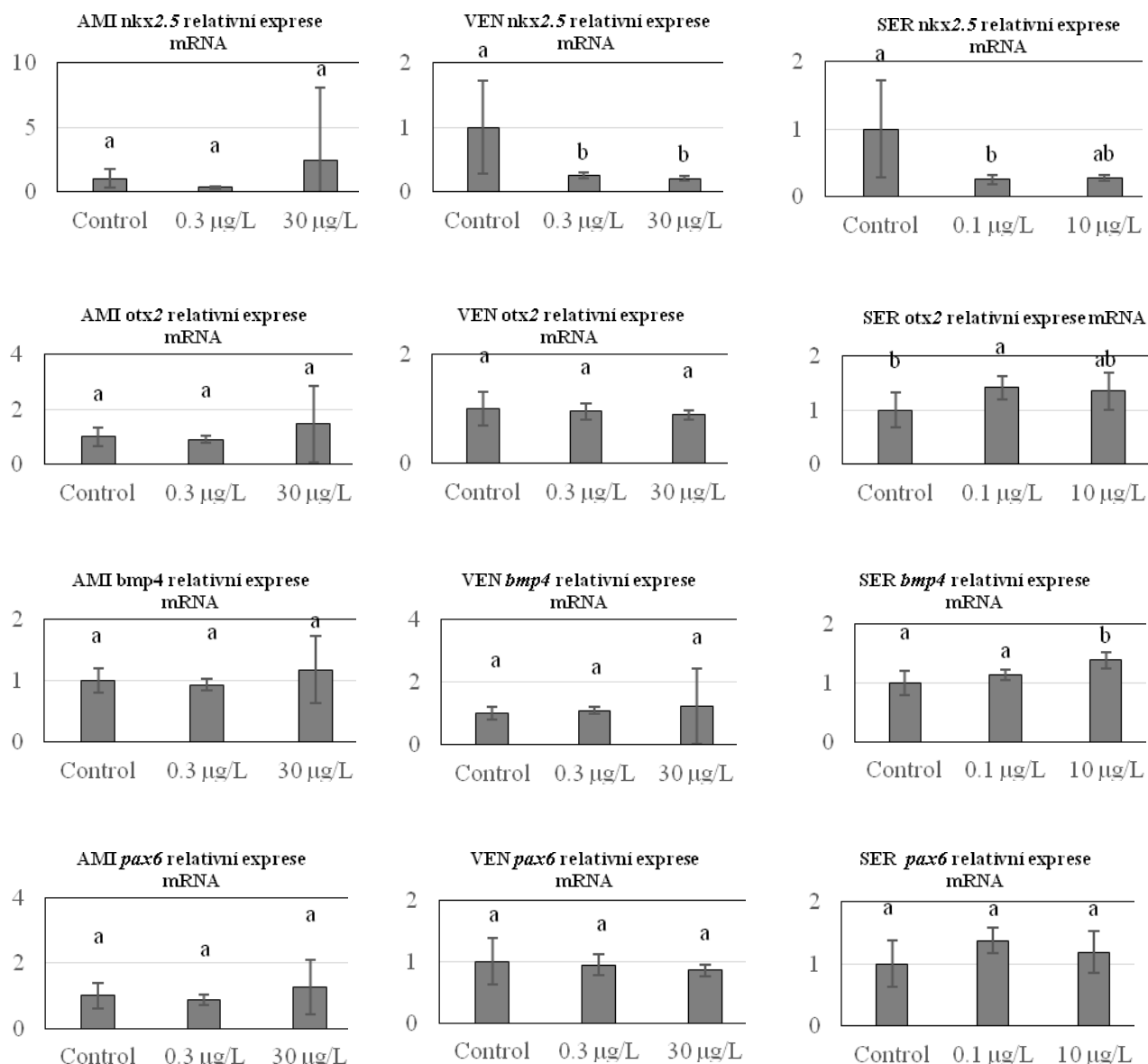
Následující soubory grafů 1. a 2. prezentují změny v relativní expresi mRNA.

Soubor grafů 1. Změny v relativní expresi mRNA u genů *nkx2.5*, *otx2*, *bmp4* a *pax6* embryí *Dania reria* 144h po fertilizaci a expozici antidepresivům amitriptylin (AMI), venlafaxin (VEN) a sertralin (SER).



V grafech, jejichž sloupce jsou označeny různými písmeny (a / b) jsou rozdíly statisticky významné, hladina významnosti  $p < 0.05$ .

Soubor grafů č. 2. Změny v relativní expresi mRNA u genů *nkx2.5*, *otx2*, *bmp4* a *pax6* u embryí *Xenopus tropicalis* 48h po fertilizaci a expozici antidepresivům amitriptylin (AMI), venlafaxin (VEN) a sertralin (SER).



V grafech, jejichž sloupce jsou označeny různými písmeny (a / b) jsou rozdíly statisticky významné, hladina významnosti  $p < 0.05$ .

### Závěr

Cílem studie bylo posoudit vliv antidepresiv amitriptylinu, venlafaxinu a sertralinu, jejichž rezidua se vyskytují v povrchových vodách, na necílové organismy – ryby a obojživelníky za pomoci změn v expresi genů zodpovědných za vývoj orgánových soustav. Z výsledků studie vyplývá, že již environmentálně-relevantní koncentrace testovaných léčiv mají potenciál ovlivnit vývoj kostní, srdce, mozku a očí o raných vývojových forem ryb a obojživelníků.

**Seznam literatury:**

OECD, 2015. Health at a Glance 2015: OECD Indicators. OECD Publishing, Paris, [10.1787/health\\_glance-2015-en](https://doi.org/10.1787/health_glance-2015-en)

Baker, D. R. and Kasprzyk-Hordern, B., 2013. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Science of the Total Environment*. 454–455: 442–456.

Connors, D. E., Rogers, E. D., Armbrust, K. L., Kwon, J.W., Black, M. C., 2009. Growth and development of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to selective serotonin inhibitors, fluoxetine and sertraline, throughout metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28, 2671 – 2676.

Heberer, T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 131: 5–17.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 207/2018/FVHE***

# Účinek antidepresiva sertralin na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Josef Václavík, Zdeňka Svobodová, Nikola Hodkovicová, Lenka Večerková

*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## Úvod

V poslední době je zaznamenán celosvětový nárůst spotřeby léčiv. Významnou kategorií představuje používání medikamentů na léčbu depresí. Jednou z látek, jenž do této skupiny patří, je sertralin. Jedná se o lék patřící do skupiny 3. generace antidepresiv, které se v těle uplatňují jako selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu, čímž udržují potřebnou koncentraci serotoninu uvnitř nervové synapse. Odpadní produkty tohoto léčiva představují potenciální zátěž pro vodní prostředí, kam se dostávají odpadními vodami skrze čistírny, které jej nejsou schopny v celém rozsahu zpětně vychytávat. Sertralin následně přechází do vodního systému, ukládá se v sedimentech v koncentracích 4,41 – 18,02 ng/g (Osorio et al., 2016) a následně přechází do potravního řetězce včetně bentosu, kde po dlouhý čas perzistuje v koncentracích 4,2 – 5,6 ng/g (Grabicova et al., 2015). U ryb a ostatních vodních živočichů, kteří přišli do kontaktu s touto látkou, se sertralin kumuluje převážně v nervové tkáni, játrech, ledvinách a gonádách (Grabicova et al., 2017). Poznatků o vlivu humánních antidepresiv na ryby není doposud ve vědecké literatuře dostatek. Jelikož spotřeba antidepresiv neustále roste, je velmi aktuální se danou problematikou zabývat.

## Materiál a metodika

Byl proveden test toxicity na rybách dle metodiky OECD 215 (Růstový test na juvenilních rybách 28 dní). Testování probíhalo semistaticky s pravidelnou výměnou vodní lázně 2x denně. K testu bylo využito 80 ks pokusných ryb pstruha duhového, které se následně rozdělily do 8 akvárií po 10ks ryb. V rámci testu byly sledovány a hodnoceny 4 skupiny (1 kontrolní + 3 testovací). Před začátkem samotného testu proběhla 3 týdenní aklimatizační fáze z důvodu navyknutí ryb na pokusné prostředí včetně podávaného krmiva Biomar 920 a kontrolní zvážení ryb. Velikost denní krmné dávky odpovídala 2 % tělesné hmotnosti ryb. Následovala fáze vlastního pokusu, který trval 28 dní, přičemž po 14 dnech proběhlo kontrolní vážení ryb a následná úprava velikosti krmné dávky vzhledem k aktuální hmotnosti. Kontrolní skupině se po celou dobu testu

podávalo samotné krmivo. Pokusným skupinám bylo zkrmováno krmivo se zabudovanou látkou sertraline v koncentraci 0,01 mg/kg, 0,1 mg/kg a 1 mg/kg krmiva. V testovacích akváriích probíhala každodenně ráno a večer kontrola kvality vody (pH, obsah kyslíku, teplota, amoniak, dusitany, chloridy). V průběhu testu se dále hodnotil příjem krmiva, hmotnostní přírůstky a případná mortalita. V závěru pokusu se rybám odebrala krev na hematologické a biochemické vyšetření. Následně se ryby usmrtily tupým úderem do hlavy a byly odebrány vzorky na histopatologické vyšetření, na stanovení oxidativního stresu a reziduí sertralinu v jednotlivých tkáních.

## Výsledky

Během provádění pokusu byly pozorováním zjištěny odlišné známky chování ryb v kontrolní skupině v porovnání s testovanými rybami, kterým bylo zkrmováno krmivo obsahující vyšší koncentraci sertralinu. Ryby pod vlivem sertralinu ochotněji přijímaly krmivo, což se nejvíce projevilo v polovině testu, kdy bylo provedeno kontrolní vážení. Po zvážení byly ryby navraceny zpět do akvárií a proběhlo krmení. Ryby na z pokusných skupin okamžitě začaly přijímat krmivo, zatímco ryby z kontrolní skupiny a skupině s nízkou koncentrací sertralinu o něj neprojevovaly zájem z důvodů proběhlé stresové situace vzniklé přelovením. Kromě toho byl u ryb pozorován snížený únikový reflex.

Po ukončení experimentu byl proveden odběr krve pro následné hematologické a biochemické vyšetření a dále byly hodnoceny vybrané morfologické parametry. Při statistickém hodnocení bylo zjištěno, že ve skupině vystavené nejvyšší testované koncentraci sertralinu došlo ke statisticky významnému zvýšení Fultonova koeficientu v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ).

Při analýze hematologických parametrů byl v případě červeného krevního obrazu zaznamenán statisticky významný rozdíl pouze u MCHC. Četnější změny byl v případě bílého krevního obrazu, kdy statisticky významné rozdíly byly zjištěny u tyčků a lymfocytů. Detailní výsledky jednotlivých ukazatelů včetně statistické významnosti jsou uvedeny v tabulce 1. Analýza biochemických parametrů ukázala statisticky významný rozdíl u amoniaku a laktátu. Výsledky včetně statistické významnosti jsou uvedeny v tabulce 2.

V rámci histologického vyšetření bylo u ryb prokázáno hyalinní zkapénkovatění tubulární výstelky ze vzorků kaudálních ledvin. Žábry vykazovaly ložiskově variabilní alterace, místy absence lístečků, deformace lístečků, cystické dilatace naplněné krví, shluky zánětlivých komponent. Vzorky mozku nevykazovaly patologické změny.

Tabulka 1. Výsledky hematologického vyšetření (průměr ± střední chyba průměru; rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ ).

Parametr	Kontrola	0,01 mg/kg	0,1 mg/kg	1 mg/kg
Erytrocyty (10 <sup>12</sup> /l)	1,49±0,07 <sup>a</sup>	1,40±0,08 <sup>a</sup>	1,57±0,08 <sup>a</sup>	1,44±0,1 <sup>a</sup>
Leukocyty (G/l)	21,69±1,77 <sup>a</sup>	23,28±3,68 <sup>a</sup>	22,71±2,7 <sup>a</sup>	21,25±2,84 <sup>a</sup>
Hemoglobin (g/L)	61,85±2,27 <sup>a</sup>	61,99±1,87 <sup>a</sup>	66,53±2,17 <sup>a</sup>	66,47±2,37 <sup>a</sup>
Hematokrit (l/l)	0,31±0,1 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>	0,3±0,01 <sup>a</sup>	0,31±0,01 <sup>a</sup>
MCV (fL)	0,21±0,01 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>	0,2±0,02 <sup>a</sup>	0,22±0,02 <sup>a</sup>
MCH (pg)	28,47±1,93 <sup>a</sup>	9,89±1,44 <sup>a</sup>	29,53±2,02 <sup>a</sup>	33,42±2,84 <sup>a</sup>
<b>MCHC (g/dl)</b>	<b>136±4,78<sup>ab</sup></b>	<b>130,6±4,18<sup>b</sup></b>	<b>150,01±4,24<sup>a</sup></b>	<b>150,53±4,65<sup>a</sup></b>
<b>Lymfocyty (%)</b>	<b>71,8±0,97<sup>a</sup></b>	<b>72,15±1,01<sup>a</sup></b>	<b>65,45±1,03<sup>b</sup></b>	<b>65,10±0,64<sup>b</sup></b>
Monocyty (%)	1,45±1,17 <sup>a</sup>	1,38±1,17	1,38±1,2	1,83±1,32
Myelocyty (%)	3,13±0,22 <sup>a</sup>	3,5±0,19	2,55±0,2	3,35±0,23
Metamyelocyty(%)	3,5±0,34 <sup>a</sup>	2,98±0,24	3,25±0,28	3,28±0,2
<b>Tyčky (%)</b>	<b>15,3±0,68<sup>b</sup></b>	<b>14,8±0,71<sup>b</sup></b>	<b>24,45±1,1<sup>a</sup></b>	<b>22,15±0,79<sup>a</sup></b>
Segmenty (%)	4,6±2,27 <sup>a</sup>	5,18±0,39 <sup>a</sup>	3,5±0,27 <sup>a</sup>	3,98±0,42 <sup>a</sup>

Tabulka 2. Výsledky biochemického vyšetření (průměr ± střední chyba průměru; rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl mezi skupinami na hladině významnosti  $p < 0,05$ ).

Parametr	Kontrola	0,01 mg/kg	0,1 mg/kg	1 mg/kg
ALP (μkat/l)	1,4±0,15 <sup>a</sup>	1,42±0,12 <sup>a</sup>	1,71±0,12 <sup>a</sup>	1,83±0,14 <sup>a</sup>
ALT (μkat/l)	0,42±0,03 <sup>a</sup>	0,46±0,05 <sup>a</sup>	0,4±0,3 <sup>a</sup>	0,43±0,04 <sup>a</sup>
<b>Amoniak (μkat/l)</b>	<b>913,66±41,36<sup>a</sup></b>	<b>728,84±42,67<sup>ab</sup></b>	<b>501,58±51,64<sup>b</sup></b>	<b>667,91±38,43<sup>b</sup></b>
Bílkovina (μkat/l)	37,96±1 <sup>a</sup>	37,05±1,64 <sup>a</sup>	37,02±1,13 <sup>a</sup>	37,06±0,8 <sup>a</sup>
<b>Laktát (μkat/l)</b>	<b>2,24±0,24<sup>a</sup></b>	<b>1,86±0,25<sup>ab</sup></b>	<b>1,41±0,28<sup>b</sup></b>	<b>2±0,21<sup>ab</sup></b>
Chol (μkat/l)	8,82±0,38 <sup>a</sup>	9,1±0,38 <sup>a</sup>	8,4±0,33 <sup>a</sup>	8,89±0,3 <sup>a</sup>
Glukoza (μkat/l)	4,27±0,18 <sup>a</sup>	5,12±0,26 <sup>a</sup>	4,62±0,16 <sup>a</sup>	4,95±0,21 <sup>a</sup>

### Závěr:

Cílem této studie bylo posoudit vliv antidepressiva sertraline na pstruha duhového. Během testování se potvrdilo, že sertraline má významný vliv na chování ryb, což se projevilo potlačením únikového reflexu a zvýšenou odolností vůči vnějším stresovým vlivům. Byla zjištěna zvýšená hodnota Fultonova koeficientu (index kondice) u ryb krmených nejvyšší koncentrací sertralínu. V rámci hematologického rozboru byly zjištěny statistické změny v počtu neutrofilních granulocytů (tyčky), lymfocytů a parametru MCHC. Výsledky biochemie prokázaly pokles koncentrace amoniaku a laktátu u ryb krmených krmivem se sertralínem. Histologickým vyšetřením jsme zjistili změny na žábřácích a kaudálních ledvinách.



### **Seznam literatury:**

Osorio V., Larranaga A., Acena J., Pérez S., Barceló D. Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci. Total Environ.* 2016,540:267 – 277

Grabicova K., Grabic R., Blaha M., Kumar V., Cerveny D., Fedorova G., Randak T., Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Research* 2015,72:145 – 153

Grabicova K., Grabic R., Fedorova G., Fick J., Cerveny D., Kolarova J., Turek J., Zlabek V., Randak T., Bioaccumulation of psychoactive pharmaceuticals in fish in a effluent dominated stream. *Water Research* 2017,124: 654 – 662

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 211/2018/FVHE*

## **Sekvenčná analýza epidemických plazmidov kódujúcich klinicky významné beta-laktamázy z prostredia**

Adam Valček<sup>1,2</sup>, Iva Kutilová<sup>1,2</sup>, Ivana Jamborová<sup>1,2</sup>, Monika Dolejská<sup>1,2</sup>  
*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>,  
CEITEC VFU, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>2</sup>*

### **Úvod**

Nárast baktérií rezistentných k antibiotikám predstavuje jednu z najväčších globálnych hrozieb. Každoročne je výsledkom antibiotickej rezistencie nárast morbidity, mortality a nemalých ekonomických výdajov spojených s liečbou.

V poslednom desaťročí je celosvetovo pozorovaný nárast enterobaktérií (*Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*) rezistentných ku kriticky dôležitým skupinám látok ako sú cefalosporínové či karbapenémové antibiotiká. Spomínaná rezistencia je spôsobená AmpC a širokospektrálnymi beta-laktamázami (ESBL, z angl. extended-spectrum beta-lactamases), teda enzýmy schopných hydrolyzovať, teda rozkladom inaktivovať tieto antibiotiká (1). Tieto enzýmy sú podobne ako iné klinicky významné skupiny beta-laktamáz obvykle kódované génmi na plazmidoch, ktoré sú prenosné medzi baktériami a môžu sa tak jednoducho šíriť v bakteriálnych populáciách. Baktérie produkujúce karbapenemázy sú rezistentné ku všetkým beta-laktamovým antibiotikám a mnohé z nich sú navyše multirezistentné, teda vykazujú rezistenciu k viacerým typom antibiotík súčasne, čo ešte viac limituje terapeutické možnosti infekcií vyvolaných týmito baktériami (2).

Tieto mobilné elementy sa dokážu šíriť v bakteriálnej populácii vertikálne, teda z rodičovských buniek na dcérske, ale aj horizontálne, teda aj na baktérie, ktoré boli pôvodne citlivé na dané antibiotikum. Taktiež je možný a bežný aj medzidruhový prenos. Častým vektorom plazmidov kódujúcich klinicky významné mechanizmy rezistencie z humánnych zdrojov sú voľne žijúce zvieratá, čo vyzdvihuje nevyhnutnosť sledovania tohto šírenia a vzájomný vplyv životného prostredia a človeka na šírenie antibiotickej rezistencie (3).

Veľmi nedávny technologický pokrok, ktorý poskytol prístup k zariadeniu MinION od Oxford Nanopore Technologies (ONT) umožňuje sekvenovanie jednej molekuly DNA a produkciu veľmi dlhých polynukleotidových sekvencií (readov), ktoré prekonávajú bariéru krátkych „readov“ zo sekvenátorov Illumina bežne používaných na celogenómové sekvenovanie (4).

### **Materiál a metodika**

Projekt vychádzal zo zbierky bakteriálnych izolátov z čeľade *Enterobacteriaceae*, rezistentných voči klinicky významným antibiotikám, s rôznym pôvodom, predovšetkým však voľne žijúcich zvierat (5, 6). Donorových kmene boli charakterizované použitím PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis), PBRT (PCR-Based Replicon Typing) a pMLST (Plasmid Multi-locus Sequence

Typing). Podľa výsledkov bola určená klonálna príslušnosť a prítomnosť plazmidu a následne s ohľadom na zistené charakteristiky, pôvod a geografickú oblasť izolátu bolo selektovaných 50 kmeňov. Tieto kmene boli podrobené konjugačným experimentom za účelom determinovať schopnosť horizontálneho prenosu génov antibiotickej rezistencie.

Celkom 50 transkonjugantov obsahujúcich jeden plazmid záujmu bolo použitých na izoláciu plazmidovej DNA kitom Genopure Plasmid Midi Kit (Roche). Takto izolovaná DNA bola následne podrobená príprave knižníc a sekvenovaniu na prístroji MiSeq (Illumina). Primárne dáta boli podrobené kvalitatívne analýze programom Trimmomatic, počas ktorej boli odstránené adaptorové sekvencie a ready nespĺňajúce kvalitatívny štandard ( $Q \geq 30$ ). Dáta boli ďalej namapované na referenčnú chromozomálnu sekvenciu *E. coli* K12 využitím algoritmu BWA-MEM, aby bola odfiltrovaná chromozomálna kontaminácia. Následne dáta, obsahujúce už len odfiltrované plazmidové ready boli assemblované do contigov použitím programu SPAdes. Plazmidy, ktoré obsahovali viac inzerčných sekvencií s obsahom repetitívnych oblastí tvorili pre sekvenačnú platformu MiSeq problém, kvôli limitácii krátkymi readmi. Takto bolo vybraných 25 vzoriek plazmidov, ktoré boli následne podrobené sekvenovaniu na prístroji MinION (Oxford Nanopore Technologies), ktoré produkuje dlhé ready. Primárne dáta z prístroja MinION boli taktiež podrobené kvalitatívnej analýze a odstráneniu adaptorových sekvencií programom Porechop. Takéto ready boli použité spolu s plazmidovými readmi získanými pri prvotnej sekvenačnej analýze (MiSeq) a boli podrobené hybridnej assembly. Princípom hybridnej assembly je využitie dlhých readov ako kostry plazmidu, ktorá pomôže prekonať repetitívne úseky a krátkych readov, ktoré poskytnú dostatočnú kvalitu pre vznik kompletnej plazmidovej štruktúry, za využitia programu Unicycler.

Získané plazmidové sekvencie boli podrobené analýze na prítomnosť génov, plazmidových replikónov a sekvenčných typov plazmidov, využitím online nástrojov na bioinformatickú analýzu (<http://www.genomicepidemiology.org/>). Následne bolo skúmané pozadie a spôsob začlenenia génov antibiotickej rezistencie do variabilných oblastí plazmidov využitím BLAST algoritmu (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a programu Geneious 9.0.5. Možnosti prenosu, zdieľania a povodu epidemických plazmidov boli determinované na základe zdieľania rovnakého replikónu a sekvenčného typu plazmidu a rovnakého variantu génu antibiotickej rezistencie.

### Výsledky

V analyzovaných dátach sme boli schopní identifikovať 50 plazmidov rôznych skupín inkompatibility so širokým zastúpením genetických determinantov antibiotickej rezistencie k rôznym skupinám antibiotík. Presné zastúpenie typov plazmidov, konkrétnych variant génov a pôvod jednotlivých vzoriek je v Tab 1.

Názov	Pôvod	Inc	Gény AR	Seq. Platforma
p1267 E1N	prostredie	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1431 E3N	primát	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1432 E1N	primát	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1434 E1N	primát	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1431 H1N	primát	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1435 H2N	primát	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1038 E1N	človek	IncK	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>tetB</i> , <i>mphA</i> , <i>ermB</i> , <i>dfrA14</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	MiSeq
p1438 E1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p1043 H1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p1043 E1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p402 E1N	prostredie	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p404 E5N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p945 E1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p947 E1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p1410 E1N	primát	IncI	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	MiSeq
p1039 E1N	primát	IncI	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	MiSeq
p1040 E1N	primát	IncI	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	MiSeq
p958 H3N	prostredie	IncX1	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>dfrA14</i> , <i>qnrS1</i>	MiSeq
p1038 H3N	primát	IncX1	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>dfrA14</i> , <i>qnrS1</i>	MiSeq
p401 E1N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p405 E3AN	prostredie	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p941 E1N	človek	IncI1	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p945 E3N	primát	IncI1	<i>tetA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p946 E1N	prostredie	IncI1	<i>tetA</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq
p77.1A	čajka	IncHI2	<i>tet(A)</i> , <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>sul1</i>	MiSeq + MinION
p77.1B	čajka	IncHI2	<i>tet(A)</i> , <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>sul1</i>	MiSeq + MinION
p77.2	čajka	IncHI2-N	<i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>catB3</i> , <i>sul1</i>	MiSeq + MinION
p74.1	čajka	IncHI2-N	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB3</i> , <i>ARR-3</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>aac(3)-II-d</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	MiSeq + MinION
p1612-1	čajka	IncHI2-N	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB3</i> , <i>ARR-3</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>aac(3)-II-d</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	MiSeq + MinION
p1612-2	čajka	IncHI2-N	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>mph(A)</i> , <i>tet(A)</i> , <i>catB3</i> , <i>ARR-3</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>sul1</i> , <i>bla</i> <sub>IMP-4</sub> , <i>aac(3)-II-d</i> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	MiSeq + MinION
pHP103	havran	IncX2	<i>dfrA14</i> <i>qnrS2</i>	MiSeq + MinION
p680m10	vrana	IncFIB	<i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	MiSeq + MinION
pFO1	tela	IncK2	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	MiSeq
pESBL20150178	človek	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
pESBL20150097	človek	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p199	prasa	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p14006165	kura	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p14011252	kura	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p14019095	kura	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p15076331	prasa	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p15090172	prasa	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p15095941	kura	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p15124679	kačica	IncI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
pESBL20140131	človek	IncI1	<i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p15078279	prasa	IncI1	<i>dfrA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p99977/2T	kôň	IncHI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>strAB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3)II-d</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION
p99975	kôň	IncHI1	<i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>tetB</i> , <i>catA1</i> , <i>strAB</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aac(3)II-d</i> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	MiSeq + MinION

p10068	kôň	IncHI1	<i>tetB, strAB, sul1, sul2, aac(3)II-d, bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	MiSeq + MinION
p10067	kôň	IncHI1	<i>dfrA17, aadA5, tetA, strAB, sul2, bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	MiSeq + MinION
p97974/2T	kôň	IncHI1	<i>dfrA17, aadA5, tetB, catA1, strAB, sul1, sul2, aac(3)II-d, bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	MiSeq + MinION

### Tabuľka 1: Kompletný prehľad sekvenovaných plazmidov, ich príslušnosti, pôvodu, génov antibiotickej rezistencie a sekvenačných platforiem

Z plazmidových analýz je možné odvodiť, že u IncI1 plazmidov z izolátov pôvodom z ľudí a potravinových zvierat prebieha výmena baktérií, či už šírením zo zvierat na ľudí alebo naopak.

#### Záver

Výsledky projektu ukázali, že gény determinujúce rezistenciu voči klinicky relevantným antibiotikám, sú asociované s rôznymi skupinami inkompatibility plazmidov. Rovnako je možné vyvodit', že plazmidy nesúce gény antibiotickej rezistencie sú prítomné u baktérií v životnom prostredí, v potravinových zvieratách a taktiež aj u ľudí, čo naznačuje, že tu prebieha prenos baktérií medzi spomínanými subjektami. Takéto zdieľanie rezistentných kmeňov a plazmidov predstavuje veľké riziko z pohľadu veterinárnej ale aj humánnej medicíny. Preto je nevyhnutné naďalej monitorovať prevalenciu génu antibiotickej rezistencie a výskyt génov ktoré ju determinujú, obzvlášť ak sú asociované s plazmidmi, ktoré umožňujú ich jednoduchý transfer.

#### Seznam literatury

- (1) WOODFORD, Neil, et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae* from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 69.2: 287-291.
- (2) NORDMANN, Patrice; DORTET, Laurent; POIREL, Laurent. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends in molecular medicine*, 2012, 18.5: 263-272.
- (3) ALCALÁ, Leticia, et al. Wild birds, frequent carriers of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of CTX-M and SHV-12 types. *Microbial ecology*, 2016, 72.4: 861-869.
- (4) JUDGE, Kim, et al. Early insights into the potential of the Oxford Nanopore MinION for the detection of antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70.10: 2775-2778.
- (5) JAMBOROVA, Ivana, et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environmental microbiology*, 2017, 19.5: 2025-2036.
- (6) DOLEJSKA, Monika, et al. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 71.1: 63-70.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 201/2018/FVHE***

# **Porovnání úrovně zdraví a welfare nosnic, brojlerových kuřat a krůt v ČR na základě nálezů při prohlídce po porážení na jatkách**

Eva Voslářová, Lenka Večerková, Jarmila Konvalinová, Martina Volfová

*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

## **Úvod**

Posouzení úrovně zdravotního stavu a welfare drůbeže v chovech České republiky je významné z pohledu směřování dalších chovatelských a veterinárních opatření ve smyslu dalšího zlepšování zdraví a pohody drůbeže při zacházení s ní. Odpovídajícím ukazatelem zdravotního stavu a úrovně welfare v chovech drůbeže mohou být nálezy získávané při veterinární prohlídce drůbeže na jatkách při jejím porážení (1). Tyto údaje mohou zásadním způsobem přispět k identifikaci rizikových faktorů u různých druhů a kategorií drůbeže a určení vhodných preventivních opatření (2). Zhodnocením úrovně zdravotního stavu a welfare drůbeže na základě nálezů získávaných při porážení se však dosud zabývali zejména zahraniční autoři, obdobná analýza v podmínkách České republiky dosud chybí.

Cílem práce bylo celkově zhodnotit úroveň pohody nosnic na základě zjištění úrovně zdravotního stavu nosnic přepravovaných na porážku v České republice posouzeného na základě veterinární prohlídky porážených nosnic a porovnat je s úrovní u brojlerů a krůt, dále přispět k hodnocení stresového zatížení nosnic při přepravě na porážku zhodnocením, zdali traumatické poranění končetin u nosnic způsobené zacházením s nosnicemi v průběhu přepravy na porážku způsobuje vyšší míru stresového zatížení, než samotné vlastní zacházení s nosnicemi, které nevede k traumatickým poraněním končetin.

## **Materiál a metodika**

Při zkoumání úrovně pohody nosnic, brojlerů a krůt přepravovaných na porážku v České republice z pohledu zdraví zvířat porážených na jatkách jsme v průběhu období let 2010 až 2017 sledovali 17 436 074 nosnic, 887 994 167 brojlerů a 919 843 krůt z chovu v České republice s veterinární prohlídkou na jatkách v České republice. Ve spolupráci se Státní veterinární správou jsme sledovali nálezy u těchto zvířat zjištěné v rámci veterinární prohlídky po porážení. Sledovali jsme celkové počty patoanatomických nálezů intravitálního původu, počty patoanatomických nálezů intravitálního původu vyskytujících se na jednotlivých orgánech a nebo částech těl, počty patoanatomických nálezů intravitálního původu podle charakteru onemocnění a nebo jejich původu (nálezy akutního charakteru, chronického charakteru, traumatického původu, parazitárního původu a jiné nezařazené) a dále výskyt počtu jednotlivých patoanatomických nálezů intravitálního původu. Pro posouzení závažnosti zjištěné úrovně zdraví drůbeže přepravované na porážku z pohledu výskytu jednotlivých patoanatomických nálezů jsme vzájemně porovnali výsledky pro nosnice, brojlerů a krůty.

Při zkoumání stresového zatížení nosnic jsme uskutečnili experimentální sledování 35 nosnic přepravených z chovu na jatky s traumatickými poškozeními končetin a zjišťovali jsme u nich koncentrace kortikosteronu, jako ukazatele stresového zatížení nosnic, a vybrané biochemické parametry (pokusná skupina), a porovnávali je s koncentracemi kortikosteronu a vybraných biochemických parametrů 35 nosnic, u nichž nebyla zjištěna traumatická poškození končetin (kontrolní skupina). Ihned po odběru byla získána plazma odstředěním krve při 3000 ot./min. po dobu 10 minut. Vzorky plazmy byly zmrazeny při -80 °C. Koncentrace kortikosteronu v plazmě byla stanovena pomocí komerčních ELISA kitů (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). Biochemická analýza krve byla provedena biochemickým analyzátozem KONELAB 20i (Thermo-Scientific).

K posouzení statistické významnosti jsme použili Chí kvadrát test k hodnocení významnosti v kontingenční tabulce 2x2 s Yatesovou korekcí pro četnosti přesahující 5 a nebo korekcí Fisherova přesného testu pro četnost do 5 s využitím statistického programu Unistat 6.5 for Excel. K vyjádření trendů v průběhu sledovaného období jsme použili Spearmanův koeficient pořadové korelace vypočítaný s pomocí statistického programu Unistat 6.5 for Excel. Pro posouzení rozdílů mezi dvěma průměry u hladin kortikosteronu a biochemických parametrů jsme použili studentův t-test s využitím statistického modulu programu Excel 2013.

## Výsledky

V části týkající se welfare nosnic z pohledu zdravotního stavu zvířat zjišťovaného v rámci veterinární prohlídky nosnic porážených na jatkách jsme zaznamenali celkový index poměru počtu patoanatomických intravitálních nálezů k počtu porážených nosnic na úrovni 0,378, který byl statisticky významně vyšší než index zjištěný u brojlerů a nebo krůt (index 0,016 až 0,101), vysvětlení tohoto zjištění lze nalézt ve skutečnosti, že nosnice jsou poráženy jako zvířata po vyčerpání jejich užitkového potenciálu a jejich předcházející intenzivní využívání se zobrazuje na úrovni zdravotního stavu a schopnosti se s vlivy ovlivňujícími zdravotní stav při chovu, přepravě a zacházení s nimi vyrovnat. Naopak brojleři a krůty představují mladá zvířata na vrcholu jejich hospodářského využití, kdy dopad jejich chovu na zdravotní stav není tak výrazný a projevuje se nižší úrovní poškození zdravotního stavu a tím vyšší schopností se s vlivy chovu, přepravy a zacházení s nimi vyrovnat, než je tomu u nosnic.

Zjistili jsme statisticky významný trend poklesu poměru počtu patoanatomických nálezů k počtu porážených nosnic (index) vyjádřený Spearmanovým koeficientem pořadové korelace na úrovni -0,762, který v porovnání se zjištěným statisticky významným trendem poklesu pro brojlery -0,738 a zejména se zjištěným statisticky významným trendem nárůstu pro krůty +0,833 za sledované období 2010 až 2017 se ukázal jako pozitivní zjištění ve vztahu k vývoji zdraví a tím i welfare u nosnic ve srovnání zejména s krůtami.

Zaznamenali jsme také zvýšené patoanatomické nálezy na játrech (26,76 %), střevech (0,26 %) a končetinách (6,03 %), dále vysoké počty nálezů kategorie celkových nálezů (1,57 %) a nezařazených nálezů (2,78 %); tyto počty byly ve srovnání s brojlery a nebo krůtami zjištěny statisticky významně zvýšené a dokládají nižší úroveň zdraví u nosnic a tím také nižší úroveň welfare u nosnic ve srovnání s brojlery a nebo krůtami.

Zjistili jsme také zvýšené patoanatomické nálezy chronického charakteru (26,32 %), akutního charakteru (5,29 %) a traumatického charakteru (3,90 %), zanedbatelný byl počet nálezů parazitárního původu (0,00 %). Rozdíly v počtech pro tyto nálezy mezi nosnicemi a brojlery a nebo krůtami byly statisticky významné a dokládají tak nižší úroveň zdraví na úrovni chronického i akutního průběhu a také traumatického původu u nosnic, a tím také nižší úroveň welfare u nosnic, ve srovnání s brojlery a nebo krůtami.

Zabývali jsme se také jednotlivými nálezy u nosnic. Bylo zjištěno, že u nosnic ve srovnání s brojlery a krůtami se vyskytují zvýšené počty jednotlivých nálezů na orgánech a částech těl, a to zejména nálezy u jater chronického a akutního charakteru, dále zvýšené počty u střev chronického původu, na končetinách traumatického, chronického i akutního charakteru a z celkových nálezů pak vyhublost a abscesy. Rozdíly v počtech pro tyto jednotlivé patoanatomické nálezy mezi nosnicemi a brojlery a nebo krůtami byly statisticky významné. Tyto nálezy dokládají zatížení nosnic zejména původu výživového ve vztahu k metabolismu nosnic s výrazným dopadem na játra a částečně na střeva nosnic a ovlivňující tak pohodu nosnic ve smyslu dopadu na výživu zvířat. Dále tyto nálezy dokládají zatížení nosnic směřující na pohybový aparát končetin vedoucí k traumatickému poškození končetin a akutním změnám na končetinách a kůži a mající původ v technologii chovu a naskladňování, přepravě a vyskladňování přepravních prostředků s dopadem na pohodu nosnic ve smyslu neodpovídajícího ustájení nosnic a neodpovídajícího zacházení s nimi při přepravě na porážku.

V části týkající se stresového zatížení nosnic při jejich přepravě na porážku při neodpovídajícím zacházení s nosnicemi (s traumatickým poškozením končetin u nosnic) jsme zjistili, že hladiny kortikosteronu u nosnic po přepravě na porážku s traumatickými poraněními končetin způsobenými v průběhu přepravy (naskladňování, přeprava, vyskladňování) byly statisticky významně vyšší (6381 pg/ml) ve srovnání s nosnicemi bez traumatických poranění, (3681 pg/ml). Zacházení s nosnicemi při přepravě na jatky vedoucí k traumatickým poraněním končetin způsobuje vyšší míru stresového zatížení u nosnic než samotné vlastní zacházení s nosnicemi, které nevede k traumatickými poraněním končetin. Dále jsme zjistili, že hladiny celkové bílkoviny a albuminu byly statisticky významně vyšší a hladiny triglyceridů, vápníku a alaninaminotransferázy (ALT) byly statisticky významně nižší v plazmě nosnic s traumatickými poraněními končetin ve srovnání s nosnicemi bez traumatických poranění končetin. Z výsledků vyplývá, že zacházení s nosnicemi při přepravě na jatky vedoucí k traumatickým poraněním končetin a působení vlastního traumatického poranění způsobuje ve vnitřním prostředí změny, které se odráží ve zvýšené a případně snížené koncentraci některých biochemických parametrů.



## Závěr

Celkově je možné konstatovat, že welfare nosnic při jejich chovu a při přepravě na porážku, promítající se do zdravotního stavu zvířat, jehož úroveň byla zjišťována v rámci veterinární prohlídky nosnic porážených na jatkách, je nižší úrovně, než welfare brojlerů a nebo krůt. Dále, že stresové zatížení potencované traumatickými poraněními zvyšuje u nosnic dále hladiny kortikosteronu v plazmě, jako ukazatele stresu u nosnic, a že ovlivňuje koncentrace některých biochemických parametrů, zejména zvyšuje hladiny celkové bílkoviny, albuminu a snižuje hladiny triglyceridů, ALT a vápníku v krevní plazmě. Tato zjištění dokládají potřebu zvýšené péče o nosnice při jejich chovu a přepravě na porážku k zvýšení úrovně welfare nosnic tak, aby dosahovala úrovně jako pro jiné druhy a kategorie drůbeže.

### Seznam literatury:

- 1) HUNEAU-SALAUN, A., K.D.C. STARK, A. MATEUS, C. LUPO, A. LINDBERG a S. LE BOUQUIN-LENEVEU, 2015. Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiology & Infection*, **143**(11), 2459-2472.
- 2) STARK, K.D.C., 2017. Abattoir condemnation data remain under-used in decision making. *Veterinary Record*, **180**(21), 514-515.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 212/2018/FVHE*

**Příspěvky**

**Farmaceutické fakulty**

## Vliv změny kvalitativních parametrů tablet s obsahem sodné soli warfarinu na liberaci

Martin Dominik<sup>1</sup>, Jiří Zeman<sup>1</sup>, Aleš Franc<sup>1</sup>, Jan Muselík<sup>1</sup>, Eva Bartoníčková<sup>2</sup>

Ústav technologie léků, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>  
Centrum materiálního výzkumu, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně<sup>2</sup>

### Úvod

Warfarin je antikoagulační látka s úzkým terapeutickým indexem, což vyžaduje jeho vysoce přesné dávkování. Jsou známy klinické případy, kdy došlo ke krvácení pacientů vlivem špatné srážlivosti krve způsobené záměnou krystalické formy (WSC) za amorf (WSA) nebo kolísáním obsahu účinné látky v lékové formě<sup>1</sup>. I přesto, že nebyly závěry těchto klinických případů dostatečně objasněny v literatuře, existují v některých zemích omezení při generické substitucích<sup>2</sup>. Cílem experimentu bylo „*in vitro*“ sledovat rozdíly v uvolňování obou forem warfarinu (WSA a WSC) v závislosti na složení a odlišných technologiích výroby tablet. Za účelem sledování vlivu rozdílné formy substance či technologie výroby byly použity komerční bioekvivalentní tablety obsahující 5 mg WSA vyrobené vlhkou granulací (A) a 5 mg tablety WSC vyrobené přímým lisováním (B). Za účelem sledování vlivu formy samotné účinné látky na disoluci byly metodou přímého lisování připraveny tablety o stejné síle s obsahem WSC (C) a WSA (D). Bylo zjištěno, že disoluce tablet je více ovlivněna jejich odlišnou technologií výroby, než samotnou formou API. Přestože disoluční profily komerčních tablet mohou být za určitých podmínek rozdílné, jsou tyto tablety bioekvivalentní. To je pravděpodobně způsobeno přesrážením API v žaludku na špatně rozpustnou kyselou formu warfarinu (W), která se následně rozpustí v neutrálním prostředí tenkého střeva. Tato rekrystalizace byla ověřena disolucí API v pH 1,2 a 4,5 a následně potvrzena srovnáním spekter Ramanovy spektroskopie.

### Materiál a metodika

#### Příprava tablet a jejich disoluce

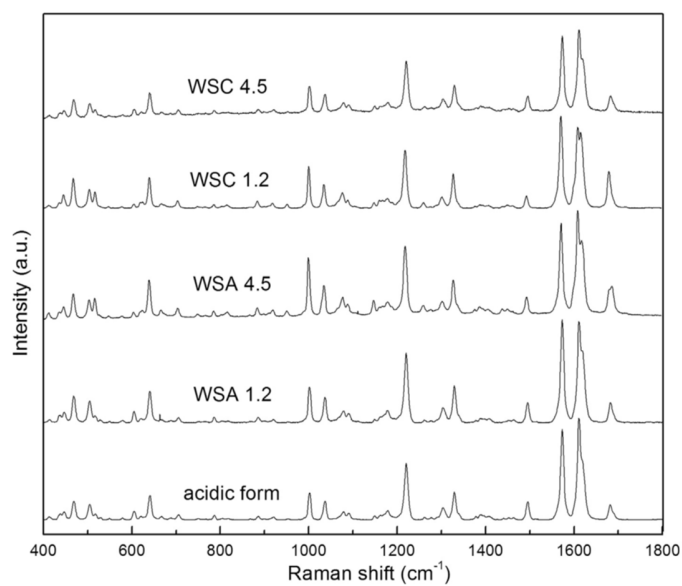
Pro hodnocení byly použity bioekvivalentní tablety A a B s obsahem 5 mg sodné soli warfarinu pocházející z trhu EU, zatímco tablety C a D byly připraveny podle již publikované metodiky s použitím běžně dostupných excipientů fosforečnanu vápenatého (Di-Cafos 92-14, Budenheim KG, Německo), mikrokrytalické celulosy (Avicel PH 101, FMC BioPolymer, USA), zesíťované sodné soli karboxymethylcelulosy (Ac-Di-Sol FMC, BioPolymer, USA) a stearanu hořečnatého (Peter Greven, Německo)<sup>3</sup>. WSA byl připraven „*in situ*“ rozpuštěním přibližně 20,0 g WSC (Pliva, Chorvatsko) v 300 ml čištěné vody. Takto připravený roztok byl umístěn do horkovzdušné sušárny 38A Horo (Dr. Ing. A. Hofmann GmbH, Německo) s teplotou  $60 \pm 1$  °C a po vysušení byl odparek rozetřen v třecí misce. Pro homogenizaci tabletoviny byl použit kontejnerový mísič Turbula T2C s rychlostí 40 rpm (Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Švýcarsko). Pro tabletování bylo použito excentrického lisu Korsch EK0 (Korsch, Německo). Výsledné tablety měly plochý tvar s průměrem 10 mm, pevností přibližně 50 N a hmotností 270 mg. Disoluce byla provedena na aparatuře SOTAX AT7 (Donau Lab, Švýcarsko). Objem disolučního média vytemperovaného na  $37,0 \pm 0,5$  °C byl 900 ml. Lékopisná metoda, tedy disoluce ve vodném prostředí, byla rozšířena o fosfátový pufr pH 6,8 a rychlost pádel byla v obou případech 25 a 50 rpm. Celkový počet otestovaných tablet byl 12. Během disoluce byly odebírány vzorky v časech 5, 10, 20, 30, 60 a 120 min, které byly následně vyhodnoceny pomocí HPLC<sup>3</sup>.

### Příprava a disoluce vzorků pro sledování přeměny WSC/WSA při průchodu trávicím traktem

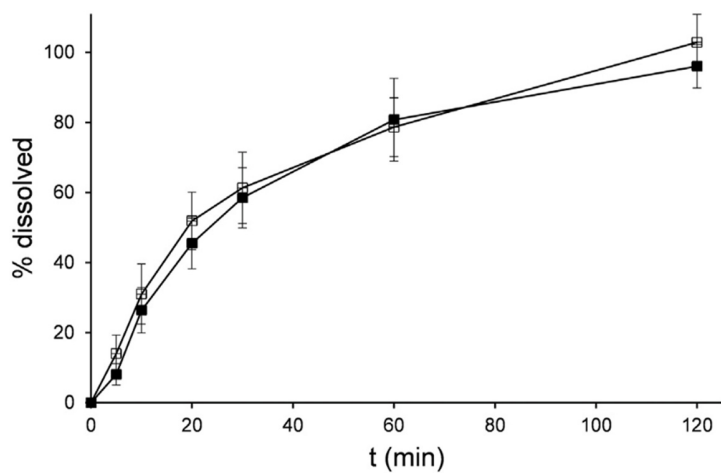
Pro sledování přeměny WSC, resp. WSA na kyselou formu warfarinu během průchodu žaludkem bylo na digitálních vahách Kern 440-47 (Gettl. Kern a Sohn GmbH, Německo) naváženo 0,5 g WSC, resp. WSA a zvlášť rozpuštěno ve dvou typech médií obsahující sodík a dvou které sodík neobsahovaly. Konkrétně v 500 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové o pH 1,2 a v acetátovém nebo sodno-acetátovém pufru o pH 4,5. Experiment byl proveden na aparatuře SOTAX AT7 (Donau Lab, Švýcarsko). Obě média byla vytemperována na  $37,0 \pm 0,5$  °C a rychlost pádel byla nastavena na 50 rpm. Po 120 minutách byl roztok zfiltrován přes filtrační papír (KA 4, Papírna Perštejn s.r.o, Česká republika), který byl následně umístěn do horkovzdušné trouby Horo 038A (Dr. Ing. A. Hoffman GmbH, Německo) vytemperované na teplotu 30 °C pro dobu 24 hodin. Vysušený vzorek byl na závěr přesítovaný přes síto o velikosti ok 500  $\mu$ m a zanalyzován pomocí Ramanovy spektroskopie, rentgenové difrakce a laserové difrakce. 5 mg takto připraveného přesráženého vzorku bylo manuálně umístěno do tvrdé želatinové tobolky velikosti 0 (Dr. Kulich Pharma s.r.o., Česká republika) a doplněno laktózou (Pharmatose 200M, DMV Int., Nizozemsko) na celkovou hmotnost 200 mg. Pro eliminování času rozpadu, bylo před disolucí, žiletkou seříznuto víčko tobolky. Disoluce probíhala v pH 6,8 při 50 rpm na aparatuře SOTAX AT7 (Donau Lab, Švýcarsko). Objem disolučního média vytemperovaného na  $37,0 \pm 0,5$  °C byl 900 ml.

### **Výsledky**

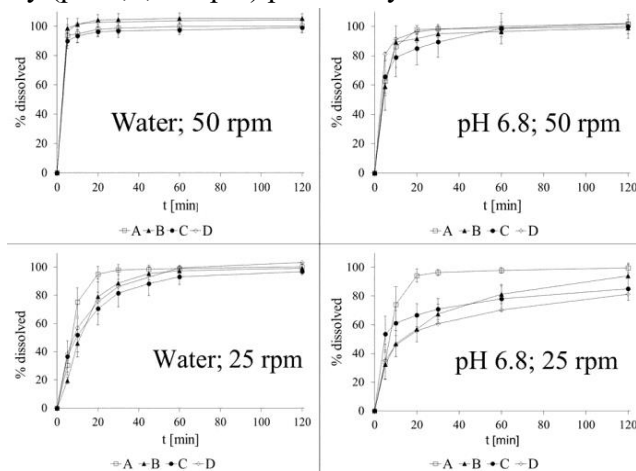
Komerčně vyráběné tablety (A a B) s odlišným disolučním profilem jsou bioekvivalentní i přesto, že obsahují rozdílné formy warfarinu (WSA nebo WSC) a byl u nich použit jiný technologický postup výroby (přímé lisování nebo vlhká granulace). To lze odůvodnit přeměnou WSA a WSC vlivem žaludeční kyseliny na kyselou formu warfarinu (obrázek 1.) s prakticky identickou velikostí částic. Kyselá forma se následně rozpouští (obrázek 2.) a vstřebává v neutrálním prostředí tenkého střeva. Při srovnání všech disolučních profilů A – D (obrázek 3.) je patrný větší význam použité technologie než vlivu formy účinné látky. Tím byl vyvrácen předpoklad, že zvýšená krvácivost, byla způsobena generickou záměnou tablet s obsahem WSC za WSA či naopak. To potvrzuje i nedávné prohlášení FDA, že ani úplná přeměna WSC na WSA během doby použitelnosti bioekvivalentních tablet nemůže ovlivnit bioekvivalenci daného produktu<sup>4</sup> Hlavním problémem tedy zůstává obsahová stejnoměrnost, která by měla být udržována na úrovni, která zajišťuje reprodukovatelnost dávky vzhledem k titrované hladině. Získané výsledky ukázaly, že v případě hodnocení in vitro je vhodné použít doporučenou metodu rozpouštění FDA (pH 6,8, rychlost pádel 50 rpm). Větší rozlišení disolučních profilů dosažené například snížením rychlosti otáček nemá žádný praktický význam z hlediska předpovědi bioekvivalence.



Obrázek 1. Ramanova spektra warfarinu (WSA, WSC) po 120 minutách v prostředí simulujícím žaludek (pH 1,2 nebo 4,5)



Obrázek 2. Disoluční profily (pH 6,8, 50 rpm) přesrážených forem WSA a WSC po 120 min v pH 1,2.



Obrázek 3. Disoluční profily tablet

**Seznam literatury:**

1. Vercaigne, L. et al. Clinical significance of bioequivalence and interchangeability of narrow therapeutic range drugs: focus on warfarins. *J Pharm Sci*, 1 (3), 92-94 (1998).
2. Vivian, C.J. Generic-substitution laws. *U.S. Pharm.* 33, 30-34 (2008).
3. Muselík, J. et al. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharma.* 64, 355-367 (2014).
4. Zhang, X. Bioequivalence and Characterization of Generic Drugs [WWW Document] (2016) Food Drug Adm. URL [https://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/center-of-excellence-in-regulatory-science-and-innovation/news-and-events/slides-generics-workshop/Zhang\\_Generic\\_Substitutability\\_Nov\\_2016.pdf](https://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/center-of-excellence-in-regulatory-science-and-innovation/news-and-events/slides-generics-workshop/Zhang_Generic_Substitutability_Nov_2016.pdf)

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 317/2018/FAF*

## Využití 3D tisku v přípravě lékových forem vhodných pro individualizovanou terapii

Jan Elbl, Jan Muselík, Aleš Franc, Jan Kolarczyk, Natália Janigová

*Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

V medicínských oborech se 3D tisk uplatňuje např. při výrobě protetických náhrad, kostních náhrad, specifických biosenzorů, tkáňových struktur a velmi intenzivně je zkoumáno pole tzv. bioprintingu.[1] V oblasti nových lékových forem připravených technologií 3D tisku probíhá také rozsáhlý výzkum těžící z již zmíněných aspektů této technologie, nicméně do praxe se zatím prosadil pouze jediný přípravek.[2]

Cílem tohoto projektu bylo otestovat možnost aditivní přípravy orodispergovatelných filmů, které lze využít jako nosiče širokého spektra léčiv a mají řadu výhod při podání u dětí nebo naopak geriatrických pacientů. Naším cílem bylo vyvinout metodu přípravy těchto filmů metodou tzv. direct writingu a ověřit vlastnosti takto připravených filmů. Dalším cílem byla aditivní příprava tablet nebo náplní tobolek určených k terapii závislosti na benzodiazepinech a Z-hypnoticích.

### Materiál a metodika

3D tiskárna byla upravena pomocí navrženého lineárního dávkovače, kdy pohybem krokového motoru je disperze vytlačována a deponována jehlou o zvoleném průměru podle definovaných koordinát. Pro tisk byla zvolena disperze o složení Glucidexu<sup>®</sup> 6D:sorbitol:voda v poměru 8:5:87 hm. %. Základní parametry tisku byly následující: jako podložka byla zvolena teplovzdorná PES folie na skle o teplotě 75 °C (první vrstva) a 70 °C pro následující vrstvy. Průměr extruzní jehly byl 0,84 mm. Šířka, rychlost depozice a výška vrstvy byla zvolena na 0,7 mm; 7,5 mm·s<sup>-1</sup>; 0,005 mm pro první vrstvu a 0,84 mm; 20 mm·s<sup>-1</sup>; 0,02 mm pro další vrstvy. Filmy byly tištěny v šaržích po 20 ks ve tvaru obdélníku o rozměrech 20 × 30 mm a výšce 0,205 mm. Modely byly připraveny v programu *Blender 2.78* a exportovány ve formě souboru *.stl*. Příprava tiskových dat probíhala v programu *Slic3r PE v. 1.35*. U připravených filmů byla hodnocena hmotnost, tloušťka (Elcometer 456 - Elcometer Limited, UK), pH a čas rozpadu.

Při využití modelových léčiv pro potřeby stanovení obsahové stejnoměrnosti bylo do disperze zapracováno množství odpovídající 220 µg methylenové modři (MM), případně 3 mg benzydamin hydrochloridu (BDH) na jeden film. Obsah MM a BDH v konečné lékové formě byl stanoven spektrofotometricky (UV-1600 PC, VWR International, China) v roztoku připraveném rozpouštěním filmu ve 100ml čištěné vody.

Pro nástřik léčiva byl připraven jednoduchý program, definující množství roztoku deponovaného do tobolek umístěných na tiskové ploše. Přesnost dávkování byla ověřena roztokem MM v objemu odpovídajícím plánovaným objemům roztoku diazepam. V každé šarži bylo plněno 10 tobolek. Po odpaření roztoku byl obsah MM stanoven spektrofotometricky. Po ověření přesnosti byly vybrány 3 hladiny dávky diazepam v rozmezí 2,125 – 0,492 mg a dávkován roztoku diazepam o koncentraci 24 mg·ml<sup>-1</sup> v isopropanolu. Po odpaření byl diazepam stanoven metodou HPLC.[3]

K přípravě FDM filamentů byl využit extruder Noztek Pro (Noztek Ltd., UK). Počáteční testování bylo provedeno s technickým PLA. Po dosažení tolerance tloušťky filamentu  $\pm 0,05$  mm pro PLA byly extrudovány směsi s majoritním obsahem Eudragitu® E. Tolerance rozměrů připravených filamentů byla ověřována obrazovou analýzou. U filamentu byly dále ověřeny mechanické vlastnosti, především Youngův modul a schopnost vlákna nelámat se při tisku.

### Výsledky

Po zkušebním tisku bylo usouzeno, že díky malé viskozitě a velkému povrchovému napětí disperze dochází k nerovnoměrnému přilnutí k tiskové podložce. Jako řešení byl vyzkoušen 1% přídavek hydroxyetylcellulozy Cellosize® v různých stupních viskozity, snížení rychlosti tisku a zvýšení teploty tiskové podložky pro první vrstvu. Výsledky (Tabulka 1) potvrzují pozitivní vliv přídavku HEC s vyšším stupněm viskozity na uniformitu filmů, s výjimkou času rozpadu u filmů s obsahem QP 4400. To lze vysvětlit problematickejší dispergací tohoto typu HEC, vedoucí ke vzniku regionů ve kterých je rozpad urychlen oproti zbytku filmu. Proto byl pro další experimenty zvolen typ QP 300.

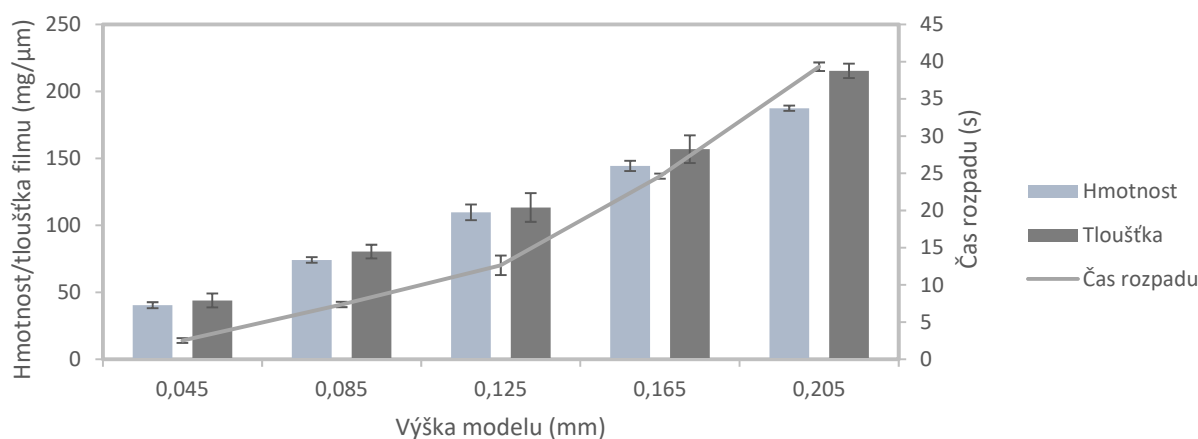
Cellosize®	Hmotnost [g]	RSD <sub>hm</sub> [%]	Tloušťka [μm]	RSD <sub>tl</sub> [%]	Rozpad [s]	RSD <sub>rozp</sub> [%]
QP40	0,1803	1,08	219,0	10,8	39,8	3,4
QP300	0,1874	1,06	215,4	2,5	39,3	1,5
QP4400	0,1827	1,03	210,5	3,1	40,3	3,7

**Tabulka 1 – Porovnání filmů z různých typů HEC**

Pro urychlení přípravy byla dále testována možnost zvýšení rychlosti tisku a to z původních  $20 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  na  $30$  resp.  $40 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$  na obdélníkovém modelu. Zjištěné obsahy MM v jednom filmu při vzrůstající rychlosti tisku odpovídaly předpokládanému obsahu  $220 \mu\text{g}$  ve filmu ( $218,09 \pm 1,92 \mu\text{g}$ ;  $219,57 \pm 1,35 \mu\text{g}$  a  $220,64 \pm 1,98 \mu\text{g}$ ). Byla vybrána rychlost tisku  $40 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$ , která při tisku 30 ks filmu dostahuje k dosušení jednotlivých vrstev před depozicí dalších. Flexibilita metody byla dále ověřena tiskem filmů tvaru čtverce a kruhu o objemu odpovídajícímu výchozímu obdélníku  $20 \times 30 \times 0,205 \text{ mm}$ . I zde byla uniformita dávkování potvrzena porovnáním obsahu MM v připravených filmech ( $219,5 \pm 3,61 \mu\text{g}$  pro kruh resp.  $221,0 \pm 3,84 \mu\text{g}$  pro čtverec).

Další částí experimentu byla příprava obdélníkových filmů o tloušťkách modelu 0,045; 0,085; 0,125; 0,165 a 0,205 mm z disperze QP 300 s obsahem 3 mg BDH. Výsledky (Obrázek 1) dokazují korelaci měřených veličin s výškou modelu (hmotnost:  $R = 0,9989$ , tloušťka:  $R = 0,9929$  a čas rozpadu:  $R = 0,9699$ ). Horší korelaci času rozpadu lze připsat rozdílům mezi výškou modelu a reálnou tloušťkou filmů (pro vztah času rozpadu a skutečné tloušťky filmu platí  $R = 0,9906$ ). Průměry zjištěných obsahů BDH ve filmech vyjádřeny procentuálně vůči 3mg BDH  $\pm$  RSD byly  $97,28 \pm 4,02$ ;  $99,86 \pm 3,44$ ;  $99,32 \pm 1,14$ ;  $98,26 \pm 1,09$  a  $101,00 \pm 1,88$  ve vzestupném pořadí tloušťky filmu. Doba tisku šarže 30 ks filmů byla 41, 60, 78, 96 a 114 minut, což je dostačující pro potřeby rychlé přípravy konečné lékové formy na míru konkrétnímu pacientovi.





**Obrázek 1: Korelace výšky modelu a měřených veličin**

Výsledky testování přímého nástřiku roztoku léčiva do tobolky shrnuje Tabulka 2.

Vzorek	2,125	1,535	1,109	0,801	0,578	0,492
Objem roztoku [μl]	88,54	63,96	46,21	33,38	24,08	20,50
RSD pro MM [%]	1,78	1,26	1,77	2,24	8,15	5,05
RSD pro diazepam [%]	9,1	-	3,88	-	-	13,28

*Tabulka 2 - Shrnutí RSD pro přímý nástřik roztoku léčiva*

FDM filament připravený z PLA vyhovovala rozměrovým limitům a splňovala i parametry důležité pro tisk (Youngův modul  $E = 3,45$  GPa) – přičemž za ideální se považuje hodnota v řádech GPa.

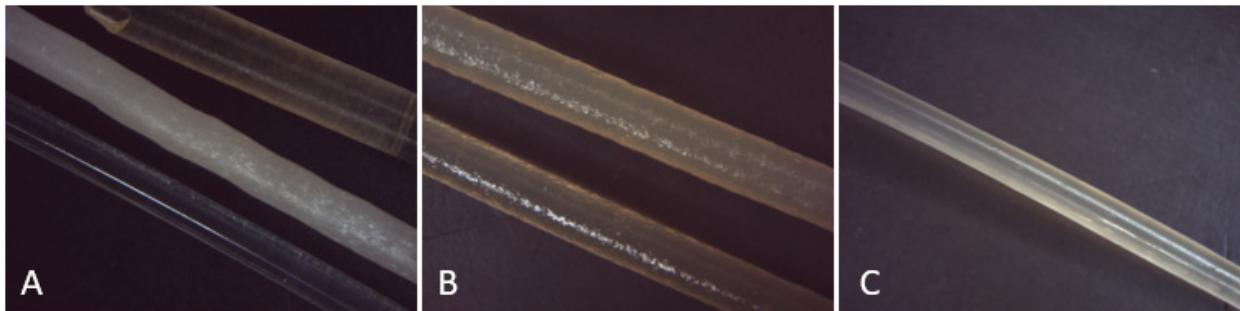
FDM filamenty byly připravovány v teplotním rozmezí 120 – 180 °C. Filamenty z Eudragitu® E nebo Affinisol® VA64 byly příliš křehké pro manipulaci a tisk. Proto byla vytvořena směs Eudragitu® E, Affinisol® VA64 (10 a 20%) a 2 % stearanu vápenatého pro usnadnění extruze. Ani zde však nebylo dosaženo vhodných vlastností a tak bylo přistoupeno k použití plastifikátoru triethylcitrátu v 1; 2 a 3% koncentraci a přidavku 2 % stearanu vápenatého. Filament s obsahem 3% plastifikátoru bylo již možné zavádět do tiskárny a dosahoval hodnot  $E = 1,32$  GPa. Ani u jednoho filamentu s obsahem Eudragitu® nebylo dosaženo tolerance rozměrů filamentu lepší než  $\pm 0,1$  mm na 1 metr. To při průměru 1,75 mm

*Obrázek 2: Připravené filamenty*

(A) zvrchu Eudragit® E, Affinisol® VA64, PLA (B) směsné filamenty Eudragit® E + Affinisol® VA64 (zvrchu 10 a 20%) (C) Eudragit® E, Affinisol® VA64, TEC a Ca stearát (85/10/3/2 %)

představuje odchylku  $\pm 17\%$  v každých 3 gramech materiálu a nebylo tak možné využít připravené filameny pro tisk lékových forem, kde je žádoucí nižší odchylka hmotností jednotlivých forem.

### Závěr



Byly ověřeny možnosti přesného ovlivnění konečných vlastností filmů modifikací výchozího digitálního modelu včetně tvaru, rychlosti rozpadu, hmotnosti, tloušťky a obsahu léčiva. Jako ideální se jeví filmy v rozmezí tloušťky 0,085 až 0,165 mm především z pohledu rychlosti rozpadu a manipulace s konečnou lékovou formou. Přímé dávkování roztoků léčiva pomocí 3D tiskárny se u malých množství dávkovaného roztoku neukázalo jako vhodné, přesto lze soudit, že zvýšením dávkovaných objemů by došlo ke zlepšení obsahové stejnoměrnosti. Dále bylo optimalizováno složení filamentu určeného k přípravě lékových forem s okamžitým uvolňováním v žaludečním prostředí. Ke zlepšení tolerance rozměrů filamentu by bylo vhodné aplikovat jiné metody kontroly průměru filamentu v návaznosti na vylepšení ovládání extruzních parametrů samotného extruderu.

### Seznam literatury:

- [1] J. Jang, J. Y. Park, G. Gao, and D.-W. Cho, “Biomaterials-based 3D cell printing for next-generation therapeutics and diagnostics,” *Biomaterials*, vol. 156, pp. 88–106, Feb. 2018.
- [2] J. Norman, R. D. Madurawe, C. M. V. Moore, M. A. Khan, and A. Khairuzzaman, “A new chapter in pharmaceutical manufacturing: 3D-printed drug products,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 108, pp. 39–50, Jan. 2017.
- [3] A. Franc *et al.*, “Diazepam filled hard capsules intended for detoxification of patients addicted to benzodiazepines and Z-drugs,” *Eur. J. Hosp. Pharm.*, Apr. 2018.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 318/2018/FAF*

# **Příprava, charakterizace, vlastnosti a využití nanočástic jako transportérů kyseliny askorbové v onkologické terapii**

Adéla Firlová<sup>1</sup>, Radka Opatřilová<sup>1</sup>

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>*

## **Úvod**

Kyselina askorbová byla v terapii onkologických onemocnění zkoumána již od druhé poloviny dvacátého století. Pouze o pár let později však byla publikována studie americké Mayo Clinic, která nepotvrdila hypotézu účinku. Z toho důvodu bylo od dalších výzkumů upuštěno. Teprve na konci století se začaly objevovat studie nové, které rozlišují způsob podání farmakologické dávky vitamínu C a navrhují, že její účinnost je závislá na i.v. podání (1) Úprava askorbátu navázáním na křemíkové nanočástice by mohla výrazně snížit jeho dávku, která je v i.v. formě 10 g/den.

## **Materiál a metodika**

### Příprava a charakterizace nanočástic

Křemíkové nanočástice byly připraveny za použití cetrimonium bromidu (CTAB), amonné vody, tetraorthosilikátu (TEOS) a ethanolu (Sigma Aldrich). CTAB byl rozpuštěn v čištěné vodě s přidáním amonné vody a míchán pomocí míchadla 1 hodinu. Poté byl po kapkách přidáván tetraorthosilikát a směs byla míchána za pokojové teploty po 4 hodiny. Poměr diametrů byl kontrolován poměrem CTAB a TEOS dle dostupné literatury. Následně byly vytvořené nanočástice centrifugovány po 20 minut rychlostí 15k rpm. Po vyjmutí supernatantu byly nanočástice promyty vodou a ethanolem a sušeny přes noc při teplotě 60 °C (2). Následně byly nanočástice redispergovány v teplém acidickém methanolu (2 ml HCl + 120 ml MeOH) po dobu 24 hodin, centrifugovány, promyty ethanolem a sušeny při 80 °C (3).

### Navázání NH<sub>2</sub> skupin na povrch nanočástic

Pro povrchovou úpravu byl použit bezvodý dimethylformamid (DMF) a aminopropyltriethoxysilan (APTES) (Sigma Aldrich). 20 mg nanočástic obou tvarů bylo redispergováno ve 20 ml DMF. 10 ul APTES bylo smíseno s 200 ul DMF a přidáno k nanočásticím. Po důkladné sonikaci bylo mícháno za pokojové teploty po dobu 20 hodin, následně centrifugováno a promyto vodou.

## Navázání askorbátu na povrch nanočástic

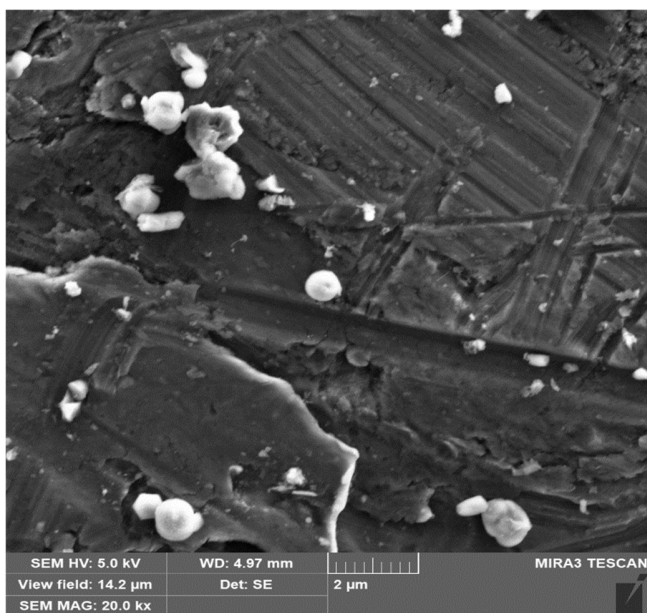
Pro navazování askorbátu bylo použito kyseliny askorbové (Sigma Aldrich). 50 ug nanočástic s  $\text{NH}_2$  skupinou na povrchu bylo dispergováno v miliQ vodě, přidáno 20, 40, 60 a 80 ug kyseliny askorbové ve vodném roztoku v celkovém objemu 500 ul. Následně byly zkumavky míchány stylem end over end po dobu dvou hodin. Po dvou hodinách byly nanočástice centrifugovány a ze supernatantu byl diferenciálně stanoven podíl navázané kyseliny askorbové.

## MTT assay

MTT assay byla provedena za pomoci dimethylsulfoxidu (DMSO), phenazinmethosulfátu (PMS) a tetrazolium bromidu (MTT) (Sigma Aldrich). K supernatantu zbylému po navazování askorbátu bylo přidáno 50 ug MTT a 25 ug PMS. Následně byla provedena inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Po 30 minutách byly vzniklé krystalky formazanu centrifugovány, supernatant odebrán a formazan rozpuštěn v 500 ul DMSO a měření absorpční spektrofotometrií na přístroji Cytation 3 při vlnové délce 500 nm.

## Výsledky

Příprava nanočástic byla hodnocena pomocí elektronového mikroskopu Tescan Mira 3. Nanočástice s poměrem diametru 1 odpovídaly velikosti cca 150 nm, nanočástice s poměrem diametru 5 odpovídaly velikosti cca 80 nm. Pro bližší možnost hodnocení by bylo zapotřebí lepšího rozlišení mikroskopu.



Obr. 1 Snímek z EM Tescan Mira 3, poměr diametru 1

Obr. 2 Snímek z EM Tescan Mira 3, poměr diametru 5

Navazování askorbátu proběhlo úspěšně, nejvyšší procento navázání bylo pozorováno při poměru 50 ug nanočástic k 20 ug askorbátu. Nanočástice s poměrem diametru 5 na sebe navázaly větší procento (21,8 %) než nanočástice poměrem diametru 1 (15,2 %), což by mělo být způsobeno jejich větší plochou.

MTT assay vykazovala lineární závislost koncentrace až do množství 50 ug na assay, což odpovídá údajům, který je udán v komerčních kitech pro detekci kyseliny askorbové pomocí MTT assaye (4).

### **Diskuze**

Výsledky naznačují správnou přípravu křemíkových nanočástic a jejich povrchovou úpravu pomocí NH<sub>2</sub> tím, že bylo možno na povrch nanočástic navázat 15,2 %, resp. 21,8 % askorbátu z použitého roztoku.

Velikost nanočástic je potřeba dále zkoumat a pokračovat v jejich charakterizaci tak, aby bylo dosaženo konstantního výsledku při přípravě a výhodných vlastností při navazování léčiva. Využití obou poměrů diametru je zajímavé i z farmakologického hlediska prostupnosti buněčnými membránami a mělo by mu být věnována pozornost i při případných testech na buněčných kulturách.

### **Závěr**

Autorka děkuje interní grantové agentuře VFU Brno, která podpořila tento projekt grantem 322/2018/FaF a dále především Doc. Radce Opatřilové za konzultace, Prof. Renému Kizekovi za pomoc a cenné rady při optimalizaci metody pro detekci askorbátu, Doc. Janu Gajdziokovi za pomoc při zobrazování na elektronovém mikroskopu, Dr. Alemu Närvanenovi za předané vědomosti v oblasti nanočástic, Doc. Oldřichu Farsovi za zapůjčení centrifugy a Dr. Dominiku Rotreklovi za zapůjčení rotační třepačky.

### **Reference**

1. Craegan, E. a Moertel, C. et al. Failure of High-Dose Vitamin C (Ascorbic Acid) Therapy to Benefit Patients with Advanced Cancer - A Controlled Trial. místo neznámé : N Engl J Med, 1979. Sv. 301, stránky 687-690.
2. Xinglu, Huang a Xu, Teng. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular. místo neznámé : Biomaterials, 2010. 21, stránky 438-448.
3. A, Hakeem a F, Zahid. Polyaspartic acid-anchored mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive doxorubicin release. místo neznámé : International Journal of Nanomedicine, 2018. 13, stránky 1029-1040.
4. Boehringer Mannheim. L-Ascorbic acid: Colorimetric method.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 32/2018/FaF*

# Vývoj syntetických metod přípravy prenylovaných stilbenoidů jako látek se širokou biologickou aktivitou

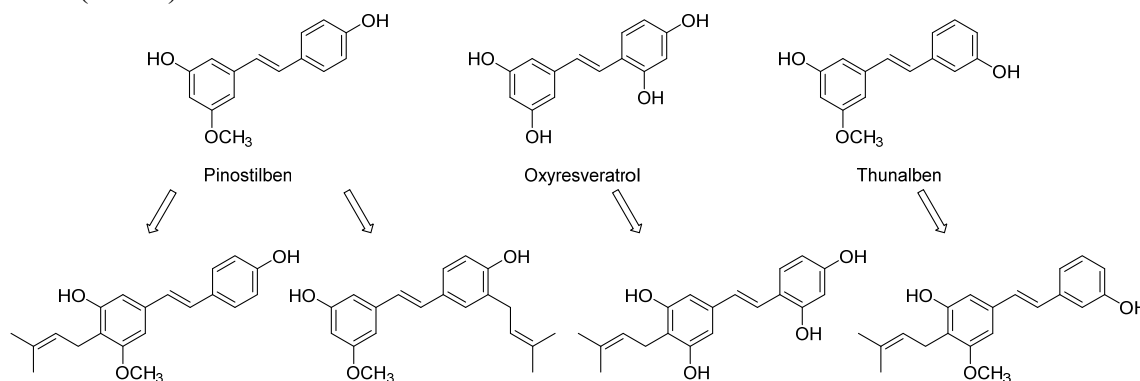
Michal Greguš, Kateřina Šenkeříková, Pavel Bobál

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

## Úvod

Polyfenoly představují velkou chemickou třídu fytochemikálií, mezi nimiž přitahovala významnou pozornost podtřída stilbenoidů vzhledem k jejich rozvinuté strukturální rozmanitosti a biologickým aktivitám. Stilbenoidy jsou hydroxylované deriváty stilbenu a vykazují významné antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, protinádorové a jiné aktivity. V poslední době proběhla studie jejich vlivu na rotavirové infekce.<sup>1</sup> Zatímco biologická aktivita všem známého *trans*-resveratrolu byla značně studována, účinky prenylovaných stilbenoidů byly jen minimálně prozkoumány.<sup>2</sup> Prenylace může zvýšit nebo ovlivnit biologickou funkci stilbenoidů. Prenylace také zvyšuje lipofilitu molekul, což jim umožňuje snadno proniknout přes buněčné membrány. Zvýšení lipofility (běžně vyjádřené jako log P konstanta) často koreluje pozitivně se zvýšenou biologickou aktivitou ve skupinách sloučenin podobných struktur.<sup>3</sup>

Z nespočetného množství prenylovaných stilbenoidů, izolovaných zejména z rostlinného materiálu v malém množství, jsme si vybrali pro syntézu např. deriváty pinostilbenu, oxyresveratrolu a thunalbenu (Obr. 1).



Obr. 1. Cílové struktury vybraných prenylovaných stilbenoidů

## Materiál a metodika

Přírodní stilbenoidy jako je pterostilben, piceatanol, pinostilben, pinosylvin, oxyresveratrol a jiné, jsou komerčně dostupné, avšak v poměrně malém množství a za vysokou cenu. Na druhé straně prenylované stilbenoidy jsou komerčně téměř nedostupné nebo dostupné jenom ve velice omezeném rozsahu. Proto je nevyhnutelné provést jejich chemickou syntézu. Pro syntézu vybraných prenylovaných stilbenoidů jsme navrhli několik postupů znázorněných na Schématu 1. Při syntéze samotných stilbenoidů mohou být uplatněny mnohé postupy využívající tvorbu olefinické vazby z příslušného vhodně substituovaného aromatického aldehydu a aromatického intermediátu s aktivovanou methylovou skupinou (Wittigova, Horner-Wadsworth-Emmonsova reakce – cesta A)<sup>4</sup>, paladiem katalyzovanou Sonogashirovou reakcí s následnou selektivní hydrogenací z arylalkynu a halogenarenu (cesta B)<sup>5</sup>, Mizoroki-Heckovou reakcí

z vinylarenu a halogenarenu (cesta C)<sup>6</sup> nebo Suzuki-Miyauraovou reakcí z halovinylarenu a arylboronové kyseliny (cesta D)<sup>7</sup> (Schéma 1, R<sup>1</sup> = H). V průběhu naší práce jsme experimentálně zjistili, že vhodnou metodou přípravy stilbenoidů je klasická metoda A, proto jsme rozvíjeli tuto alternativu.

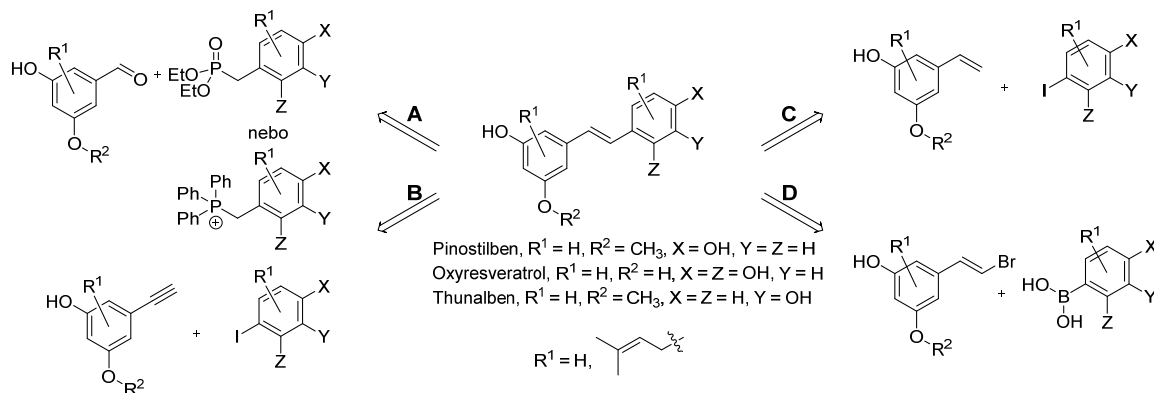


Schéma 1. Návrh syntézy stilbenoidů

Po syntéze stilbenoidů s chráněnými hydroxylovými skupinami nebo jejich halogenovaných derivátů je možné zavést prenylovou skupinu do molekuly (Schéma 2). V literatuře je popsána celá škála postupů prenylací fenolických látek.<sup>8</sup> Negativní zkušenosti našich kolegů, kteří prováděli prenylací hotových chráněných stilbenoidů a izolovali pouze velmi malé množství žádoucích produktů ve směsi mnoha látek, nás vedly k možnosti zavedení prenylové skupiny už do struktur intermediátů např. aldehydů apod. a posléze propojení aromatických jader dle metody A.

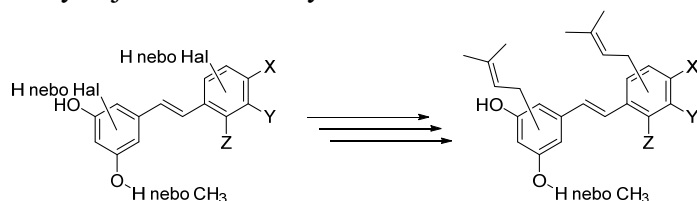


Schéma 2. Transformace stilbenoidů na prenylované deriváty

## Výsledky

Projekt syntézy prenylovaných stilbenoidů, případně jejich analogů je možné rozčlenit na pět částí.

1. Ověření přípravy komerčně nedostupných fosfonátů, resp. fosfoniových solí z komerčně dostupných surovin. Základními surovinami byly většinou hydroxy nebo methoxy substituované aromatické aldehydy nebo karboxylové kyseliny. Příklad takové syntézy uvádí schéma 3.

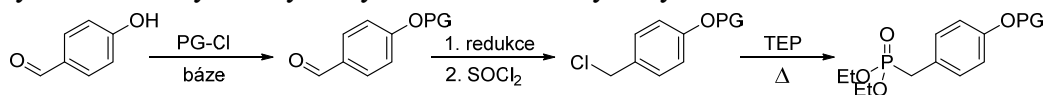


Schéma 3. Příklad přípravy fosfonátu.

V případě, že chránící skupinou byla methylová skupina, bylo možné použít i komerčně dostupný *p*-methoxybenzylchlorid. Kromě fosfonátu byla také připravena fosfoniová sůl. (Schéma 4)

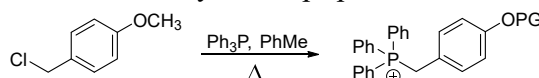
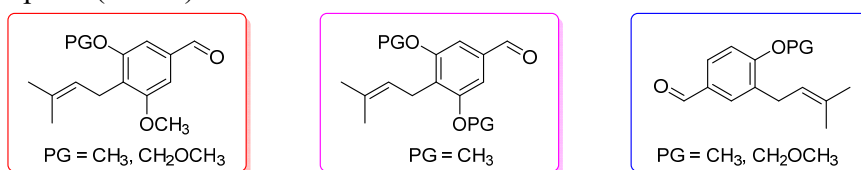


Schéma 4. Syntéza fosfoniové soli

2. Dalším úkolem bylo testování vhodné chránící skupiny. Z testovaných několika chránících skupin a z literárních zdrojů byla vybrána methoxymethylová.
3. V této části projektu byla aplikována metoda přípravy fosfonátů na ochráněné intermediáty. Obdobným způsobem byly připraveny i další fosfonáty.
4. Dalšími synthony pro přípravu stilbenoidů byly substituované aromatické aldehydy obsahující prenylovou skupinu. (Obr. 2)



Obr. 2. Struktury prenylovaných intermediátů.

Pro prenylaci byly vybrány příslušné bromderiváty aldehydů nebo karboxylových kyselin v závislosti na komerční dostupnosti. Kolegové v našem týmu provedli úspěšně prenylaci chráněného *p*-methoxybenzaldehydu pomocí prenylbromidu, *n*-BuLi a katalyzátoru na bázi mědi. Naší nynější snahou je aplikovat tuto metodu na naše substráty. Pro chránění aldehydické skupiny byl úspěšně použit ethylenglykol. V případě, že výchozí látkou byla karboxylová kyselina, bylo nutné ji nejprve zredukovat na alkohol *in situ* generovaným boranem a posléze oxidovat na aldehyd oxidem manganičitým. (Schéma 5)

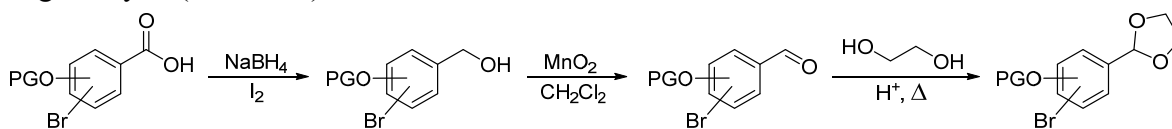


Schéma 5. Příprava chráněných substrátů pro prenylaci

5. Posledním krokem syntézy bude samotná Horner-Wadsworth-Emmonsova kondenzace s následnou selektivní deprotekcí, která zůstává předmětem dalšího výzkumu. Veškeré meziproducty byly charakterizovány pomocí <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, IČ a HRMS. Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC nebo HPLC.



**Seznam literatury:**

1. Ball, J. M., Medina-Bolivar, F., Defrates, K., Hambleton, E., Hurlburt, M. E., et al., Investigation of Stilbenoids as Potential Therapeutic Agents for Rotavirus Gastroenteritis. *Advances in Virology*, **2015**, 1-10.
2. Sobolev, V. S.; Khan, S. I.; Tabanca, N.; Wedge, D. E.; Manly, S. P.; Cutler, S. J.; Coy, M. R.; Becnel, J. J.; Neff, S. A.; Gloer, J. B., Biological Activity of Peanut (*Arachis hypogaea*) Phytoalexins and Selected Natural and Synthetic Stilbenoids. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1673-1682.
3. Schultz, T. P.; Nicholas, D. D.; Fisher, T. H. Quantitative structure-activity relationships of stilbenes and related derivatives against wood-destroying fungi. *Recent Res. Dev. Agric. Food Chem.* **1997**, *1*, 289–299
4. Maercker, A., The Wittig Reaction. *Org. React.* **1965**, *14*, 270–490; Wadsworth, W. S., Synthetic Applications of Phosphoryl-Stabilized Anions. *Org. React.* **1977**, *25*, 73–253.
5. Sonogashira, K., Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp<sup>2</sup>-carbon halides. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 46–49.
6. [Heck, R. F.](#), Nolley, J. P., Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*(14), 2320–2322.
7. Miyaura, N., Suzuki, A., Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*(7), 2457–2483.
8. Hoarau, C., Pettus, T. R. R., Strategies for the Preparation of Differentially Protected ortho-Prenylated Phenols. *Synlett* **2003**, *No. 1*, 127–137.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 320/2018/FaF*

## **Příprava a hodnocení liquisolid tablet s obsahem kapalných rostlinných extraktů s antioxidanty**

Klára Kostelanská, Jan Gajdziok, Aleš Franc, Sylvie Pavloková, Marek Štipka, Vendula Rosí, René Číž

*Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Systémy kapalina v pevné fázi (liquisolid systems, LSS) se připravují nanesením léčiva v netěkavém rozpouštědle na vybraný porézní nosič a obalovací materiál. V průběhu formulace se kapalina pomocí adsorpce a absorpce inkorporuje do struktury nosného materiálu. Výsledkem je pak suchý, nepřilnavý, volně tekoucí a dobře stlačitelný prášek, který je vhodný pro lisování do tablet (1). Tato metoda byla využita pro inkorporaci rostlinných extraktů zředěných vodou a ethanolem do struktury porézního nosiče - aluminometasilikát Neusilin® US2. Vzniklé tablety byly následně testovány před i po sušení (1 a 3 min v mikrovlnné troubě, 60 a 180 min v horkovzdušné sušárně) a byly mezi nimi pozorovány změny z hlediska fyzikálních vlastností, ale i antioxidační aktivity.

### **Materiál**

Pro přípravu liquisolid tablet byly využity kapalně extrahované extrakty *Rosa canina* L., *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, *Crateagus leavigata* (Poir.) DC., *Prunus spinosa* L., *Prunus padus* L. a *Rubus fruticosus* L. Rostlinný materiál byl zakoupen od společnosti F-Dental Hodonín s.r.o. (Česká republika). Jako rozpouštědla byly použity 96% ethanol (Mikrochem, Slovakia) a destilovaná voda, jako porézní nosič Neusilin® US2 (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., Japonsko), obalový materiál Aerosil® 200 (Eurošarm spol. s.r.o., Česká republika), plnivo Avicel® PH 101 (FMC Biopolymer, USA), kluzná látka magnesium stearát (Zentiva a.s., Česká republika). Rozvolňovač Vivasol® bylo pro experiment věnováno od společnosti JRS Pharma (Německo). Jako činidla pro zjištění antioxidační aktivity se použily hexahydrát chloridu železitého (Mikrochem, Slovensko), heptahydrát síranu železnatého (Mikrochem, Slovensko), kyselina chlorovodíková (Centralchem, Slovensko) a 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko). Všechny chemikálie používané pro stanovení antioxidační aktivity měly analytický stupeň kvality.

### **Metodika**

#### *Příprava tabletovin a tablet:*

Sorpce rozpuštěného extraktu na porézní nosič probíhala v high shear mixeru (Rotolab Ima Zanchetta, Itálie). Tento experiment byl rozdělen do dvou částí, kdy každý z extraktů byl zvlášť rozpuštěn ve vodě a nasorbován na nosič. Stejný postup byl aplikován i pro ethanol. Díky tomu vznikly dvě různé směsi, které byly následně porovnávány z hlediska fyzikálních vlastností.

Na přesné množství Neusilinu® US2, byl nanesen vodný nebo ethanolický roztok rostlinného extraktu (50% w/w) v high shear mixeru. Došlo tak ke vzniku volně tekoucího prášku lehce zabarveného extraktem. Prášková směs byla přesítována (oka 1 mm) a zhomogenizována v tříosém homogenizéru (T1C, TURBULA System Schatr, Švýcarsko). Poté byl přidán obalový materiál Aerosil® 200, směs byla přesítována a homogenizována. Posledním krokem bylo přidání ostatních pomocných látek – Avicel® PH 101, magnesium stearát, Vivasol®, přesítování a konečná homogenizace. U takto připravených směsí byly testovány tokové vlastnosti, úhel skluzu, sypaný úhel, pyknometrická hustota, ztráta sušením, sypaný a setřesný objem (Hausnerův poměr, index stlačitelnosti). Směsi byly slisovány do tvaru oválných tablet (18 x 8 mm) o hmotnosti 650 mg a pevnosti 100 N na excentrickém tabletovacím lisu (EK 0, KORSCH, Německo). Vzniklé tablety byly sušeny v horkovzdušné sušárně po dobu 60 a 180 min a v mikrovlnné troubě po dobu 1 a 3 min.

#### *Hodnocení tablet:*

Vzniklé tablety byly nejprve testovány nesusšené pro porovnání vlastností před a po sušení. Dle Evropského lékopisu byly testovány tablety na pevnost, hmotnostní stejnoměrnost, pyknometrickou hustotu, rozpad, oděr, ztráta sušením (2), dále se použily i nelékopisné zkoušky na zjištění výšky tablet, nasákavosti a času nasákání.

Tablety byly rovněž podrobeny modifikované disoluční zkoušce s cílem o zjištění jejich antioxidační aktivity pomocí zařízení s lopatkami (Hanson SR8 Plus Dissolution Test station, USA).

Pro disoluční analýzu byly z hlediska fyzikálně-chemických vlastností vybrány vzorky s rostlinnými extrakty *Rosa canina* L., *Aronia melanocarpa* a *Crateagus leavigata*.

Jako disoluční médium byla vybrána destilovaná voda. Analýza byla provedena při 50 ot/min a teplotě 37±0,5°C. Disoluční kapalina (1 ml) byla odebírána po 5, 10, 15, 20 a 30 minutách a následně nahrazena destilovanou vodou. Odebrané vzorky byly okamžitě analyzovány na antioxidační aktivitu metodou FRAP (fluorescence recovery after photobleaching). Analyzovaný vzorek (50 µl) byl smíchán s 1 ml směsí vytvořené roztokem TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazin) (0,01M) v kyselině chlorovodíkové (0,04M), roztokem chloridu železitého (0,02M) a vodou v poměru 1:1:10. Byla změřena absorbance při vlnové délce 593 nm po 4 minutách inkubace (A4 min). Stejná technika byla použita pro stanovení absorbance (A0) směsí sestávající z analyzované disoluční kapaliny (50 µl) a destilované vody (1 ml). Každá šarže tablet byla analyzována šestkrát.

Stabilitní testování bylo provedeno v podmínkách 40°C/70% RH po dobu 6 měsíců pro nesusšené tablety. Následně byl zkoumán vliv podmínek ve stabilitním boxu na jakostní parametry tablet. Byly provedeny totožné zkoušky jako u tablet hodnocených po nalisování (pyknometrická hustota, ztráta sušením, oděr, pevnost aj.).

Výsledky jednotlivých analýz byly shrnuty ve formě tabulek a grafů a statisticky vyhodnoceny pomocí nástrojů vícerozměrné analýzy (PCA – analýza hlavních komponentů).

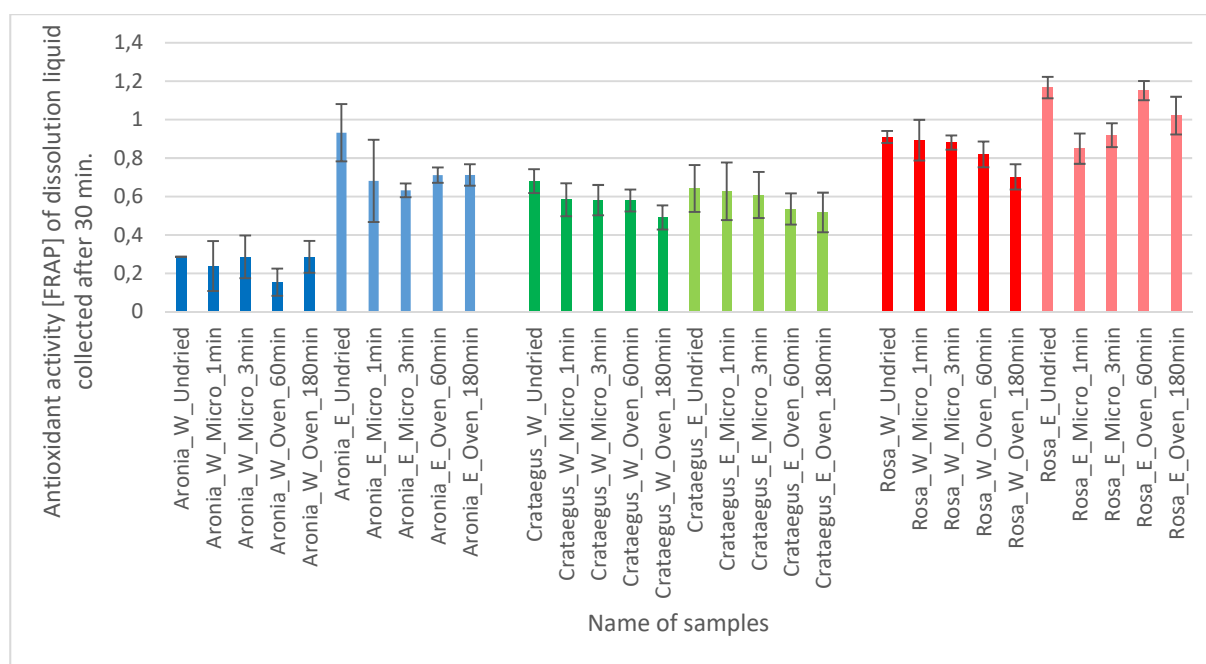
## Výsledky

Z hodnocení tokových vlastností práškové směsi je patrné, že extrakt ovlivňuje chování tabletoviny. Při srovnání vzorků s destilovanou vodou a ethanolem je zřejmé, že voda jako rozpouštědlo zajišťuje lepší tokové vlastnosti.

Vliv sušení na vzniklé tablety je vysoký. Pevnost tablet roste s časem sušení, protože se minimalizuje množství kapalná fáze v tabletách.

Ze statistické analýzy dat vyplývá, že druh použitého rostlinného extraktu je na vlastnosti tabletoviny i výsledných tablet zanedbatelný. Naopak vliv rozpouštědla měl částečný vliv na chování tablet – vyšší výška tablet, čas nasákavosti a rozpad a zvýšení antioxidační aktivity. Zásadní vliv na vzniklé tablety měl typ a délka sušení. Při sušení docházelo ke zvýšení nasákavosti, pevnosti a porosity, naopak ztráta sušením, oděr a hmotnost tablet jsou obecně nižší.

Z výsledků disoluční zkoušky je zřejmé, že tablety obsahující rostlinný extrakt *Rosa canina* L. vykazovaly nejvyšší antioxidační aktivitu z celé skupiny analyzovaných tablet. U všech analyzovaných vzorků dochází po tepelném ošetření k významnému snížení antioxidační aktivity. Tato ztráta antioxidační aktivity je patrná při delší tepelné zátěži. Pro většinu vzorků je snížení antioxidační aktivity vyšší při sušení v mikrovlnné troubě. Pro začlenění relativně viskózních rostlinných extraktů do LSS tablet bylo nutné použít rozpouštědlo. Použití ethanolu jako rozpouštědla vede k vyšší antioxidační aktivitě tablet.



Obr.

**1: Graf antioxidační aktivity analyzovaných vzorků.**

Stabilitní testování provedené v podmínkách 40 °C/70% RH po dobu 6 měsíců pro nesušené tablety prokázalo prodloužení času potřebného na rozpad tablet a také času nasákání oproti nesušeným tabletám,

které byly testovány po nalisování. Naopak hodnoty oděru a hmotnosti tablet se u vzorků po stabilitních testech snižovaly, stejně tak i procento nasákané kapaliny (nasákavost).

### **Závěr**

Tokové vlastnosti tabletovacích směsí připravených liquisolid metodou, se zhoršují s přítomností rostlinného extraktu, zvláště pokud se jako rozpouštědlo použije ethanol. Sušení má největší vliv na fyzikálně-mechanické vlastnosti tablet. Závěrem lze říci, že rostoucí doba sušení vede ke zvýšení pevnosti tablet, k urychlení rozpadu, zhoršení hmotnostní stejnoměrnosti, zvýšení pyknometrické hustoty a významnému snížení antioxidační aktivity.

### **Seznam literatury:**

1. VRANÍKOVÁ, BARBORA, et al. Systémy kapalina v pevné fázi jako moderní trend zvyšování biologické dostupnosti léčiva. *Chem. Listy*, 2013, 107: 681-687.
2. EUROPEAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, et al. *European Pharmacopoeia 9<sup>th</sup> Edition*: Council of Europe, 2017. ISBN 978-99-9913-561-0.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 301/2018/FAF***

## Testing of N-alkoxyphenylhydronaphthalenecarboxamide activity against intestinal sulfate reducing bacteria

Ivan Kushkevych<sup>1,2</sup>, Oľga Leščanová<sup>2</sup>, Tomáš Gončec<sup>1</sup>, Peter Kollár<sup>1</sup>, Josef Jampílek<sup>3</sup>

*Department of Human Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno<sup>1</sup>, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University<sup>2</sup>, Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, Slovakia*

### Introduction

The increased number of sulfate-reducing bacteria (SRB) and the intense process of dissimilatory sulfate reduction in the gut are thought to be significant risk factors of inflammatory bowel diseases in both humans and animals. These bacteria are often found in persons with rheumatic diseases, ankylosing spondylitis, etc. [1]. There is also an assumption that SRB can be responsible for some forms of cancer of the rectum through the formation of hydrogen sulfide that affects the metabolism of intestinal cells and give rise to various inflammatory bowel diseases [2,3].

Hydroxynaphthalene-2-carboxanilides can be considered as cyclic analogues of salicylanilides that have expressed promising results as potential antimicrobial agents. Their antimicrobial effects are connected with the ability of vicinal hydroxyarylamides to inhibit various enzymatic systems in bacteria. In addition, the presence of an amide group with a hydrophobic residue in its close vicinity is able, due to its electron properties, to interact and bind with a number of enzymes/receptors and affect the biological response by means of these target sites. The properties of the amide moiety can be easily modified by various substitutions [4,5].

In our previous research, antimicrobial effect of salicylamide derivatives against intestinal sulfate-reducing bacteria as well as influence of selected 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides on viability and sulfate metabolism of *Desulfovibrio piger* were studied and described [6-7]. The present work is focused on investigation of the biological activity of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalen-2-carboxamides against intestinal sulfate-reducing bacteria isolated from mice.

### Materials and methods

#### Bacterial culture and cultivation

The sulfate-reducing bacteria were isolated from the intestine of healthy mice and with colitis, identified as described previously [9]. The cultures of intestinal SRB have been kept in the collection of microorganisms at the Department of Experimental Biology, Faculty of Science at the Masaryk University (Brno, Czech Republic). The bacteria were grown for 36 hours at 37 °C under anaerobic conditions in nutrition modified Postgate's liquid medium. Before bacterial passage in the medium, 0.05 ml.L<sup>-1</sup> of sterile solution of Na<sub>2</sub>S×9H<sub>2</sub>O (1%) was added. The sterile 10 mol.L<sup>-1</sup> solution of NaOH (0.9 ml.L<sup>-1</sup>) in the medium was used to provide the final pH 7.2. The medium was heated in boiling water for 30 min in order to obtain an oxygen-free medium and cooled to 30 °C. The tubes were brim-filled with medium and closed to provide anaerobic conditions.

#### Determination of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalen-2-carboxamide activity

Prior to the experiment, equimolar solutions of N-(alkoxyphenyl)-1-hydroxynaphtalene-2-carboxamide derivatives were prepared by diluting a weighed amount of each substance in corresponding amount of dimethylsulfoxide (DMSO), resulting in a set of solutions of a molar concentration equal to 100 mmol/l. After that, 10 µl of each solution was pipetted at the bottom of a sterile Wasserman tube. Finally, pair of tubes containing 10 µl of clear diluent (DMSO) were added.

Agar medium with Mohr's salt ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O) was liquefied by heating and then tempered to 43°C in a thermostatic water bath. At this temperature, the bacteria would survive in the medium and at the same time, the medium would stay at a liquid phase suitable for pipetting. In sterile conditions, 24-hours old culture of SRB was added to the medium in a volume equal to 10% of agar medium volume (e.g. 5 ml of SRB culture to 45 ml of agar medium). In total, 990 µl of this cell suspension was pipetted into each of the Wasserman tubes containing 10 µl of substance solution prepared beforehand. This way, the final concentration of substance in the suspension was 1000 µmol /l.

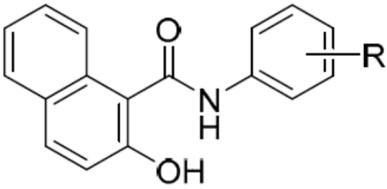
Each experiment consisted of two sets of equivalent tubes. Finally, a pair of tubes containing blank agar bacterial solution was added, serving as a non-inhibited growth control.

In a few moments, the agar cell suspension would solidify due to cooling to room temperature. At this point, 500 µl of sterile paraffin oil was added to each tube on the top of solidified suspension to form an oxygen-proof layer.

The results were observed after 24 hours of cultivation in 37°C. Because the agar medium contained Mohr's salt, presence of SRB could be detected easily by black color indicating SRB growth.

### Results

The results of *in vitro* antimicrobial activity, in particular minimal inhibition concentrations (MIC) of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphtalen-2-carboxamides against intestinal sulfate-reducing bacteria isolated from mice are presented in Table 1. In total, the activity of nineteen compounds was tested and ciprofloxacin [7] was used as a control. The minimal inhibition concentrations of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphtalen-2-carboxamides for both SRB isolated from healthy mice and with colitis were > 1000 µmol/L. Some of these compounds also stimulated the bacterial growth and were not toxic in the concentration range from 10 to 1000 µmol/L.

				
Compound name	Substituent	Molecular weight [g/mol]	MIC [µmol/L]	
			SRB from healthy mice	SRB from mice with colitis
NM01	H	263.290	> 1000	> 1000
NM05	2-OCH <sub>3</sub>	293.310	> 1000	> 1000
NM06	3-OCH <sub>3</sub>	293.310	> 1000	> 1000

NM07	4-OCH <sub>3</sub>	293.310	> 1000	> 1000
GO01	2-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	307.343	> 1000	> 1000
GO02	3-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	307.343	> 1000	> 1000
GO03	4-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	307.343	> 1000	> 1000
GO04	2-OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO05	3-OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO06	4-OC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO07	2-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	335.396	> 1000	> 1000
GO08	3-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	335.396	> 1000	> 1000
GO09	4-OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	335.396	> 1000	> 1000
GO10	2-OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO11	3-OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO12	4-OCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	321.370	> 1000	> 1000
GO13	2-OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	335.396	> 1000	> 1000
GO14	3-OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	335.396	> 1000	> 1000
GO15	4-OCH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	335.396	> 1000	> 1000
<b>Control</b> (ciprofloxacin)	–	–	45 [7]	

Table 1. Structures of discussed N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalen-2-carboxamides; molar volume (MV (cm<sup>3</sup>)) of R substituents and *in vitro* antimicrobial activity (MIC) of compounds against intestinal sulfate-reducing bacteria isolated from mice.

In the light of the obtained results, it can be stated that almost all the discussed N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalen-2-carboxamides have no a noteworthy antimicrobial efficacy against intestinal sulfate-reducing bacteria in concentrations higher than 1000 µmol/L. Although a series of nineteen N-(alkoxyphenyl)-2-hydroxynaphthalene-1-carboxamides and a series of their nineteen positional isomers N-(alkoxyphenyl)-1-hydroxynaphthalene-2-carboxamides were characterized and antimycobacterial activity (*Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *M. kansasii* and *M. smegmatis*) comparable with or higher than that of rifampicin showed, however similar effect of this compounds against intestinal sulfate-reducing bacteria was not observed. Obviously, that these compounds are effective and promising only as antimycobacterial agents but not effective against intestinal SRB because some of them have stimulating effect of SRB growth.

#### References:

- [1] Cummings JH, Macfarlane GT, Macfarlane S (2003) Intestinal Bacteria and Ulcerative Colitis. *Curr Issues Intest Microbiol* 4:9–20.
- [2] Rowan FE, Docherty NG, Coffey JC, O’Connell PR (2009) Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *British J Surgery* 96:151–158.



- [3] Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1991) Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of health subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol Ecol* 86:103–112.
- [4] Gonec T, Pospisilova S, Kauerova T, Kos J, Dohanosova J, Oravec M, Kollar P, Coffey A, Liptaj T, Cizek A, Jampilek J (2016) N-Alkoxyphenylhydroxynaphthalenecarboxamides and their antimycobacterial activity. *Molecules* 21(8), 1068.
- [5] Gonec T, Zadrazilova I, Nevin E, Kauerova T, Pesko M, Kos J, Oravec M, Kollar P, Coffey A, O'Mahony J, Cizek A (2015) Synthesis and biological evaluation of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* 20(6), 9767–87.
- [6] Kushkevych I, Kollar P, Ferreira AL, Palma D (2016) Antimicrobial effect of salicylamide derivatives against intestinal sulfate-reducing bacteria. *J Appl Biomed* 14:125–130.
- [7] Kushkevych I, Vítězová M, Kos J, Kollár P, Jampilek J (2018a) Effect of selected 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides on viability and sulfate metabolism of *Desulfovibrio piger*. *J. App Biomed* 16(3):241–246.
- [8] Kushkevych I, Kos J, Kollar P., Kralova K, Jampilek J (2018b) Activity of ring-substituted 8-hydroxyquinoline-2-carboxanilides against intestinal sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger*. *Medicinal Chemistry Research* 27(1):278–284.
- [9] Kushkevych IV (2013) Identification of sulfate-reducing bacteria strains of human large intestine. *Studia Biologica* 7, 115–124.

### **Acknowledgements**

This study was supported by University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (project IGA VFU 303/2018/FaF).

# Syntéza derivátů 1*H*-indolu s fenylnpiperazinovým fragmentem a testování jejich možnosti ovlivnění cholinergního systému

Tereza Padrtová<sup>1</sup>, Jakub Šenkýř<sup>1</sup>

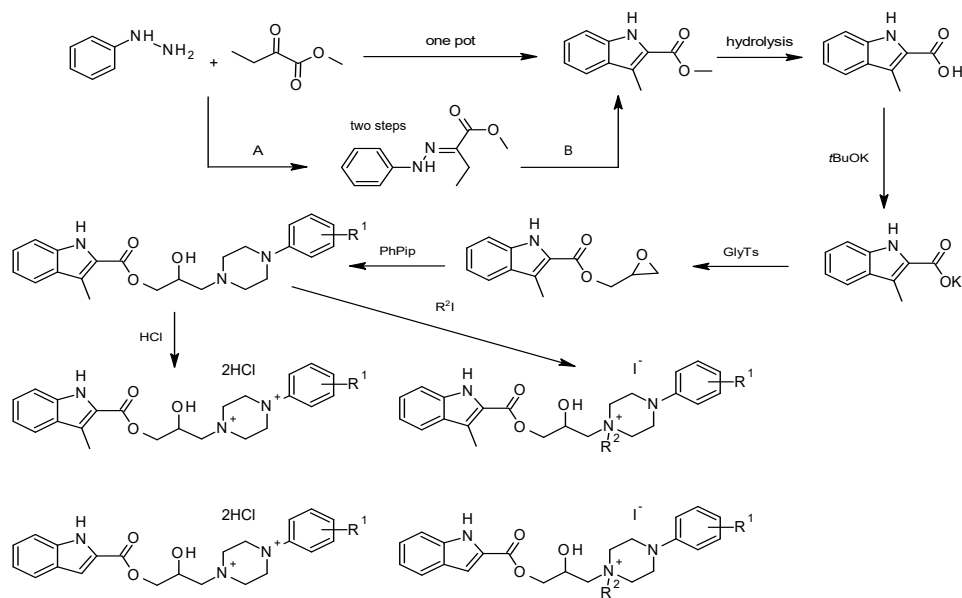
<sup>1</sup>Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

## Úvod

Na základě posledních zpráv Světové zdravotnické organizace (WHO) celosvětově přibližně 47 milionu obyvatel trpí demencí, tedy nejčastějším příznakem neurologického onemocnění centrálního nervového systému - Alzheimerovy choroby (AlCH), přičemž každý rok dochází ke vzniku cca 10 milionu nových případů. AlCH vede ke ztrátě neuronových funkcí a dochází k dysfunkci cholinergní neurotransmise, což vede ke sníženým hodnotám hladiny acetylcholinu (ACh) v synapsích, zároveň dochází k poklesu nikotinových a muskarinových receptorů, zvýšení oxidativního stresu a masivní ztrátě neuronů. Acetylcholinesteráza je enzym zodpovědný za deacetylaci ACh, což způsobuje ukončení přenosu impulzů v cholinergních synapsích jak v centrální nervové soustavě, tak periferní [1,2].

## Materiál a metodika

### Syntetická část



Obrázek 1: schéma syntézy finálních sloučenin

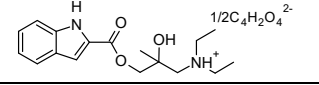
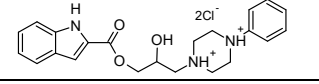
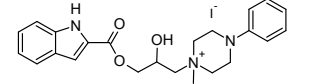
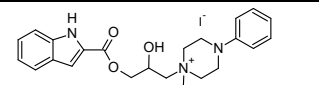
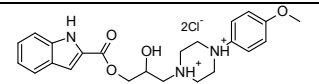
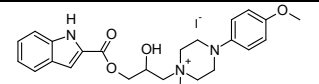
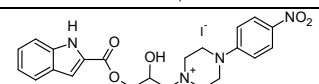
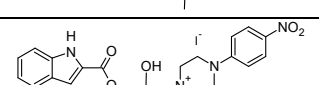
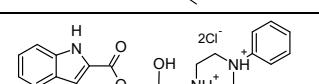
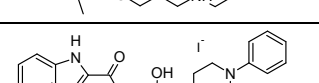
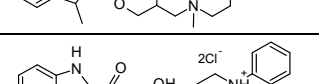
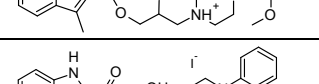
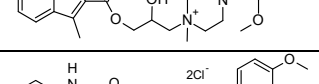
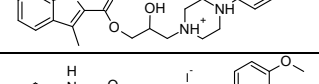
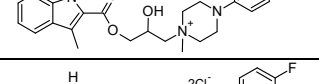
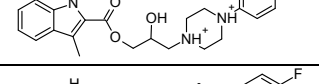
Deriváty kys. 1*H*-indol-2-karboxylové byly připraveny z komerčně dostupné kys. 1*H*-indol-2-karboxylové, přičemž syntéza chloridů této kyseliny představovala první krok syntetického postupu. Následně byly chloridy převedeny na příslušné oxiranové deriváty, které reagovaly s *N*-fenylpiperaziny za vzniku bází. Báze byly alkylovány za vzniku kvartérních amoniových solí, nebo reagovaly s HCl za vzniku příslušných dihydrochloridů. V případě syntézy derivátů kys. 3-methyl-1*H*-indol-2-karboxylové muselo být postupováno tak, že bylo nejprve třeba si tuto kyselinu připravit pomocí tzv. Fischerovy syntézy indolu (Obr. 1). Byly voleny postupy one pot nebo two steps. V prvním případě byly

fenylhydrazin, methyl 2-oxobutanoát a katalyzátor (T3P<sup>®</sup>, HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>...) smíseny dohromady a byla provedena příslušná reakce. V druhém případě nejprve vzniknul reakcí fenylhydrazinu a methyl 2-oxobutanoátu meziproduct fenylhydrazon, u kterého poté došlo za kyselé katalýzy k přesmyku na finální kyselinu. Jako nejlepší postup (výtěžek, reakční čas) se jeví provedení dané reakce pomocí dvou kroků, kdy byl nejprve připraven fenylhydrazon v přítomnosti katalytického množství kys. octové v prostředí ethanolu (výtěžek: 69,5 %) a následný přesmyk za působení H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v prostředí methanolu (výtěžek: 85%). Po syntéze kyseliny následovalo její převedení na draselnou sůl a reakci s glycidyl tosylátem. Příslušný oxiranový derivát reagoval s *N*-fenylpiperaziny za vzniku bází, které byly převedeny buď na dihydrochloridy nebo kvartérní amoniové sloučeniny.

Testování připravených sloučenin na schopnost inhibovat cholinesterázy bylo provedeno tzv. Ellmanovou metodou: 170 μL 0.1 M fosfátového pufru (pH 7.0), 20 μL AChE nebo BuChE ve fosfátovém roztoku (2.3 U/mL), 20 μL testované sloučeniny v methanolu a 20 μL 10 mM (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoové kyseliny), DTNB, Ellmanovo činidlo) byly smíchány a inkubovány při 37 °C po dobu 15 min. Poté bylo přidáno 20 μL 7.5 mM acetylthiocholin jodidu (ATCI)/butyrylthiocholin jodidu (BTCI). Absorbance byla měřena při 405 nm. Každé měření bylo pětkrát opakováno. Jako kontrola byly použity vzorky, ve kterých místo testované látky byl přítomen pouze methanol. Terciární aminy i kvartérní amoniové soli byly nejprve testovány při koncentraci 100 μM a byla měřena schopnost procentuálně inhibovat oba zmíněné enzymy. Poté, látky, které při koncentraci 100 μM vykazovaly vyšší než 50 % inhibici, byly otestovány ve více koncentracích a byla vypočítána hodnota IC<sub>50</sub> pomocí softwaru SigmaPlot [3].

### Výsledky

Celkem bylo připraveno 16 sloučenin. Z toho 8 derivátů kys. 1*H*-indol-2-karboxylové a 8 derivátů kys. 3-methyl-1*H*-indol-2-karboxylové. Jednalo se o *N*-fenylpiperazinové deriváty připravené ve formě dihydrochloridů nebo kvartérních amoniových solí. V jednom případě se jednalo o diethylaminový derivát, konkrétně jeho forma soli kyseliny fumarové (**TP43b**).

Označení látky	Struktura	AChE (%)	AChE (IC <sub>50</sub> )	BUChE (%)	BUChE (IC <sub>50</sub> )
TP43b		10,7 ± 3,3	> 100	27,8 ± 1,5	> 100
TP44b		ND	ND	26,6 ± 2,4	> 100
TP44c		14,4 ± 3,5	> 100	44,4 ± 3,1	> 100
TP44d		30,1 ± 4,3	> 100	61,4 ± 1,5	46,2 ± 0,7
TP46b		20,1 ± 4,1	> 100	30,6 ± 1,	> 100
TP46c		20,1 ± 4,1	> 100	30,2 ± 2,6	> 100
TP47c		74,1 ± 2,2	60,9 ± 2,1	48,9 ± 4,0	> 100
TP47d		55,7 ± 4,6	89,4 ± 4,3	61,7 ± 1,4	43,8 ± 3,2
TP48b		34,2 ± 3,1	> 100	13,8 ± 2,2	> 100
TP48c		41,6 ± 2,0	> 100	62,5 ± 1,5	43,9 ± 1,1
TP49b		38,5 ± 4,8	> 100	23,5 ± 2,4	> 100
TP49c		23,0 ± 1,2	> 100	54,5 ± 0,7	60,0 ± 3,3
TP50b		21,0 ± 4,3	> 100	15,0 ± 2,4	> 100
TP50c		23,7 ± 1,4	> 100	61,2 ± 0,8	34,0 ± 1,5
TP51b		28,7 ± 2,8	> 100	2,9 ± 2,3	> 100
TP51c		42,2 ± 3,1	> 100	59,6 ± 0,6	40,6 ± 1,4
galanthamin		82,1 ± 0,9	1,0 ± 0,1	64,7 ± 2,3	73,5 ± 0,6

<b>rivastigmin</b>		48,1 ± 3,1	88,0 ± 1,1	67,9 ± 1,4	11,5 ± 0,1
--------------------	--	------------	------------	------------	------------

Tabulka 1: názvy, chemické struktury a výsledky inhibičních aktivit syntetizovaných sloučenin  
 Z hodnocení inhibice cholinesteráz vyplývá (Tab. 1), že obecně kvartérní amoniové soli vykazují vyšší účinek než příslušné dihydrochloridy. Jako potenciálně nejlepší kandidát se jeví látka **TP47d** (AChE IC<sub>50</sub> = 89,4 μM; BUChE IC<sub>50</sub> = 43,8 μM), což je derivát kys. 1*H*-indol-2-karboxylové, který na *N*-fenylpiperazinovém fragmentu obsahuje nitro skupinu v poloze *para* a jedná se o kvartérní amoniovou sůl (alkylace ethylem). V případě inhibitorů AChE vykazovala nejnižší hodnoty IC<sub>50</sub> látka **TP47c**, jejíž chemická struktura se od látky **TP47d** liší pouze v alkylaci na kvartérním dusíku (methyl). Nejnižší hodnotu IC<sub>50</sub> v případě inhibitorů BuChE vykazovala látka **TP50c** (IC<sub>50</sub> = 34,0 μM; derivát kys. 3-methyl-1*H*-indol-2-karboxylové, v *para* poloze na *N*-fenylpiperazinu přítomná methoxyskupina, kvartérní sůl). Účinek látky **TP50c** se nejvíce blížil komerčně dostupným léčivům, nicméně i přesto byly její hodnoty téměř 3x vyšší (IC<sub>50</sub> rivastigmin = 11,5 μM).

#### Seznam literatury:

- [1] Novak, P.; Schmidt, R.; Kontsekova, E.; Zilka, N.; Kovacech, B.; Skrabana, R.; Vince-Kazmerova, Z.; Katina, S.; Fialova, L.; Prcina, M. *Lancet Neurol.* 2017, 16.
- [2] Wang, D.-M.; Feng, B.; Fu, H.; Liu, A.L.; Wang, L.; Du, G.H.; Wu, S. *Molecules* 2017, 22, 172.
- [3] Padrtova, T.; Marvanova, P.; Odehnalova, K.; Kubinova, R.; Parravicini, A-G.; Garro, A.; Enriz, R-D.; Humpa, O.; Oravec, M.; Mokry, P. *Molecules* 2017, 22.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 302/2018/FaF*

## Stanovení laktulose vedle laktosy a mannitolu pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) s detektorem ELSD

Jiří Pazourek, Klára Lamačková

*Ústav chemických léčiv, FaF, Palackého tř. 1946/1, VFU Brno, 612 42 Brno*

### Úvod

Laktulosa (4-*O*- $\beta$ -D-galaktopyranosyl-D-fruktosa) je syntetický disacharid skládající se z galaktosy a fruktosy. Přestože je nestravitelný (díky enzymorezistentní  $\beta$  (1 $\rightarrow$  4) glykosidické vazbě), je velmi významně spojený s humánní výživou a medicínou jako:

- Sladidlo: sladivost laktulose je větší než u laktosy. Laktulosa je bifidofaktor, přidává se do kojenecké výživy i mléčných výrobků. Obsah laktulose je také charakteristický pro UHT (*Ultra-high-temperature*) mléka, protože laktulosa vzniká při tepelném zpracování laktosy.
- Léčivo: laktulosa se používá v terapii hepatické encefalopatie (související s cirhózou jater), zácpy a salmonelózy. V tenkém střevě není laktulosa metabolizována ani absorbována. Ve srovnání s rostlinnými sacharidy je laktulosa bakteriálně rozkládána až v tlustém střevě na jednoduché kyseliny (k. mléčná, k. octová) a plyny, převážně vodík, který se také může stanovovat plynovou chromatografií (*Hydrogen Breath Test*, HBT). Tímto mechanismem laktulosa významně zvyšuje obsah vodíku v těle, čili působí jako nepřímý antioxidant, šetrný a účinný při léčbě mukózní kolitidy (IBD) [1].
- Marker, kterým se zjišťuje stav střevní flóry resp. propustnost stěn tenkého střeva. Laktuloso – mannitolový test (L/M test) slouží ke sledování poškození tenkého střeva. Klinicky se vyhodnocuje poměr obsahu L/M v tělních tekutinách po orálním podání několikogramové dávky mannitolu a laktulose [2]. Mannitol ani laktulosa nejsou hydrolyzovány v žaludku, ani v tenkém střevě. Mannitol může procházet (tzv. transcelulárně) vodními póry tenkého střeva, ale laktulosa může procházet tzv. paracelulárně pouze v případě poškození stěn střeva. K takovému poškození dochází např. při Crohnově chorobě, HIV infekci, atopické dermatitidě, cystické fibróze nebo intoleranci bílkovin z kravského mléka.

Laktulosa je převážně vyráběna alkalickou izomerizací laktosy, ikdyž v tomto procesu vzniká dosti vedlejších produktů. Efektivnější, ale dražší, je enzymatické štěpení laktosy  $\beta$ -galaktosidázou [3].

V tomto příspěvku vyvinutá analytická metoda rychlého stanovení laktulose vedle laktosy je vhodná pro aplikaci na laktuloso-mannitolový test, ale také pro monitorování konverze laktulose i pro monitorování technologie zpracování mléka.

## **Materiál**

Laktulosa, sacharosa, glukosa, galaktosa, acetonitril HPLC grade byly od firmy Sigma Aldrich (Merck), NaOH a laktosa od firmy Lach-ner (CZ), Centrifuga CF10 (Witeg, D), vodní lázeň ED5 (Julabo, D). HPLC systém Ultimate 3000 (Dionex, USA), ELSD Varian LC-380 (Varian, USA).

## **Metodika**

Při výběru optimálních separačních podmínek pro HILIC HPLC jsme vycházeli z výsledků diplomové práce K. Lamačkové získaných na aparatuře YL9100 s ELSD Agilent, ale pro tento projekt se podařilo z FVL (doc. Illek) zapůjčit kvalitní detektor ELSD, a proto výsledky byly nakonec dosaženy na aparatuře Dionex Ultimate 3000 s detektorem ELSD Varian 380-LC. Parametry ELSD: výparník/zmlžovač 40°C, průtok 1.0 slm.

Nejvhodnější stacionární fází se ukázala diolová kolona HALO PentaHILIC (AMT, USA) obsahující 2.7 um „coreshell“ částice, 4,6x150 mm. Mobilní fáze byla vždy směs acetonitril – voda; pro separaci mannitol – laktulosa v moči byl použit gradient (10-25% vody / 8 min), pro separaci sacharidů (laktulosa – laktosa) vyhovovala isokratická eluce (20% vody). V souladu s předchozími experimenty, lepšího rozlišení se dosáhne při nižší teplotě, proto byla zvolena 10°C.

Problémem bylo zpracování vzorku moči pro LM test. Byla testována možnost

- zakoncentrovat cukry metodou SPE na diol-kolonách nebo zakoncentrovat analyty odpařováním solventu pod proudem dusíku.
- Deproteinovat pomocí acetonu/acetonitrilu s následným odstředováním

## **Výsledky**

Byla vyvinuta rychlá metoda HPLC v módu HILIC s ELSD: kolona diolová (Halo, AMT), mobilní fáze acetonitril/voda – gradient 10-25 vody /8 min nebo isokratická (20% vody + 80% acetonitril), průtok 2 ml/min, teplota 10°C. ELSD nastavení: zmlžování, odpařování 40°C, průtok dusíku 1 slm.

Jsou možné 3 oblasti aplikace:

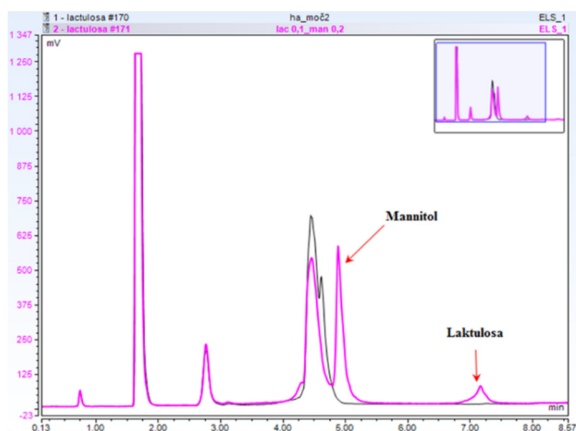
a/ zjištění laktuloso-mannitolového poměru pro test kvality střevního epitelu

Získání vzorku: Subjekt po 10-ti hodinovém lačnění vypije nápoj (2 g mannitolu+9.9 g Duphalac por.sol.(Abbott)+40 g sacharosy + doplněno do 100 g vodou) a pak 6 h sbírá moč.

Zpracování vzorku: 0,5 mL moči je smíseno s 1,5 mL acetonitrilu a centrifugováno 15 min při 13500 ot/min. Čas analýzy = 10 min, LOD(laktulosa) = 0,01 mg/ml.

Diskuse: SPE pomocí kolonek Diol přineslo pouze dvojnásobné zakoncentrování, protože problematické bylo zachycení polárních analytů na kolonkách SPE z polární matrice.

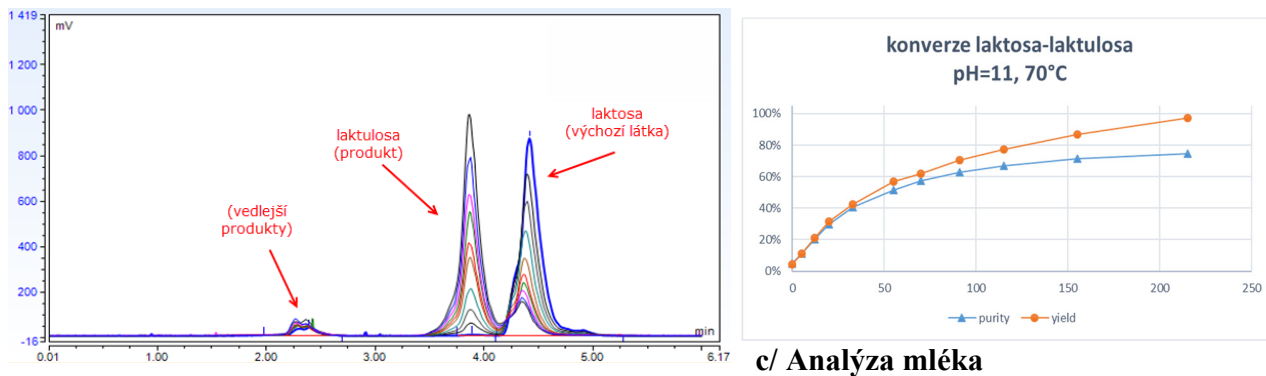
**Obr. 1** Selektivita metody ve vzorku deproteinované moči. Složky matrice se eluují do 4.5 minuty, retenční čas mannitolu / laktulosa je 5 resp. 7 minut, celý experiment trvá cca 10 min (ekvilibrace).



### b/ Monitorování konverze laktosa – laktulosa

Podmínky: 2,5 g tetraboritanu disodného, 0,5 g NaOH, 10 g laktosy do 100 mL vody, pH upraveno pro přídatku laktosy na 11,0, termostátovaná vodní lázeň 70°C, 220 min, dosažená konverze=90%. Bylo odebráno 0,5 ml reakční směsi, ochlazeno na ledové lázni, neutralizováno 200 uL 1M HCl a ředěno do 25 ml odměrné baňky [4].

**Obr. 2** Monitorování konverze laktosa – laktulosa. Vedlejšími produkty jsou galaktosa, glukosa, isocukrová kyselina. 70°C, boritan sodný, pH upraveno NaOH na 11.0.

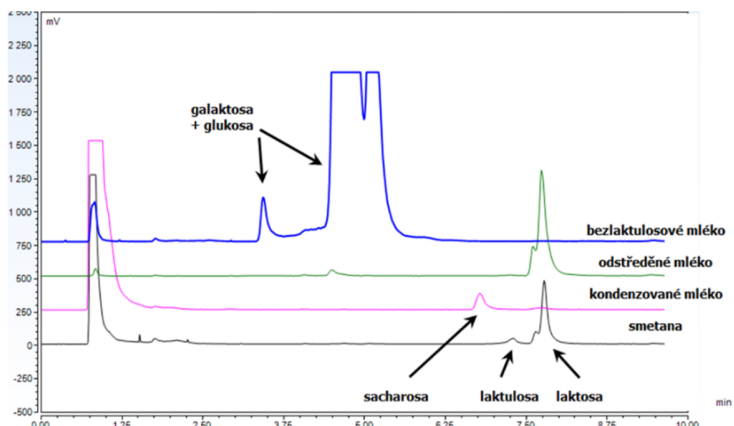


### c/ Analýza mléka

Byla prováděna deemulsifikace ethanolem (1:1), následovala deproteinace ledovým acetonem (1:3), stání, centrifugace. Testované odpařování rozpouštědla sice dokázalo zakonzentrovat minoritní složky, ale neodstranilo matrici. Srovnáním různých typů UHT výrobků z mléka (odstředěné, běžné, smetana, bezlaktosové) byl prokázán výrazný rozdíl v chromatogramu.



**Obr. 3. Chromatogramy různých druhů výrobků z mléka. Mléčné výrobky byly zakoupeny v běžné obchodní síti (supermarkety Tesco, Albert).**



Dosavadní výsledky možností aplikace laktuloso - manitolového testu byly prezentovány na mezinárodní konferenci „18th International Nutrition & Diagnostics Conference, INDC 2018, 22. – 25.9., 2018, Prague, Czech Republic“ ([www.indc.cz](http://www.indc.cz)).

### Seznam literatury

1. Del Valle-Pinero, A. Y., Van Deventer, H. E., Fourie, N. H., Martino, A. C., Patel, N. S., Remaley, A. T., & Henderson, W. A. (2013). Gastrointestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome assessed using a four probe permeability solution. *Clinica Chimica Acta*, 418 (Supplement C), 97-101
2. Marsilio, R., D'Antiga, L., Zancan, L., Dussini, N., & Zacchello, F. (1998). Simultaneous HPLC determination with light-scattering detection of lactulose and mannitol in studies of intestinal permeability in pediatrics. *Clin Chem*, 44(8 Pt 1), 1685-1691.
3. Rentschler, E., Schuh, K., Krewinkel, M., Baur, C., Claaßen, W., Meyer, S., Kuschel, B., Stressler, T., & Fischer, L. (2015). Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. *Journal of Dairy Science*, 98(10), 6767-6775.
4. Zokaee, F., Kaghazchi, T., Zare, A., & Soleimani, M. (2002). Isomerization of lactose to lactulose—study and comparison of three catalytic systems. *Process Biochemistry*, 37(6), 629-635.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 323/2018/FaF***

## Zkoumání protizánětlivého potenciálu frakcí extraktů získaných z kůry kořenu

### *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq.

Zuzana Plavcová<sup>1</sup>, Jiří Vágner<sup>2</sup>, Michaela Grézlová<sup>1</sup>, Alice Sychrová<sup>2</sup>, Jan Hošek<sup>1</sup>

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie<sup>1</sup>, Ústav přírodních léčiv<sup>2</sup>, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

*Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (*Celastraceae*) je amazonský strom (v nářečí nazývaný aj „chuchuhuasha“), z ktorého sa v ľudovej medicíne využíva červená kôra koreňa a kmeňu pri liečbe reumatizmu, hnačke, bronchitíde, prechladnutí, rakovine kože a ako antimalarikum. Je cenený pre svoje antibakteriálne účinky a pôsobí aj ako tonikum, či afrodisiakum. Miestnymi obyvateľmi je používaný lokálne ako odvar alebo macerát v rume z cukrovej trstiny (1, 2). Nedostatok informácií o jeho pôsobení a účinkoch mu bráni stať sa používaným liečivom. Cieľom práce bolo testovanie protizápalového účinku a pro- alebo anti-oxidačnej aktivity *in vitro* novo separovaných frakcií z *M. macrocarpa* z Ústavu prírodných léčiv.

### Materiál a metodika

#### Príprava separácie z materského extraktu

Z kôry stromu *M. macrocarpa* bol pripravený materský extrakt za použitia 80% etanolu. Obsahové látky materského extraktu boli potom na základe odlišnej polarít a vzájomnej nemiesiteľnosti rozpúšťadiel separované vytrepávaním na hexanový, chloroformový a etylacetátový podiel.

#### Separácia chloroformového extraktu

K ďalšiemu spracovaniu bola zvolená časť chloroformová. Extrakt (15,1 g) bol rozseparovaný stĺpcovou chromatografiou. Ako stacionárna fáza bol použitý silikagél Sigma-60A (o veľkosti častíc 0,04-0,063 mm). Výška stĺpce bola 85 cm, priemer 6,2 cm. Na základe testovacích TLC bola ako mobilná fáza zvolená zmes chloroform:toluen:metanol v pomere 7,75:2,0:0,25 (V/V/V – mobilná fáza (MF) A). Neskôr bola MF zmenená na chloroform:toluen:metanol v pomere 8:1:1 (V/V/V – MF B).

#### Spájanie získaných frakcií

Frakcie boli spájané na základe kontrolnej TLC a HPLC analýzy. HPLC meranie prebiehalo gradientovou elúciou na kolónach Ascentis® Express RP-Amide (10/15 cm × 2,1 mm × veľkosť zrn 2,7 μm).

#### Príprava buniek a vzoriek pre testovanie biologickej aktivity *in vitro*

Pre všetky experimenty boli použité monocyty THP-1-XBlue™-MD2-CD14. Bunky boli kultivované v RPMI 1640 médiu s obsahom 10% FBS a penicilín (100 U/mL)/streptomycín (100 µg/mL) v inkubátore pri konštantnej teplote 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Viabilita buniek bola > 90 %. Pre každý experiment bolo použité RPMI 1640 médium len s penicilín/streptomycínom. Bunky boli kultivované v 96-jamkovej doštičke, o koncentrácii 50 000 buniek na jamku v 100 µL média.

Všetky testované substancie boli rozpustené v dimetylsulfoxide (DMSO) na zásobné koncentrácie 20 µg/mL. Okrem testovania cytotoxicity bola finálna koncentrácia v jamke pre roztoky 1 µg/mL a pre štandardy 1 µM v 0,1% DMSO. Každá frakcia bola testovaná v triplikáte.

#### Meranie cytotoxicity frakcií

Po 2 hod inkubácie v 96-jamkovej doštičke, boli k bunkám pridané 2 µL testovaných frakcií vo finálnej koncentrácii 20 µg/mL a 5 µg/mL. Po 24 hodinovej inkubácii sa k zmesi buniek pridalo 10 µL WST-1 (Roche, Nemecko) a po pol hodine bola reakcia meraná na spektrofotometri, kde nameraná absorbancia zodpovedá počtu živých buniek. Tetrazolinové soli sú rozkladané na farbivo formazan pomocou mitochondriálnej dehydrogenázy, kde množstvo farbiva odpovedá metabolicky aktívnym bunkám.

#### Detekcia protizápalového potenciálu

Postupovalo sa ako pri meraní cytotoxicity s rozdielom, že testovaná koncentrácia bola pre všetky frakcie 1 µg/mL a pre prednizón 1 µM. Lipopolysacharid (Sigma-Aldrich, Nemecko) 1 µg/mL (LPS) bol pridaný po 1 hod inkubácii vzoriek s bunkami. Po 24 hod inkubácie sa doštička scentrifugovala a 20 µL supernatantu bolo vpravených do 200 µL QUANTI-Blue™ (QB) (Invivogen, USA) roztoku. Po približne 40 min inkubácie došlo k spektrofotometrickému vyhodnoteniu. Ako štandard bol použitý 1 µM prednizón. LPS je schopný stimulovať bunky a spúšťať signálnu kaskádu vedúcu k aktivácii NF-κB a AP-1 a sekrécii secernovanej embryonálnej alkalickéj fosfatázy, ktorá mení zafarbenie QB.

#### Antioxidačná a prooxidačná aktivita

Pre meranie anti- a pro-oxidačnej aktivity sa postupovalo rovnako ako pri detekcii protizápalového potenciálu s tým rozdielom, že bunky boli vpravené do tmavej doštičky. V prípade antioxidačnej aktivity sa po hodinovej inkubácii frakcií s bunkami pridalo do všetkých jamiek okrem negatívnej kontroly 10 µL 100 µM pyocyanínu (Sigma-Aldrich, Nemecko). Pre prooxidačnú aktivitu bol pridaný len do pozitívnej kontroly. U krátkodobého (1 hod) experimentu bolo pridaných 10 µL DCFH<sub>2</sub>-DA (Sigma-Aldrich, Nemecko) po pol hodine a u dlhodobého (24 hod) po 24 hodinách. Po 30 minútovej inkubácii s DCFH<sub>2</sub>-DA sa výsledky vyhodnotili spektrofotometricky. Ako štandard bol použitý 1 µM quercetín (Koch-Light laboratories LTD, Anglicko). DCFH<sub>2</sub>-DA sa deacetyluje bunkovými esterázami na nefluorescenčnú látku po preniknutí do bunky. Tá je v prítomnosti reaktívnych kyslíkových foriem (ROS) schopná sa oxidovať na dichlorofluoresceín diacetát a ten je detekovateľný fluorescenčnou spektrofotometriou. Pyocyanín bol použitý k indukcii tvorby reaktívnych kyslíkových radikálov.

## Výsledky

Pomocou dvoch rozdielnych MF bolo získaných 108A frakcií a 78B frakcií. Ako najzaujímavejšie pre ďalšie spracovanie sa javili spojené frakcie 29-30A, 31-32A a 33A. Tieto frakcie obsahovali látky s elektrónovými spektrami, ktoré sa nezhodovali s knižnicou spektier ÚPL, jednotlivé píky vykazovali dostatočnú intenzitu a rozdiel v retenčných časoch, čo je podmienkou pre následnú izoláciu. Časť 29-30A bola frakcionovaná metódou preparatívnej TLC. Týmto spôsobom bolo získaných 38 finálnych subfrakcií. Časť 31-32A i 33A boli frakcionované pomocou preparatívnej HPLC. Separované subfrakcie boli opäť podľa kontrolnej analýzy (vid'. vyššie) spájané. Ziskom z frakcie 31-32A bolo 11 subfrakcií, z ktorých subfrakcia 31-32A/PIR1-10 obsahovala relatívne čistú látku, v dostatočnom množstve (32 mg) a bola teda vybraná k budúcej identifikácii. V prípade frakcie 33A bol zisk 8 subfrakcií. K budúcej identifikácii bola vybraná subfrakcia 33A/P3R1-3 (52 mg).

Určovanie cytotoxicity ukázalo, že u všetkých testovaných 38 frakcií bolo  $IC_{50} \geq 10 \mu\text{g/mL}$ . Následne boli všetky frakcie testované pri netoxickej koncentrácii  $1 \mu\text{g/mL}$ . Pri detekcii protizápalovej aktivity na základne schopnosti inhibovať transkripčné faktory NF- $\kappa$ B/AP-1 z frakcií A vyšla najlepšie a štatisticky významne len frakcia 38A ( $p < 0.0001$ ). Na rovnakej úrovni pri porovnaní so štandardom, prednizonom, boli frakcie 13-15A, 16-17A, 21-25A, 34A, 37A, 39-42A, 43-45A, 79-84A a 93-96A. Naproti tomu u frakcií B nebola žiadna z nich schopná znižovať zápalový potenciál, ba dokonca 1-14B pôsobila prozápalovo ( $p < 0.05$ ) a len frakcia 25-26B bola účinnosťou zrovnateľná s prednizonom. Žiadna frakcia zo skupiny A ani B sa neukázala, mať schopnosť znížiť tvorbu reaktívnych kyslíkových radikálov indukovaných pyocyanínom po 1 ani 24 hodinách. Testovaním prooxidačnej aktivity sa sledovala schopnosť jednotlivých frakcií vyvolať tvorbu ROS. Pri porovnaní s pozitívnou kontrolou, kde tvorba ROS bola indukovaná pyocyanínom, boli frakcie A pri 1 hod experimente bez významných výsledkov, oproti tomu 18-20B ( $p < 0.05$ ), 24-26B ( $p < 0.01$ ) a 30B ( $p < 0.01$ ) boli schopné znížiť množstvo ROS. Pri 24 hod experimentoch sa z frakcie A ukázala len 46A ( $p < 0.05$ ), schopná znížiť množstvo ROS a pri frakcii B, to bola 24-26B ( $p < 0.05$ ). Frakcia 27-29B ( $p < 0.05$ ) naopak signifikantne zvýšila hladinu ROS.

## Záver

Z etanolického extraktu *M. macrocarpa* boli obsahové látky separované vytrepávaním do chloroformového podielu. Bolo získaných 108 frakcií s mobilnou fázou A a 78 frakcií s mobilnou fázou B. Spojovaním vzniklo 26 spojených frakcií A a 12 spojených frakcií B, ktoré následne podliehali biologickému testovaniu. To preukázalo signifikantný protizápalový potenciál frakcie 38A. Žiadna z testovaných frakcií nepreukázala antioxidačnú aktivitu, ale frakcie 24-26B a 30B boli schopné významne znížiť tvorbu ROS. Napriek používaniu tohto extraktu domorodými obyvateľmi pre jeho protizápalové účinky, zvolený model na detekciu inhibície aktivácie transkripčného faktoru NF- $\kappa$ B/AP-1 sa neprejavil ako štatisticky významný. Nasledujúci výskum by sa mal zamerať na identifikáciu separovaných frakcií a testovanie ďalších možných biologických aktivít.

### **Zoznam literatúry:**

1 GONZALEZ, J.Gonzalez, MONACHE, G.Delle, MONACHE, F.Delle a MARINI-BETTOLÒ, G.B. Chuchuhuasha — A drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Maytenus laevis*. *Journal of Ethnopharmacology*. 1982, **5**(1), 73-77. DOI: 10.1016/0378-8741(82)90022-8. ISSN 03788741.

2 CHÁVEZ, Haydee, RODRÍGUEZ, Gladis, ESTÉVEZ-BRAUN, Ana, G. RAVELO, Ángel, ESTÉVEZ-REYES, Rafael, G. GONZÁLEZ, Antonio, L. FDEZ-PUENTE Jose a GARCÍA-GRÁVALOS Dolores. Macrocarpins A–D, new cytotoxic nor-triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2000, **10**(8), 759-762. DOI: 10.1016/S0960-894X(00)00082-2. ISSN 0960894X.

***Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU 313/FaF/2018***

## **Preklinické hodnocení kardiovaskulárně-metabolických parametrů olanzapinu na vybraném animálním modelu schizofrenie.**

Jiří Procházka, Tomáš Hammer, Kateřina Horská, Hana Kotolová  
*Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Nežádoucí metabolické účinky atypických antipsychotik (AAP), jejichž důsledkem je rozvoj metabolického syndromu (MS), jsou dnes považovány za jednu z významných komplikací terapie psychotických onemocnění. Studie opakovaně prokázaly souvislost s vyšším výskytem jednotlivých komponent MS (hyperglykemií, dyslipidemií, vzestupem tělesné hmotnosti a dalšími kardiovaskulárními rizikovými faktory) po nasazení atypických antipsychotik. V důsledku klinické manifestace nežádoucích metabolických účinků atypických antipsychotik může být významně ohrožena efektivita a úspěšnost léčby primárního onemocnění snížením medication adherence a compliance pacienta.

V poslední době se tématem výzkumu úzce souvisejícím s MS stává endokrinní funkce tukové tkáně. Adipocyty (buňky tukové tkáně) syntetizují hormony se souhrnným názvem adipokiny, které mají velkou úlohu v regulačních a homeostatických pochodech. Mezi tyto pochody patří regulace množství tuku a energetické rovnováhy, kontrola krevního tlaku, imunitní odpověď, hemostáza a reprodukční funkce. Změny plazmatických hladin adipokinů jsou možnou příčinou narušení metabolismu glukózy a lipidů. Studie se konkrétně zaměřují na biologickou aktivitu některých z adipokinů v kontextu atypických antipsychotik a na změny jejich produkce v průběhu terapie. Možnost predikce pozdních metabolických komplikací navozených terapií atypickými antipsychotiky na základě stanovení jejich biomarkeru již ve velmi časně fázi léčby by významně přispěla k prevenci těchto nežádoucích účinků, zajištění bezpečné a účinné léčby. Zároveň by umožnila individualizovat terapii.

V poslední době se též intenzivně studuje hypotéza, že samotná patofyziologie schizofrenie je spojena s rozvojem metabolického syndromu, výzkum naznačuje společný základ subchronického zánětu a dysbalanci sekrece adipokinů. Tyto patofyziologické predispozice pro rozvoj složek metabolického syndromu jsou dále posíleny antipsychotickou medikací.

V naší studii se zabýváme preklinickým hodnocením kardiometabolických parametrů olanzapinu na animálním modelu schizofrenie (model THC) u laboratorního potkana.

### **Materiál a metodika**

V tomto projektu jsme použili 40 potkanů Sprague-Dawley (S/D) o hmotnosti  $132,73 \pm 15,65$  g a věku osmi týdnů. Potkany jsme rozdělili do 4 skupin po deseti jedincích. Z tohoto celkového počtu bylo 20 zvířat tvořících 2 skupiny s navozeným neurovývojovým modelem schizofrenie. Další dvě skupiny zvířat sloužily jako kontrolní. Model, schizofrenii – podobný fenotyp byl u potkanů navozen podáváním  $\Delta$ -9tetrahydrocannabinolu (THC) březím samicím v dávce 5mg/kg (p.o.), a to koncem období březosti a dále během neonatálního vývoje potomstva. Potomci byli THC vystaveni prenatálně a postnatálně prostřednictvím mateřského mléka. Roztok látky byl podáván pomocí zahnuté intragastrické sondy od 15. gestačního dne do 9. postnatálního dne potomků. Potomkům byly provedeny behaviorální

testy na potvrzení validity animálního modelu schizofrenie (ve spolupráci s Farmakologickým ústavem LF MÚ Brno).

- Skupina 1 – (K) - bez modelu i bez medikace podáván fyziologický roztok, 8 týdnů (n = 10)
- Skupina 2 – (K+O) - bez modelu s medikací podáván olanzapin, 8 týdnů (n = 10)
- Skupina 3 – (THC) – THC model bez medikace podáván fyziologický roztok, 8 týdnů (n = 10)
- Skupina 4 – (THC+O) – THC model s medikací podáván olanzapin, 8 týdnů (n = 10)

Po týdenní aklimatizaci bylo potkanům v druhé a čtvrté skupině depotně aplikováno léčivo olanzapin (ZypAdhera® 100mg/kg - 1x14 dní), dalším dvěma skupinám byl aplikován fyziologický roztok. Zvířata byla pravidelně vážena a byla sledována spotřeba krmiva. Voda i krmivo bylo podáváno ad libitum. Zvířata byla usmrcena na konci experimentu předávkováním trojsložkovým anestetikem T61 a zachycenou krve jsme zpracovali centrifugací. Získané sérum bylo použito k analýze. Analyzovali jsme celkový cholesterol, LDL, HDL, triglyceridy a dále jsme stanovili hladiny adipokínů v séru (adiponektin, leptin, ghrelin) pomocí metody ELISA. Experiment byl proveden v laboratorních prostorech ÚHFT (akreditovaný zvířetník VFU Brno) v souladu s platnými právními předpisy.

### Výsledky

Porovnáním kontrolní skupiny K s léčenou skupinou K+O jsme u skupiny K+O zjistili signifikantně nižší koncentrace adiponektinu na hladině významnosti  $p < 0,05$ , glukagonu na hladině významnosti  $p < 0,001$ , a ghrelinu na hladině významnosti  $p < 0,01$ . Dále jsme zjistili signifikantně vyšší koncentraci leptinu na hladině významnosti  $p < 0,01$ . Další sledované parametry nebyly statisticky významně ovlivněny.

Při srovnání skupiny kontrolní K se skupinou s neurovývojovým modelem THC jsme u THC skupiny zjistili statisticky významně nižší sérové hladiny adiponektinu na hladině významnosti  $p < 0,05$ , glukagonu na hladině významnosti  $p < 0,001$  a ghrelinu na hladině významnosti  $p < 0,001$ . Dále jsme zjistili statisticky významně vyšší koncentraci leptinu na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Další sledované parametry nebyly statisticky významně ovlivněny.

Při porovnání K s THC+O jsme u THC+O skupiny zjistili statisticky významně nižší koncentrace glukagonu na hladině významnosti  $p < 0,001$  a ghrelinu na hladině významnosti  $p < 0,001$ . Dále jsme zjistili signifikantně vyšší sérovou hladinu u LDL-cholesterolu na hladině významnosti  $p < 0,05$  a leptinu na hladině významnosti  $p < 0,01$ .

Porovnáním THC s THC+O jsme u THC+O skupiny zjistili statisticky významně nižší sérovou hladiny ghrelinu na hladině významnosti  $p < 0,05$ . Dále jsme zjistili statisticky významně vyšší sérovou hladinu LDL cholesterolu na hladině významnosti  $p < 0,05$ .

### Závěr

Cílem této práce bylo zhodnotit, zda má přítomnost schizofrenického fenotypu a léčiva (olanzapinu) vliv na rozvoj metabolického syndromu u animálního modelu schizofrenie.

Po statistickém zpracování hodnocených parametrů jsme v souladu s očekáváním konstatovali u skupin s THC modelem schizofrenie a kontrolní skupiny s olanzapinem významně vyšší hladinu leptinu a významně nižší hladiny adiponektinu, ghrelinu a glukagonu. V případě skupiny THC+O byla

zaznamenána i zvýšená hladina LDL cholesterolu. Tyto adipokiny, ghrelin a glukagon se účastní dějů spojených s příjmem potravy a regulací tělesné hmotnosti a změny v jejich koncentracích bývají spojovány s přítomností metabolického syndromu a kardiovaskulární morbiditou na které se podílí i zvýšený LDL cholesterol. Změny v hmotnosti a hladinách celkového cholesterolu, HDL cholesterolu a triacylglyceridů mezi experimentálními skupinami nebyly statisticky významné.

Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost schizofrenie jako onemocnění sama o sobě predisponuje pacienta ke vzniku metabolického syndromu a jeho složek, dále z těchto výsledků vyplývá, že i nežádoucí účinky léčby tohoto onemocnění predisponují pacienta ke vzniku metabolického syndromu. To usuzujeme především ze signifikantních změn v hladinách vybraných adipokinů a ghrelu u testovaných skupin s navozeným modelem schizofrenie a i u skupin s medikací.

V této oblasti je třeba dalších studií zkoumajících vliv schizofrenie jako nemoci na rozvoj metabolického syndromu, aby mohla být lépe pochopena spojitost mezi patofyziologií tohoto onemocnění a vlivem léčby.

### **Seznam literatury:**

MICALE, Vincenzo; MAZZOLA, Carmen; DRAGO, Filippo. Endocannabinoids and neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*, 2007, 56.5: 382-392.

HORSKA, Katerina, et al. Aripiprazole-induced adverse metabolic alterations in polyI: C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats. *Neuropharmacology*, 2017, 123: 148-158.

RUDÁ, J. a kol. Behaviorální metody v neuropsychofarmakologii. [online]: Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů, 2016. 125 s. Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity. [cit. 27.3.2018] Dostupné z: <http://portal.med.muni.cz/clanek-652-behavioralni-metody-v-neuropsychofarmakologii.html>. ISSN 1801-6103

HORSKÁ, K., et al. Metabolic syndrome-dysregulation of adipose tissue endocrine function. *Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti*, 2013, 63.4: 152-159.

BOBO W. V. et al. Prediction of long-term metabolic effects of olanzapine and risperidone treatment from baseline body mass index in schizophrenia and bipolar disorder. *Psychiatry Research*, 2011. 189 (2), 200-207. ISSN 0165-1781.

SKREDE, Silje, et al. Olanzapine depot formulation in rat: a step forward in modelling antipsychotic-induced metabolic adverse effects. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2014, 17.1: 91-104.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 321/2018/FaF***



## **Imunomodulační vliv flavonoidů enkapsulovaných v glukanových částicích na ex vivo izolované prasečí buňky imunitního systému**

Dominik Rotrek<sup>1</sup>, Kateřina Kouřilová<sup>1</sup>, Jan Hošek<sup>1</sup>

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno<sup>1</sup>*

### **Úvod**

Flavonoidy patří mezi jednu z nejobsáhlejších skupin přírodních látek, u kterých byla již na mnoha *in vitro* i *in vivo* experimentech prokázána široká škála účinků, mezi které patří například antioxidační, protizánětlivé, antivirotické, vasodilatační a celá řada dalších [1]. Vzhledem k jejich nízké biodostupnosti se stále hledají možnosti, jak jejich dostupnost pro organismus zvýšit [2]. Jednou z možností je využití vhodného nosiče. Mezi zatím nepříliš prozkoumanou kombinací, avšak vzhledem k vlastnostem zajímavou variantu, patří i využití glukanových částic. Jedná se o vysoce čištěné porézní částice skládající se především z beta-glukanů, které pochází ze *Saccharomyces cerevisiae* [3]. Díky schopnosti beta-glukanů stimulovat a být rozpoznán imunitním systémem, dochází k zvýšené fagocytóze glukanových částic. Následuje nejpravděpodobněji jejich lýze a uvolnění nesené účinné látky. Díky těmto vlastnostem může být navýšena biodostupnost vysoce účinných přírodních látek s horší biodostupností. Navíc v případě zánětu, nebo infekce se může jednat až o cílené uvolnění účinné látky, ke kterému bude docházet ve zvýšené míře při větším nahromadění buněk imunitního systému.

### **Materiál a metodika**

#### Odběr vzorků

Vzorky prasečí krve byly odebrány na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství. Neutrofilů byly z krve vyizolovány za pomoci centrifugace (500 g, 4 °C, 30 min) na dextranovém koncentračním gradientu. Poté, co byla odebrána vrstva obsahující neutrofilů, byla v této frakci provedena lýze erythrocytů pomocí chloridu amonového (74.7%) s následnou centrifugací (350 g, 18 °C, 10 min). Pelety byly poté 3x promyty a uchovány v RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium). Mononukleární buňky imunitního systému byly vyizolovány za pomoci centrifugace (800 g, 18 °C, 25 min) krve na koncentračním gradientu Histopaque. Poté, co byla odebrána vrstva obsahující PBMC, byla v této frakci provedena opět lýze erythrocytů a následně promytí.

#### Měření produkce reaktivních forem kyslíku (ROS)

Produkce volných kyslíkových radikálů byla měřena pomocí chemiluminiscenční metody [4]. Měření ROS produkce neutrofilů a PBMC buněk probíhalo na 96 jamkové destičce v koncentraci  $2 \times 10^5$  buněk u neutrofilů a  $2 \times 10^6$  buněk u PBMC v jamce, a to v celkovém objemu 200  $\mu$ l na jamku, skládajícího se ze suspenze buněk (150  $\mu$ l), 25  $\mu$ l luminolu a 25  $\mu$ l testovaných látek. Jako pozitivní kontrola byl použit phorbol myristate acetát (50  $\mu$ g/ml) (PMA) a jako negativní kontrola Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) s  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ve kterém byly naředěny i jednotlivé testované látky. Ty byly testovány v duplikátech a v koncentracích 400  $\mu$ g/ml, 200  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml pro glukany a glukanové částice. Přírodní aktivní látky byly testovány v koncentracích odpovídajících jejich zastoupení

v kompozitech s glukanovými částicemi (pro kurkumin a diplakon odpovídající 5 % obsahu byly tedy použity koncentrace 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml). ROS produkce byla měřena po dobu 120 minut v integračním módu. ROS produkce byla vyjádřena v relativních světelných jednotkách (RLU – relative light units).

#### Měření produkce cytokinů

Výše uvedenými metodami byly z prasečí krve izolovány PBMC buňky, které byly následně inkubovány (37 °C a v atmosféře s obsahem 5 % CO<sub>2</sub>) po dobu 24 hodin na 24 jamkové destičce v koncentraci 2,5x10<sup>6</sup> buněk/ml v kompletním médiu (RPMI + 1 % Na-pyruvátu, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilin/streptomycin, 1 % kanamycin, 0,1 % glutamin, 7,5 % fetální telecí sérum) v přítomnosti testovaných látek (negativní kontrola – RPMI, pozitivní kontrola – 100 µg/ml LPS, GP 20 µg/ml a 200 µg/ml, GP s inkorporovanými 5 % kurkuminu a diplakonu – 20 µg/ml a 200 µg/ml, fyzická směs odpovídající GP s 5 % kurkuminu, nebo diplakonu – 20 µg/ml a 200 µg/ml, kurkumin a diplakon – 10 µg/ml). Po 24 hodinách byl sesbírán supernatant, proběhla jeho centrifugace a čistý supernatant byl následně uchován při -80 °C. Koncentrace produkovaných cytokinů byla následně měřena pomocí ELISA kitů (Swine IL-1 beta ELISA kit, Porcine IL-12 (IL12A) ELISA kit, Swine IL-10 Elisa kit, Swine TNF-α Elisa kit, Thermo Fisher Scientific, USA).

#### Výsledky

V rámci projektu byly testovány imunomodulační účinky diplakonu, kurkuminu, glukanových částic (GP) a jejich vzájemných kompozitů a fyzických směsí na *ex vivo* izolovaných prasečích buňkách přirozené imunity. V prvním kroku byl sledován vliv na produkci reaktivních forem kyslíku (ROS). Jak neutrofily, tak PBMC buňky produkovali ve zvýšené míře volné radikály v přítomnosti samotných glukanových částic. Fyzické směsi také zvyšovali produkci ROS, ale v koncentraci 400 µg/ml v porovnání se samotnými GP signifikantně méně. U dalších koncentrací byl již rozdíl zanedbatelný. Nejmenší nárůst produkce ROS byl u kompozitů GP s diplakonom a samotných testovaných látek. Dalším krokem bylo testování produkovaných cytokinů. Testované cytokiny byly IL-1β, IL-10, IL-12 a TNF-α. IL-10 a IL-12 bohužel neprokázali žádné signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami. TNF-α bylo ve zvýšené míře produkováno v přítomnosti glukanových částic a fyzických směsí o koncentraci 20 µg/ml. V přítomnosti kompozitů v koncentraci 200 µg/ml byla produkce TNF-α utlumena. Zajímavé bylo navýšení hladiny TNF-α v přítomnosti samotného kurkuminu. Zde ale navýšení může být spojeno i s jeho krystalickou formou. IL-1β byl testován pouze u kurkuminu a jeho kompozitů v rozdílných koncentracích. Nejnižších hodnot produkce tohoto cytokinu bylo dosaženo v případě kompozitů s 5% obsahem kurkuminu v koncentraci 200 µg/ml. Ostatní formy hladinu IL-1β zvyšovali. Ze získaných výsledků je patrné, že byla zachována schopnost glukanové částice být rozpoznán buňkami imunitního systému a pravděpodobně uvolnění účinné látky po fagocytóze vedlo k následnému tlumení prozánětlivých cytokinů.

#### Závěr

Glukanové částice mají díky beta-glukanovým strukturám na povrchu zachovanou schopnost interakce s buňkami imunitního systému, což nám dokazuje jejich vliv na ROS produkci. Díky možnosti být rozpoznán imunitním systémem a stabilitě v lidském organismu mají tyto částice šanci stát se nejen

vhodným nosičem pro celou řadu nejen přírodních látek, ale stát se i cílenými nosiči pro účinné látky především s protizánětlivým působením. V rámci provedeného experimentu bylo sledováno využití glukanových částic jakožto nosiče pro přírodní protizánětlivé látky diplakon a kurkumin. Vzniklé kompozity dosahovali nižší produkce ROS než samotné GP, nebo fyzické směsi. Zároveň byly schopné tyto kompozity snížit produkci prozánětlivých cytokinů IL-1 $\beta$  a TNF $\alpha$ . U testovaných kompozitů je zapotřebí dalšího výzkumu, jako je například otestování jejich vlivu na ROS produkci a produkci cytokinů na modelu s indukci zánětu a následná farmakokinetika.

#### **Seznam literatury:**

- [1] GONZÁLEZ-GALLEGO JAVIER, et al. Fruit polyphenols, immunity and inflammation. *British Journal of Nutrition*, 2010, 104.S3: S15-S27.
- [2] THILAKARATHNA SURANGI H, et al. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 2013, 5.9: 3367-3387.
- [3] SALOŇ IVAN, et al. Suspension stability and diffusion properties of yeast glucan microparticles. *Food and Bioproducts Processing*, 2016, 99: 128-135.
- [4] SONCK EVA, et al. The effect of  $\beta$ -glucans on porcine leukocytes. *Veterinary immunology and immunopathology*, 2010, 135.3: 199-207.

***Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 312/2018/FaF***

## **Zelená syntéza stříbrných nanočástic s protinádorovými účinky (GREEN NANO)**

Branislav Ruttkay-Nedecký<sup>1,2</sup>, Karel Sehnal<sup>3</sup>, Martin Löffelmann<sup>3</sup>, Michaela Dočekalová<sup>4</sup>, Radka Opatřilová<sup>2</sup> a René Kizek<sup>3</sup>

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie<sup>1</sup>, Ústav chemických léčiv<sup>2</sup>,  
Ústav humánní toxikologie a farmakologie<sup>3</sup>, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická  
univerzita Brno, Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o. Studénka-Butovice<sup>4</sup>*

### **Úvod**

Syntéza nanočástic stříbra (AgNPs) přitahuje stále větší zájem vědecké obce vzhledem k jejich novým a odlišným charakteristikám, které umožňují jejich uplatnění v různých oblastech medicíny a biotechnologií především v antimikrobiálních přípravcích [1]. Vlastnosti AgNPs jako velká plocha jejich povrchu, velmi malá velikost a vysoká disperze z nich činí jeden z nejčastěji používaných nanomateriálů. Syntéza AgNPs pomocí biologických metod s využitím mikroorganismů, enzymů a rostlin nebo rostlinných extraktů byla navržena jako možná alternativa chemických a fyzikálních metod [2]. Mnoho studií prokázalo cytotoxickou aktivitu AgNPs připravených zelenou syntézou tj. pomocí rostlinných extraktů na různých nádorových buněčných liniích (např. karcinomu tlustého střeva, prsu, jater, prostaty, žaludku, ledviny) [3]. Bylo také prokázáno, že AgNPs připravené zelenou syntézou jsou více cytotoxické na nádorové buňky než na nenádorové buňky [4]. V dalších studiích byla zjišťována antioxidační aktivita AgNPs připravených zelenou syntézou [5, 6]. Cílem této práce bylo sledovat cytotoxicitu AgNPs připravených zelenou syntézou na buněčné linii nádoru prsu MCF-7 a provést srovnání s AgNPs připravenými chemickou syntézou. Dalším cílem bylo stanovení antioxidační aktivity deseti různých AgNPs připravených zelenou syntézou.

### **Materiál a metodika**

#### *Syntéza nanočástic*

Pro stanovení cytotoxicity byly připraveny 4 různé typy AgNPs-CHS (lišily se obsahem NaBH<sub>4</sub>) a 4 různé typy AgNPs-ZS. U AgNPs-CHS bylo 0,5 ml 0,1 M AgNO<sub>3</sub> smícháno s 49 ml destilované vody. Poté bylo přidáno 1650 µL 1 % roztoku citrátu tri-sodného a 10 ml roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentracích 5 (AgNPs-CHS1), 10 (AgNPs-CHS2), 15 (AgNPs-CHS3) a 20 mM (AgNPs-CHS4). Roztok se poté míchal 1 hodinu při pokojové teplotě. AgNPs-ZS se lišily výluhem z rostliny (výluhy byly připraveny z nálevových sáčků čajů zakoupených v lékárně (Apotheke, Mediate s.r.o., ČR); ze zeleného čaje (*Camelia sinensis*; AgNPs-ZS1), mateřídoušky obecné (*Thymus vulgaris*; AgNPs-ZS2), třezalky tečkované (*Hypericum perforatum*; AgNPs-ZS3), měsíčku lékařského (*Calendula officinalis*; AgNPs-ZS4) zahříváním a mícháním 0,5 g sušené rostliny v 25 ml destilované vody při teplotě 70°C po dobu 20 minut), který se účastnil reakce. AgNPs-ZS byly připraveny mícháním výluhů z rostlin s 0,1 M roztokem AgNO<sub>3</sub> v poměru 1:1 při pokojové teplotě 24 hodin. AgNPs byly potom třikrát promyty destilovanou vodou centrifugací při 10 000 g po dobu 10 minut při pokojové teplotě a koncentrace Ag v roztoku nanočástic byla vypočtena z množství přidaného AgNO<sub>3</sub>. AgNPs byly poté zředěny DMEM médiem a přidány k nádorové buněčné linii MCF-7. Dalších 10 AgNPs použitých ke stanovení antioxidační aktivity (viz. Obr. 2) bylo připravených zelenou syntézou stejným postupem (viz. postup nahoře) s tím, že k přípravě byly použity rostliny, které s výjimkou čaje a kávy byly sklizeny v

Boskovické brázdě v květnu roku 2018. Po odběru byly promyty destilovanou vodou a sušeny v sušárně při teplotě 60 ° C po dobu 48 hodin a následně rozdrceny na velikost částic asi 1 mm.

#### Charakterizace nanočástic

AgNPs byly charakterizovány spektrofotometricky (UV-3100PC UV-VIS spektrofotometr, VWR, USA) a stanovením zeta potenciálu a velikosti nanočástic (Zetasizer NANO-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Velká Británie).

#### Měření buněčné viability

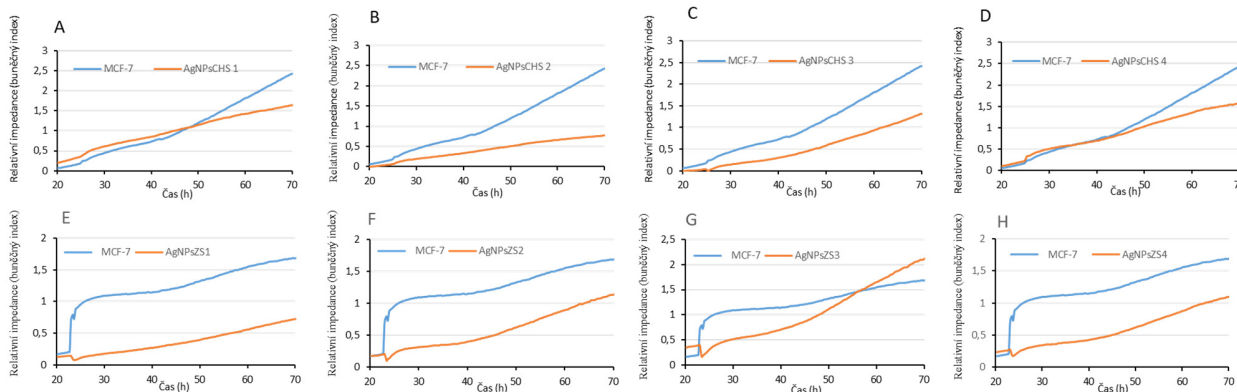
Kultivace buněčné linie MCF-7 probíhala v DMEM médiu s 5 % FBS na Petriho miskách s průměrem 10 cm. AgNPs byly přidány po 24 hodinách inkubace při 37 ° C a 5 % CO<sub>2</sub>. Do 16-ti jamkové destičky se napipetovalo 190 μL buněčné linie MCF-7 (8 000 buněk) v DMEM médiu a 10 μL stříbrných nanočástic. Buněčná viabilita byla měřena na přístroji xCELLigence RTCA (ACEA Biosciences Inc., USA) po dobu 48 hodin.

#### Měření antioxidační aktivity

Test DPPH je založen na schopnosti stabilního 2, 2-difenyyl-1-pikrylhydrazylvého volného radikálu reagovat s donory vodíku. ABTS metoda je jedním z nejpoužívanějších testů pro stanovení antioxidační aktivity. Je založena na neutralizaci radikálového kationtu vzniklého oxidací syntetického chromoforu 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonové kyseliny) (ABTS):  $ABTS \cdot^- + e^- = ABTS \cdot^+$ . Metoda FRAP (Ferric Reduction Antioxidant Power) je založena na redukci komplexů 2,4,6-tripyridyl-s-triazinu s hexahydrátem chloridu železitého ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ), které jsou téměř bezbarvé nebo nakonec mírně hnědé. Tato chemikálie tvoří po redukci modré železnaté komplexy. Stanovení antioxidační aktivity se provádělo fotometricky na automatizovaném analyzátoru BS 200 (Mindray, Čína).

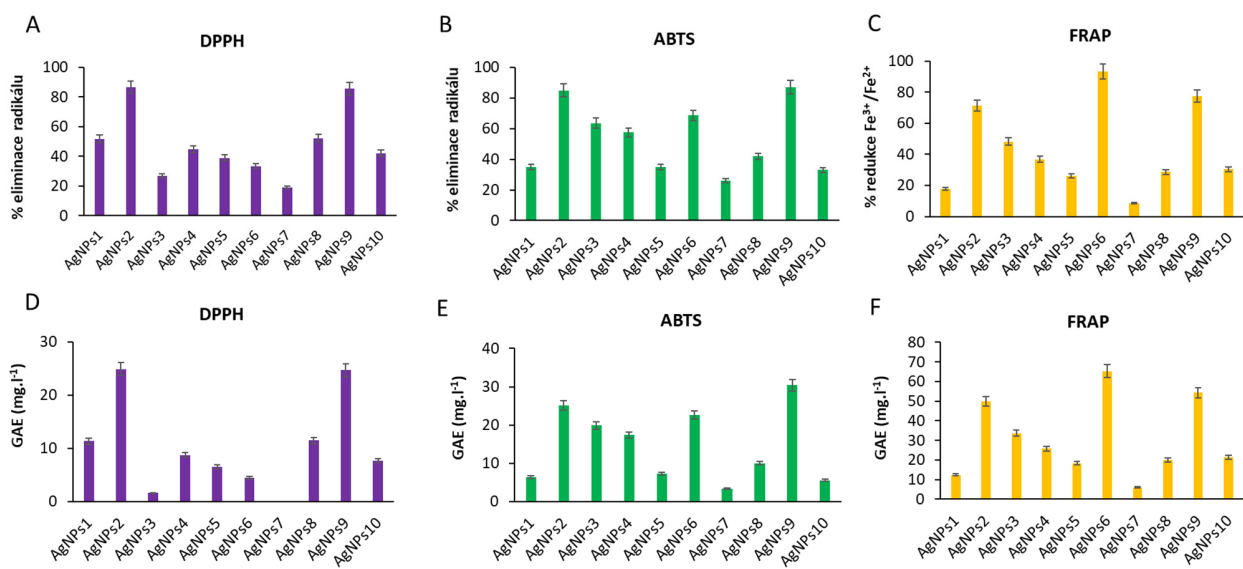
## Výsledky

AgNPs připravené chemickou nebo zelenou syntézou byly charakterizovány spektrofotometricky a jejich absorpční maxima se pohybovala v rozmezí 370–470 nm. Velikost AgNPs dosahovala 30–80 nm. Nejdříve byla sledována viabilita MCF-7 nádorové buněčné linie po přidání stříbrných nanočástic v čase. Stříbrné nanočástice připravené zelenou syntézou byly účinné v 5x nižší koncentraci Ag (80 μM) ve snížení viability buněčné linie MCF-7 než stříbrné nanočástice připravené chemickou syntézou (400 μM; Obr. 1). Nejvíce cytotoxické byly stříbrné nanočástice AgNPs-ZS1 (připravené za použití extraktu ze zeleného čaje)



**Obrázek 1:** Časový průběh viability MCF-7 buněk vyjádřen jako relativní impedance od 20. hodiny po 70. hodinu. AgNPs-CHS 1-4 a AgNPs-ZS 1-4 byly přidány k MCF-7 buňkám ve 24. hodině v testované koncentraci 400  $\mu\text{M}$  u AgNPs-CHS a 80  $\mu\text{M}$  u AgNPs-ZS. Jako kontrola byly použity MCF-7 buňky bez přidání nanočástic.

Dále byla zjišťována antioxidační aktivita u deseti AgNPs připravených zelenou syntézou pomocí metod DPPH, ABTS a FRAP (Obr. 2). Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena v AgNPs 2 (připraveného za použití extraktu ze zeleného čaje) a v AgNPs 9 (připraveného za použití extraktu z jahodníku velkoplodého) pomocí metod DPPH a ABTS. Výsledky antioxidační aktivity těchto vzorků se pohybovaly v rozmezí 85-87% eliminace radikálů a 24-30 GAE ( $\text{mg.l}^{-1}$ ). Při použití metody FRAP byla nejvyšší antioxidační aktivita stanovena v AgNPs 6 (připraveného za použití extraktu z maliníku obecného). Výsledek antioxidační aktivity vzorku byl 93% redukce  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  a 65 GAE ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).



**Obrázek 2:** Antioxidační aktivita AgNPs připravených zelenou syntézou stanovená metodou DPPH (A, D), metodou ABTS (B, E) a metodou FRAP (C, F). Na obr. 2A a 2B je antioxidační aktivita vyjádřena v procentech eliminace radikálů, na obrázku 2C jako procenta redukce  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  a na obr. 2D, E a F v ekvivalentech kyseliny gallové (GAE). AgNPs byly připraveny s použitím následujících rostlinných extraktů: AgNPs 1 - černý čaj (*Camelia sinensis*), AgNPs 2 - zelený čaj (*Camelia sinensis*), AgNPs 3 - káva (*Coffea arabica*), AgNPs 4 - mateřídouška obecná (*Thymus vulgaris*), AgNPs 5- jetel luční (*Trifolium pratense*), AgNPs 6 – maliník obecný (*Rubus idaeus*), AgNPs 7 – pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*), AgNPs 8 – řepík lékařský (*Agrimonia eupatoria*), AgNPs 9 - jahodník velkoplodý (*Fragaria ananassa*), AgNPs 10 – čičorka pestrá (*Securigera varia*).

## Závěr

Stanovili jsme časový průběh vlivu nanočástic stříbra připravených chemickou syntézou a zelenou syntézou na viabilitu nádorové buněčné linie MCF-7. Stříbrné nanočástice připravené zelenou syntézou

byly účinné v 5x nižší koncentraci Ag (80  $\mu$ M) ve snížení viability buněčné linie MCF-7 než stříbrné nanočástice připravené chemickou syntézou (400  $\mu$ M). Nejvíce cytotoxické byly stříbrné nanočástice připravené za použití extraktu ze zeleného čaje. Dále jsme stanovili antioxidační aktivitu u deseti různých AgNPs připravených zelenou syntézou pomocí metod DPPH, ABTS a FRAP. Nejvyšší antioxidační aktivita byla stanovena u AgNPs 2 (připraveného za použití extraktu ze zeleného čaje), AgNPs 9 (připraveného za použití extraktu z jahodníku velkoplodého) a AgNPs 6 (připraveného za použití extraktu z maliníku obecného).

### Seznam literatury:

1. Abou El-Nour, K.M.M., et al., *Synthesis and applications of silver nanoparticles*. Arabian Journal of Chemistry, 2010. **3**(3): p. 135-140.
2. Saxena, A., R.M. Tripathi, and R.P. Singh, *Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity*. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2010. **5**(2): p. 427-432.
3. Ovais, M., et al., *Green synthesis of silver nanoparticles via plant extracts: beginning a new era in cancer theranostics*. Nanomedicine, 2016. **11**(23).
4. Banerjee, P.P., et al., *Mentha arvensis (Linn.)-mediated green silver nanoparticles trigger caspase 9-dependent cell death in MCF7 and MDA-MB-231 cells*. Breast Cancer-Targets and Therapy, 2017. **9**: p. 265-278.
5. Abdel-Aziz, M.S., et al., *Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract*. Journal of Saudi Chemical Society, 2014. **18**(4): p. 356-363.
6. Huo, C., et al., *Eco-friendly approach for biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus maxima* peel extract and their characterization, catalytic, antioxidant and antimicrobial characteristics*. Materials Research Express, 2019. **6**(1): p. 13.

**Poděkování:** Autoři děkují Dr. Marii Brázdové z Ústavu molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie FaF, VFU za poskytnutí nádorové buněčné linie MCF-7 a dále ještě děkují Dr. Martě Kepinské z Wroclawské lékařské univerzity za charakterizaci stříbrných nanočástic.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 316/2018/FAF*

## **Modifikace chitosanových nanočástic (s doxorubicinem) povrchově aktivními látkami a jejich interakce s proteinovou korunou**

Sylvie Skaličková<sup>1</sup>, Michael Gargulák<sup>1</sup>, Dagmar Uhlířová<sup>1</sup>, René Kizek<sup>1</sup>

*Ústav humánní toxikologie a farmakologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

### **Úvod**

Výzkum cíleného a specifického transportu léčiv do organismu se zabývá nalezením vhodných postupů. Experimentálně připravené nanotransportéry musí být bezpečné, vykazovat potřebnou specifitu k cílové buňce/tkáni a zachovávat efektivitu účinné látky. Předpokládá se, že nanotransportéry léčiv budou aplikovány do krevního oběhu, je zde kladen důraz na bio/hemo kompatibilitu. Avšak celkové hodnocení toxicity se komplikuje povrchovou dynamikou nanomateriálů vystavených biologickému prostředí: interakce s biomolekulami vede často k vytvoření tzv. proteinové korony. Proteinová korona je vrstva adsorbovaných biomolekul, které zároveň minimalizují povrchovou energii nanomateriálu a mění fyzikálně-chemické vlastnosti jeho povrchu [1]. Bylo prokázáno, že nanomateriál s proteinovou korunou vykazuje nízkou podobnost s původním nanomateriálem v chemickém složení, fyzikálně-chemickými interakcemi a biologickou odezvou. Z tohoto důvodu studium složení proteinové korony může pomoci k racionální funkcionalizaci a modifikaci nanotransportérů pro prodloužení doby jejich cirkulace v krevním oběhu a biologickou dostupnost [2].

Chitosanové nanotransportéry jsou moderní oblastí nanomedicíny díky jejich nízké toxicitě, biodegradabilitě a biodostupnosti. Avšak přes veškeré výhody stále zůstává výzvou vysoká viskozita, nerozpustnost při fyziologickém pH, vysoká molekulová hmotnost a vyšší hydrofilita samotného chitosanu [3]. Z tohoto důvodu jsou chitosanové nanočástice často modifikovány povrchově aktivními látkami, které řeší negativní vlastnosti přírodního polymeru chitosanu. Chování nanočástic uvnitř organismu a imunologická odezva je v současné době velmi diskutovanou otázkou na úrovni nanomedicíny [4]. Bylo prokázáno, že složení proteinové korony závisí na struktuře a fyzikálně-chemických vlastnostech nanočástic [5]. Dosud však nebyl sledován vliv povrchově aktivních látek ve struktuře chitosanových nanočástic na složení a tvorbu proteinové korony. Získané výsledky tak budou přínosem v oblasti designu nanotransportérů a pro transport antracyklinových antibiotik k nádorové tkáni. Cílem této práce bylo navrhnout chitosanový nanotransportér modifikovaný povrchově aktivní látkou (kyselina stearová, dodecylsulfát sodný a kyselina hyaluronová). Sledována byla účinnost enkapsulace, uvolňování léčiva, jeho toxicita, a interakce s albuminem, který je nejčastějším proteinem proteinové korony.

### **Materiál a metodika**

#### *Chemikálie*

Nízkomolekulární chitosan, tripolyfosfát sodný, doxorubicin, kyselina stearová, dodecyl sulfát sodný, kyselina hyaluronová, lidský sérový albumin (HSA) a další chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Ninhydrin, hydridantin byly pořízeny od firmy Ingos (Česká republika).

#### *Příprava chitosanových nanočástic*



12.5 mg chitosanu bylo rozpuštěno v 5 mL 1 % kyselině octové. Pro přípravu variant nanočástic byly k roztoku chitosanu přidány tyto modifikátory: kyselina stearová, dodecylsulfát sodný, kyselina hyaluronová v koncentracích 20 µM. Vzniklá směs byla míchána na rotátoru (Multi-Rotator RS-60 BIOSAN) (30 rpm, 3 hodiny, 24 °C). Doxorubicin (30 µM) byl přidán ke vzniklému roztoku a směs byla míchána 3 hodiny při 24 °C. Nakonec roztok byl opatrně přidán roztok tripolyfosfátu sodného (0,25 % w/v). Nenavázaný doxorubicin byl odstraněn pomocí opakované centrifugace, kdy nanočástice tvořily pelet a supernatant (nenavázaný doxorubicin) byl odstraněn. Centrifugace probíhala 10 min, 14000 g (Eppendorf, Hamburg, Německo). Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 5 mL 3% kyseliny octové.

#### *Charakterizace chitosanových nanočástic*

Fluorescenční a absorbanční spektra byla získána pomocí multifunkčního mikrodestičkového readeru Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Švýcarsko). Excitační vlnová délka pro doxorubicin 480 nm. Fluorescenční sken byl v rozsahu 510 – 850 nm po 2-nm krocích. Citlivost detektoru byla nastavena na 100. Absorbanční spektra byla v rozsahu 230 – 700 nm. Vzorky byly umístěny do mikrotitrační 96 jamkové mikrotitrační destičky Costar (Corning, USA). Měření byla provedena při 25 °C kontrolované by Tecan (TECAN, Švýcarsko).

Enkapsulační efektivita (EE) byla vypočítána dle rovnice (1):

$$EE (\%) = (c_f / c_t) \times 100 \quad (1)$$

$c_f$  je koncentrace léčiva po separaci nenavázaných molekul

$c_t$  je celková vstupní koncentrace léčiva

#### *Ninhydrinová reakce*

2 g ninhydrinu byly rozpuštěny v 25 ml 4 M acetátového pufru (pH 5.2) a 0.3 g hydrindantinu v 75 ml DMSO. 75 µL reagentu bylo přidáno ke 100 µL vzoru. Po inkubaci (30 min, 99°C) byly změřeny absorbanční spektra v rozsahu 300-700 nm (Infinite M200 Pro, TECAN, USA).

#### *Hemolytická aktivita*

Pro analýzu byla použita krev psa. Vzorky byly promíchány s erytrocyty a inkubovány 1h při 37 °C. Jako negativní kontrola byl použit PBS a jako pozitivní kontrola voda. Vzorky byly centrifugovány a absorbance supernatantu obsahující lyzované erytrocyty byla měřena při 540 nm.

#### *Gelová elektroforéza (SDS PAGE).*

K CS-D NPs byl přidán HSA (0, 100, 500, 1000, 1500 µg/mL) a vzniklé roztoky byly míchány 30 minut na rotátorové míchačce za laboratorní teploty. Gelová elektroforéza byla provedena na 12,5% akrylamidovém gelu, který byl připraven ze zásobního roztoku 30% akrylamidu s 1% bisakrylamidem. Separační gel obsahoval 12,5% akrylamid, 0,5% bisakrylamid, 0,1% dodecylsírán sodný (SDS) a 0,4 M Tris/HCl, pH 8,8. Zaostrovací gel obsahoval 4,5% akrylamid, 0,15% bisakrylamid, 0,1% SDS a 0,1 M Tris/HCl, pH 6,8. Pro nanášení vzorků na gel byl použit PLB (Protein loading buffer). Vzorky se míchali s PLB v poměru 1:2. Jako elektrolyt byl použit pufr s obsahem 24 mM Tris, 0,2M glycin a 3mM SDS. SDS/PAGE bylo provedeno při 150 V (zdroje VWR, USA) po dobu 1 hodiny. Barvení gelu bylo

provedeno pomocí stříbra. Pomocí ColorTestu byly porovnány získané pixely ze skenu gelu s denzitou vyjádřenou jako  $\text{Log}(I_0/I)$ , kdy  $I_0 = 255$  a  $I$  je naměřená denzita.

#### *Kontrola dat a statistická analýza*

Všechna experimentální data byla evidována a ukládána do laboratorního informačního systému Qinslab [6]. Dostupná experimentální data byla zpracována a vyhodnocena matematicky a statisticky přímo v databázi Qinslab. Pro hodnocení intenzity barevnosti byl navržen ColorTest. ColorTest pracuje s obrázkem a hodnotí intenzitu pixelů ve škále RGB. Vyloučení extrémních hodnot u souborů dat bylo provedeno výpočtem v Grubbsově testu. Experimentální práce byla provedena ve třech nezávislých experimentech ( $n_1$ ). Každý vzorek v experimentech byl 5krát analyzován ( $n_2$ ). Získaná data prezentovaná v této práci jsou uvedena jako průměrné hodnoty. Pro přípravu práce byla data dále zpracována programovým balíkem MICROSOFT (USA).

## Výsledky

### *Design a charakterizace chitosanových nanočástic*

Pro základní charakterizaci nanočástic byla využita spektrofotometrická analýza. Aby bylo možné sledovat změny struktury nanočástic, použili jsme ninhydrinovou esej. Ta je založena na reakci primárních a sekundárních aminů chitosanu (CS) s ninhydrinem za vzniku Ruhemanovy červeně. Absorbanční spektrum komplexu ninhydrin-CS vykazuje tři maxima v 342, 408 a 572 nm (Obr. 1A). Optimalizace metody je popsána v naší předchozí práci [7]. Připravené nanočástice bez modifikace (CS NPs), nebo s modifikací kyselinou stearovou (CS-S NPs), dodecylsulfátem sodným (CS-D NPs) a kyselinou hyaluronovou (CS-H NPs) vykázaly shodný průběh absorbančních spekter. Míra tvorby Ruhemanovy červeně prokázala, že modifikace nanočástic povrchově aktivními látkami ovlivňuje míru zesíťování struktury. Z výsledků lze usuzovat, že kompaktnost nanočástic klesá v pořadí CS NPs > CS-H NPs > CS-D > CS-S NPs. Tyto výsledky potvrzuje analýza jejich velikosti, která je založena na měření dynamického rozptylu světla sledovaných vzorků. Velikost nanočástic byla následující: CS NPs 135 nm, CS-S NPs 120 nm, CS-H NPs 110 nm a CS-D NPs 115 nm. Z-potenciál sledovaných nanočástic kolísá v rozmezí -20 až -25 mV, což značí, že modifikace nanočástic má minimální vliv na agregační chování nanočástic (Obr 1C).

### *Enkapsulační efektivita CS NPs*

Uvolňování a enkapsulační kapacita léčiva (doxorubicin) z CS NPs a jejich modifikací bylo umožněno díky přidavku magnetických zlatých nanočástic do jejich struktury. Pomocí magnetické separace mohly být nanočástice odděleny od uvolněného doxorubicinu. Určením koncentrace uzavřeného doxorubicinu a odečtením celkové koncentrace doxorubicinu použitého při přípravě nanočástic a do nanočástic pomocí fluorescenční spektroskopie byla zjištěna enkapsulační kapacita CS NPs 20%, CS-S NPs 15 %, CS-D NPs 25 %, CS-H 40 %. Následně byly připravené varianty nanočástic podrobeny analýze uvolňování léčiva při pH 6,5, což odpovídá pH vnitřního prostředí organismu. V průběhu experimentu (0-12 hodin)

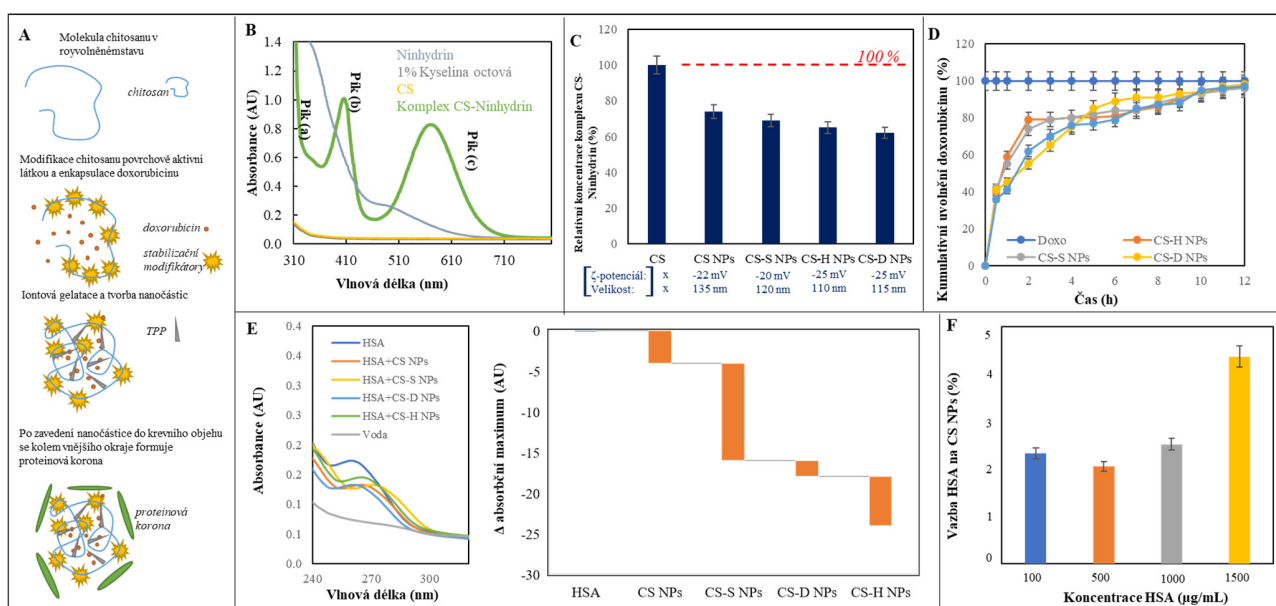
bylo zjištěno výrazné uvolnění doxorubicinu u již po 120 min pro CS-H NPs a CS-S NPs, 240 min pro CS NPs a 300 min pro CS-D NPs.

#### *Toxikologické hodnocení nanotransportéru*

Hemolytická aktivita CS nanotransportéru a jeho modifikací byla kvantifikována úbytkem absorbance při  $\lambda=450$  nm. Čím vyšší úbytek absorbance byl zaznamenán oproti pozitivní kontrole (100% hemolytická aktivita), tím větší schopnost vykazovaly nanotransportéry lyzovat erythrocyty. Z výsledků je patrné, že samotný chitosan způsoboval minimální hemolytickou aktivitu (10%), zatímco přídavek TPP způsobil její zvýšení o 20 %. Modifikace CS NPs povrchově aktivními látkami způsobila snížení hemolytické aktivity, kdy pro CS-S, SC-D, CS-H NPs byla 5, 8 a 13 % v uvedeném pořadí. Ze získaných výsledků je patrné, že sledované varianty chitosanových nanočástic mohou být aplikovány do organismu, aniž by docházelo k negativnímu ovlivnění erythrocytů. Tyto výsledky prokazují vysoký potenciál uplatnění nanočástic na bázi chitosanu v cíleném transportu léčiv.

#### *Interakce CS NPs s albuminem.*

Nejrozšířenějším proteinem krevního séra je albumin, který byl zároveň prokázán jako nejčastější protein vyskytující se v proteinové koruně. Spektrofotometrickou analýzou jsme sledovali interakci studovaných variant CS NPs s albuminem, odpovídající koncentraci albuminu v lidském krevním séru. Albumin vykazuje silnou absorpci světla v absorpčním pásmu 260 – 300 nm, které je dané přítomností aromatických aminokyselin (tryptofan a tyrosin). UV-VIS absorpční spektra komplexu albumin-CS NPs vykazují typická spektra. Při přídavku CS-NPs dochází k červenému posunu absorpčního maxima a ke snížení absorbance u všech variant nanočástic. Nejvýraznější posun byl zaznamenán u CS-S NPs a nejnižší u CS-D NPs. U CS-H je posun shodný s CS NPs. Z výsledků lze usuzovat, že proteinová korona se bude nejvíce tvořit v případě CS-S NPs. Naopak CS-D NPs interagují s proteiny slabě a je tedy možné předpokládat, že tato modifikace chitosanových nanočástic bude vhodná pro další funkcionalizaci povrchu využitelného v případě cíleného transportu léčiv. V další části experimentu byly vybrány CS-D NPs pro interakci s HSA 0, 100, 500, 1000, 1500  $\mu\text{g/ml}$  sledovanou pomocí gelové elektroforézy. Díky tomu, že nenavázaný HSA na CS NPs bude migrovat v elektrickém poli odlišnou rychlostí, lze určit míru interakce pomocí vyhodnocení intenzity barvení výsledných bandů pomocí software ColorTest. Z výsledků (**Obr. 1F**) je patrné, že na CS-D NPs se vážalo 2 – 4% HSA v průběhu 30 min. interakce.



**Obr. 1:** **A)** Schéma designu chitosanových nanočástic a tvorba proteinové korony. **B)** Průběh absorbančního spektra komplexu chitosan-ninhydrin, samotného ninhydrinu (2 mg/mL) a chitosanu (100  $\mu$ M). **C)** Relativní koncentrace CS-ninhydrin komplexu je přímo úměrná množství volných  $\text{NH}_2$  skupin v molekule chitosanu. Vyšší stupeň zesíťování struktury nanočástice vede k nižší dostupnosti  $\text{NH}_2$  skupin chitosanu. Jako 100% je považována absorbance volného chitosanu (100  $\mu$ M) v komplexu s ninhydrinem (2 mg/mL). **D)** Kumulativní uvolňování doxorubicinu variant CS NPs. Signál 30  $\mu$ M volného doxorubicinu byl brán jako 100%. **E)** Vlevo: Absorbanční spektrum albuminu (HSA) (10  $\mu$ g/mL) a komplexu albumin – CS, CS-S, CS-D, CS-H NPs (1 mg/mL). Vpravo: Červený posun absorbního maxima testovaných variant NPs. Jednotlivé hodnoty byly odečteny od absorpčního maxima HSA (260 nm). Vazba HSA na varianty CS NPs (CS-S, CS-D, CS-H) v po 30 min interakci. Intenzita signálu HSA byla vyhodnocena ColorTestem a přepočtena na signál HSA (10  $\mu$ g/ml).

## Závěr

V experimentu byl proveden design a charakterizace chitosanového nanotransportéru. Sledován byl zejména vliv stabilizace struktury kyselinou stearovou, dodecylsulfátem sodným a kyselinou hyaluronovou a interakce s nejvýznamnějším proteínem korony - albuminem. Zároveň test hemolytické aktivity CS NPs a jejich variant prokázal ne toxicitu nanotransportéru založeného na chitosanové struktuře pro krevní erytrocyty. Budoucí výzkumy mohou být orientovány na studium funkcionalizace povrchu CS-D NPs, který nejméně interagoval s albuminem a proto funkční skupiny na povrchu nanočástic mohou zachovat svoji reaktivitu.

### Seznam literatury:

1. Xiao, W. and H.L. Gao, *The impact of protein corona on the behavior and targeting capability of nanoparticle-based delivery system*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. **552**(1-2): p. 328-339.
2. Abdelkhalik, A., et al., *Impact of nanoparticle surface functionalization on the protein corona and cellular adhesion, uptake and transport*. Journal of Nanobiotechnology, 2018. **16**.
3. Zhao, D.Y., et al., *Biomedical Applications of Chitosan and Its Derivative Nanoparticles*. Polymers, 2018. **10**(4).
4. Oh, J.Y., et al., *Cloaking nanoparticles with protein corona shield for targeted drug delivery*. Nature Communications, 2018. **9**.
5. Zhang, H.J., et al., *Ligand Size and Conformation Affect the Behavior of Nanoparticles Coated with in Vitro and in Vivo Protein Corona*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2018. **10**(10): p. 9094-9103.
6. Ruzicka, J., et al., *Informační systém pro vážení*. PUV - národní s žádostí o zapsání do rejstříku, 2013. **26797**: p. 2013-28822.
7. Skalickova, S., et al., *Zinc-Modified Nanotransporter of Doxorubicin for Targeted Prostate Cancer Delivery*. Nanomaterials, 2017. **7**(12).

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 306/2018/FaF*

## Vytvorenie metódy pre dynamickú biorelevantnú disolúciu na prístroji Golem v2

Ivan Stupák<sup>1</sup>, Tomáš Bílik<sup>2</sup>, Jakub Vysloužil<sup>2</sup>, Jiří Dohnal<sup>3</sup>, Martin Čulen<sup>1</sup>  
*Ústav chemických liečiv<sup>1</sup>, Ústav technológie liek<sup>2</sup>, Ústav aplikovanej farmácie<sup>3</sup>, Fakulta farmácie,  
Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno*

### Úvod

Vývoj pokročilých *in vitro* disolučných testov predstavuje dôležitý posun vpred v predikcii *in vivo* správania orálnych liekových foriem. Za týmto účelom sa náš tím zameriava na inovatívnu *in vitro* disolúciu využitím dynamického biorelevantného disolučného zariadenia – Golem, ktorý simuluje fyziologickú disolúciu liekovej formy v ľudskom trakte. Pre plné zavedenie nášho prístroja bolo nevyhnutné stanovenie presnosti meraní a dôkladná optimalizácia základných parametrov. V úvode našej práce bol testovaný vplyv interindividuálnej variability na výsledky meraní. Štatistickým vyhodnotením, použitím faktora podobnosti bola dokázaná vyhovujúca variabilita medzi dvoma operátormi ( $56,70 < f_2 < 79,36$ ). V nasledujúcej časti práce, zameranej na štandardizáciu rozmerov disolučných kompartmentov bol testovaný vplyv umiestnenia ich vnútorného členenia. Z troch výškových variant členenia (9, 10 a 11 cm) u dvoch vybraných kompartmentov (typ B a C), bola dosiahnutá najvyššia robustnosť meraní a zároveň citlivosť k zmene disolučných podmienok konkrétne u variant B/10 cm a C/11 cm.

### Materiál a metodika

#### Tablety

Ako modelové liečivo boli vyrobené Ústavom technológie liek kofeínové tablety s okamžitým uvoľňovaním. Ploché tablety o priemere 7 mm boli pripravené priamym lisovaním (Korsh typ EK O) z homogenizovanej tabletovej zmesi (bezvodý kofeín 12,5% w/w; stearan horečnatý 2,0% w/w, mikrokryštalická celulóza Avicel PH 102 42,75% w/w; laktóza Pharmatose DCL 42,75% w/w). Tablety boli podrobené skúškam, ktoré pre hodnotenie tabliet predpisuje Ph. Eur. 8 (1).

#### Disolúcia na prístroji Golem v2

Disolúcia prebiehala na modifikovaných disolučných kompartmentoch s upraveným vnútorným členením, navrhnutých pre zvýšenie hydrodynamiky. Ako disolučné médium bol použitý fosforečnanový pufer (pH 6,8) o objeme 100 ml a 250 ml, prístrojovo temperovaný na  $37,0 \pm 5$  °C. Simulácia peristaltiky prístroja Golem v2 bola zvolená v dvoch rozličných rýchlostiach, 3 a 7 zdvihov za minútu (z celkového pracovného rozsahu 0-7). Vzorky média boli manuálne odoberané v 3., 8., 12., 17., 22., 27., 33., 40., 50. a 60. minúte od administrácie tablety do kompartmentu.

#### HPLC analýza

Vzorky k analýze boli filtrované (0,22  $\mu$ m) a následne podrobené vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografii (Agilent Technologies 1260 Infinity) na kolóne s reverznou fázou (Supercosil ABZ+Plus; 15 cm x 4,6 mm, 3  $\mu$ m). Ako metóda bola vyvinutá izokratická elúcia so zložením mobilnej fázy 50 mM octanu amónneho (pH 4) a metanolu (80:20, v/v), pri prietoku kolónou 1,5 ml/min, teplote 40 °C s objemom nástreku 10  $\mu$ l a pri spektrofotometrickej detekcii 294 nm. Namerané hodnoty boli graficky vyhodnotené ako závislosť uvoľneného kofeínu z tabliet v čase.

## Experimentálna časť

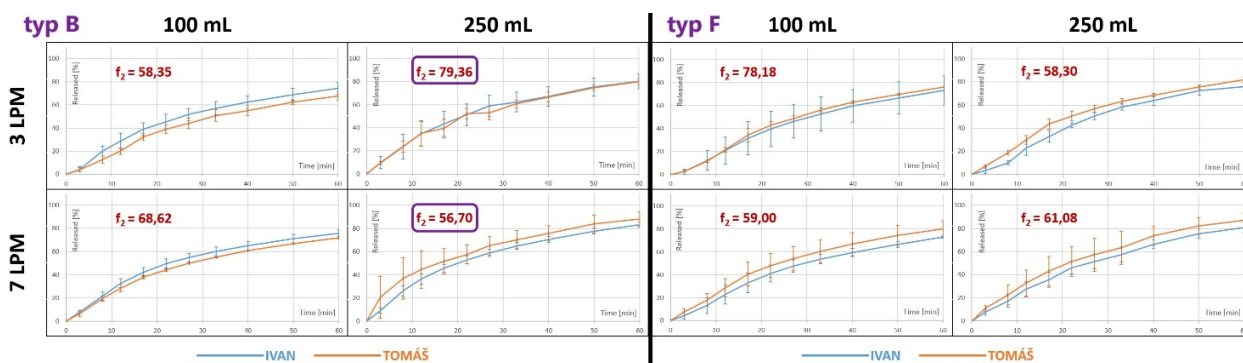
Dizajn experimentu vychádzal zo zistení predchádzajúcej štúdie zameranej na optimalizáciu disolučných kompartmentov (2). V úvode práce bol vyhodnotený vplyv interindividuálnej variability na presnosť meraní. Zvolené boli dva vlastnosťami rozdielne disolučné kompartmenty, typ B (robustný) a typ F (variabilný). Experiment prebiehal u každého operátora v rovnakých podmienkach ale v rozdielnom čase. Výsledky porovnania boli štatisticky vyhodnotené faktorom podobnosti ( $f_2$ ), počítané podľa vzorca 1. V druhej časti sme testovali vplyv výškového posunu vnútorného členenia dvoch vybraných kompartmentov (typ B a C), vzhľadom k pádlu zabezpečujúcemu peristaltiku. Navrhnuté k tejto štúdií boli ich 3 varianty podľa výšky miesta najväčšieho zúženia (9, 10 a 11 cm - merané od spodného okraja kompartmentu). Výsledky disolúcie boli porovnané na základe odchýlky meraní a dosiahnutej maximálnej koncentrácie liečiva na konci disolúcie.

$$f_2 = 50 \times \log \left[ \left( 1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0,5} \times 100 \right]$$

**Vzorec 1:** Vzorec pre výpočet faktora podobnosti ( $f_2$ ), hodnoty  $f_2 > 50$  vyjadrujú mieru podobnosti.

## Výsledky

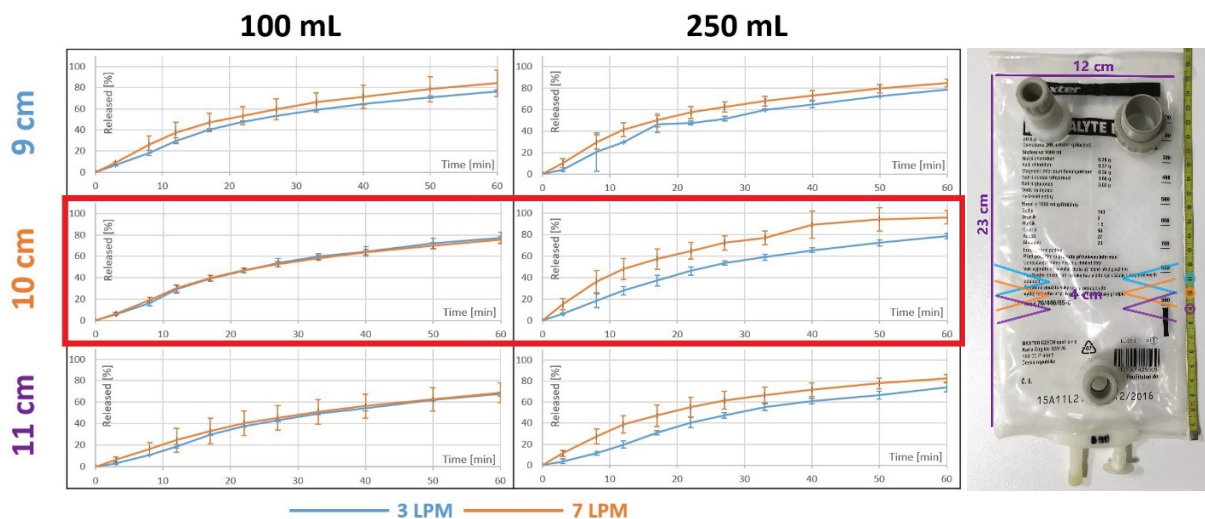
Základom testovania interindividuálnej variability boli 2 operátori a porovnávali sa dosiahnuté výsledky za rôznych disolučných podmienok (2 typy kompartmentov, 2 objemy média a 2 rýchlosti miešania). Štatistickým vyhodnotením, použitím faktora podobnosti bola dokázaná uspokojivá jednotnosť meraní medzi operátormi navzájom ( $56,70 < f_2 < 79,36$ ) aj napriek miestami zvýšenej variability u niektorých podmienok a modifikácií kompartmentov (Obr. 1).



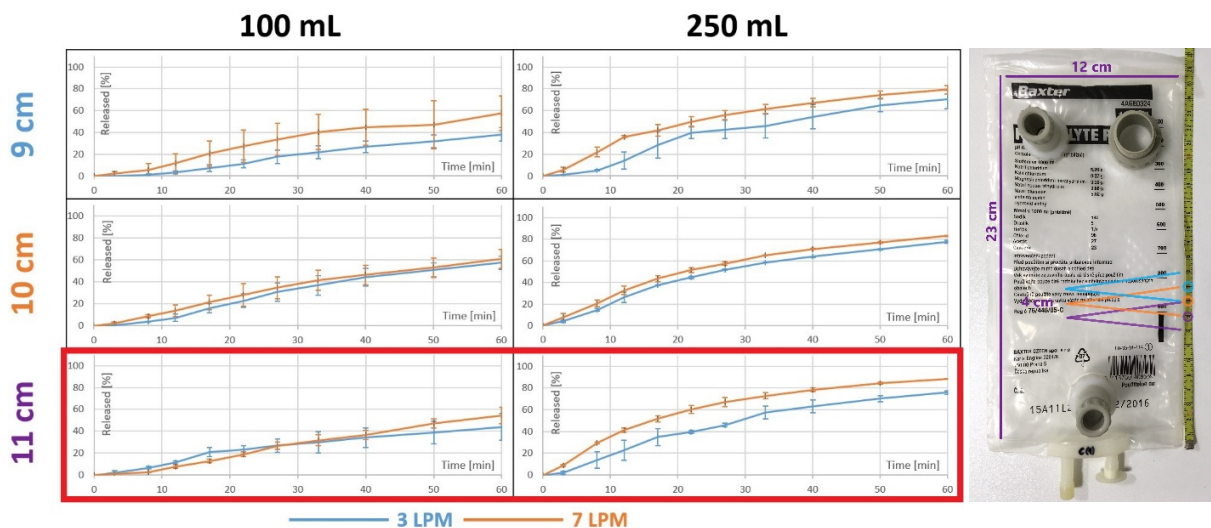
**Obrázok 1:** Porovnanie disolučných profilov medzi dvoma operátormi pri rôznych disolučných objemoch (100 a 250 mL) a rýchlostiach miešania (3 a 7 LPM) pre kompartmenty typu B a F.

Vzhľadom na výsledky z prechádzajúcej časti sme ďalej testovali vplyv umiestnenia vnútorného členenia disolučných kompartmentov. Vybrané k podrobnejšiemu testovaniu boli 2 kompartmenty (typ B a C) a ich 3 varianty podľa výšky zúženia (9, 10 a 11 cm). Spolu s výsledkami disolúcie znázornené na obrázku 2 a 3. Pozorovaná u týchto kompartmentov bola rýchlosť disolúcie v rôznych disolučných podmienkach (objem média a rýchlosť miešania). V kombinácii najnižšia rýchlosť a objem a zase naopak, bol dosiahnutý najväčší rozdiel v množstve uvoľneného liečiva v 60. minúte, 76/96% (typ B/10

cm) a 44/88% (typ C/11 cm). Zároveň, u týchto dvoch variant bola dosiahnutá najvyššia robustnosť meraní, median RSD < 14 (typ B/10 cm) a median RSD < 25 (typ C/11 cm). Tieto zistenia vymedzujú pracovný rozsah vybraných kompartmentov, v rámci ktorého vieme kontrolovať rýchlosť disolúcie a jej presnosť.



**Obrázok 2:** Porovnanie disolučných profilov pre jednotlivé varianty kompartmentu B pri rôznych disolučných objemoch (100 a 250 mL) a rýchlostiach miešania (3 a 7 LPM). Z toho zvýraznená varianta B/10 cm ako najlepšia na základe robustnosti meraní (median RSD < 14) a citlivosti k zmene podmienok dosiahnutím koncentrácie uvoľneného liečiva v 60. min (75% < c60 < 96%).



**Obrázok 3.** Porovnanie disolučných profilov pre jednotlivé varianty kompartmentu C pri rôznych disolučných objemoch (100 a 250 mL) a rýchlostiach miešania (3 a 7 LPM). Z toho zvýraznená varianta C/11 cm ako najlepšia na základe robustnosti meraní (median RSD < 25) a citlivosti k zmene podmienok dosiahnutím koncentrácie uvoľneného liečiva v 60. min (44% < c60 < 88%).



### **Záver**

Výhodou nášho prístroja oproti klasickým disolučným prístrojom je jeho komplexnosť, ktorá však zároveň kladie vyššie nároky na obsluhu. Bolo nevyhnutné stanoviť presnosť meraní dôkladnou optimalizáciou základných parametrov prístroja Golem v2. Z toho dôvodu bol testovaný vplyv interindividuálnej variability na reprodukovateľnosť meraní a zároveň bol štandardizovaný rozmer disolučných kompartmentov, čo viedlo k určeniu variability a pracovného rozsahu u jednotlivých variant skúmaných kompartmentov. Pre vytvorenie spoľahlivej metódy pre dynamickú biorelevantnú disolúciu sú tieto zistenia kľúčové.

### **Zoznam literatúry:**

1. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. European Pharmacopoeia, 8th ed.; Council of Europe: Strasbourg, France, 2013; Volume 1, Chapter 4.1.3.; p. 542.
2. Stupák, I.; Pavloková, S.; Vysloužil, J.; Dohnal, J.; Čulen, M. Optimization of Dissolution Compartments in a Biorelevant Dissolution Apparatus Golem v2, Supported by Multivariate Analysis. *Molecules* 2017, 22, 2042.

***Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 319/2018/FaF***

## Antimikrobiálně a protizánětlivě aktivní geranylované flavonoidy izolované z plodů *Paulownia tomentosa*

Alice Sychrová<sup>1</sup>, Anna Hudcovičová<sup>1</sup>, Klaudia Harbutová<sup>1</sup>

Ústav přírodních léčiv<sup>1</sup>, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

### Úvod

*Paulownia tomentosa* je strom pocházející z Číny, dorůstající 15–25 m, s vejčitými listy a zvonkovitými modrými květy. Je vysazována i v teplejších oblastech Evropy a nedávno rostla jako dekorativní strom v areálu VFU Brno. Užívá se především v tradiční Čínské medicíně k terapii bronchitidy, astmatu, konjunktivitidy, enteritidy, kapavky, tonsilitidy atd. Mezi nejvýznamnější obsahové látky patří fenolové glykosidy, lignany, furanochinony, iridoidy a flavonoidy. Všechny tyto složky a zejména geranylované flavonoidy jsou nyní intenzivně zkoumány pro své zajímavé biologické aktivity. Z rostliny byla na ústavu již dříve izolována celá řada nově popsanych látek. Jedná se o bohatý zdroj geranylovaných flavonoidů s prokázanou *in vitro* (Hanáková et al., 2015, 2017) a *in vivo* (Vočyánová et al., 2015) protizánětlivou aktivitou. Dále schopností eradikace rezistentních druhů bakterií, např. MRSA samostatně (Navrátilová et al., 2013) nebo v kombinaci s antibiotiky (Navrátilová et al., 2016).

### Materiál a metodika

Separace rostlinného materiálu

Separace podílů získaných z ethanolickeho extraktu plodů *P. tomentosa* probíhala pomocí standardních technik vytřepávání mezi nemísitelná rozpouštědla a pomocí sloupcové chromatografie s použitím silikagelu a mobilních fází, tvořených z různých poměrů nepolárních rozpouštědel. Získané frakce byly jímány do baněk cca po objemech 150 ml, odpařeny pomocí vakuové rotační odparky (BÜCHI Rotavapor B–480, Switzerland), a spojeny pomocí TLC (F<sub>254</sub> 20×20 cm, Merck) na základě podobnosti látek a jejich retenčních faktorů. Frakce byly analyzovány pomocí analytické HPLC (Agilent HP1100 s UV-Vis DAD, USA). Ty, které obsahovaly látky s elektronovými spektry, která se neshodovala s knihovnou spekter ÚPL, a jednotlivé píky vykazovaly dostatečnou intenzitu a rozdíl v retenčních časech, což je podmínka pro následnou izolaci, byly dále separovány pomocí preparativní HPLC (Young Lin, Korejská republika) s použitím preparativní kolony Ascentis RP-Amide 25×1 cm, 5 μm (Supelco, USA) nebo preparativní TLC (skleněné desky 20×20 cm, 500 μm, Merck) (viz. schéma č. 1). Všechny frakce a získané látky byly porovnány s knihovnou spekter ÚPL. Získané čisté látky byly lyofilizovány a postoupeny identifikačním spektrometrickým metodám.

Testování antimalarické aktivity

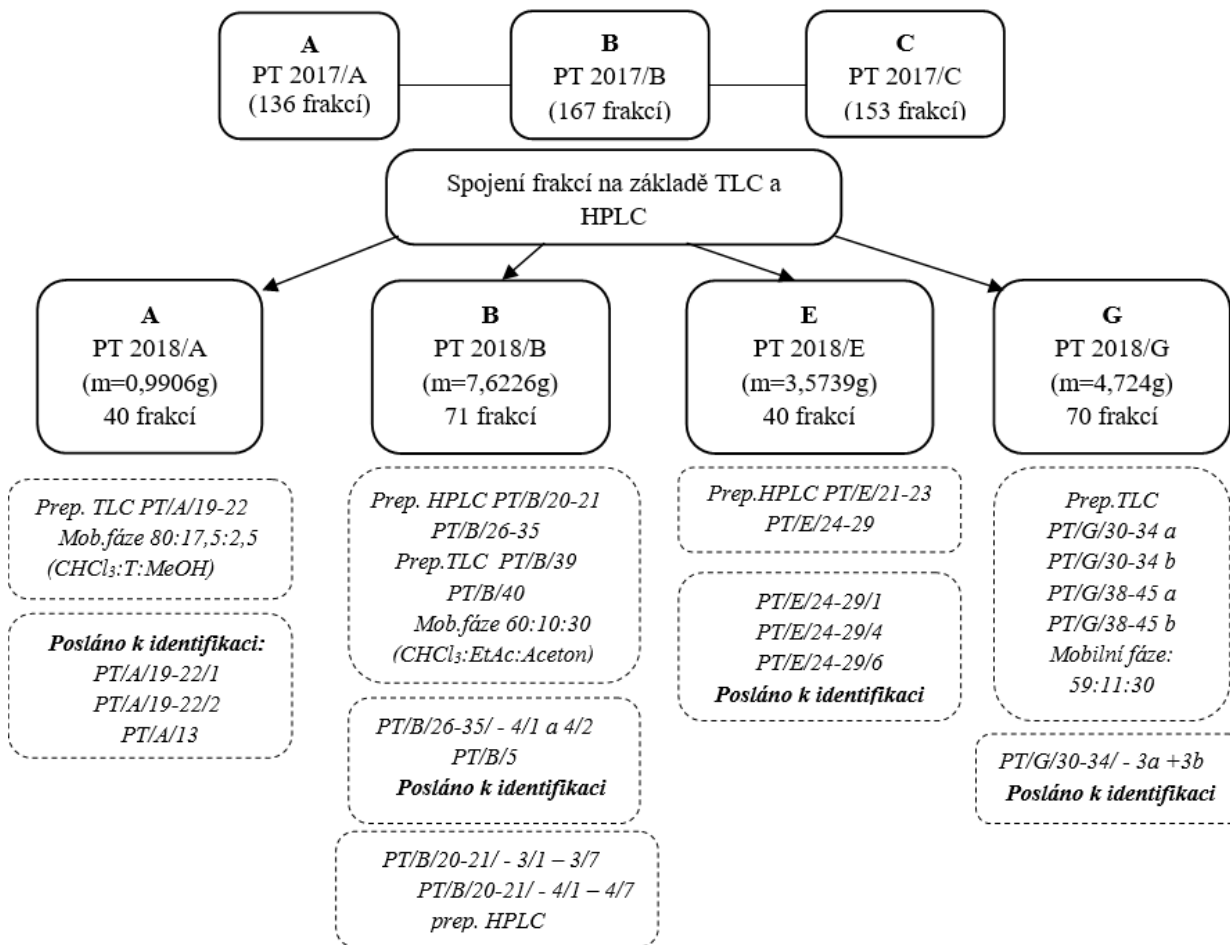
Testy probíhaly ve výzkumném centru léčivých rostlin peruánské Amazónie (CIRNA-UNAP) pod dohledem profesorky Ruiz-Mesia Lastenie. Chlorochin rezistentní *Plasmodium falciparum* (FCR3) bylo kultivováno pomocí RPMI média, erytrocytů dárce, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, a 90% N<sub>2</sub>, účinkujících po dobu 1 minuty. Kultivační baňky byly inkubovány 48 hodin při t=37 °C. Denně bylo měněno médium a

kontrolována parazitémie (Giemsovo barvení krevního nátěru). Hodnocení citlivosti probíhalo *in vitro*. Mikrotitrační destičky obsahovaly 100 µl parazitické směsi a 100 µl připravených koncentrací roztoků v DMSO. Destičky se inkubovaly 48 hodin a poté barvily 10 µg/ml ETB pro označení parazitovaných erytrocytů. Jamky se promyly 2x PBS a výsledky se měřily na průtokovém cytometru FL2 (procento parazitémie). Objem ne/parazitovaných erytrocytů, které se mají přidat, byl vypočítán dle vzorce:  $V_1 \times C_1 = 280 \mu\text{l} \times 2\%$ , kde  $V_1$  je množství parazitovaných erytrocytů, které je potřebné přidat a  $C_1$  je parazitémie dané kultury. Následně se doplní objem ( $V_1$ ) do 280 µl neparazitovanými erytrocyty. 100 µl směsi erytrocytů se smísilo se 100 µl připravených koncentrací testovaných látek, v triplicátu. Destičky byly umístěny do exsikátoru, uvnitř něhož byla zapálena svíčka a víko bylo utěsněno parafilmem. Destičky se nechaly inkubovat při teplotě 37°C po dobu 48 hodin. Po inkubaci se destičky 2x centrifugovaly, promyly se 100 µl PBS, přidalo se 100 µl ETB do každé jamky a nechalo se inkubovat 30 minut při teplotě 37°C. Následně byly vzorky resuspendovány s 200 µl PBS a přeneseny do označených zkumavek typu FACS a měřeny v průtokovém cytometru FL2.

### Výsledky

Chloroformový podíl byl zpracován v rámci 7 následných sloupcových chromatografií. Ze tří kolon bylo získáno celkem 456 frakcí, které byly vzájemně porovnány a spojeny pomocí TLC a HPLC analýzy. Frakce vykazující píky dostatečné intenzity, jejichž spektra se neshodovala se spektry knihovny UPL, byly dále separovány na subfrakce A-G, jejichž zpracování vedlo k získání dalších 221 subfrakcí. Následovala separace za pomoci preparativní TLC nebo semipreparativní HPLC analýzy s cílem izolace čistých látek (viz. schéma č. 1). 10 látek bylo získáno v čistotě (dle UV) >85% a v dostatečném množství, aby bylo možné je strukturně popsat dle výsledků z MS a NMR analýzy, která bude probíhat ve spolupráci se zahraničními pracovišti. Elektronová spektra získaných látek byla porovnána s knihovnou spekter ÚPL a dle výsledků očekáváme získání látek typu flavanonů, jejichž spektra se ale neshodovala s dříve izolovanými majoritními flavanony s nesubstituovaným geranylovaným řetězcem a dále flavanonů se zacykleným geranylem. Dalších 5 subfrakcí je finálně přečišťováno. Vybrané látky z *P. tomentosa* byly testovány na antimalarickou aktivitu, kde se jako nejúčinnější jevil 3'-O-methyl-5'-methoxydiplakon s  $IC_{50}=0.7 \mu\text{g/mL}$  (Tab. č.1). Získané výsledky byly prezentovány na konferenci s mezinárodní účastí (23. Seminář- Aktuální otázky pěstování LAKR) v Olomouci formou posteru.

Schéma č.1



Byla vypočtena procenta inhibice pro koncentrace 0.1, 1 a 10 µg/mL dle následujícího vzorce:

$$\text{Procento inhibice} = \frac{\text{Parazitémie NK} - \text{parazitémie testované látky}}{\text{parazitémie NK}}$$

A získané hodnoty sloužily ke stanovení  $IC_{50}$ :

$$\log (IC_{50}) = \log (X_1) - (50 - Y_1/Y_2 - Y_1) [\log X_2 - \log X_1]$$

(Kde  $X_1$  je koncentrace léčiva, která má hodnotu parazitémie  $Y_1 > 50\%$  a  $X_2$  je koncentrace léčiva, která má hodnotu parazitémie  $Y_2 < 50\%$ ).

Tabulka č.1

Testovaná látka	IC <sub>50</sub> µg/mL				
	1. opak.	2. opak.	3. opak.	Průměr	SD
3'-O-methyl-5'-hydroxydiplakon	5.4	2.4	4.3	4	1.52
Diplakon	4.4	3	4	3.8	0.72
Mimulon	5	1.6	5.5	4	2.12
Schizolaenon C	2.9	0.7	5.4	3	2.35
3'-O-methyl-5'-methoxydiplakon	0.6	0.7	0.9	0.7	0.15

**Seznam literatury:**

- HANÁKOVÁ, Zuzana, et al. C-geranylated flavanones from Paulownia tomentosa fruits as potential anti-inflammatory compounds acting via inhibition of TNF- $\alpha$  production. *Journal of natural products*, 2015, 78.4: 850-863.
- HANÁKOVA, Zuzana, et al. Anti-inflammatory activity of natural geranylated flavonoids: Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitory properties and proteomic analysis. *Journal of natural products*, 2017, 80.4: 999-1006.
- NAVRÁTILOVÁ, Alice, et al. Minor C-geranylated flavanones from Paulownia tomentosa fruits with MRSA antibacterial activity. *Phytochemistry*, 2013, 89: 104-113.
- NAVRÁTILOVÁ, Alice, et al. C-Geranylated flavonoids from Paulownia tomentosa fruits with antimicrobial potential and synergistic activity with antibiotics. *Pharmaceutical biology*, 2016, 54.8: 1398-1407.
- VOCHYÁNOVÁ, Zora, et al. Diplacone and mimulone ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Fitoterapia*, 2015, 101: 201-207.

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 310/2018/FaF*

## Design, syntéza a *in vitro* testování aktivity potenciálních inhibitorů aminopeptidasy N

Peter Zubáč, Oldřich Farsa, Nikola Čalkovská, Kristián Pršo

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Aminopeptidasa N (syn. membránová alanyl aminopeptidasa, leucinová aminopeptidasa nebo také aminopeptidasa M, dále jen APN) je Zn-dependetní metaloexopeptidasa, která štěpí peptidovou vazbu na volném N-konci oligo- až polypeptidického řetězce. Má širokou substrátovou specifitu a patří mezi běžně se vyskytující peptidasy v savčím organismu. Tento multifunkční integrální membránový protein se nalézá přednostně v kartáčovém lemu membrán ledvin, v sliznici tenkého střeva, v játrech, v placentě, dále též v lymfocytech, neutrofilech, na různých místech CNS aj. APN se podílí na degradaci velkého množství biologicky aktivních peptidů, kupř. enkefalinů, endorfinů, neurokininů, vazomotorických peptidů (angiotensiny, somatostatin), cytokinů (interleukiny) a jiných peptidických hormonů. APN je dokonce totožná s povrchovým antigenem CD13, který je „vstupnou branou“ pro některé viry, jako např. savčí koronaviry, cytomegalovirus a TGEV. Látky působící inhibičně na aktivitu APN vykazují tedy široké spektrum farmakologických účinků. Na úrovni CNS působí inhibitory APN zejména analgeticky a antinocicepčně, ovšem bez typických nežádoucích účinků exogenních opioidů (např. morfinu). Mimo CNS se inhibitory APN vyznačují zejména antineoplastickým a antimetastatickým účinkem. Jelikož je APN ve zvýšené míře exprimována v buňkách karcinomu kůže, vaječnicků, štítné žlázy, plic, žaludku, tlustého střeva, ledvin, kostí a prostaty, představují inhibitory APN slibnou terapeutickou skupinu v léčbě těchto nádorů, nebo jejich metastáz. [1][2]

Jakýmsi "standardem" mezi inhibitory APN je bestatin, známý též pod INN ubenimex. Jedná se pseudodipeptid, který vykazuje inhibiční účinek na celou řadu aminopeptidas. V současnosti se zkoumá jeho využití v léčbě některých druhů akutní leukemie, ovšem jeho toxicita a relativní neselektivita brání jeho širšímu využití v medicíně. Mezi další peptidové inhibitory APN patří amastatin, aktinoin, phebestin, probestin, leuhistin a dokonce i kurkumin. Do dnešní doby bylo připraveno také velké množství syntetických inhibitorů APN různých chemických struktur. Významný je např. tosedostat, který je proléčivem aktivní kyseliny CHR-79888. Momentálně se nachází ve fázi klinického testování v léčbě akutní myeloidní leukemie. [3]

Cílem naší práce je vývoj syntetických inhibitorů APN dvou různých strukturních sérii. První strukturní série zahrnuje syntetické inhibitory APN typu nesymetrických diacylhydrazinů s bazickými (i heterocyklickými) aminy ve své molekule, což umožní tvorbu ve vodě dobře rozpustných solí s různými anorganickými i organickými kyselinami. Jistou podskupinou této série jsou různé (alkyl)kvarterní deriváty těchto aminů, u kterých lze předpokládat selektivně periferní účinek, jelikož jako kladně nabitě molekuly by neměli pro svou polaritu prostupovat do CNS. Druhá strukturní série představuje inhibitory APN typu syntetických pseudo(di)peptidů, rovněž s bazickými (heterocyklickými) aminy ve své molekule. Kromě toho je karboxylová funkční skupina těchto derivátů transformována na alkylester (viz analogie s tosedostatem) nebo na hydroxamovou kyselinu. Ovšem metodika syntézy těchto hydroxamových kyselin není ještě zcela optimalizována.

## Materiál

K synthese byly použity komerčně dostupné chemikálie tříd čistoty *purum* a *pro analysi*. Část chemikálií byla již k dispozici (v držení Ústavu chemických léčiv, dále jen ÚChL), větší část však byla zakoupena výhradně pro účely projektu, a to zejména od společností Merck™ a Sigma-Aldrich™. Použitá rozpouštědla od spol. Lach-Ner™ byla užitá přímo, nebo byla upravena sušením *ex tempore* za použití standardních metodik sušení rozpouštědel.

Pro stanovení inhibiční aktivity vůči APN byl použit komerčně dostupný enzym, izolovaný z prasečích ledvin od spol. Sigma-Aldrich™, stejně tak i chromogenní substrát: L-leucin-p-nitroanilid (L-Leu-pNA), pufrý a další chemikálie. Ze zásob ÚChL pocházel jak p-nitroanilin, tak i použitý standard inhibitoru APN, 1,10-fenanthrolin (o-fenanthrolin) *p.a.*. Ke zpracování dat byl použit tabulkový procesor Microsoft™ Excel™ a biochemický software GraFit™.

## Metodika

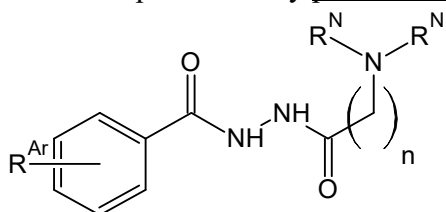
Látky první strukturní série byly syntetizovány z příslušně substituovaných benzoových, resp. arylkarboxylových kyselin. Ty byly převedeny na methylester kyselý katalyzovanou esterifikací nebo thionylchloridem v bezvodém methanolu. Následně byly podrobeny hydrazinolýze roztokem hydrazinhydrátu v ethanolu nebo 1-propanolu za refluxu. Připravené hydrazidy byly chloracylovány příslušným chloracylchloridem v prostředí kyseliny octové. Takto získané N'-chloracyl-N-arylhydrazidy reagovaly se sekundárními aminy (dialkylaminy, heterocykly: pyrrolidin, piperidin, morfolin, azepan, N-substituované piperaziny) za vzniku první skupiny látek této strukturní série. Druhá skupina byla připravena kvarternizací látek první skupiny pomocí methyljodidu, ethylbromidu a benzylbromidu v acetonu, resp. butan-2-onu.

Synthesa látek druhé strukturní série vycházela z hydrochloridů-methylesterů příslušných aminokyselin, které byly připraveny reakcí dané aminokyseliny s thionylchloridem v bezvodém methanolu nebo byly zakoupeny. Tyto soli (hydrochloridy) byly převedeny na volné methylestery aminokyselin a následně byly chloracylovány příslušnými chloracylchloridy. Vzniklé produkty reagovaly se sekundárními aminy (zejména heterocyklickými, viz výše) za vzniku substituovaných pseudodipeptidů. Část z nich byla převedena na soli (oxaláty), část byla podrobena reakci s hydroxylaminem za vzniku hydroxamových kyselin. Ovšem tato část synthesy ještě není zcela optimalizována. Kromě toho byly experimentálně připraveny i další deriváty těchto pseudodipeptidů (N-alkylamidy a podobně). U všech látek (kde to bylo možné) byla stanovena teplota tání kapilárním bodotávkem Büchi™ 520 a provedena TLC na deskách Merck™ 60 F<sub>254</sub> (detekce UV zářením při 254 nm nebo vizualizace párami jodu). Strukturní charakterizace byla provedena IČ spektrometrií na přístroji Nicolet™ Impact FTIR, <sup>1</sup>H- a <sup>13</sup>C-NMR spektra byla získána na NMR spektrometru Jeol™ JNM-ECZ400R s pracovní frekvencí 400 MHz pro <sup>1</sup>H.

Stanovení inhibiční aktivity vůči APN bylo provedeno na přístroji BioTek™ Cytation™ 3 Reader za použití 96-jamkových mikrotitračních destiček. Testovaná látka byla inkubována spolu s enzymem a chromogenním substrátem (L-leucin-p-nitroanilid) v příslušném pufru. Ve stanovených časových intervalech bylo provedeno měření absorbance při 405 nm, což odpovídá abs. maximu p-nitroanilinu, uvolněnému z chromogenního substrátu enzymatickou hydrolýzou. Z naměřených hodnot absorbance byla IC<sub>50</sub> vypočítána pomocí programu GraFit.

## Výsledky

Připravené látky první strukturní série odpovídají obecnému vzorci v uvedeném schématu:



$R^{Ar}$  = H; 2-OH; 4-OH; 4-OCH<sub>3</sub>; 2-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

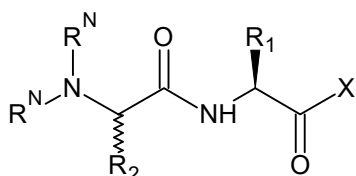
$R^N$  = butyl *nebo tvoří součást těchto heterocyklů:*

pyrrolidin, piperidin, morfolin, azepan, *subst.* piperazin

$n$  = 1 nebo 2

Připravené látky druhé strukturní série odpovídají

obecnému vzorci v uvedeném schématu:



$R^1$  = CH<sub>3</sub>; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>; CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>

$R^2$  = H nebo CH<sub>3</sub>

$R^N$  *tvoří součást těchto heterocyklů:* piperidin, morfolin (azepan, *subst.* piperazin)

$X$  = OCH<sub>3</sub> nebo NHOH

V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty IC<sub>50</sub> látek, které se ukázali jako nejúčinnější. Hodnoty IC<sub>50</sub> ostatních látek jsou již vyšší (někdy až řádově), proto v tabulce nejsou uvedeny. Ovšem pro srovnání byly do tabulky zahrnuty i hodnoty kvarterních látek 1. strukturní série, což dokazuje, že tyto látky mají hodnoty IC<sub>50</sub> cca o řád vyšší a jako inhibitory APN se tudíž moc neosvědčili.

Kód látky	Strukturní série	IC <sub>50</sub> [mmol.dm <sup>-3</sup> ]
1,10-fenanthrolin	<i>standard</i>	0,4136
ZH-1102	1.	1,4125
ZH-1103	1.	2,5043
ZH-2102	1.	2,2367
ZH-2103	1.	0,5834
ZH-3202	1.	10,900
ZH-1202Bn <sup>+</sup> Br <sup>-</sup>	1. kvart.	60,200
ZH-1203Et <sup>+</sup> X <sup>-</sup>	1. kvart.	14,700



### **Závěry**

Spolu bylo připraveno více než 20 originálních látek v rámci obou strukturních sérií. Nejúčinnějším inhibitorem APN se ukázala být látka ZH-2103, chemicky 2-hydroxy-N'-(2-morfolinoacetyl)benzhydrazid. Její strukturní optimalizace proto do budoucna umožní získat látky, které svou účinností předčí i standard (1,10-fenanthrolin).

### **Reference**

- [1] MINA-OSORIO, Paola. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. Trends in Molecular Medicine [online]. 2008, 14(8), 361-371 [cit. 2017-12-05]. DOI: 10.1016/j.molmed.2008.06.003. ISSN 14714914. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491408001342>
- [2] RAWLINGS, Neil D. a G. SALVESEN. Handbook of proteolytic enzymes. Third edition. /. Amsterdam: Elsevier/AP, 2013. ISBN 9780123822192.
- [3] BAUVOIS, Brigitte a Daniel DAUZONNE. Aminopeptidase-N/CD13 (EC 3.4.11.2) inhibitors: Chemistry, biological evaluations, and therapeutic prospects. Medicinal Research Reviews [online]. 2006, 26(1), 88-130 [cit. 2017-12-05]. DOI: 10.1002/med.20044. ISSN 0198-6325. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/med.20044>

*Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 304/2018/FaF*

Editovali:	<p>doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.  prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.  doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.  prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM  doc. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.  doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.  doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.</p>
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	219
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2018

**978-80-7305-811-1**