

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

BRNO 2016

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2016

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2016 financovaných z prostředků účelové podpory
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2016

Editovali:

doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D.

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.

prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc.

doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2016

ISBN 978-80-7305-783-1

Vážené kolegyně / Vážení kolegové

Sborník, který právě otvíráte, je výstupem, kde jsou prezentovány příspěvky k projektům, které byly řešeny v rámci specifického výzkumu prostřednictvím konference **Interní grantové agentury** Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Právě **konference**, je tou nejzajímavější částí, která nám opět nabízí mnoho inspirace v oblastech veterinárních, veterinárně-hygienických, potravinářských, farmaceutických věd.

Spolupráce mladých pracovníků a jejich vědeckých školitelů podporuje možnosti, jak navzájem spolupracovat při různorodém odborném zaměření a tvoří podstatu výzkumu a úsilí všech zapojených.

Děkuji všem

řešitelům, spoluřešitelům, školitelům, oponentům, posuzovatelům,
a hlavně komisi IGA VFU za vzájemnou spolupráci.

doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA

předsedkyně IGA komise VFU

OBSAH

Příspěvky FVL

Zavedení moderních metod v diagnostice respiračních infekcí koček a sledování prevalence jednotlivých patogenů.....	2
Detekce mastocytů v pohlavních orgánech koček v různých fázích pohlavního cyklu.....	6
Kytovci jako model volně žijících zvířat indikujících kontaminaci vodního prostředí parazitem <i>Toxoplasma gondii</i>	9
Odpadní vody jako potenciální zdroj multirezistentní <i>E. coli</i> pro volně žijící zvířata.....	13
Studium vlivu přírodních látek na buněčné kultury fibroblastů působením přes signální dráhu NF- κ B	17
Imunohistochemická analýza odontogenních novotvarů.....	21
Hodnocení vlivu kapsaicinu na diethylnitrosaminem indukovanou hepatokarcinogenezi u myší	24
Srovnání tří elektrokardiografických přístrojů pro diagnostiku kardiovaskulárních poruch u plazů	28
Kongenitální anomálie páteře u králíků.....	34
Neinvazivní markery jaterní fibrózy v diagnostice chronických hepatopatií u psů.....	38
Vliv stimulačního efektu implantátu s deslorelinem na kvalitu a konzervovatelnost ejakulátu psů	42
Vliv deslorelin acetátu (Suprelorin®) na ovariální aktivitu samic gekončíka nočního (<i>Eublepharis macularius</i>).....	46
Intraluteální aplikace cloprostenolu u dojeného skotu.....	50
Využití nového biomateriálu s nanovláknky k léčbě defektů kostní tkáně.....	54
Vliv nedostatku železa na ukazatele oxidačního stresu selat.....	57
Metody odběru, vyšetření a mrazení ejakulátu oslích hřebců (<i>Equus asinus</i>).....	60
Rozdíly v bakteriální mikrobiote trusu u koní zdravých a koní trpících hnačkovým onemocněním.....	65

Příspěvky FVHE

Nejvýznamnější nákazy obojživelníků ve volné přírodě a v záchranných chovech.....	72
Posouzení zdravotního stavu dravců a sov v záchranných centrech: biochemická, hematologická a parazitologická studie.....	76
Salt reduction in sushi meal.....	80
Vliv solné koupele na vybrané ukazatele pstruha duhového při léčbě proliferativního onemocnění ledvin.....	84
Identifikace <i>Helicobacter</i> spp. s využitím metody sekvenování.....	88
The effect of packaging on selected freshness parameters of chicken broilers meat from organic production system.....	92
Vliv imunostimulantů na míru oxidativního stresu u pstruha duhového po infekci bakterií <i>Aeromonas salmonicida</i>	96
Antibiotická rezistence ichtyo-patogenních kmenů aeromonád v kaprovém rybníkářství...100	
Molekulární taxonomie všenek (Phthiraptera) ptáků Latinské Ameriky.....	105
<i>In vitro</i> buněčný model pro hodnocení účinku léčiv na vybrané druhy zvěře.....	108
Zdravotní problematika starších koček s ohledem na jejich potřeby.....	113
Endoparazitární infekce u středoevropských netopýrů.....	117
Obsah cholesterolu a vybraných vitaminů v kobyším mléce.....	121
Vliv tepelného opracování na aktivitu stafylokokových enterotoxinů v mléce.....	125
Citlivost spor mikrosporidie <i>Nosema ceranae</i> k dezinfekčním činidlům.....	129
Hodnocení exotického a tuzemského ovoce českého trhu z pohledu kvality, antioxidační aktivity a fází zralosti.....	133
Vliv zpracovatelských technologií a izolačních postupů na kvalitu DNA v tuňákových výrobcích	137
Rezidua antidepresiv v povrchových vodách – vliv na raná vývojová stádia ryb.....	141
Stanovení základních chemických parametrů zvěřiny prasat divokých.....	144
Stanovení diverzity <i>Listeria monocytogenes</i> v potravinovém řetězci v České republice.....	148
Vliv porušení medu sacharidovými sirupy na jeho jakost a zdravotní nezávadnost.....	152

Příspěvky FaF

Příprava inovativního nosiče pro enzymatickou detekci inhibitorů cholinesteráz.....	157
Obsahové látky <i>Coleus blumei</i> Benth. a <i>Coleus caninus</i> (Roth.) Vatke jako inhibitory prozápalových mediátorov.....	161
Vývoj vaginální kroužků pro veterinární použití.....	165
Enzymatické stanovení glukózy pro hodnocení disolučního profilu pelet s řízeným uvolňován	169
Syntéza derivátů 1,3,5-triazinu obsahujících nové chalkonové, triazolové a další dusíkaté strukturální motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „Zelené chemie“.....	173
Studium duální inhibiční aktivity prenylovaných sloučenin z <i>M. alba</i>	177
Hodnocení nově syntetizovaných antibakteriálních chemoterapeutik.....	180
Vplyv olanzapínu na sérové koncentrácie adipokínov u animálneho modelu schizofrenie	184
Vliv risperidonu na sérové hladiny adipokinů u animálního modelu schizofrenie....	188
Syntéza inhibitorů protein kinas jako nových potenciálních antimikrobiálních sloučenin...	192
Vliv derivátů hydroxynaftalenkarboxanilidu na enzymatickou aktivitu DNA topoizomeráz	196
Stanovení vybraných fyzikálně-chemických vlastností derivátů arylkarbonyloxyaminopropanolů separačními technikami.....	200
Izolace obsahových látek <i>Sceletium tortuosum</i> a stanovení jejich protizánětlivé a antibakteriální aktivity.....	204
Testování nově syntetizovaných lokálně hemostatických látek.....	208
Stereoselektivní syntéza derivátů arylkarbonyloxyaminopropanolu a stanovení jejich fyzikálně-chemických vlastností.....	212
Syntéza vybraných synthonů Largazolu a totální syntéza jeho analogů.....	216
Studium antiproliferačních účinků prenylovaných flavonoidů z <i>Paulownia tomentosa</i> u lidské nádorové buněčné linie.....	221
Syntéza a charakterizace alkylesterů arylaminopropanolů a jejich prekurzorů	225

Příspěvky

Fakulty veterinárního lékařství

Zavedení moderních metod v diagnostice respiračních infekcí koček a sledování prevalence jednotlivých patogenů

Dana Lobová^{1,2}, Vendula Kleinová¹, Petra Šnajdrová¹

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹; CEITEC, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Respiratorní infekce koček jsou považovány za multifaktoriální onemocnění s nespecifickými klinickými příznaky, které bývají často reprezentovány záněty spojivek, záněty nebo ulceracemi horních, méně často i dolních cest dýchacích, které se projevují serózními až mukopurulentními výtoky ze spojivkového vaku nebo z horních cest dýchacích (Konvalinová a kol., 2016). Hlavní role v tomto komplexu onemocnění je přisuzována herpesviru koček (Feline herpesvirus-1, FHV) a kaliciviru koček (Feline calicivirus, FCV). Z bakteriálních patogenů jsou významnými druhy *Mycoplasma felis*, *Chlamydia felis* a *Bordetella bronchiseptica*. (Sykes 2014; Lister a kol, 2015). Část původců má zoonotický a epidemiologický potenciál (*B. bronchiseptica*, *M. felis*, *Ch. felis*) a to především u imunosuprimovaných jedinců. (Hartley a kol., 2001).

Cílem tohoto projektu bylo mapování původců respiračních patogenů koček a především diferenciací virových a bakteriálních původců s ohledem na vhodnost antibiotické léčby. Významným cílem bylo též zavedení metod molekulární biologie, především metodu Real Time PCR, nested RT-PCR do rutinní diagnostiky původců. Dále pak charakterizace kmenů na úrovni genomu pomocí sekvenování, odlišení vakcinačních a terénních kmenů porovnáním získaných sekvencí s databází GenBank.

Konečným cílem bylo pak zajištění diagnostického a konzultačního servisu pro veterinární veřejnost, zejména pro chovatele koček a rozšíření spolupráce diagnostické laboratoře a klinických pracovišť.

Materiál a metodika

Vyšetřované vzorky:

Celkem bylo ve studii vyšetřeno 218 koček, od kterých bylo odebráno 177 vzorků suchých stěrů orofaryngeálních a 70 stěrů z oční spojivky. Bylo zaregistrováno celkem 149 koček chovaných v domácím prostředí (indoor) a 69 koček venkovních (outdoor). Vzorky pocházely především z chovů koček nemocných, s akutním nebo chronickým respiračním projevem onemocnění a ojediněle z chovů zdravých zvířat.

Detekce viru:

Byla prováděna z homogenizovaného vzorku použitím komerčních extrakčních kitů podle instrukcí výrobce:

- Virová RNA kitem NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel)
- Bakteriální i virová DNA kitem NucleoSpin Blood DNA, (Machery-Nagel)
- Společná extrakce NK (DNA/RNA) kitem High Pure viral nucleic acid kit (Roche)

Získaná RNA a DNA byla ihned použita pro amplifikaci nebo zamražena při -80 °C do dalšího použití.

Detekce a kvantifikace calicivirové RNA byla provedena komerčním kitem Xceed qPCR SG 1step 2x Mix Lo-ROX (100 rxns) v celkovém objemu 20 µl podle návodu výrobce na přístroji Light Cycler® 480 II (Roche). Primery byly použity dle publikace (Helps a kol., 2002).

Virová DNA (FHV1) byla detekována a amplifikována metodou nested PCR v přístroji Piko ThermalCycler, Finnzymes s následnou vizualizací v agarozovém gelu.

Detekce a kvantifikace bakteriální DNA byla provedena kitem Xceed qPCR probe 2x Master mix v celkovém objemu 20 µl podle návodu výrobce na přístroji Light Cycler® 480 II (Roche). Primery byly navrženy a optimalizovány na našem pracovišti (UICHM) pro účely Multiplex qPCR.

DNA sekvenování:

Byla sekvenována oblast genomu kódující kapsidový protein felinního caliciviru. Byly srovnány získané sekvence se sekvencemi referenčních kmenů získanými v genetické databázi (Genbank).

Pozitivní PCR produkty z nested PCR byly odeslány k sekvenování do společnosti Macrogen (Holandsko). Analýza sekvencí pak byla provedena počítačovým programem Vector NTI.

Výsledky

Tabulka1. Výsledky analýz qRT-PCR, Multiplex qPCR a nested PCR

	Celkem	Indoor +/(%)	Outdoor +/(%)
Koček celkem	218	149	69
Calicivirus pozitivní	17	10 (6.7)	7 (10.0)
Herpesvirus pozitivní	36	12 (8.0)	24 (34.8)
Mycoplasma pozitivní	111	72 (48.3)	39 (56.5)
Chlamydia pozitivní	20	7 (4.7)	13 (18.8)
Bordetella pozitivní	10	9 (6.0)	1 (1.4)

Tabulka 2. Výskyt jednotlivých patogenů koček v závislosti na věku

	Do 1 roku +/- (%)	1-3 roky +/- (%)	3 a více let +/- (%)
Koček celkem	60	68	90
Calicivirus pozitivní	7 (11,7)	5 (7,4)	5 (5,6)
Herpesvirus pozitivní	11 (18,3)	12 (17,6)	13 (14,4)
Mycoplasma pozitivní	35 (58,3)	33 (48,5)	43 (47,8)
Chlamydia pozitivní	11 (18,3)	4 (5,9)	5 (5,6)
Bordetella pozitivní	5 (8,3)	3 (4,4)	2 (2,2)

Tabulka 3. Výskyt jednotlivých patogenů koček v závislosti na místě odběru vzorku

	Celkem	Orofaryng +/- (%)	Spojivka +/- (%)
Calicivirus pozitivní	17	15 (8,5)	2 (2,9)
Herpesvirus pozitivní	36	21 (11,9)	15 (21,4)
Mycoplasma pozitivní	111	87 (49,1)	24 (34,2)
Chlamydia pozitivní	20	10 (5,6)	10 (14,2)
Bordetella pozitivní	10	10 (5,6)	0 (0)

Z výsledků v tab. č. 1 je patrné, že infekcemi horních dýchacích cest trpí v klinické nebo subklinické podobě spíše kočky venkovní (84 pozitivních průkazů patogenů u 69 zvířat) než domácí (110/149). Celkem 35 koček bylo infikováno více než jedním patogenem a 5 koček více než dvěma. Jednalo se převážně o koinfekce herpesvirus, mycoplasma a chlamydie. U různých patogenů si lze povšimnout závislosti na prostředí koček: zatím, co u herpesviru a chlamydie je zřetelná převaha infekcí u koček žijících venku (přibližně 4 x), u mykoplazmy a kaliciviru je rozdíl mnohem menší (1.2 x resp. 1.5 x). Naopak u domácích koček se jeví být častější infekce bakterií *B. bronchiseptica* a to 4.3 x. Ovšem u této bakterie jsme měli pozitivních průkazů nejméně a nejedná se o typický primárního patogena. Porovnání četnosti pozitivních průkazů infekčních agens u různých věkových kategorií (tab. č. 2) napovídá, že koťata a mladé kočky do 1r. jsou nejčastějším přenašečem respiračních infekcí. Nejvýraznější pokles pozitivivity během života jsme zaznamenali u bordetel a chlamydií. Následoval kalicivirus koček. U herpesvirů a mykoplasmat dochází k podobně častým záchytům během celého života. Co se týká vhodného místa pro odběr vzorků u různých patogenů, řídili jsme se metodikou (orofarynx) a klinickými příznaky (konjunktivitida). Pouze u bordetely jsme zaznamenali jednoznačnou lokalizaci a to na sliznici orofaryngu. Ostatní původci se vyskytovali na obou místech odběru. Herpesvirus a chlamydie s převahou na spojivce, kalicivirus a

mykoplazma na sliznici orofaryngu. Zatímco FHV a bakteriální patogeny lze z genetického hlediska označit za spíše stabilní, genom kaliciviru koček je vysoce variabilní. Analýza jeho genů sekvenováním může být použita pro diferenciaci mezi vysoce virulentními a slabě virulentními izoláty. Porovnáním sekvencí s databází Gen Bank jsme zjistili u některých kmenů podobnost s vysoce virulentními kmeny FCV vyskytujícími se v USA i v Evropě. (Ossiboff et al., 2007, Rong et al,2006).

Závěr

Zavedli jsme metody Real Time PCR, nested RT-PCR do rutinní diagnostiky původců. Pomocí těchto metod byly spolehlivě diferencovány původci virové a bakteriální etiologie. Charakterizovali jsme kmeny caliciviru na úrovni genomu pomocí sekvenování a zjistili jsme výraznou diverzitu jednotlivých izolátů FCV v populaci koček, kterou budeme dále analyzovat.

Literatura

SYKES, J.E. Feline Respiratory Viral Infections. In: SYKES, J.E. (2014). Canine and feline infectious diseases, s. 239 – 251. ISBN 978-1-4377-0795-3.

LISTER, A. WU,C.C, LEUTENEGER, C.M. Detection of feline upper respiratory tract disease pathogens using a commercially available real-time PCR test. *The Veterinary Journal*. 2015,vol. 206, no 2,s.149-53. doi: 10.1016/j.tvjl.2015.08.001

HARTLEY, J.C, STEVENSON, S., ROBINSON, A.J., LITTLEWOOD, J.D., CARDER,C., CARTLEDGE, J., CLARK, C., RIDGWAY, G.L. Conjunctivitis due to *Chlamydomphila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *Journal of Infecion*. 2001, vol. 43, no 1,s. 7-11.

HELPS, C., LAIT, P., TASKER, S., HARBOUR, D. Melting curve analysis of feline calicivirus isolates detected by real-time reverse transcription PCR. *Journal of Virological Methods*, 2002, vol.106, no 2, s. 241-4.

KONVALINOVÁ, J., KOVAŘÍKOVÁ, S., HUMPOVÁ, K., LOBOVÁ, D., MOLINKOVÁ, D. Infekce respiračního traktu koček – review. *Veterinářství*. 2016, vol. 66, s. 327-34.

OSSIBOFF, R.J., SHEH, A., SHOTTON, J., PESAVENTO, P.A., PARKER, J.S. Feline caliciviruses (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *Journal of Genetical Virology*. 2007, vol. 88, s. 506-17.

RONG,S., SLADE, D., HAWKINS,K.F, WHEELER,D. Characterization of a highly virulent feline calicivirus and attenuation of this virus. *Virus Research*. 2006 vol.122, s.95-108.

Tato práce byla financovaná projektem IGA VFU Brno 128/2016/FVL.

Detekce mastocytů v pohlavních orgánech koček v různých fázích pohlavního cyklu

Petr Čížek, Pavla Hamouzová

Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Cílem studie bylo detekovat mastocyty v *zona vasculosa* vaječníku a *stratum vasculare* dělohy u koček v různých fázích pohlavního cyklu. Současně ověřit u kočky vliv koncentrace estradiolu a progesteronu v krevním séru na počet mastocytů v různých orgánech pohlavního aparátu, který byl prokázán u jiných domácích zvířat. Dále určit jejich pozitivitu na chymázu a/nebo tryptázu a výsledky porovnat s dosud známou situací u jiných druhů zvířat. Tato studie je prvním popisem mastocytů v pohlavních orgánech v různých fázích pohlavního cyklu u zvířete s provokovanou ovulací.

Materiál a metodika

Z každé fáze pohlavního cyklu, tedy z anestru, proestru, estru a diestru, bylo hodnoceno 10 vzorků vaječníků, vejcovodů a proximálních úseků děložních rohů. Fixace byla provedena 4% roztokem formaldehydu. Z krve rutinně odebírané pro diagnostické účely se navíc získalo sérum pro stanovení koncentrace estradiolu a progesteronu (SynLab Czech, s.r.o.; Praha). Hranicí pro anestrus byla koncentrace estradiolu pod 20 pg/ml (=73,42 pmol/l), pro estrus koncentrace estradiolu nad 20 pg/ml, pro diestrus koncentrace progesteronu nad 1,5 ng/ml (=4,77 nmol/l). Do proestru byly zařazeny kočky s koncentrací estradiolu 15-20 pg/ml.

Vzorky byly zpracovány běžnými metodami pro světelnou mikroskopii. K barvení vzorků se použilo jednak přehledné barvení hematoxylinem-eozinem pro základní zhodnocení a kontrolu nepřítomnosti patologických lézí, jednak diferenční barvení toluidinovou modří (0,5% roztok v 0,25 M HCl, pH 1,2, doba barvení 15 minut) k detekci, kvantifikaci a lokalizaci mastocytů.

Počet mastocytů byl hodnocen v 5 zorných polích při zvětšení 400x v *zona vasculosa* vaječníku a v 10 zorných polích ve *stratum vasculare* dělohy.

Detekce chymázy byla provedena komerčně dostupným kitem Sigma kit 91-C (Sigma Chemical Co.), využívajícím jako substrát Naphthol-AS-D-Chloroacetate. Následně byla provedena imunohistochemická detekce tryptázy dle následujícího protokolu: 0,1% Protease XIV (Sigma Chemical Co.) 10 min. při 37 °C, následně aplikace monoklonální protilátky TPSAB1 Monoclonal Antibody (ThermoFisher Scientific) v ředění 1:500 po dobu 45 min. Poté byl aplikován Universal HRP Immunostaining Kit For Mouse and Rabbit Primary Antibodies (Diagnostic BioSystems) dle

návodu udávaného výrobcem. Správnost použité metody byla průběžně ověřovaná použitím pozitivní kontroly - kožního mastocytomu psa.

Na závěr se provedlo statistické zhodnocení závislosti počtu mastocytů v *zona vasculosa ovarii* a *stratum vasculare uteri* na koncentraci estradiolu a progesteronu. Byla provedena korelační analýza, analýza rozptylu, Scheffeho test a Fisherův LSD test. Výsledky byly porovnány se známou situací u jiných druhů zvířat a se situací u člověka.

Výsledky

Nejvyšší počet mastocytů ve vaječníku byl zjištěn v *zona vasculosa*. V kortexu se vyskytovaly ve všech fázích cyklu pouze ojediněle. Průměrný počet mastocytů v *zona vasculosa* vaječníku byl v anestru $4,5 \pm 2,1$, v estru $12,2 \pm 10,7$ a v diestru $9,6 \pm 11,3$. V anestru byl nízký počet mastocytů zjištěn u všech koček, zatímco v estru a diestru byl u některých vysoký a u dalších nízký. Fisherovým LSD testem byl zjištěn významný rozdíl mezi anestrem a estrem ($p < 0,05$). Mastocyty u koček tedy mohou, obzvláště jsou-li přítomny ve vysokém počtu, ovlivňovat průběh ovulace.

Nejvyšší počet mastocytů byl v děloze zjištěn ve *stratum vasculare*. Průměrný počet mastocytů ve *stratum vasculare* dělohy činil v anestru $5,4 \pm 2,7$, v proestru $13,6 \pm 2,3$, v estru $22,6 \pm 7,6$ a v diestru $3,4 \pm 1,5$. Scheffeho testem byl zjištěn vysoce významný rozdíl mezi anestrem a estrem ($p < 0,01$), estrem a diestrem ($p < 0,01$) a významný rozdíl mezi proestrem a estrem ($p < 0,05$) a diestrem a estrem ($p < 0,05$).

Nebyla zjištěna korelace mezi koncentrací estradiolu či progesteronu a počtem mastocytů v děloze nebo vaječníku.

V důsledku pouze ojedinělého výskytu mastocytů ve všech vrstvách vejcovodu tento výsledek nebyl dále vyhodnocován.

Výsledky detekce chymázy a tryptázy ve vaječníku a děloze byly ve všech vzorcích negativní.

Závěr

Bylo zjištěno, že počet mastocytů ve *stratum vasculare* dělohy koček je výrazně ovlivněn fází pohlavního cyklu. Nejvyšší počet byl prokázán v estru, tedy v období, kdy koncentrace estradiolu dosahuje svého maxima, a naopak nejnižší v anestru, kdy se jak estradiol, tak progesteron vyskytují v organismu pouze v bazálních koncentracích.

V *zona vasculosa* vaječníku byl zjištěn významný vliv fáze pohlavního cyklu zjištěn pouze mezi anestrem, kdy byl zjištěný počet mastocytů nejnižší, a estrem, kdy byl nejvyšší. Počet

mastocytů byl u estrických a diestrických koček ve srovnání s anestrickými zvýšen pouze v polovině případů. Mastocyty by se tudíž mohly podílet na průběhu spontánní ovulace, která bývá popisována až u 54 % koček (Hajurka et al. 2014).

Byla prokázána závislost počtu mastocytů v pohlavních orgánech koček na sérové koncentraci estradiolu a progesteronu.

Byla zjištěna negativita vzorků na chymázu a tryptázu. Možnost výskytu dvojité negativních mastocytů předpokládají rovněž Welle et al. (1997) v *cervix uteri* klisen.

Seznam literatury

Hajurka, J., Hornakova, L., Vitkova, T. Spontaneous ovulation in the cats. **In:** *Reproduction and pediatrics in dogs, cats and exotics*. 17 th EVSSAR Congress, Wroclaw: 2014.

Karaca, T., Yoruk, M., Uslu, S. Distribution and quantitative patterns of mast cells in ovary and uterus of rat. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 2007, **39**, 135-139.

Karaca, T., Arikan, S., Kalender, H., Yoruk, M. Distribution and heterogeneity of mast cells in female reproductive tract and ovary on different days of the oestrus cycle in Angora goats. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, **43**, 451-456.

Kube, P., Audige, L., Kuther, K., Welle, M. Distribution, density and heterogeneity of canine mast cells and influence of fixation techniques. *Histochemistry and Cell Biology*, 1998, **110**, 129-135.

Ozen, A., Ergun, L., Ergun, E., Simsek, N. Morphological studies on ovarian mast cells in the cow. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2007, **31**, 131-136.

Welle, M.M., Audige, L., Belz, J.P. (1997) The equine endometrial mast cell during the puerperal period: Evaluation of mast cell numbers and types in comparison to other inflammatory ganges. *Veterinary Pathology*, 1997, **34**, 23-30.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 101/2016/FVL.

Kytovci jako model volně žijících zvířat indikujících kontaminaci vodního prostředí parazitem *Toxoplasma gondii*

Jana Juránková¹, Dana Halová¹, Barbora Bártová¹

*Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno¹*

Úvod

Kytovci jsou jako vodní savci vhodným modelem živočichů indikujících kontaminaci vodního prostředí, jelikož nejpravděpodobnějším zdrojem infekce je pro ně vodní prostředí s infekčními oocystami. *T. gondii* je u kytovců důležitá také z hlediska ochrany přírody, neboť u nich byla prokázána jako významný patogen. Studium kytovců s využitím nejnovějších molekulárních metod detekce, kvantifikace a genotypizace *T. gondii* umožňuje odhadovat nebezpečí přenosu a srovnání patogenity *T. gondii* z vodního prostředí pro lidskou populaci.

Materiál a metodika

Původ a skladování vzorků

Biologický materiál pochází z odběrů tkání z přirozeně uhynulých kytovců provedených partnerskými institucemi (University of Teramo, University of Valencia, Itálie a National Institute for Marine Research a z jejich tkáňových bank, vzorky jsou skladovány v -20 °C. Ve studii byly použity tkáně z 25 kytovců: 7 delfinů skákavých (*Tursiops truncatus*), 11 delfinů pruhovaných (*Stenella coeruleoalba*) a 7 sviňuch obecných (*Phocoena phocoena relicta*).

Izolace DNA a PCR

Ze vzorků byla izolována celková DNA pomocí tkáňového kitu (High Pure PCR Template Preparation Kit) a DNA *T. gondii* pomocí sekvenčně specifického magnetického zachytávání (magnetic capture). DNA získaná oběma izolačními metodami byla amplifikována se zaměřením na opakující se úsek 529 bp repeated element *T. gondii* a výsledný produkt o velikosti 167 bp byl elektroforeticky vizualizován v 1,5% TAE gelu s fluorescentní barvou GoodView nucleic acid stain.

Statistická analýza

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny s využitím Chi-kvadrát a Fisher testu v programu Unistat 6.5 (UNISTAT Ltd., UK).

Výsledky

Pět jedinců (dva delfini skákaví a tři delfini pruhoaní) původem z Itálie bylo *T. gondii* pozitivních s využitím obou izolačních metod. Jeden delfín skákavý vykazoval dubiózní výsledek, jelikož pouze jeden vzorek izolovaný tkáňovým kitem byl pozitivní. Všechny testované sviňuchy obecné původem z Rumunska byly negativní. Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 1 – 3.



Number	Species	MC PCR	TK PCR	PCR	Ser.
1	Tt	+	+	+	
2	Tt	+	+	+	
3	Tt	-	+/-	-	
4	Tt	-	-	-	
5	Stc	+	+	+	1:320
6	Stc	+	+	-	1:20
7	Stc	+	+	+	1:2560
8	Stc	-	-	-	1:80
9	Stc	-	-	-	1:80
10	Stc	-	-	-	-
11	Stc	-	-	-	-
12	Tt	-	-	-	-
13	Tt	-	-	-	-
14	Tt	-	-	-	-
15	Stc	-	-	-	-
16	Stc	-	-	+/-	-
17	Stc	-	-	-	-
18	Stc	-	-	-	1:160

Tabulka 1: srovnání výsledků získaných magnetic capture PCR (MC PCR) a izolací DNA tkáňovým kitem a PCR (TK PCR); PCR = výsledky vyšetření poskytnuté italskými kolegy, Ser. = výsledky serologického vyšetření poskytnuté italskými kolegy, Tt = *Tursiops truncatus*, Stc = *Stenella coeruleoalba*, Ph = *Phocoena phocoena*, +/- = dubiózní výsledek

No.	Species	Organ	Our tests		Italy PCR
			MC	Kit	
1	Tt	spleen	+	+	+
		brain	+	+	
		heart	+	+	
		mes. ln.	+	+	
		lungs	+	+	
		testicle	+	-	
		muscle	+	+	
		kidney	+	+	
2	Tt	muscle	+	+	+
		heart	+	+	+
		mes. ln.	+	-	
		lungs	+	-	
		kidney	+	-	
3	Tt	blubber	-	+/-	
		muscle	-	-	-
5	Stc	brain	+	+	+
6	Stc	muscle	+	+	
		brain			-
7	Stc	brain	+	+	+
		muscle	+	+	
total neg			17	13	
total samples			141	144	
			158	158	
			p =	0.7053	

Tabulka 2: Srovnání výsledků získaných MC PCR and TK PCR (Kit).

mes. ln = mezenteriální mízní uzliny, Tt = *Tursiops truncatus*, Stc = *Stenella coeruleoalba*, Ph = *Phocoena phocoena*, +/- = dubiozní výsledek

No.	brain	gen. org.	kidney	spleen	pulm. ln.	mes. ln.	adr. gl.	lungs	heart	liver	muscle	blubber	total
1	+	+	+	+	-	+		+	+	-	+		
2		+	+	+		+		+	+	+	+	+	
5	+												
6		+					+	+	+		+		
7	+	+									+		
POS	3	1	2	1	0	2	0	2	2	0	4	0	17
NEG	0	3	1	1	1	0	1	0	1	2	0	1	11
total	3	4	3	2	1	2	1	2	3	2	4	1	28
			positive										
			negative										

Tabulka 3: Výsledky vyšetření jednotlivých orgánů u pozitivních zvířat vyšetřených MC PCR.

gen. org = pohlavní orgány, pulm. ln = plicní mízní uzliny, mes. ln. = mezenteriální mízní uzliny, adr. gl. = nadledviny, prázdná políčka = vzorky nebyly k dispozici

Závěr

Toxoplasma gondii nebyla nalezena ani u jedné ze studovaných sviňuch (*P. phocoena*). Vyšetření však bylo provedeno zatím jen u malého počtu zvířat a nelze proto vyloučit přítomnost *T. gondii* u tohoto druhu žijícího v Černém moři. Senzitivita PCR po izolaci DNA magnetických zachytáváním a extrakci pomocí tkáňového kitu byla srovnatelná, statistická analýza neodhalila významný rozdíl. Pro samotnou detekci DNA *T. gondii* v tkáních kytovců lze proto využít klasickou izolaci DNA tkáňovým kitem a následnou PCR, jelikož se jedná o časově i finančně méně náročnou metodu. Výhoda magnetického zachytávání DNA spočívá zejména v možnosti kvantifikace *T. gondii* pomocí kvantitativní PCR. Nejčastější pozitivní tkáni u obou srovnávaných metod izolace DNA byla svalovina, která se jeví jako tkáň „první volby“ pro detekci DNA *T. gondii*. Spektrum orgánů napadených *T. gondii* je konzistentní s publikovanými výsledky. Vzorky budou dále využity pro kvantifikaci *T. gondii* v tkáních studovaných kytovců a ke genotypizaci *T. gondii*.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 112/2016/FVL.

Seznam literatury

- DI GUARDO, G, DI CESARE, A, OTRANTO, D, CASALONE, C, IULINI, B, MIGNONE, W, TITTARELLI, C, MELONI, S, CASTAGNA, G, FORSTER, F, KENNEDY, S, TRAVERSA, D. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates in meningo-encephalitis affected striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Italy. *Veterinary Parasitology*. 2011, 183, 31–36.
- OPSTEEGH, M, LANGELAAR, M, SPRONG, H, HARTOG, L, DE CRAEYE, S, BOKKEN, G, AJZENBERG, D, KIJLSTRA, A, GIESSEN VAN DER, J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 139, 193-201.
- SCHAEFER, AM, REIF, JS, GOLDSTEIN, JD, RYAN, CN, FAIR, PA, BOSSART, GD. Serological evidence of exposure to selected viral, bacterial, and protozoal pathogens in free-ranging atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the Indian River Lagoon, Florida, and Charleston, South Carolina. *Aquatic Mammals*. 2009, 35, 163.
- VAN BRESSEM, MF, RAGA, JA, DI GUARDO, G, JEPSON, PD, DUIGNAN, PJ, SIEBERT, U, BARRETT, T, DE OLIVEIRA SANTOS, MC, MORENO, IB, SICILIANO, S. Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2009, 86, 143–157.

Odpadní vody jako potenciální zdroj multirezistentní *E. coli* pro volně žijící zvířata

Martina Masaříková^{1,2}, Ludmila Kohoutová¹, Iva Kutilová³, Ivan Manga²

¹Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²CEITEC VFU Brno, ³Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Při vzniku a šíření rezistentních mikroorganismů má výsadní postavení vodní prostředí. V povrchových vodách se totiž setkávají nejrůznější bakterie, mezi nimiž může docházet k horizontálnímu přenosu mobilních genetických elementů kódujících rezistenci (Baguero et al., 2008). Vodní prostředí nefiguruje pouze jako prostředek mechanického šíření rezistentních mikroorganismů, ale představuje také médium, kde dochází ke kontaktu rezistentních bakterií humánního a animálního původu s přirozenými bakteriemi vodního ekosystému. Tím je umožněna transformace těchto přirozených bakterií ve významný environmentální rezervoár genů rezistence (Aminov and Mackie, 2007).

Jedním z nejvýznamnějších zdrojů kontaminace povrchových vod rezistentními mikroorganismy jsou čistírny odpadních vod (ČOV), (Goñi-Urriza et al., 2000). Proces dekontaminace uplatňovaný ČOV nevede vždy k eliminaci všech mikroorganismů, naopak může poskytovat optimální podmínky ke vzniku a horizontálnímu šíření mobilních genetických elementů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám. Rizikové jsou zejména velkokapacitní ČOV, kde je současně zpracováván odpad různého původu, což umožňuje kontakt mikrobů humánní i animální provenience s virulentními kmeny původců nozokomiálních infekcí. Z epidemiologického hlediska představují stále rostoucí problém enterobakterie rezistentní k antibiotikům vyčleněným k léčbě život ohrožujících infekcí. Jejich šíření z ČOV do povrchových vod je aktuálně středem zájmu mikrobiologů po celém světě (Amos et al., 2014).

Říční vody tvoří životní prostředí pro široké spektrum druhů volně žijících zvířat, které se bezprostředním kontaktem s vodním prostředím vystavují riziku kolonizace rezistentními bakteriemi, které mohou v rámci svých migračních aktivit přenášet na velké vzdálenosti. Vhodným modelovým druhem pro studium kolonizace organismů volně žijících zvířat rezistentními mikroorganismy je racek chechtavý (*Chroicocephalus ridibundus*). Racek může sloužit jako bioindikátor znečištění přírody nejrůznějšími mikroby, ale také na něm lze demonstrovat cirkulaci patogenních původců mezi člověkem, hospodářskými zvířaty a životním prostředím (Literák et al., 1992). Pro jeho výběr ke studiu cirkulace mikrobů je důležité, že žije v blízkosti člověka, ale je při

tom v úzkém kontaktu s vodním prostředím. V neposlední řadě je racek v období hnízdění poměrně dostupný k odběru vzorků přímo od individuálních jedinců.

V rámci výzkumných aktivit Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie bylo v průběhu roku 2012 odebráno celkem 37 vzorků odpadních vod (OV) vytékajících po přečištění z ČOV Brno do řeky Svratky a 284 kloakálních výtěrů mláďat racka (R) chechtavého hnízdících na vodním díle Nové Mlýny, do kterého se řeka Svratka vlévá. Cílem předkládané studie, realizované s podporou IGA, bylo z odebraného materiálu izolovat rezistentní *E. coli*, podrobně popsat fenotypové a genotypové znaky jejich rezistence a následně metodami molekulární genetiky identifikovat míru vzájemné shody mezi izoláty získanými z odpadních vod a racků. Tím bychom mohli na modelu racka chechtavého posoudit vliv člověka na šíření multirezistentních escherichií do volné přírody prostřednictvím odpadních vod.

Materiály a metodika

Vzorky odpadních vod a kloakálních výtěrů mláďat racků odebraných v roce 2012, pomnožených v peptonové vodě, zamražených v kryoprotektivním médiu a uchovávaných do současnosti zmražením v -80 °C, byly vyočkovány na výběrově – diagnostické médium pro kultivaci enterobakterií, McConkey agar (Oxoid, Velká Británie). Ten byl za účelem izolace *E. coli* rezistentních k β -laktamovým antibiotikům a chinolonům modifikován přísadkou cefalosporinu (2mg/l) a ciprofloxacinu (0,05 mg/l). Z čistých kultur byla provedena definitivní identifikaci izolátů, dle morfologie kolonií předběžně určených jako *E. coli*, metodou MALDI-TOF MS přístrojem MALDI Biotyper LT (Bruker Daltonics, Německo). Každý vzorek (odpadní vodu, racka) mohly reprezentovat maximálně dva izoláty *E. coli*, jeden získaný kultivací na půdě s obsahem cefotaximu, druhý kultivací na půdě obsahující ciprofloxacin.

U každého izolátu byla určena citlivost k 16 antimikrobiálním látkám diskovým difúzním testem, (μ g/disk): amoxicilin klavulanát (20/10), ampicilin (10), cefalotin (30), ceftazidim (30), chloramfenikol (30), ciprofloxacin (5), gentamicin (10), kyselina nalidixová (30), streptomycin (10), sulfametoxazol trimetoprim (23,75/1,25), směs sulfonamidů (300), tetracyklin (30), imipenem (10), meropenem (10), cefoxitin (30) a cefotaxim (30), (Oxoid, Velká Británie). Ke kontrole kvality provedení diskové difúzní metody byl použit kmen *E. coli* ATCC 25922.

Izoláty s fenotypem rezistence k jednomu či více antibiotikům byly vyšetřeny na přítomnost genů, které tento fenotyp rezistence kódují. Konkrétně jsme metodou PCR prokazovali geny *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA} a *bla*_{CTX-M}, *catA1*, *cmlA*, *floR*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* a *oqxB*, *strA*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)* a *tet(G)*. U rezistentních izolátů escherichií byly dále identifikovány geny pro integrázy 1, 2, integrony tříd 1, 2

a analyzovala se přítomnost plazmidů rezistence metodou PCR. Detailní analýza některých genů (zejména genů rezistence vůči beta – laktamům a chinolonům) byla dokončena jejich sekvenací, výsledky sekvenace se vyhodnotily porovnáním s databází BLAST.

Pro identifikaci příbuznosti mezi izoláty *E. coli* získaných z odpadních vod a racků byla zvolena pulzní gelová elektroforéza (PFGE) fragmentů DNA po jejich enzymatické restrikci endonukleázou XbaI (Takara, Japonsko). Pulzní profily izolátů byly analyzovány na software BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Belgium) a podobnost vyhodnocena na základě Diceho indexu. Příbuznost mezi izoláty byla potvrzena, pokud Diceho index podobnosti přesáhl 85 %.

Výsledky

Z 37 vzorků odpadních vod a 284 kloakálních výtěrů racka chechtavého byl postupem selektivní kultivace na půdách s přídavkem antibiotik cefotaximu a ciprofloxacinu získán soubor 670 *E. coli* (450 původem z odpadních vod, 220 z racků). Konkrétně, na půdách suplementovaných cefotaximem vyrostlo 311 *E. coli* (185 OV, 126 R) a na MCA s ciprofloxacinem potom 359 *E. coli* (265 OV, 94 R).

Pouze čtyři izoláty *E. coli* (3 OV, 1 R) vykázaly v diskovém difúzním testu citlivost ke všem testovaným antibiotickým substancím, všechny ostatní izoláty byly rezistentní k jednomu či více antibiotikům. Multirezistenci jsme identifikovali u 79 % všech izolátů *E. coli*. Nejčastěji prokazovanou rezistencí byla rezistence k ampicilinu (539/80 %, z toho 359 OV a 180 R), kyselině nalidixové (494/74 %, z toho 350 OV a 144 R) a cefalotinu (394/59 %, z toho 245 OV a 149 R). Naopak, pouze čtyři izoláty byly rezistentní k imipenemu (0,6 %, 1 OV, 3 R). Jedna imipenem-rezistentní *E. coli* z racka však vykazovala rezistenci či intermediální citlivost ke dvanácti ze všech šestnácti testovaných látek.

Polymerázovou řetězovou reakcí a následnou sekvenací byly identifikovány tyto geny rezistence: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27}, *bla*_{CMY-2}, *qnrS1*, *cat*, *strA*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)* a *tet(B)*. U pěti z 34 *E. coli* pozitivních na gen pro integrázu *intI1* (15 %) jsme potvrdili přítomnost integronů třídy 1 o velikosti 2 kbp.

V rámci základního souboru 670 izolátů bylo vyselektováno 86 *E. coli* pro testování metodou PFGE. Výběr izolátů, u nichž byla hledána klonální shoda pomocí PFGE, byl podmíněn jejich vzájemnou podobností. Nejmenší počet izolátů, které byly srovnávány, byl dva – jeden izolát z odpadních vod fenotypově a genotypově shodný s jedním izolátem z racků. Klonální příbuznost byla prokázána u 26 % izolátů *E. coli*.

Závěr

Příbuznost mezi izoláty původem z racků, nebo vzájemná podobnost mezi izoláty nacházejícími se v odpadních vodách, byla identifikována poměrně často, nicméně průkaz identického izolátu v odpadní vodě a v organismu racka byl vzácnější. Přesto se nám podařilo stanovit více než 87% podobnost makrorestrikčních profilů u 22 (26 %) *E. coli* vyskytujících se jak v odpadní vodě, tak kolonizujících racky. Naše výsledky tedy potvrdily původní hypotézu, že rezistentní mikroorganismy, které nebyly eliminovány dekontaminací v ČOV, mohou po vypuštění do řek kolonizovat volně žijící zvířata žijící v bezprostředním kontaktu s povrchovou vodou, která je těmito odpadními vodami znečištěna.

Kromě potvrzení původní hypotézy jsme navíc prokázali, že nejčastějším izolátem, který cestou odpadní vody kolonizoval gastrointestinální trakt racků, byla *E. coli* sekvenčního typu 131, která se vyznačuje vysokou virulencí, multirezistencí k antimikrobiálním látkám a je často izolována z humánního klinického materiálu, kde figuruje v etiologii extraintestinálních koliinfekcí.

Citovaná literatura

1. Aminov RI and Mackie RI. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2007;271(2):147-61.
2. Amos GC, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Waste water effluent contributes to the dissemination of CTX-M-15 in the natural environment. J Antimicrob Chemother. 2014;69(7):1785-91.
3. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotech. 2008;19(3):260-5.
4. Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol. 2000;66(1):125-32.
5. Literák I, Čížek A, Honza M. Using examinations of young Black-headed gulls (*Larus ridibundus*) for the detection of salmonellae in the environment. Acta Vet Brno. 1992;61:1441-6.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 116/2016/FVL.

Studium vlivu přírodních látek na buněčné kultury fibroblastů působením přes signální dráhu NF- κ B

Ivana Veselá¹, Barbora Replková, Polina Rapekta, Petra Bíliková¹, Petra Celá¹

Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Naším cílem bylo stanovení vlivu aeruginosinu-865 a kapsaicinu na přesně definované buněčné linie se zaměřením na signální dráhu NF- κ B. Aeruginosin-865 je tetrapeptid izolovaný z terestriálních cyanobakterií rodu *Nostoc*, u kterého byl jako jediného sekundárního metabolitu cyanobakterií prokázán antiinflamatorní účinek. Tento efekt je zprostředkován mechanismem ovlivnění signální dráhy NF- κ B, kterou Aeruginosin-865 inhibuje¹. Kapsaicin je přírodní alkaloid produkovaný rostlinami rodu *Capsicum*, u kterého byl mimo jiné prokázán také antiinflamatorní účinek podobně jako u aeruginosinu-865².

Materiál a metodika

Buněčné kultury: Pro experimenty byly využity komerčně dodávané myší buněčné linie normálních fibroblastů NIH/3T3 (ve sbírce Ústavu fyziologie) a nádorových fibroblastů WEHI-13VAR (ATCC® CRL-2148™). Jedná se o adherentní buněčné linie, které byly kultivovány na kultivačním plastiku, saturovány živným médiem (MEM/RPMI) obsahujícím 10% FBS a antibiotika (penicilin, streptomycin) a umístěny v inkubátoru s 5% atmosférou CO₂.

Přírodní látky: Aeruginosin-865 byl dodán Mikrobiologickým ústavem AV ČR v Třeboni. Kapsaicin je součástí sbírky Ústavu fyziologie. Látky byly aplikovány paralelně na oba typy buněk v různých koncentracích a časových intervalech dle typu experimentu.

Imunocytochemie: Buňky byly nasazeny v koncentraci 1×10^5 na speciální podložní skla potažené poly-D-lysinem, druhý den byly aplikovány příslušné přírodní látky, a po uplynutí doby kultivace byly buněčné kultury fixovány 4% pufrovaným formaldehydem (PFA) po dobu 30 minut. Po oplachu PBS následovala inhibice autofluorescence použitím 50 mM NH₄Cl v PBS po dobu 15 minut. Permeabilizace buněk a blokáce nespecifických vazeb byla provedena v roztoku 10% FBS s 0,1% Tritonem po dobu 1 hodiny. Následovala aplikace primární protilátky (NF- κ B p65, Abcam, 1:100) při 4 °C přes noc. Po oplachu PBS byly nanесeny sekundární protilátka (Alexa Fluor 488, Life Technologies) a protilátka vizualizující cytoskelet (Alexa Fluor 568 Phalloidin, Life Technologies) ředěné v poměru 1:400 na dobu 60 minut. Jádra buněk byla následně dobarvena

pomocí média s DAPI (Vectashield, Vector Laboratories). Fotografie byly zhotoveny pomocí mikroskopu Leica DM LB2 (Leica Microsystems).

MTT test: Pro stanovení viability byly buňky nasezeny v koncentraci $20 \times 10^3 / 200 \mu\text{l}$ média na 96 jamkovou destičku. Po přisednutí buněk následovala aplikace příslušných přírodních látek včetně kontrol, a buňky byly dále kultivovány po dobu 24 hodin. Dále byl přidán MTT (MTT cell proliferation assay kit, Trevigen) na dobu 2-4 hodin. Vytvořené barevné krystaly byly rozpuštěny v detergentu přes noc, následně byla měřena absorbance při 570 nm na přístroji SynergyHT (Biotek) a spočítána viabilita buněk.

Detekce apoptotických a nekrotických buněk: Buňky byly nasazeny v koncentraci $1 \times 10^5 / \text{jamka}$ na 6 jamkovou desku, a po přisednutí ovlivněny příslušnými přírodními látkami. Pro označení apoptotických a nekrotických buněk byl použita souprava „Dead cell apoptosis kit with annexin V and propidium iodide“ (Life Technologies). Buňky byly po inkubaci sklizeny pomocí dispázy II (1,6 U/ml, Sigma) a rozsuspendovány v Annexin vazebném pufru. Následně byly přidány fluorescenční barvy propidium iodid a annexin V na dobu 15 minut. Poté byly buňky analyzovány pomocí průtokového cytometru ve spolupráci s oddělením imunologie VÚVeL Brno, v.v.i.

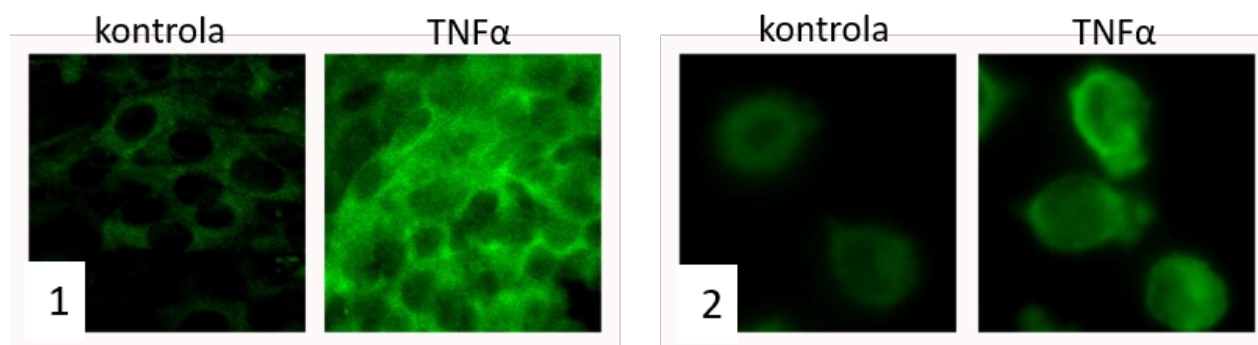
Detekce kaspázy 3: Buňky byly nasazeny na malé kultivační misky v koncentraci 1×10^6 a po přisednutí byly aplikovány příslušné přírodní látky. Po uplynutí doby inkubace byly buňky sklizeny pomocí trypsinu/EDTA a spočítány včetně stanovení jejich viability. Analýza kaspázy 3 byla provedena pomocí soupravy Caspase-3 Assay kit (Life Technologies) dle instrukcí dodavatele. Lyzáty buněk byly naneseny do 96 jamkové destičky a po inkubaci s příslušnými činidly byla měřena absorbance při 405 nm.

Detekce volných radikálů: Buňky byly nasazeny v koncentraci 20×10^3 na černou 96 jamkovou desku, po jejich přisednutí byly aplikovány přírodní látky. Analýza reaktivních metabolitů kyslíku a dusíku byla provedena pomocí soupravy Total ROS/superoxide detection kit (Enzo) dle instrukcí výrobce. Fluorescence volných radikálů byla detekována ve dvou kombinacích vlnových délek – Ex 488nm/Em 520 nm (pro fluorescein) a Ex 550 nm/Em 610 nm (pro rhodamine).

Výsledky

NF- κ B je za normálních podmínek lokalizován v cytoplazmě ve formě heterodimeru p65/p50 vázaný na I κ B³. Po indukci této dráhy pomocí TNF α dochází k degradaci I κ B a translokaci

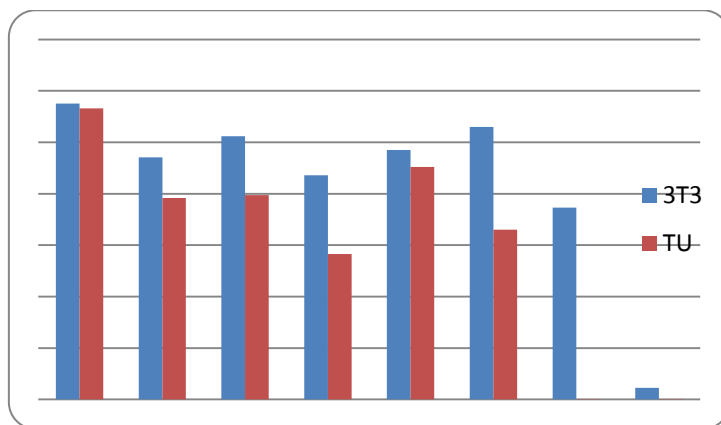
komplexu do jádra. Bylo prokázáno, že aplikace Aeruginosinu- 865 brání jaderné translokaci, a tím spuštění exprese např. prozánětlivých faktorů¹. V našem experimentu jsme vycházeli ze zmíněné publikace, testovali navíc i různé koncentrace či doby působení TNF α , ale translokaci NF- κ B se nám vyvolat nepodařilo. Po aplikaci TNF α jsme pozorovali pouze výraznou stimulaci NF- κ B signální dráhy a přítomnost NF- κ B v cytoplazmě (Obr. 1). Mezi všemi testovanými koncentracemi Aeruginosinu- 865 a kapsaicinu nebyl pozorován výrazný rozdíl, kdy NF- κ B je lokalizován v cytoplazmě. Jelikož na námi používaných buněčných liniích výrazně nefunguje translokace vyvolaná TNF α , není možné určit, zda zmiňované přírodní látky tento mechanismus ovlivňují.



Obrázek 1: Imunocytochemická detekce NF- κ B. 1 – normální buňky; 2 – nádorové buňky

Dále byl testován vliv přírodních látek na viabilitu buněčných linií v závislosti na koncentraci dané látky a době jejího působení. Zjistili jsme, že se zvyšující se koncentrací Aeruginosinu-865 dochází po 24 hod k výraznější inhibici růstu u nádorových buněk (viabilita 56%, 250 μ M Aeruginosinu-865) v porovnání s normálními buňkami (viabilita 87%, 250 μ M Aeruginosinu-865). U kapsaicinu byl tento rozdíl ještě výraznější, kde u normálních buněk viabilita dosahovala 75% ve srovnání s úplnou inhibicí růstu u buněk nádorových při použití 100 μ M kapsaicinu (Obr. 2). Mechanismus působení u Aeruginosinu-865 není přesně znám, zatímco u kapsaicinu řada studií prováděných na nejrůznějších humánních buněčných liniích popisuje rezistenci normálních buněk vůči jeho cytotoxickému vlivu a selektivní působení právě na nádorové buňky⁴.

Nebylo pozorováno zvýšení aktivity kaspázy 3 po působení Aeruginosinu-865 a kapsaicinu ani u jedné buněčné linie. Při detekci volných radikálů jsme zaznamenali rozdíly v nárůstu produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a superoxidu (SO). Po působení Aeruginosinu-865 nedocházelo ke zvýšení produkce ROS ani SO, zatímco po působení kapsaicinu byl pozorován pouze mírný nárůst produkce SO u normálních i nádorových buněk. Dále byl zaznamenán rozdíl, jakou formou buňky podstupují buněčnou smrt. Po působení kapsaicinu byl pozorován výrazný nárůst apoptotických buněk u normální buněčné linie a nekrotických buněk u nádorové buněčné linie. U Aeruginosinu-865 se nám doposud nepodařilo prokázat vliv na formu buněčné smrti.



Obrázek 2: Detekce viability pomocí MTT po 24 hod působení různých koncentrací Aeruginosinu-865 a kapsaicinu. 3T3-normální buňky a TU-nádorové buňky.

Závěry

Na myších buněčných liniích normálních a nádorových fibroblastů výrazně nefunguje translokace vyvolaná TNF α , a není možné určit, zda Aeruginosin-865 a kapsaicin tento mechanismus ovlivňují. Se zvyšující se koncentrací Aeruginosinu-865 a kapsaicinu dochází k výraznější inhibici růstu u buněk nádorových.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 109/2016/FVL.

Seznam literatury

- (1) Kapuščík 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) Reyes-Escogido Mde L, Gonzalez-Mondragon EG, Vazquez-Tzompantzi E. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules* 2011; 16:1253-1270.
- (3) Chen W, Li Z, Bai L, Lin Y-. NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011; 16:1172-85.
- (4) Lewinska A, Jarosz P, Czech J, Rzeszutek I, Bielak-Zmijewska A, Grabowska W, Wnuk M. Capsaicin-induced genotoxic stress does not promote apoptosis in A549 human lung and DU145 prostate cancer cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2015; 779:23-34.

Imunohistochemická analýza odontogenních novotvarů

Iveta Putnová, Hana Dosedělová, Denisa Řeháková, František Tichý
*Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Novotvary dutiny ústní patří mezi nejčastěji diagnostikovaná nádorová onemocnění malých zvířat. U psů se jedná zejména o maligní melanom (MM), skvamocelulární karcinom (SCC) a fibrosarkom (FSA). U koček je nejčastější SCC, méně se zjišťuje FSA. Diferenciálně diagnosticky je nutno vzít v úvahu benigní neoplazie a zánětlivé léze (virová papilomatóza, epulis, eosinofilní granulom). Poněkud jiná situace se týká incidence odontogenních tumorů, a to jak u zvířat, tak i u lidí. Jedná se o nádory, jejichž původ lze odvodit ze zbytků odontogenního epitelu, které přetrvávají v periodontálním vazivu a dásních trvale (v dásních se označují jako Serresovy epitelové zbytky, v periodontálním vazivu jako zbytky Malassezovy). V tomto případě je četnost nádorů výrazně nižší a tyto novotvary jsou považovány za relativně vzácné.

Prognóza a léčba těchto onemocnění závisí na typu nádoru a na jeho umístění v dutině ústní. Terapií první volby je ve většině případů radikální chirurgická excize, která může vyžadovat odstranění velké části čelisti. Při neadekvátní chirurgické léčbě (zejména nekompletním odstraněním novotvaru při kyretáži či enukleaci) následuje častá recidiva.

V naší práci jsme se zaměřili na stanovení imunohistochemického profilu tkání některých vybraných novotvarů dutiny ústní psa, kočky a člověka.

Materiál a metodika

Pro sledování exprese vybraných proteinů (Sox2, PCNA, cytokeratin, signální molekuly WNT dráhy, EMT markery, Actin, E-Cadherin) v tkáních novotvarů dutiny ústní jsme použili vzorky biopsií či excidovaných nádorů psa, kočky a člověka. Vzorky byly získány z Ústavu anatomie, histologie a embryologie VFU Brno a z Kliniky ústní, čelistní a obličejové chirurgie FN Ostrava. Ke stanovení exprese proteinů jsme použili metodu imunohistochemického barvení založenou na vazbě detekovaného proteinu s příslušnou specifickou protilátkou.

Fixované vzorky byly po dehydrataci vzestupnou alkoholovou řadou převedeny do parafínu, zality do histologických bločků a nakrájeny na sériové řezy. Po deparafinizaci, rehydrataci a odhalení epitopů antigenu varem v 97°C horkém citrátovém pufru s pH7 bylo na vzorky aplikováno blokační sérum na dobu 30 minut. Na takto připravená skla jsme nanесли

vybranou primární protilátku v ředění 1:50 a inkubovali po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. K vizualizaci protilátky jsme využili značenou sekundární protilátku a po zamontování jsme preparáty prohlíželi pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným fotoaparát. Zhotovené snímky byly dále upraveny pomocí programu Adobe Photoshop.

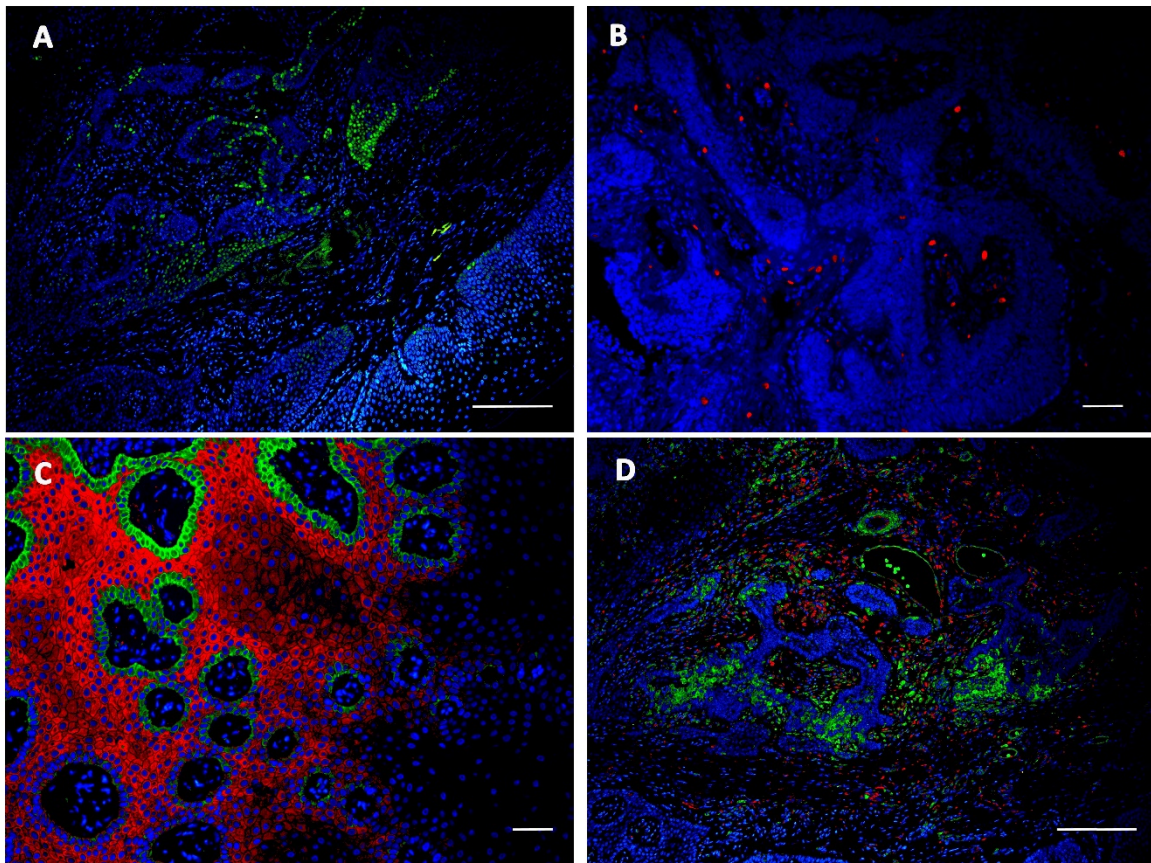
Výsledky

Expresí vybraných proteinů byla porovnávána ve vzorcích humánních, kočičích a psích nádorů dutiny ústní. Kromě vzorků humánních a kočičích ameloblastomů jsme expresi porovnávali i s výskytem sledovaných markerů ve tkáni ústního skvamocelulárního karcinomu kočky a fibrogranulomatózního epulisu psa.

Prvním studovaným faktorem bylo stanovení výskytu progenitorových buněk v nádorové tkáni. V tkáni ameloblastomů se SOX2-pozitivní buňky vyskytovaly především v epitelové vrstvě nasedající na bazální membránu, která ohraničuje tyto novotvary od okolního mezenchymu (Obr. 1A). Podobnou distribuci signálu jsme pozorovali i ve skvamocelulárním karcinomu kočky. Ve vzorku fibrogranulomatózního epulisu byly SOX2-pozitivní buňky detekovatelné pouze v orálním epitelu, avšak nikoliv ve tkáni vlastního novotvaru. Proliferující buňky (PCNA-pozitivní) bylo možné detekovat ve všech třech typech nádorů (Obr. 1B). Dělicí se buňky jsme pozorovali v malém množství v epitelové i mezenchymové oblasti vzorků, přičemž proliferace převažovala v mezenchymu přiléhajícím k nádorové tkáni ameloblastomů i karcinomu. V případě epulisu byla patrná výrazná proliferační aktivita v mezenchymální tkáni nádoru.

Předmětem výzkumu je v dnešní době i vliv exprese FZD6 na polarizaci nádorových buněk ve tkáni čelistí. V našem případě FZD6-pozitivní buňky vytvářely nepravidelné okrsky v epitelové tkáni ameloblastomů i karcinomu, kterou jsme vizualizovali cytokeratinem (Obr. 1C). Ve vzorku epulisu jsme FZD6-pozitivní buňky detekovali pouze v orálním epitelu.

Epitel humánního i kočičího ameloblastomu vykazoval pozitivitu na aktin, zejména pak na hranici s mezenchymem (Obr. 1D). V okolních mezenchymálních oblastech se také vyskytovaly buňky pozitivní na aktin, které vykazovaly i parciální pozitivitu na vimentin. Ve vzorcích skvamocelulárního karcinomu jsme rovněž na hranici orálního epitelu i nádorové tkáně s mezenchymem pozorovali větší množství aktin-pozitivních buněk, které byly zároveň částečně pozitivní na vimentin.



Obr. 1: Detekce vybraných proteinů v humánním ameloblastomu.

A) Sox2-pozitivní buňky (zelené) jsou lokalizované v oblasti epitelu, B) proliferující PCNA-pozitivní buňky (červené) jsou rozptýleny v epitelu i okolním mezenchymu, C) pouze v některých oblastech dochází k překryvu FZD6-pozitivních buněk (zelený) s cytokeratinem (červený), D) aktin-pozitivní buňky (zelené) jsou soustředěny do vrstev v blízkosti bazální membrány, zatímco vimentin-pozitivní buňky (červené) jsou rozptýleny v mezenchymu. Jádra jsou dobarvena DAPI (modře). Scale bar = 100 μm .

Závěr

Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že ve tkáních ameloblastomů humánního i kočičího původu dochází k velice podobnému vzoru exprese sledovaných molekul. Jisté odchylky v expresi molekul charakteristických pro cytoskelet (aktin a vimentin) jsme pozorovali v případě skvamocelulárního karcinomu dutiny ústní kočky. Dle očekávání vykazoval největší odchylky fibrogranulomatózní epulis psa. Všechny námi detekované proteinové markery je zároveň možné detekovat i ve specifických oblastech embryonálních čelistí jako je zubní lišta či epitelové perly a je tedy pravděpodobné, že se tyto oblasti mohou podílet na vzniku epitelových nádorů dutiny ústní.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 134/2016/FVL.

Hodnocení vlivu kapsaicinu na diethylnitrosaminem indukovanou hepatokarcinogenezi u myší

Vendula Kuchařová, Jaroslava Tomenendálová, Ondřej Daněk

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

Úvod

Tumory jater patří u lidí celosvětově mezi jedny z nejčastějších typů nádorů. Nitrosaminy, které za určitých podmínek vznikají v potravinách během jejich výroby či skladování, patří mezi vědecky prokázané hepatokarcinogeny. Mezi jednu z nejpoužívanějších látek pro vyvolání tumorigeneze v játrech experimentálních zvířat patří z této skupiny diethylnitrosamin (DEN). Kapsaicin, alkaloid produkovaný rostlinami rodu *Capsicum*, se vyznačuje mimo jiné prokazatelným antimutagenním a antikarcinogenním působením *in vitro* i *in vivo*. Cílem tohoto projektu bylo posoudit efekt kapsaicinu na diethylnitrosaminem indukovanou tumorigenezi v játrech na myším *in vivo* modelu.

Materiál a metodika

Průběh experimentu

V experimentu bylo použito 51 myší kmene CD-1 samičího pohlaví. Experiment byl zahájen po čtyřtýdenní aklimatizaci a probíhal v souladu s předpisy na ochranu zvířat proti týrání. Na základě aplikovaných látek a aplikačního schématu byly myši rozděleny do 5 skupin (tabulka 1).

Skupina	Týden								
	1	2	3	5	7	9	11	13	
EtOH (n= 11)			1% roztok etanolu	1% roztok etanolu	1% roztok etanolu	1% roztok etanolu	1% roztok etanolu	1% roztok etanolu	eutanázie
KAP (n=10)			kapsaicin 1,5 mg/k g v 1% etanolu	kapsaicin 1,5 mg/k g v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	eutanázie
KAP-DEN (n=10)	kapsaicin 1,5 mg/k g v 1% etanolu	DEN 25 mg/kg v 0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	eutanázie

DEN-KAP (n=10)		DEN 25 mg/kg v 0,9% NaCl	kapsaicin 1,5 mg/k g v 1% etanolu	kapsaicin 1,5 mg/k g v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	kapsaicin 0,75 mg/ kg v 1% etanolu	eutanázie
DEN (n=10)		DEN 25 mg/kg v 0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	eutanázie

Tabulka 1. Aplikační schéma. DEN = diethylnitrosamin.

Analýzy

V průběhu experimentu byly myši pravidelně každý týden váženy a ve dvoutýdenních intervalech byl odebírán vzorek krve z ocasní žíly pro stanovení hematokritu a zhotovení krevního nátěru. Na závěr experimentu byla provedena eutanázie předávkováním anestetika (éter) s následnou dekapitací. Od každé myši byly získány vzorky: krevní sérum, játra, ledvina, slezina, plíce a srdce a byl zhotoven krevní nátěr a nátěr z aspirátu kostní dřeně.

Nátěry krve a kostní dřeně byly obarveny dle Pappenheima a probíhá mikroskopické vyhodnocení. Krevní sérum bylo následně využito ke stanovení koncentrace sérových proteinů a aktivit ALT a AST (Biochemický analyzátor DPC Konelab 20i – Thermo Scientific) a byla provedena elektroforetická separace jednotlivých proteinových frakcí (HydraGel B1-B2, Sebia, Francie).

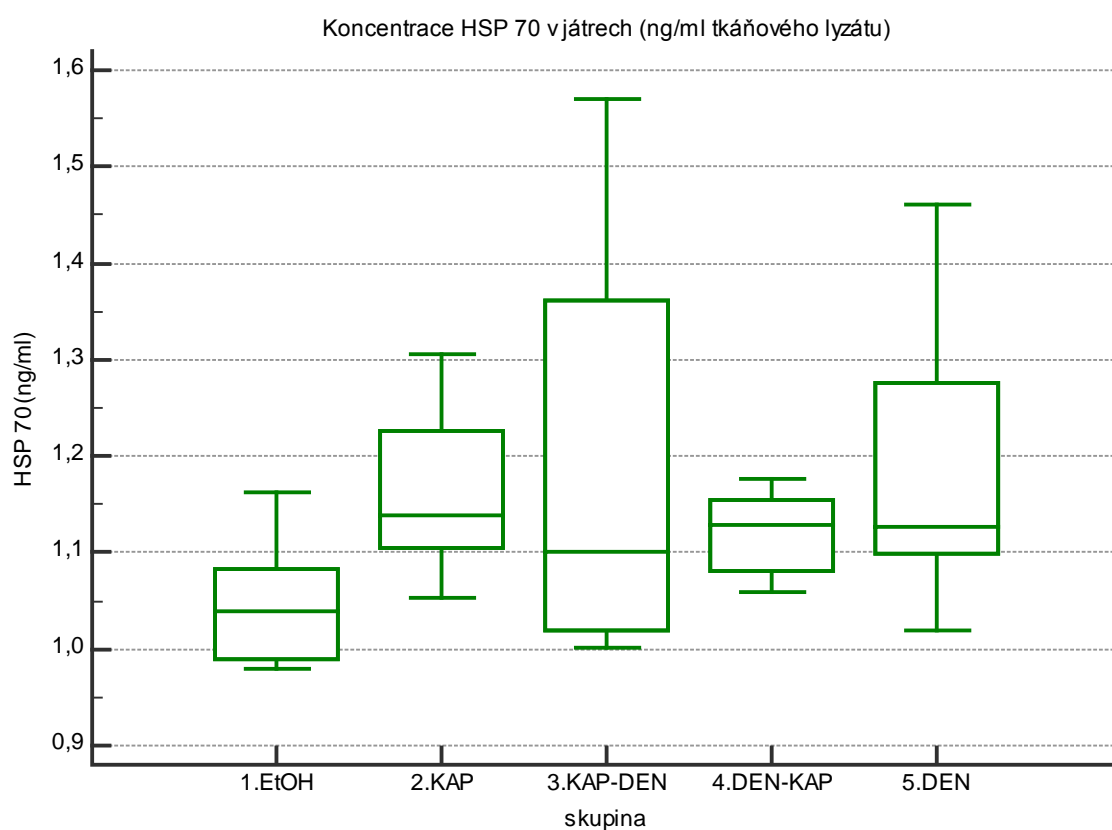
Orgány byly po fixaci v pufovaném formalínu zality do parafinových bločků. Řezy jater byly obarveny hematoxylin-eosinem pro mikroskopické vyšetření, rovněž bude provedena imunohistochemická detekce kaspázy-3 (Rabbit polyclonal Anti-Glutamine Synthetase antibody, Abcam, UK) a glutamin-syntetázy (Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E) Rabbit mAb, Cell Signaling Technologies, USA). V tkáňovém lyzátu jater byla dále stanovena koncentrace HSP-70 (HSP70 ELISA Kit, Abcam, UK). Výsledky byly zpracovány pomocí statistického programu MedCalc.

Výsledky

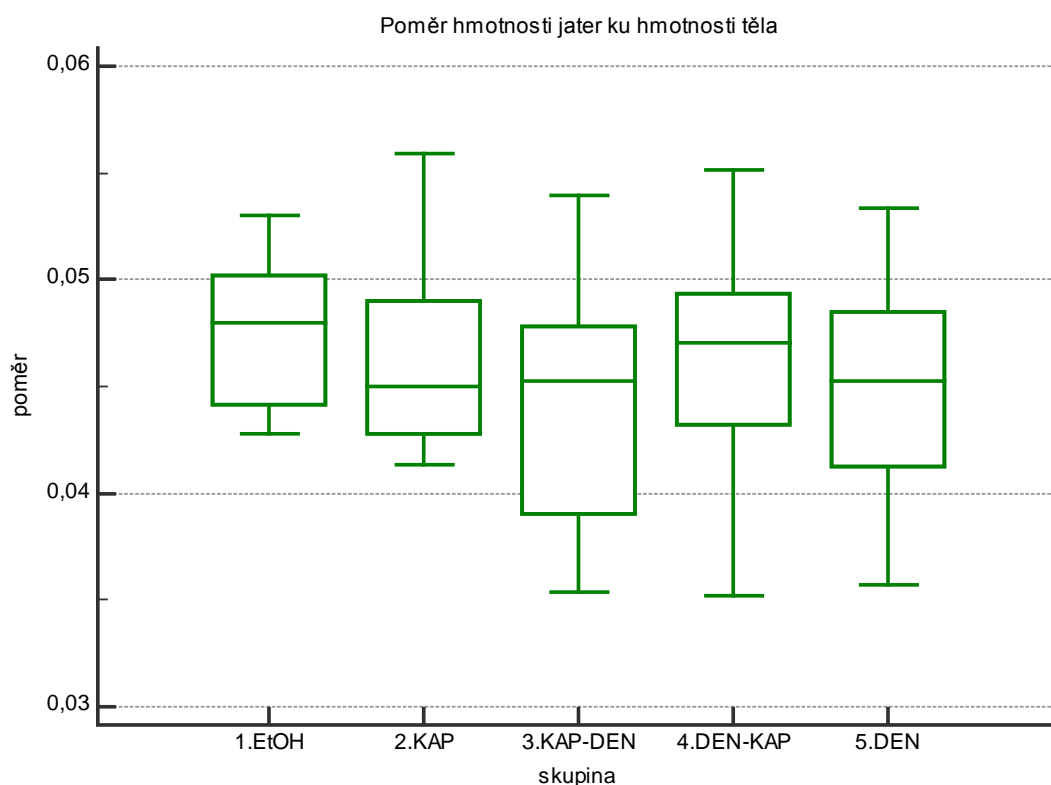
Výsledky vybraných analýz jsou shrnuty v tabulce 2 a grafu 1. Statisticky nebyl prokázán efekt kapsaicinu na hepatokarcinogenezi. Statisticky významná se jeví negativní korelace poměru hmotnosti jater k hmotnosti těla a koncentrace HSP 70 v játrech ($P < 0,01$, graf 2).

	Poměr hmotnost jater/tělesná hmotnost	Sérová AST (μkat/)	Sérová ALT (μkat/)	HSP 70 (ng/ml lyzátu hepatocytů)
EtOH	0,0473 \pm 0,0038	2,43 \pm 0,72	0,37 \pm 0,13	1,046 \pm 0,065
KAP	0,0461 \pm 0,0046	1,95 \pm 0,48	0,36 \pm 0,08	1,162 \pm 0,092
KAP-DEN	0,0443 \pm 0,0058	2,43 \pm 0,76	0,35 \pm 0,12	1,176 \pm 0,193
DEN-KAP	0,0462 \pm 0,0060	2,01 \pm 0,48	0,32 \pm 0,08	1,121 \pm 0,045
DEN	0,0450 \pm 0,0061	2,37 \pm 0,50	0,35 \pm 0,10	1,179 \pm 0,144

Tabulka 2. Výsledky analýz jsou uvedeny jako průměr \pm SD.



Graf 1. Koncentrace HSP 70 v lyzátu hepatocytů.



Graf 2. Poměr hmotnosti jater k hmotnosti těla.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 114/2016/FVL.

Seznam literatury

BLEY K., BOORMAN G., MOHAMMAD B., MCKENZEIE D., BABBAR S. A. Comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol.* 2012, 40(6), 847-873.

JANG J.J., CHO K.J., LEE Y.S., BAE J.H. Different modifying responses of capsaicin in a wide-spectrum initiation model of F344 rat. *J Korean Med Sci.* 1991, 6(1), 31-36.

JANG J.J., KIM S.H. The Promoting Effect of Capsaicin on the Development of Diethylnitrosamine-initiated Enzyme Altered Hepatic Foci in Male Sprague - Dawley Rats. *J Korean Cancer Assoc.* 1988, 20(1), 1-8.

LEE J., LIM K.T. Activity of tumor necrosis factor- α blocked by phytolectin (38 kDa) at initiation stage in N-nitrosodiethylamine-induced ICR mice. *Mol Cell Biochem.* 2012, 362(1-2), 177-186.

TOLBA R., KRAUS T., LIEDTKE C., SCHWARZ M., WEISKIRCHEN R. Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory Animals.* 2015, 49(1 Suppl), 59-69.

Srovnání tří elektrokardiografických přístrojů pro diagnostiku kardiovaskulárních poruch u plazů

Anna Zemanová, Veronika Sochorcová, Zdeněk Knotek

Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, Fakulta veterinárního lékařství

Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno

Úvod

Obdobně jako u jiných pacientů lze i u plazů využít EKG k odhalení zdravotních alterací a pro monitorování stavu pacienta v průběhu anestezie. Klasickými parametry, které jsou hodnoceny, jsou srdeční frekvence, rytmus, intervaly a komplexy, amplitudy a směr hlavní elektrické osy. Srdeční kontrakce začíná v pravé síni v oblasti *sinus venosus* a konečného úseku *vena cava posterior*. Tento fakt se na EKG může projevit jako přídatná vlna SV. U plazů jsou odlišovány komplexy P, QRS, T. P vlna odpovídá depolarizaci síní, QRS komplex depolarizaci komory a T vlna repolarizaci komory. Amplituda je všeobecně velmi nízká – méně než 1 mV, což vyžaduje použití vhodného EKG přístroje – ne všechny přístroje používané v praxi u malých zvířat jsou dostatečně citlivé pro měření nízkých amplitud. Proto je nutné vzájemně porovnat standardně používané přístroje a určit jejich možnost použití pro diagnostiku kardiovaskulárního aparátu v pokročilé medicíně plazů.

Materiál a metodika

Pokusná zvířata

Bylo použito 12 dospělých leguánů (9 samců/3 samice; 10 – 15 let) - pacientů kliniky plazů (KCHPPDS) s příznaky onemocnění kardiovaskulárního systému nebo zdravých jedinců. Jednalo se o pacienty ošetřené ambulantně případně hospitalizované ve standardních hospitalizačních teráriích KCHPPDS při konstantním cyklu světlo/tma (12hod/12hod). Voda a potrava byla volně dostupná odpovídající druhu zkoumaného jedince. Nebyly prováděny žádné invazivní zákroky – nebylo nutné schválení pokusů.

Přístroje

Pro získání záznamů EKG byla vyšetření provedena na třech typech přístrojů (tři přístroje používané doposud pouze k měření EKG u psů a koček, případně drobných savců). Konkrétně se jednalo o tradiční přístroj EKG Seiva Practic vet s použitím standardních EKG svorek; přístroj používaný doposud v zahraničí pro EKG u exotických zvířat CardioStore ECG (Vetronic Services, UK) s použitím standardních EKG svorek; zcela nový přístroj pro klinické využití ve veterinární praxi EKG iPhone - AliveCor Veterinary heart monitor s přímým přiložením elektrod na povrch těla pacienta bez svorek.

Zapojení

Pro leguány byly použity standardní svody zakončené klasickými krokosvorkami. Pro vytvoření optimálního kontaktu svodů s povrchem těla plazů byl použit indiferentní gel. Končetinové svody byly umístěny na krk (žlutý doleva, červený doprava) a na kůži z boku do místa dotyku přiloženého kolene (zelený doleva, černý doprava; Obr. 1). Pro zmírnění stresu při měření EKG byla všem jedincům zakryta hlava ručníkem.

Měření pomocí iPhoneu (Alive Cor ECG) bylo provedeno na levém boku v úrovni axily.

Měření

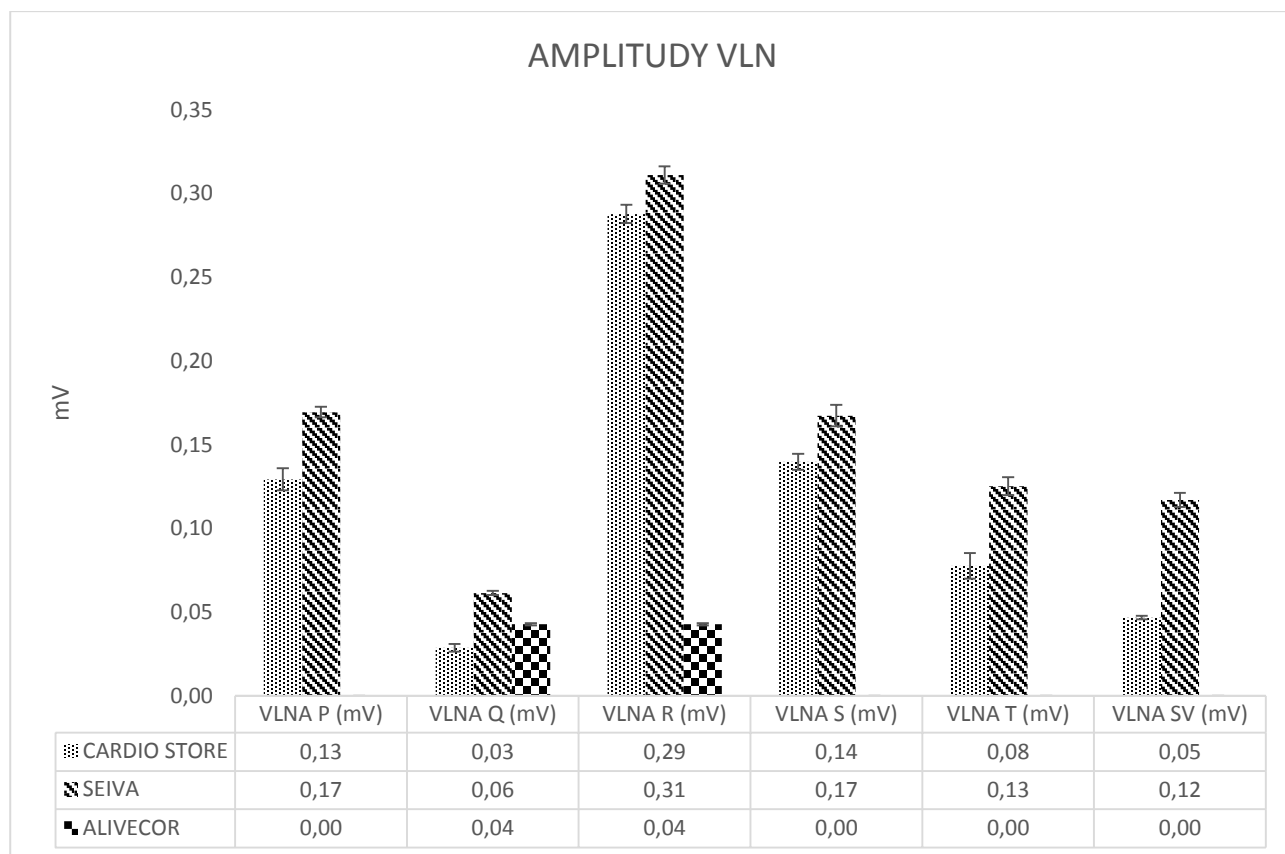
Měření proběhlo pomocí všech tří přístrojů během jednoho sezení. Při měření přístroji zapojenými přes elektrody zůstaly krokosvorky připojeny na těle zvířete a měnila se pouze koncová část vedoucí k přístroji. Přístrojem CardioStore a AliveCor byl měřen záznam o minimální délce 3 minuty, přístroj Seiva umožňuje záznam měření pouze 10 sekund, tato měření byla provedena 2, uložen byl vždy záznam bez výrazných rušivých artefaktů jako je pohyb zvířete apod. U zvířat byla měřena teplota tělního povrchu (bezkontaktním teploměrem, paprsek mířen na bok zvířete; 22,5 °C – 30,9 °C) a teplota místnosti (22,6 °C – 28 °C).



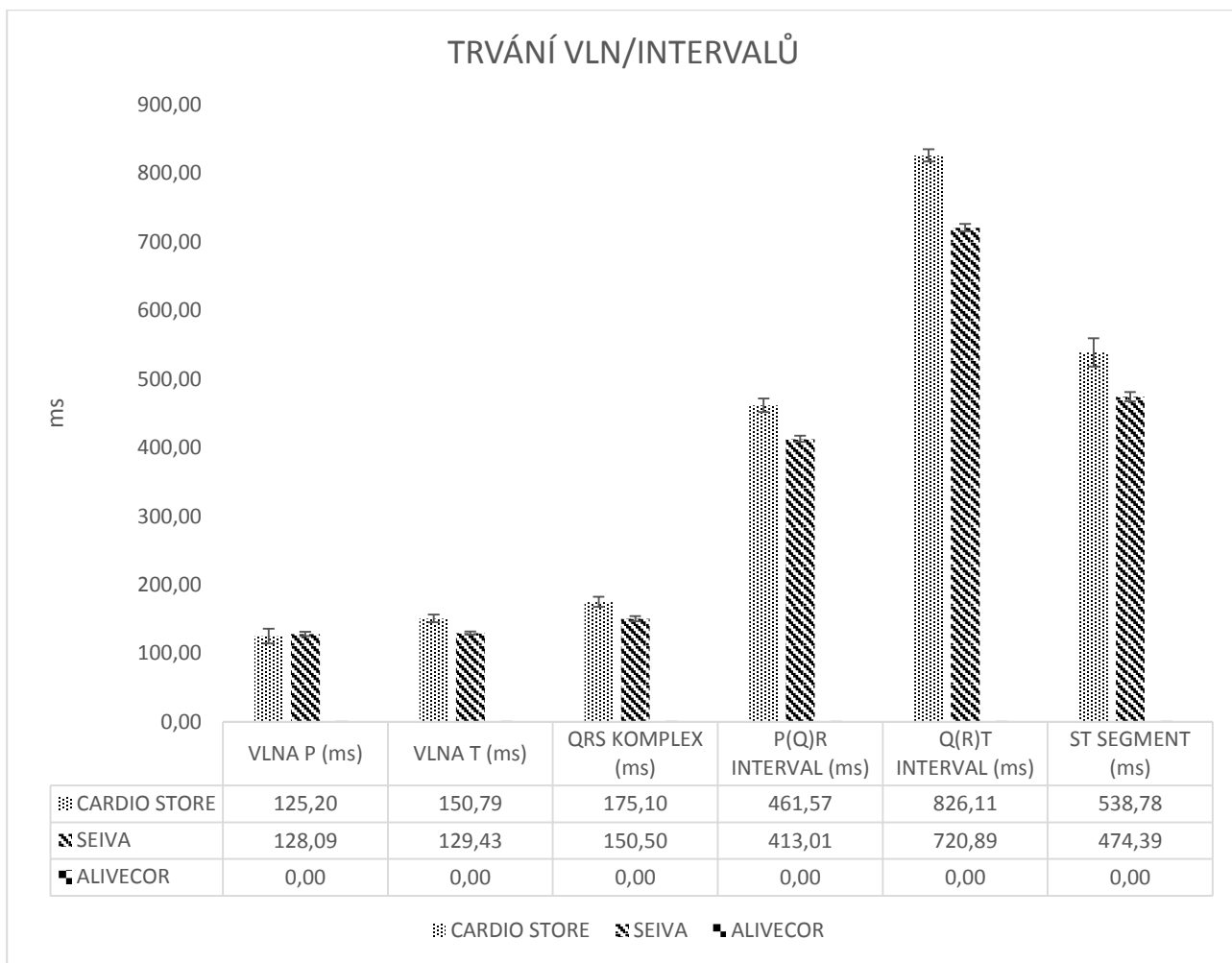
Obr. 1: Zapojení svodů v pokuse – hlava překryta ručníkem pro snížení stresových artefaktů (Foto a úprava: A. Zemanová)

Výsledky

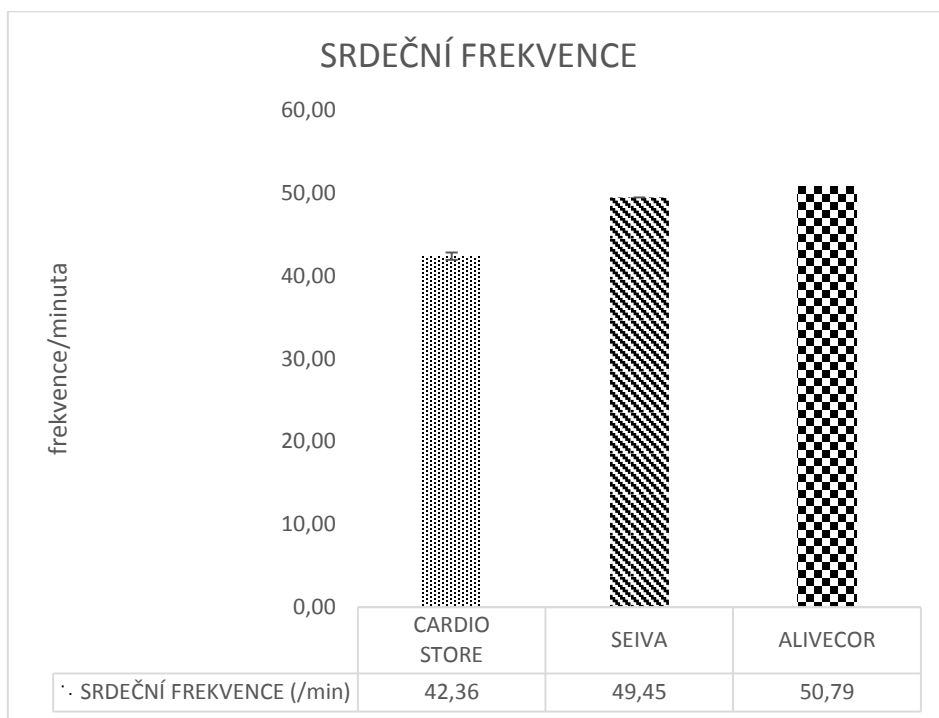
Byly hodnoceny tyto parametry: vlna P (první negativní nebo pozitivní výchylka před QRS komplexem – měřena amplituda a trvání), vlna Q (první negativní výchylka před R vlnou – měřena amplituda), vlna R (první pozitivní výchylka QRS komplexu – měřena amplituda), vlna S (první negativní výchylka po R vlně – měřena amplituda), vlna T (první negativní nebo pozitivní výchylka po QRS komplexu – měřena amplituda a trvání), vlna SV (pokud jsou po QRS komplexu dvě vlny – SV vlna je druhá – mezi vlnou T a P – měřena amplituda), PQ intervalů (úsek od začátku vlny P po začátek QRS komplexu – v případě nepřítomnosti Q vlny mluvíme o PR intervalu), QT interval (úsek od začátku vlny Q po konec vlny T – v případě nepřítomnosti vlny Q mluvíme o RT intervalu), ST segment (úsek od konce vlny S po začátek vlny T – zároveň sledujeme i jeho elevaci/depresi), SVP interval (v případě přítomnosti vlny SV je to úsek od začátku SV vlny po konec P vlny), a srdeční frekvence. Amplitudy byly měřeny v milivoltech a délky trvání vln/intervalů/segmentů v milisekundách. Z každého parametru proběhlo měření 20 hodnot (pokud to záznam umožňoval) u všech tří přístrojů. Výsledky z přístroje CardioStore ECG byly měřeny v počítačovém programu, výsledky z přístrojů EKG Seiva Practic vet a AliveCor Veterinary heart monitor byly zaznamenány do počítače, vytištěny a měřeny pomocí elektronického posuvného měřidla, hodnoty byly následně z mm přepočítány na ms/mV. Následně byly hodnoty zaznamenány do grafů pro přehlednost srovnání (Graf 1, Graf 2, Graf 3).



Graf 1: Znázornění srovnání přístrojů při měření amplitud vln



Graf 2: Znárodnění srovnání přístrojů při měření trvání vln, intervalů a segmentů



Graf 3: Znárodnění srovnání přístrojů při měření parametru srdeční frekvence

Závěr

Elektrokardiografie je slibnou metodou k hodnocení kardiovaskulárních poruch. Při srovnávání tří přístrojů bylo zjištěno několik výhod a nevýhod, které budou probrány v následujících bodech:

CardioStore ECG (Vetronic Services, UK)

- + možnost uložení záznamu dlouhého až 20 minut
- + možnost úpravy v počítačovém programu a tím přesnější hodnocení
- + možnost zapojení pomocí standardních svodů na standardizovaná místa na těle leguána
- při měření lze sledovat pouze na malém displeji, dochází k nepřesnostem při interpretaci přímo nad pacientem

EKG Seiva Practic vet

- + možnost sledování přímého záznamu na monitoru počítače, nedochází k nepřesnostem při interpretaci přímo nad pacientem
- + možnost zapojení pomocí standardních svodů na standardizovaná místa na těle leguána
- možnost uložení záznamu dlouhého pouze 10 sekund
- omezená možnost úpravy v počítačovém programu
- nutnost měření ručně po vytisknutí

EKG iPhone - AliveCor Veterinary heart monitor

- + menší invazivita měření (pouhé přiložení přístroje bez nutnosti připojení klipů)
- + možnost uložení libovolně dlouhého záznamu
- nižší možnost standardizovaného umístění elektrod
- není možné upravovat v počítačovém programu
- nutnost měření ručně po vytisknutí

Ve výsledku měření není významný rozdíl mezi přístroji EKG Seiva Practic vet a CardioStore ECG. Oba přístroje byly shledány jako možné pro použití v pokročilé medicíně plazů. Odchytky mohly vzniknout díky nepřesnosti v měření případně i změnami některých parametrů díky prodlužující se manipulaci s jedinci. U přístroje AliveCor EKG došlo pravděpodobně k nepřesnosti měření v důsledku nesprávně zvoleného místa přiložení elektrod. Přístroj je kvalitní možností pro monitoring zvířete v anestezii (zaznamenání srdeční frekvence případně arytmií), ale podle autorů není vhodný pro stanovování přesných elektrokardiografických parametrů pro měření v diagnostice onemocnění kardiovaskulárního aparátu.

Poděkování

Autoři by rádi poděkovali Fyziologickému ústavu VFU za zapůjčení přístroje EKG Seiva Practic vet. Dále by rádi poděkovali grantu IGA VFU Brno 119/2016/FVL, kterým byla práce zafinancována.

Seznam literatury

SCHILLIGER, L. H. Reptile cardiology. Proc. 2nd. International Conference on Avian, Herpetological and Exotic Mammal Medicine, 18.–24. 4. 2015, Paris, 2005:44-54.

SNYDER, P. S., SHAW, N. G., HEARD, D. J. Two-dimensional echocardiographic anatomy of the snake heart (*Python molurus bivittatus*). Vet Radiol Ultrasound 1999;40:66-72. 18.

SCHILLIGER, L. H, TESSIER, D., POUCHELON, J. L., CHETBOUL, V. Proposed Standardization of the Two-Dimensional Echocardiographic Examination in Snakes. Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 2006;16:77-87.

DAHAN, M. Elektrokardiographische Untersuchungen beim Grünen Leguan (*Iguana iguana*). Dizertační práce. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006:101 s.

HOLZ, R. M., HOLZ, P. Electrocardiography in anaesthetised red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). Research in Veterinary Science, 1995;58:67-69.

Kongenitální anomálie páteře u králíků

Pavel Proks, Andrea Nečasová, Alois Nečas, Andrea Štusáková

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

Úvod

Kongenitální a vývojové anomálie obratlů bývají častým náhodným nálezem při rentgenologickém vyšetření páteře u společenských zvířat. Popisované kongenitální a vývojové vady obratlů u domácích zvířat zahrnují abnormální počty obratlů, přechodové obratle, blokové obratle a hemivertebrae, malformace atlantoaxiálního spojení a rozštěp páteře (spina bifida). Abnormální počty obratlů a přechodové obratle v cervikothorakální a thorakolumbální části páteře zpravidla nezpůsobují klinické problémy, mohou však vést k chybnému určení místa komprese míchy při dekompresní operaci. Hemivertebrae a blokové obratle jsou považovány za náhodný nález bez klinického významu, v některých případech jsou však příčinou stenózy páteřního kanálu nebo predispozicí pro výhřez meziobratlové ploténky. Spina bifida je často diagnostikována jako náhodný nález bez klinického významu (spina bifida occulta), v některých případech bývá spojena s výhřezem míchy a neurologickými příznaky. Výskyt přechodových obratlů v lumbosakrální oblasti způsobuje vyšší výskyt syndromu cauda equina. Prevalence kongenitálních anomálií páteře a variabilita počtu obratlů v jednotlivých úsecích páteře u králíků nebyla podle znalostí autorského kolektivu doposud publikována.

Cílem předkládané práce je stanovit prevalenci kongenitálních anomálií páteře a variabilitu počtu obratlů v jednotlivých úsecích páteře u reprezentativního počtu králíků pomocí rentgenologického vyšetření.

Materiál a metodika

Do studie byly zařazeny rentgenogramy páteře králíků vyšetřovaných na Klinice chorob ptáků, plazů a drobných savců a Oddělení zobrazovacích metod Kliniky chorob psů a koček. Rentgenogramy páteře byly zhotoveny v laterolaterální (LL) a ventrodorzální (VD) projekci. Všechny rentgenogramy u králíků byly zhotoveny v inhalační anestezii na rentgenovém přístroji Proteus XR/a,(GE) v digitálním formátu (CR, Capsula XL, Fuji) a bez použití sekundární clony. Do výsledků studie byly retrospektivně zařazeny i rentgenogramy páteře králíků z předchozích vyšetření provedených na Oddělení zobrazovacích metod. Z rentgenogramů byla zaznamenána četnost výskytu kongenitálních vad v krční (C), hrudní (Th), bederní (L) a křížové (S) oblasti páteře

a počty obratlů v C, Th, L, S oblasti páteře. Za kongenitální vady byla považována přítomnost hemivertebrae, blokového obratle, přechodového obratle a rozštěp páteře.

Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 250 králíků (120 samců, 130 samic). Normální morfologie obratlů byla zaznamenána v 214 případech (98 samců, 116 samic). U jedinců bez morfologických anomálií obratlů bylo podle počtu obratlů v jednotlivých úsecích páteře zaznamenáno celkem 7 různých vzorů složení páteře (Tab. 1).

Tabulka 1. Zastoupení jednotlivých vzorů složení páteře u králíků bez přítomnosti kongenitální anomálie obratlů.

Vzor	Samice		Samec		Celkem	Celkem %
	Počet	%	Počet	%		
C7/Th11/L7/S4	1	0,4	0	0	1	0,4
C7/Th12/L6/S4	4	1,6	4	1,6	8	3,2
C7/Th12/L7/S4	104	41,6	88	35,2	192	76,8
C7/Th12/L7/S5	2	0,8	2	0,8	4	1,6
C7/Th12/L7/S6	1	0,4	0	0	1	0,4
C7/Th12/L8/S4	1	0,4	2	0,8	3	1,2
C7/Th13/L7/S4	3	1,2	2	0,8	5	2
Celkem	116	46,4	98	39,2	214	85,6

U 36 králíků (22 samců, 14 samic) byla zjištěna kongenitální anomálie páteře. V 31 případech byla u stejného jedince zjištěna pouze jedna kongenitální anomálie, v 5 případech bylo u stejného jedince zaznamenáno více kongenitálních anomálií (Tab. 2). Přítomnost jedné kongenitální anomálie byla nejčastěji lokalizována na přechodu hrudní a bederní páteře (24 případů). V krční části páteře byly zaznamenány 2 případy. Na přechodu bederní a křížové části páteře 5 případů. Z jednotlivých typů kongenitálních anomálií byla zaznamenána přítomnost motýlovitého obratle

(2), thorakolumbárního přechodového obratle (27), lumbosakrálního přechodového obratle (6), haemivertebrae (2) a skoliózy (4).

Tabulka 2. Prevalence kongenitálních anomálií páteře u králíků

Typ patologie	Složení páteře	Lokalizace	Počet
Kongenitální anomálie			
Motýlovitý obratel	C7/Th12/L7/S4	Krční (C3)	1
	C7/Th12/L7/S4	Krční (C5)	1
LTV	C7/Th12/L6/LTV/S4	LS	2
	C7/Th12/L7/LTV/S4	LS	1
	C7/Th12/L7/LTV/S3	LS	1
	C7/Th12/L6/LTV/S3	LS	1
TTV Unilaterální žebro	C7/Th11/ TTV/L7/S4	TL	4
	C7/Th12/TTV/L7/S4	TL	6
TTV unilaterální žebro, nekompletní osifikace	C7/Th11/TTV/L7/S4	TL	1
	C7/Th12/TTV/L7/S4	TL	1
TTV unilaterální rudimentární žebro, normální kontralaterální žebro	C7/Th11/TTV/L7/S4	TL	2
	C7/Th12/TTV/L7/S4	TL	4
TTV bilaterálně rudimentární žebro	C7/Th11/TTV/L6/S4	TL	1
	C7/Th12/TTV/L6/S4	TL	5
Kombinovaná kongenitální anomálie			
Skolióza	C7/Th12/L6/S4	C	1

Skolióza + TTV	C7/Th12/TTV/L6/S4	TL	1
Skolióza + haemivertebrae + TTV	C7/Th12/TTV/L6/S4	TL	2
Skolióza + TTV+LTV	C7/Th12/TTV/L6/LTV/S 4	TL, LS	1
Celkem			36

TTV – thorakolumbární přechodový obratel, LTV – lumbosakrální přechodový obratel, TL – thorakolumbární, LS - lumbosakrální

Závěr

Rozpoznání přesného počtu obratlů v jednotlivých úsecích páteře je nezbytné k provádění chirurgických zákroků na páteři. U králíků byla zjištěna variabilita počtu obratlů v jednotlivých úsecích páteře. Celkem bylo zaznamenáno 7 různých variant složení páteře. Kongenitální anomálie páteře byly zaznamenány v 14,4 % případů nejčastěji na přechodu hrudní a bederní a bederní a křížové části páteře.

Seznam literatury

- MEREDITH AL, RICHARDSON J: Neurological diseases of rabbits and rodents. J Exot Pet Med. 2015;24:21-33.
- NEWITT A, GERMAN AJ, BARR FJ. Congenital abnormalities of the feline vertebral column. Vet Radiol Ultrasound. 2008;49: 35-41.
- PROKS P, STEHLIK L, PANINAROVA M, IROVA K, HAUPTMAN K, JEKL V. Congenital abnormalities of the vertebral column in ferrets. Vet Radiol Ultrasound. 2015;56:117-123.
- WESTWORTH DR, STURGES BK. Congenital spinal malformations in small animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2010;40:951-981.
- WHITTINGTON JK, AVERY BENNET R. Clinical technique: myelography in rabbits. J Exot Pet Med. 2011;20:217-221.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno IGA 120/2016/ FVL.

Neinvazivní markery jaterní fibrózy v diagnostice chronických hepatopatií u psů

Václav Cepelcha¹, Kristína Řeháková², Miša Škorič³, Denisa Kousalíková¹, Rastislav Gončár¹,
Adam Slaviček¹, Michal Crha¹

Klinika chorob psů a koček¹, Klinická laboratoř pro malá zvířata², Ústav patologické morfologie a parazitologie³, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Jaterní fibróza je charakterizována jako zmnožení vaziva v jaterní tkáni, zpravidla v periportálním prostoru (Rothuizen 2008). Za zlatý standard pro rozpoznání a *staging* jaterní fibrózy bylo dlouhou dobu považováno histopatologické vyšetření jaterní tkáně odebrané biopsií. Vzhledem k úskalím, které odběr biopátů doprovází (nutnost celkové anestezie, riziko krvácení, bolestivost, finanční a časová náročnost) je v současné době tendence nahradit je neinvazivními metodami diagnostiky, a to minimálně v indikaci monitoringu průběhu terapie. Neinvazivní markery jaterních onemocnění můžeme rozdělit na 1) přímé a 2) nepřímé. Jako přímé markery jaterní fibrózy slouží v humánní medicíně cytokiny ovlivňující fibrogenezi, např. TGF- β 1 či mnoho látek (např. kyselina hyaluronová HA), jejichž zvýšená tvorba a následná degradace v extracelulární matrix (ECM) se projeví současným zvýšením jejich koncentrací v krevním séru (Rosenberg *et al.* 2004). Nepřímé markery fibrózy nesouvisí přímo s vlastní fibrogenezí, ale s procesy odrážejícími postupnou alteraci jaterních funkcí v důsledku fibrotizace jaterního parenchymu (Grigorescu 2006) – využívá se tak např. indexu APRI - poměru AST/trombocyty (Sebastiani 2009) či de Ritisova indexu - poměru AST/ALT (Botros & Sikaris 2013). Podle Poynarda *et al.* (2012) je využití některých neinvazivních markerů při diagnostice fibrózy jater v humánní medicíně dokonce citlivější pro rozlišení mírných stupňů fibrózy než provedená biopsie. Ve veterinární medicíně je doposud velmi málo dat týkajících se užití neinvazivních markerů jaterní fibrózy.

Nalezení spolehlivého biochemického markeru by bylo benefitem nejen pro diagnostiku jaterní fibrózy u psů, ale zejména pro následný monitoring a případnou modifikaci antifibrotické terapie. Cílem projektu bylo: 1) stanovit kys. hyaluronovou (HA) metodou ELISA u zdravých psů, 2) stanovit potenciálně využitelné přímé i nepřímé neinvazivní markery fibrózy u pacientů s hepatopatiemi, 3) určit korelaci mezi neinvazivními markery a jaterní fibrózou u psů s ohledem na stupeň fibrózy vyhodnocený na základě standardizovaného skórovacího systému METAVIR.

Materiál a metodika

Na základě odběru národně, podrobné anamnézy, provedení klinického a paraklinického vyšetření (ultrasonografické vyšetření dutiny břišní), hematologického a biochemického vyšetření

krve následoval výběr vhodných jedinců do kontrolní a pokusné skupiny. V rámci hematologického vyšetření byl stanoven hemogram vč. diferenciálního rozpočtu leukocytů, biochemické vyšetření zahrnovalo stanovení následujících parametrů: celková bílkovina, albumin, urea, kreatinin, celkový bilirubin, ALT, ALP, AST, GGT, cholesterol, glukóza, Ca, P, Na, K, Cl. Krev byla odebrána *lege artis* z *v. jugularis externa*. U všech pacientů zařazených do kontrolní i pokusné skupiny byly v krevním séru analyzovány koncentrace kyseliny hyaluronové (Hyaluronan Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA) a TGF- β 1 (Human TGF-beta 1 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, USA) metodou ELISA. Před vlastní laparoskopickou biopsií jater bylo provedeno hemostazeologické vyšetření (PT, APTT, fibrinogen) a test slizničního krvácení. Do kontrolní skupiny byli zařazeni psi bez klinických příznaků onemocnění a bez zjištěných abnormalit v provedeném klinickém či paraklinickém vyšetření. Odběr biopsií jaterní tkáně probíhal v celkové anestezii s postoperační aplikací analgetik, a to u všech pacientů s podezřením na chronickou hepatopatii (pokusná skupina) a u vybraných jedinců, kteří byli v celkové anestezii z důvodu jiného standardního chirurgického zákroku (část kontrolní skupiny). Do druhé zmiňované skupiny byli zařazeni pacienti na základě změn biochemických parametrů a/nebo abnormálního ultrasonografického nálezu (nodulární léze, alterace echogenity jaterního parenchymu, nález mikrohepatie/hepatomegalie, změny v rámci biliárního systému). Skupina pacientů byla dále rozdělena na podskupinu 1 (vaskulární onemocnění jater), podskupinu 2 (parenchymatózní onemocnění jater) a podskupinu 3 (onemocnění žlučových cest). V rámci chirurgického zákroku vždy došlo k odběru min. 3 ks biopsií z různých jaterních laloků. Vlastní biopsie jater byla provedena biopsií klíšťkami, místo biopsie pak bylo ošetřeno lokálním hemostatikem (Surgicel, Ethicon, Johnson&Johnson, USA) nebo elektrokoagulací. Všechna vyšetření probíhala na Klinice chorob psů a koček, příp. v Klinické laboratoři pro malá zvířata VFU Brno. Posléze byly jaterní biopsie fixované ve formalínu vyšetřeny v histopatologické laboratoři Ústavu patologické morfologie a parazitologie s použitím speciálního barvení na kolagenní vlákna (saturnová červeň) a v případě nálezu parenchymatózního onemocnění jater zařazeny dle míry fibrózy na základě použití standardizovaného skórovacího systému METAVIR do skupiny F1 až F4 (cirhóza). Ke statistickému zhodnocení dat byla použita deskriptivní statistika. Po ověření normality (Shapiro-Wilkův test) a homoscedasticity (Levenův test) bylo v případě potřeby přistoupeno k logaritmicizaci a posléze zpětné transformaci dat a provedení parametrického vícevýběrového testu (jednocestná ANOVA) následovaného Tukey HSD post hoc testem. Pokud data nesplňovala některá z výše uvedených kritérií, byl zvolen neparametrický test (Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitneyův U test). Ke statistickému zpracování dat byl použit statistický software MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgie).

Výsledky

Z celkového počtu 16 zdravých zvířat zařazených do kontrolní skupiny byla biopsie jater provedena u 4 jedinců. Soubor tvořilo 5 psů a 11 fen (z toho 3 kastované), ve věku od 10 měsíců do 6,5 let (medián 4,5 roku). V souboru byla zastoupena následující plemena: labradorský retrívr (n=2), zlatý retrívr (n=2), borderkolie (n=2), australský ovčák (n=2), shiba inu (n=1), německý ovčák (n=1), americký kokršpaněl (n=1), irský setr (n=1), kernterier (n=1), kříženci (n=4). Do skupiny pacientů bylo zařazeno celkem 28 zvířat s hepatobiliárním onemocněním, z toho 12 psů a 16 fen (1 kastovaná), ve věku od 6 měsíců do 13 let (medián 6 let). Ve skupině pacientů byla zastoupena následující plemena: yorkshirský teriér (n=6), pražský krysařík (n=2), labradorský retrívr (n=2), zlatý retrívr (n=1), americký kokršpaněl (n=1), anglický kokršpaněl (n=1), West Highland White teriér (n=1), borderkolie (n=1), jezevčík (n=1), výmarský ohař (n=1), belgický ovčák (n=1), hovawart (n=1), italský chrtík (n=1), beagle (n=1), foxteriér (n=1), bišonek (n=1), pudl (n=1), knírač (n=1), kříženci (n=3). Do podskupiny 1 (n=8) byli zařazeni pacienti s diagnostikovaným portosystémovým zkratem (PSS), podskupina 2 (n=14) zahrnovala pacienty s neoplazmiemi jater (n=6) a s chronickou hepatitidou (n=8) a podskupinu 3 (n=6) tvořili jedinci s diagnózou akutní pankreatitida se sekundární cholestázou, emfyzematózní cholecystitida a mukokéla.

Medián koncentrace kyseliny hyaluronové v kontrolní skupině byl 27,93 $\mu\text{g/l}$ (13,95–89,52 $\mu\text{g/l}$), u pacientů podskupiny 1 141,93 $\mu\text{g/l}$ (75,86–289,61 $\mu\text{g/l}$), podskupiny 2 91,47 $\mu\text{g/l}$ (7,45–420 $\mu\text{g/l}$) a podskupiny 3 48,93 $\mu\text{g/l}$ (6,56–71,43 $\mu\text{g/l}$).

Bylo zjištěno, že pacienti s PSS a parenchymatózním onemocněním jater měli statisticky vysoce signifikantně ($p < 0,01$) vyšší hladinu kys. hyaluronové v porovnání s kontrolní skupinou. V případě podskupiny 2 byl tento statisticky vysoce významný rozdíl dán zejména začleněním pacientů s chronickou hepatitidou ve stádiu cirhózy (fibróza ve stádiu F4 dle systému METAVIR), neboť biliární ani necirhotická parenchymatózní onemocnění jater (fibróza ve stádiu F1-F3 dle systému METAVIR) nevedly ke statisticky významnému rozdílu v hladině kys. hyaluronové od kontrolní skupiny.

Narozdíl od kys. hyaluronové nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v hladině TGF- β 1 mezi kontrolní a pokusnou skupinou, neboť se koncentrace mezi oběma skupinami zcela prolínaly.

Rovněž nebyl shledán statisticky významný rozdíl v poměru AST/ALT mezi kontrolní skupinou (medián 0,66; 0,27–2,33) a pacienty s diagnostikovanou jaterní fibrózou (medián 0,30; 0,12–1,63).

Naopak v indexu APRI (AST/trombocyty) byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl mezi zdravými jedinci (medián 0,10; 0,06–0,21) a pacienty s jaterní fibrózou F1-F4 (medián 0,49; 0,09–2,27).

Závěr

Výsledky prokázaly statisticky vysoce významnou elevaci kys. hyaluronové v séru pacientů s diagnostikovanou jaterní cirhózou a portosystémovým zkratem v porovnání s kontrolní skupinou. Rovněž byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl v indexu APRI, a to mezi zdravými jedinci a pacienty s jaterní fibrózou. Kyselina hyaluronová a index APRI, narozdíl od TGF- β 1 a poměru AST/ALT, tak představují biomarkery potenciálně využitelné v klinické praxi pro diagnostiku těchto onemocnění.

Seznam literatury

BOTROS, M., SIKARIS, K. A.: The De Ritis Ratio: The Test of Time. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2013, 34(3): 117-130.

GRIGORESCU, M.: Noninvasive biochemical markers of liver fibrosis. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 2006, 15(2): 149-159.

POYNARD, T., LENAOUR, G., VAILLANT, J. C., CAPRON, F., MUNTEANU, M., EYRAUD, D., NGO, Y., M'KADA, H., RATZIU, V., HANNOUN, L., CHARLOTTE, F.: Liver Biopsy Analysis Has a Low Level of Performance for Diagnosis of Intermediate Stages of Fibrosis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2012, 10(6): 657-663.

ROSENBERG, W. M. C., VOELKER, M., THIEL, R., BECKA, M., BURT, A., SCHUPPAN, D., HUBSCHER, S., ROSKAMS, T., PINZANI, M., ARTHUR, M. J. P.: Serum markers detect the presence of liver fibrosis: A cohort study. *Gastroenterology*, 2004, 127(6): 1704-1713.

ROTHUIZEN, J. Liver. In: *Small Animal Gastroenterology* (J.M. STEINER, Ed.) Schlütersche, Hannover, 2008, pp. 241-281.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 129/2016/FVL.

Vliv stimulačního efektu implantátu s deslorelinem na kvalitu a konzervovatelnost ejakulátu psů

Robert Novotný¹, Nikola Pánková²

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

GnRH agonisté – analoga přirozeného GnRH ovlivňují pohlavní funkce různým způsobem. Po zahájení podávání dochází k vzestupu sekrece LH a FSH (flare-up effect), doprovázeném zvýšením koncentrace pohlavních steroidních hormonů. V případě, že jsou GnRH analoga podávána kontinuálně, dochází k desenzibilizaci hypofýzy, vyjádřené internalizací GnRH receptorů, což dále vede k postupné supresi sekrece gonadotropinů a následnému potlačení reprodukčních funkcí (Fontaine, Fontbonne 2011).

V roce 2005 Kawakami a kol. prokázali pozitivní vliv injekčních aplikací GnRH analoga buserelinu na kvalitu ejakulátu u psů. V roce 2012 Romagnoli a kol. hodnotili vliv implantátu s GnRH agonistou deslorelinem na rychlost nástupu infertility a kvalitu ejakulátu u psů. Došlo k nárůstu celkového počtu spermií v ejakulátu a zlepšení jejich motility 2 a 4 týdny po implantaci, ale morfologie spermií nebyla léčbou nijak ovlivněna. Podobného efektu bylo dosaženo i u kocourů, kde jeden měsíc po zavedení implantátu s deslorelinem došlo k signifikantnímu zvýšení celkového počtu spermií v ejakulátu (Novotný a kol., 2012, Novotný a kol., 2014). Výše zmíněné práce naznačují stimulační vliv GnRH agonistů na kvalitu ejakulátu. K jednoznačnému potvrzení efektu je však třeba uskutečnit sledování u většího počtu zvířat a rozšířit analýzu semene o další parametry, včetně vlivu stimulace na případnou konzervovatelnost ejakulátu.

Materiál a metodika

Do sledování bylo zařazeno devět pohlavně dospělých samců různých plemen (anglický špringršpaněl, australský ovčák, americký buldok, bulteriér, kříženec) ve věku tři až deset let, o hmotnosti $22,7 \pm 2,71$ kg. Všichni samci pocházeli od soukromých majitelů, kteří docházeli na Oddělení reprodukce Kliniky psů a koček, Fakulty veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (dále Oddělení reprodukce KCHPK). Všichni majitelé požadovali

zavedení implantátu s deslorelinem z důvodu dočasné kontracepce a s účastí zvířete ve sledování vyjádřili svůj informovaný souhlas.

Při první návštěvě byla zvířata klinicky vyšetřena a shledána způsobilými ke sledování. Návštěvy probíhaly v týdenních intervalech na Oddělení reprodukce KCHPK. Během každé návštěvy došlo k několika úkonům: odběru ejakulátu, měření velikosti varlat, sonografickému zhodnocení a měření velikosti prostaty a odběru krve ke stanovení koncentrace testosteronu. Na konci první návštěvy byl každému samci aplikován implantát obsahující 4,7 mg deslorelinu (Suprelorin, Virbac, Francie) do oblasti vnitřní strany pravého stehna.

Po odběru ejakulátu došlo k jeho analýze v nativním stavu. Stanovovanými parametry nativního ejakulátu byly: objem, koncentrace, počet spermií, motilita spermií, progresivita spermií, stanovení integrity povrchových membrán spermií a morfologie spermií.

Po zhodnocení semene v nativním stavu byla z každého ejakulátu připravena dávka pro krátkodobou konzervaci a dávka pro konzervaci hlubokým chladem. Tyto dávky byly hodnoceny následujícím způsobem. Chlazená dávka byla hodnocena v den zpracování, čtyři a osm dní po odběru. Stanovovanými parametry byly: motilita a progresivita spermií, stanovení integrity povrchových membrán spermií a morfologie spermií. Kryokonzervovaná dávka byla hodnocena po rozmražení a stanovovanými parametry byly: motilita, progresivita pohybu, propulzivita spermií, stanovení integrity povrchových membrán spermií, morfologie spermií a analýza stavu chromatinu (DFI - DNA fragmentation index, HDS - high DNA stainability).

Výsledky

Při analýze klinického efektu implantátu s deslorelinem jsme prokázali snížení hladiny testosteronu v krvi již 14 dní po implantaci. Již dva týdny po implantaci došlo ke statisticky významnému zmenšení absolutní velikosti varlat o 16,70 % oproti výchozí hodnotě. Ke statisticky významnému snížení velikosti prostaty došlo již 2 týdny po zavedení implantátu a to o 14,56 %.

Při analýze nativního ejakulátu došlo již dva týdny po implantaci ke statisticky významnému snížení objemu ejakulátu. Změny koncentrace spermií nebyly statisticky významné, motilita spermií se statisticky významně snížila 3 týdny po implantaci. Spektrum doposud v literatuře hodnocených parametrů jsme rozšířili o analýzu progresivity spermií a o stanovení podílu spermií se zachovanou integritou povrchové membrány. Hodnocení ani jednoho nově zařazeného parametru nepřineslo statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými kontrolami.

U krátkodobě konzervovaného ejakulátu jsme analyzovali motilitu spermií, progresivitu spermií, podíl spermií se zachovanou integritou povrchové membrány a morfologii spermií. Ani v jednom sledovaném parametru jsme u chlazeného ejakulátu neprokázali statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými daty. Zaznamenali jsme zlepšení některých parametrů při analýze ejakulátu v den odběru a to u motility, progresivity spermií i podílu spermií se zachovanou integritou povrchové membrány. Podíl morfologicky nezměněných spermií zaznamenal zvýšení pouze druhý a třetí týden po implantaci. Analýza vzorků čtyři dny po odběru vykazovala značné rozdíly. Motilita i progresivita spermií vykazovaly pouze snížení oproti výchozím hodnotám. Podíl spermií se zachovanou cytoplazmatickou membránou byl zvýšen po celou dobu sledování. Jeden a tři týdny od zavedení implantátu došlo ke snížení podílu morfologicky nezměněných spermií, oproti tomu druhý a čtvrtý týden došlo ke zvýšení tohoto podílu. Vzorky hodnocené 8 dní po odběru znovu vykazovaly velmi variabilní výsledky. Motilita spermií byla snížena ve všech sledovaných týdnech. I podíl spermií se zachovanou integritou povrchové membrány byl snížen, ale v posledním odběrovém týdnu došlo naopak k jeho zvýšení. Podíl spermií s progresivním pohybem byl zvýšen jeden i dva týdny po implantaci a naopak k jeho snížení došlo třetí a čtvrtý týden po implantaci. Podíl morfologicky nezměněných spermií byl zvýšen až do čtvrtého týdne po implantaci, kdy došlo naopak ke snížení.

V případě kryokonzervovaného ejakulátu byly hodnoceny následující parametry: motilita, progresivita, propulzivita spermií, podíl spermií se zachovanou integritou povrchové membrány, morfologie spermií a analýza stavu chromatinu. V průběhu sledování jsme neprokázali statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými daty. Jeden týden po implantaci došlo k mírnému zvýšení motility a progresivity spermií, následované jejich snížením při dalších kontrolách. Zlepšení propulzivity spermií nastalo jeden, dva i tři týdny po zavedení implantátu. Ke zvýšení podílu spermií se zachovanou integritou cytoplazmatické membrány došlo 3 a 4 týdny po zavedení implantátu. Morfologie spermií nebyla výrazně ovlivněna v průběhu prvních 3 týdnů po zavedení implantátu. Stanovení hodnoty DFI prokázalo zvýšení hodnoty jeden a tři týdny po zavedení implantátu. Hodnota HDS nebyla v průběhu sledování výrazně ovlivněna.

Závěr

V naší práci jsme potvrdili klinický kontracepční efekt implantátu s deslorelinem. Z výsledků analýzy nativního ejakulátu, krátkodobě i dlouhodobě konzervovaného ejakulátu vyplývá značná interindividuální variabilita úvodního stimulačního efektu deslorelinu při kontinuálním uvolňování ze subkutánního implantátu. Důležitým zjištěním je skutečnost, že přes

nastupující kontracepční efekt GnRH agonisty není negativně ovlivněna konzervovatelnost ejakulátu psů, získaného v průběhu prvního měsíce po zavedení implantátu s deslorelinem.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 108/2016/FVL.

Seznam literatury

FONTAINE, E., FONTBONNE, A. 2011: Clinical use of GnRH agonist in canine and feline species. *Reprod Domest Anim* 46: 344–353.

KAWAKAMI, E., MASAOKA, Y., HIRANO, T., HORI T., TSUTSUI, T. 2005: Changes in plasma testosterone levels and semen quality after 3 injections of a GnRH analogue in 3 dogs with spermatogenic dysfunction. *J Vet Med Sci* 67: 1249–1252.

ROMAGNOLI, S., SIMINICA, A., SONTAS, B.H., MILANI, C., STELLETA, C. 2012: Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7mg deslorelin implant in adult male dogs. *Reprod Domest Anim* 47 (Suppl. 6): 389–392.

NOVOTNY, R., CIZEK, P., VITASEK, R., BARTOSKOVA, A., PRINOSILOVA, P., JANOSOVSKA, M. 2012: Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant. *Theriogenology* 78: 848–857.

NOVOTNY, R., VITASEK, R., BARTOSKOVA, A., NOVAKOVA, K. 2014: The influence of initial stimulatory effect of deslorelin implant on the semen quality in tomcats. In: *Proceedings of 17th EVSSAR Congress: Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Exotics*. Wroclaw, Poland, 26th September, 2014: 200.

Vliv deslorelin acetátu (Suprelorin®) na ovariální aktivitu samic gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*)

Matteo Oliveri, Eva Čermáková, Zdeněk Knotek

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

Úvod

Mezi nejčastější problémy u samic plazů chovaných v zajetí patří syndrom preovulační stáze folikulů (tzv. sy. POFS). Jedná se především o samice běžně chovaných druhů ještěřů, agamy vousaté (*Pogona vitticeps*), gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*), chameleona jemenského (*Chamaeleo calypttratus*) a leguána zeleného (*Iguana iguana*)¹⁻³. U samic gekončíků nočních je v reprodukčním období roku aktivita pohlavních orgánů mimořádně dynamická a ke snůšce může docházet opakovaně každých 14 dní. To představuje obrovské energetické nároky a zátěž pro celý organismus, dochází ke komplikovaným onemocněním a ke ztrátám. Současné možnosti řešení uvedených problémů zahrnují chirurgický přístup (kastrace) nebo konzervativní postupy (indukce ovulace přítomností samce) s pouze dočasným efektem. U některých druhů plazů byly Klinikou chorob ptáků, plazů a drobných savců ověřeny konzervativní postupy s využitím GnRH agonistů¹⁻³. U gekončíků nočních zatím nebyla podobná studie uskutečněna. Hlavním cílem projektu bylo ověření účinnosti GnRH implantátu (deslorelin acetát) v klinické praxi u samic gekončíků nočních (*Eublepharis macularius*).

Materiál a metodika

Experimentální zvířata

Pokusnou skupinu tvořilo 16 dospělých, klinicky zdravých, gekončíků nočních (*Eublepharis macularius*). Gekončici byli chováni v experimentálním oddělení Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců za definovaných podmínek (optimální rozměry terárií, teplota, zdroj UV-B, dieta, minerální doplňky, úkryty, kladiště, atp.). Zdravotní stav experimentálních zvířat byl kontrolován každý den.

Zavedení GnRH implantátu (deslorelin)

Před anestezíí byl ještěřům zamezen přísun potravy na 24 hodin. V první fázi byl experimentálním samicím (n=14) po předchozí premedikaci (opioidy, nesteroidní antiflogistika) v celkové anestezii (alfaxalon, isofluran) aplikován do dutiny tělní GnRH implantát (deslorelin;

n=10) – u vybraných jedinců byl aplikován obdobný implantát bez GnRH (placebo; n=4). V průběhu anestezie probíhal monitoring základních životních funkcí (srdeční a dechová frekvence, reflexy). Po uplynutí doby rekonvalescence byly vytvořeny 2 skupiny zvířat (v každé 7 samic a 1 samec).

Kontroly

V pravidelných intervalech byly prováděny kontroly celkového zdravotního stavu zvířat včetně vážení a kontroly přítomnosti ovariálních folikulů a vaječ (vizualizace, popř. ultrasonografie či radiografie). Denně byla kontrolována kladiště a v případě záchytu vaječ následovala identifikace samice.

Vyhodnocení získaných dat

Veškerá data (ukazatele monitoringu anestezie a analgezie, reprodukční ukazatele) byla statisticky vyhodnocena. Po ověření normality bylo přistoupeno ke statistickým testům za účelem zjištění statisticky významného rozdílu v jednotlivých sledovaných parametrech. V neposlední řadě byla zpracována základní deskriptivní statistika (viz. Tabulka č.1) a zhotoveny přehledné grafy.

Výsledky

Při použití GnRH implantátu zavedeného do dutiny tělní experimentálních zvířat druhu gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*) nedošlo v rámci celkové doby sledování a monitoringu k útlumu reprodukce. Samice kladly vejce bez rozdílu, zda se jednalo o samice s GnRH či placebo implantátem. Samice byly monitorovány po dobu dvou chovných sezón a mezi těmito nebyl shledán statisticky významný rozdíl co do počtu snůšek, počtu vaječ či jejich hmotností. Průměrná hmotnost sledovaných zvířat se rovněž statisticky významně nelišila vzájemně mezi jednotlivými sezónami. Před aplikací byla 40.2 ± 13.0 g (25.4 – 66.7g), průměrná hmotnost na konci první sezóny byla 51.1 ± 7.9 g (38.2 – 69.7g) a na konci druhé sezóny 50.2 ± 11.7 g (19.4 – 66.0g). Průměrná hmotnost vaječ v období první sezóny byla 6.50 ± 1.24 g (4.15 – 8.58g), přičemž v období druhé sezóny 6.84 ± 1.0 g (5.43 – 8.48g). Celkem došlo v rámci první sezóny u všech samic dohromady k vykladení 136 vaječ, ve druhé sezóně pak ke 138 vaječ. V průměru každá samice vykladla 10 ± 4 vejce za první sezónu a 10 ± 3 vejce za sezónu druhou. U žádné samice nedošlo k postoperačním komplikacím či jiným zdravotním potížím v rámci celé doby sledování. Pouze u jedné samice došlo k výraznějším hmotnostním ztrátám, kdy však tyto byly úspěšně terapeuticky vyřešeny.

Tabulka č. 1: Základní deskriptivní statistika vybraných ukazatelů

	Průměrná hmotnost samic před aplikací	Průměrná hmotnost na konci sezóny	Průměrná hmotnost v průběhu sezóny	Průměrná hmotnost vaječ*	Celkový počet vaječ
	[g]	[g]	[g]	[g]	
1. sezóna	40.2 ± 13.0 [25.4 – 66.7]	51.1 ± 7.9 [38.2 – 69.7]	46.6 ± 7.6 [36.7 – 63.3]	6.50 ± 1.24 [4.15 – 8.58]	136
2. sezóna	40.2 ± 13.0 [25.4 – 66.7]	50.2 ± 11.7 [19.4 – 66.0]	50.1 ± 8.0 [33.6 – 63.6]	6.84 ± 1.00 [5.43 – 8.48]	138

Závěr

Použití GnRH implantátu u samic gekončíka nočního jako jedna z konzervativních metod regulace hormonální aktivity se v rámci tohoto experimentu neosvědčilo. Ani u jedné ze sledovaných skupin nedošlo k poklesu či útlumu pohlavní aktivity. Vzhledem k pomalému metabolismu, který je pro plazy tolik specifický, probíhalo sledování po dobu dvou chovných sezón. Avšak tyto se co do reprodukčních ukazatelů nikterak vzájemně statisticky významně nelišily. Ačkoli byla zvolena invazivnější metoda a místo lokalizace implantátu, je třeba dodat, že u žádných z experimentálních samic nedošlo k postoperačním či jiným zdravotním komplikacím v rámci celé doby sledování. Monitoring experimentálních zvířat bude probíhat i po dobu **následující sezóny.**

Seznam použité literatury

1. Dorrestein GM, Noule S, Kik MJL, Knotkova Z, Dieleman SJ, Knotek Z. Steroid hormone concentration related to preovulatory follicle stasis in the green iguana (*I. iguana*). Proc. 43rd. International Symposium on Diseases of Zoo and Wild Animals, 2007:96-101.

2. Knotek Z, Knotkova Z, Kley N, Möstl E, Kneidinger N. Is Ovariectomy in Female Lizards Necessary? Clinical Study with GnRH Analogue Implants in Green Iguanas. Proc. Abstr. BVZS Autumn Meeting, 2009:76.
3. Knotek Z. Hormonal contraception for reptiles. Proc. Abst. 31st World Veterinary Congress, 2013:10–14.
4. Cook K, Riggs G. Clinical report: Gonadotropic releasing hormone agonist implants. Proc Annu Conf Assoc Avian Vet, 2007: 309-315.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury VFU Brno (IGA VFU 130/2016/FVL).

Intraluteální aplikace cloprostenolu u dojeného skotu

Michaela Andrlíková, Petra Andrlová, Svatopluk Čech

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Oddělení reprodukce, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Transvaginální ultrasonografická aspirace folikulů u skotu se používá zejména k získávání oocytů v procesu produkce embryí in vitro (1), rovněž však slouží k odběru folikulární tekutiny k analýzám (2). Využití transvaginální ultrasonografie k intraovariální aplikaci u skotu je publikováno (3), nicméně podobné práce jsou velmi řídké a zatím se omezují na intrafolikulární injekce (4). Přímá aplikace hormonálních přípravků do žlutého tělíska (intraluteální aplikace, intraluteal treatment, ILT) doposud nebyla popsána. Projekt IGA je zaměřen na intraluteální aplikaci cloprostenolu (syntetický analog PGF 2α), protože vliv prostaglandinu na žluté tělísko je exaktně prokázán (5), v současné době se prostaglandiny běžně používají v řízení reprodukce skotu a jejich spotřeba je značná. V blízké budoucnosti lze očekávat obdobný tlak evropské legislativy na snížení spotřeby hormonálních preparátů jako v současnosti na spotřebu antibiotik. Přímá ILT představuje možnost, jak snížit spotřebu prostaglandinů, i když se prozatím nejeví jako metoda snadno využitelná v praxi.

Cílem projektu bylo stanovit minimální účinnou dávku cloprostenolu aplikovaného prostřednictvím transvaginální sonografické punkce vaječníku přímo do žlutého tělíska a monitorovat dynamiku morfologických a endokrinologických změn po aplikaci různých dávek.

Materiál a metodika

V experimentu bylo použito 30 krav náhodně rozdělených do šesti skupin po pěti kusech. Všechna zvířata byla synchronizována na 10. den cyklu. Kontrolní skupina 1 (K1) byla ošetřena intraluteální aplikací fyziologického roztoku (0,2 ml pro toto), kontrolní skupina 2 (K2) byla ošetřena intramuskulární aplikací cloprostenolu (500 μg pro toto, Estrumate 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ injekční roztok). Pokusná skupina 1 (P1) byla ošetřena intraluteální aplikací cloprostenolu v dávce 5 μg (cloprostenol naředěný ve fyziologickém roztoku (F1), objem 0,2 ml). Pokusná skupina 2 (P2) byla ošetřena intraluteální aplikací cloprostenolu v dávce 25 μg (cloprostenol naředěný ve fyziologickém roztoku, objem 0,2 ml). Pokusná skupina 3 (P3) byla ošetřena intraluteální aplikací cloprostenolu v dávce 50

μg (neředěný cloprostenol, objem 0,2 ml). Pokusná skupina 4 (P4) byla ošetřena intraluteální aplikací cloprostenolu v dávce 100 μg (neředěný cloprostenol, objem 0,4 ml). Intraluteální aplikace byla provedena transvaginální sonografickou punkcí vaječníků, kdy účinná látka byla aplikována z injekční stříkačky napojené na hadičku komunikující s punkční jehlou. Ve všech skupinách byla v čase 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 a 48 hodin po ošetření odebrána krev z v. *coccygea media* do heparinizovaných stříkaček. Bezprostředně po odběru byly vzorky odstředěny a plazma zamrzena pro následné stanovení koncentrace progesteronu. Laboratorní vyšetření bylo provedeno v Klinické laboratoři pro velká zvířata VFU Brno. V čase 0, 24 a 48 hodin po ošetření bylo provedeno rektální ultrasonografické vyšetření (B-mode) za účelem monitorování průběhu luteolýzy. Z pořízených videozáznamů byly stanoveny rozměry *corpus luteum* (CL).

Pro vyhodnocení výsledků byla zvolena metoda tzv. analýzy rozptylu (analysis of variance, ANOVA).

Výsledky

Výsledky jednotlivých měření jsou uvedeny v tabulce č. 1 a tabulce č. 2.

Tabulka č. 1: Průměrné hodnoty velikosti CL (plocha řezu v cm²) v daném čase po ošetření v jednotlivých skupinách.

Skupina krav	T0	T24	T48
K1 (F1)	6,18	5,98	5,99
K2 (500 μg)	4,42	2,80	2,75
P1 (5 μg)	3,93	3,94	3,92
P2 (25 μg)	4,95	3,60	3,19
P3 (50 μg)	5,44	3,72	2,74
P4 (100 μg)	5,74	3,75	2,69

K významnému zmenšení CL došlo v čase T24 u skupin K2, P2, P3 a P4. U skupin K1 a P1 se velikost CL nezměnila.

Tabulka č. 2: Průměrné hodnoty koncentrace progesteronu v periferní krvi (ng/ml) v daném čase po ošetření v jednotlivých skupinách.

Skupina krav	0	0,5	1	2	4	8	24	48
K1 (F1)	3,72	4,52	3,50	3,48	3,78	2,50	3,24	3,20
K2 (500 µg)	3,40	3,10	1,90	2,95	1,90	2,05	1,17	1,07
P1 (5 µg)	3,70	3,16	2,72	3,44	2,80	2,53	3,64	2,49
P2 (25 µg)	3,08	3,30	1,88	3,54	2,36	2,65	1,65	2,23
P3 (50 µg)	2,62	2,74	2,28	2,08	2,42	1,92	0,88	1,45
P4 (100 µg)	2,88	3,48	1,78	3,06	2,76	1,44	1,20	0,96

Změna koncentrace progesteronu byla srovnávána s hladinou v čase 0. K významnému poklesu koncentrace progesteronu došlo ve skupinách K2 a P3 od času 1, u skupiny P4 od času 8 a u skupiny P2 od času 24 až do konce sledování. Skupiny K1 a P1 se vzájemně neliší. Skupiny K2, P2 – P4 vykazaly nižší koncentraci progesteronu než skupiny K1 a P1.

Závěr

Studie prokázala přímý efekt ILT na morfologii žlutého tělíska a na koncentraci progesteronu v plazmě. Signifikantní efekt na velikost CL byl prokázán u všech dávek cloprostenolu s výjimkou dávky 5 µg. Signifikantní vliv na pokles koncentrace progesteronu byl prokázán u dávky 25 µg a více. Nicméně jako klinicky účinná luteolýza může být posouzen stav až po aplikaci 100 µg cloprostenolu, protože za 48 h po ILT poklesla koncentrace progesteronu na úroveň 1 ng/ml plazmy, což je úroveň dosažená v tomto čase u skupiny ošetřené dávkou 500 µg cloprostenolu intramuskulárně (obvyklá v praxi používaná dávka). Koncentrace progesteronu 1 ng/ml plazmy je rovněž uznávána jako hranice funkčnosti žlutého tělíska. Nižší dávky cloprostenolu podané intraluteálně by tedy mohly být považovány za dávky subluteolytické.

Hormony aplikované intrafolikulárně (IFT) jsou účinné již v dávce řádově desetisíckrát nižší než při systémovém podání (3, 4). Dávky cloprostenolu aplikované intraluteálně v naší studii jsou účinné v dávce řádově 10x – 20x nižší než při systémovém podání, tedy relativně podstatně vyšší než u IFT. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben nemožností dosáhnout všech nebo alespoň většiny buněk žlutého tělíska. Zatímco po podání účinné látky intrafolikulárně se tato rozptýlí ve folikulární tekutině a může přejít do všech buněk folikulární stěny obklopující dutinu folikulu, lokální aplikace cloprostenolu přímo zasáhne jen část objemu luteální tkáně. Žluté tělísko je sice jedním z nejvíce vaskularizovaných orgánů a vykazuje nejvyšší průtok krve na jednotku tkáně v těle

(6), nicméně jen těžko se dá odhadnout, jak velká část intraluteálně aplikovaného léčiva se dostane prostřednictvím lokální cévní sítě z místa aplikace do celého objemu luteální tkáně. Je možné, že i vlastní mechanika injekce může ovlivnit výsledek. Například použití většího objemu roztoku o nižší koncentraci nebo pomalejší provedení injekce za současného posuvu injekční jehly mohou způsobit přímý kontakt aplikovaného léčiva s větším počtem luteálních buněk a tím umožnit nebo urychlit účinek aplikovaného léčiva. To by mohlo být cílem dalších experimentů za použití různých objemů aplikovaných preparátů a s uvedenou modifikací aplikační techniky.

Seznam literatury

1. Pieterse MC, Kappen KA, Kruip ThAM, Taverne MAM (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30, 751 – 762.
2. Cech S, Indrova E, Lopatarova M, Mala J, Pechova A, Dolezel, R. (2011): Limitations of ultrasound guided follicular aspiration for analysis of follicular fluid in dairy cattle. *Acta Vet. Brno*, 80, 179 – 184.
3. Kot K, Gibbons JR, Ginther OJ (1995): A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. *Theriogenology*, 44, 41 – 50.
4. Mala J, Beckers JF, de Sousa NM, Indrova E, Lopatarova M, Dolezel R, Sevelova H, Cech S (2013): Determination of minimum effective doses of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin for intrafollicular treatment to induce ovulation in dairy heifers. *Acta Vet. Brno*, 82, 375 – 379.
5. Ginther OJ, Araujo RR, Palhao MP, Rodrigues BL, Beg MA (2009): Necessity of sequential pulses of prostaglandin F₂alpha for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.*, 80, 641 – 648.
6. Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A (2002): Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F₂α injection in the cow. *Biol. Reprod.*, 66, 651 – 658.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury VFU Brno 110/2016/FVL.

Využití nového biomateriálu s nanovláknny k léčbě defektů kostní tkáně

Robert Srnec¹, Lucie Urbanová¹, Martin Kořínek², Filip Bareš², Klára Harazinová², Alois Nečas¹

*Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹*

*Magisterský studijní program (student), Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno²*

Úvod

V důsledku traumatických poranění kostí nebo následkem patologických procesů mohou vznikat i velmi rozsáhlé defekty kostní tkáně. Pro úspěšnou léčbu těchto defektů je vedle vhodné stabilní rigidní fixace postižené kosti nutné provést náhradu kostní hmoty k zachování kontaktu kostních ploch (osteokondukce) a indukce procesu hojení kostní tkáně (sekundární kostní hojení). Taktéž může být poměrně rozsáhlý defekt v integritě kostní tkáně získán iatrogeně po vyjmutí implantátů po zhojení fraktury². V současné době je nejvíce klinicky využívaným médiem pro výplň defektu kostní tkáně ve veterinární medicíně autogenní spongiózní nebo kortiko-spongiózní kostní štěp. To ovšem vyžaduje zvýšení invazivity zákroku na straně pacienta a v případech rozsáhlých defektů neumožňuje dostatečné množství náhradní tkáně. Tuto problematiku pak řeší synteticky vyráběné kostní náhrady, které mají často charakter prefabrikovaných tvarů vyrobených z β trikalciumpfosfátu¹. Naše předchozí práce popisují, obdobně jako uvádí další literární zdroje, i další možnosti biologické stimulace kostní tkáně k podpoře hojení např. v podobě mezenchymálních kmenových buněk nebo dalších syntetických materiálů^{3,4}. Pro klinické praktické využití nových materiálů pro výplně defektů kostní tkáně je ovšem také nezanedbatelným požadavkem snadná a jednoduchá aplikace. Takové požadavky nejvíce naplňují gelové formy preparátů, jež se i s minimálním přístupem dají injekčně aplikovat do defektů různorodých tvarů. V naší předcházející studii jsme testovali podobný materiál z pohledu mechanické podpory kostní tkáně s velmi dobrými výsledky⁵.

Materiál a metodika

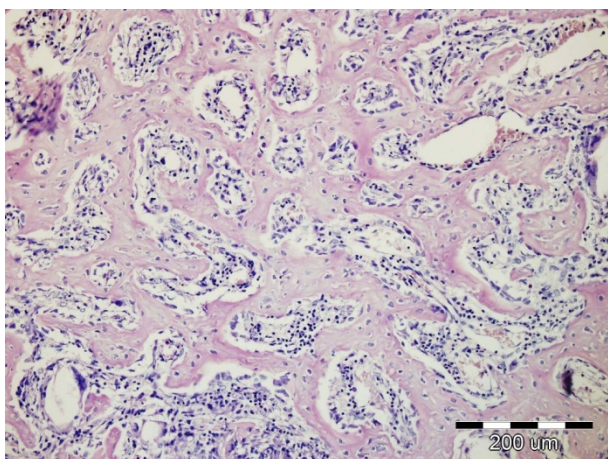
U modelového zvířete – laboratorní potkan Wistar (n = 20) byl v rámci schváleného projektu pokusu v celkové anestezii proveden otevřený přístup k distální diafýze femuru. Pod vizuální kontrolou byl vytvořen jeden pravidelný kruhový defekt 1,5 mm v celé šířce distální diafýzy femuru totožně na obou pánevních končetinách pokusného zvířete. Na levé končetině byl defekt ponechán ke spontánnímu vyhojení (kontrolní defekt) a na pravé končetině byl tento defekt

vyplněn injektáží kompozitem peptigelu s nanovláknny (experimentální defekt). Po implantaci byl proveden chirurgický uzávěr rány a medikace pokusných zvířat (antibiotická clona, terapie bolesti). Soubor experimentálních zvířat byl pro další sledování rozdělen do čtyř sledovaných skupin (A, B, C, D). Týden po chirurgické implantaci byla první skupina pokusných zvířat (sk. A; n = 5) lege artis utracena, bylo provedeno RTG vyšetření obou pánevních končetin a odběr vzorku kosti z kontrolního i experimentálního defektu k histologickému hodnocení. Další skupiny pokusných zvířat byly obdobně vyhodnoceny v období 2, 4 a 6 týdnů po chirurgickém zákroku (sk. B, C, D; n = 5). Vzorky byly porovnány v rámci skupiny vždy samostatně u jednoho pokusného zvířete párovým způsobem (parametrický t-Test pro párová data).

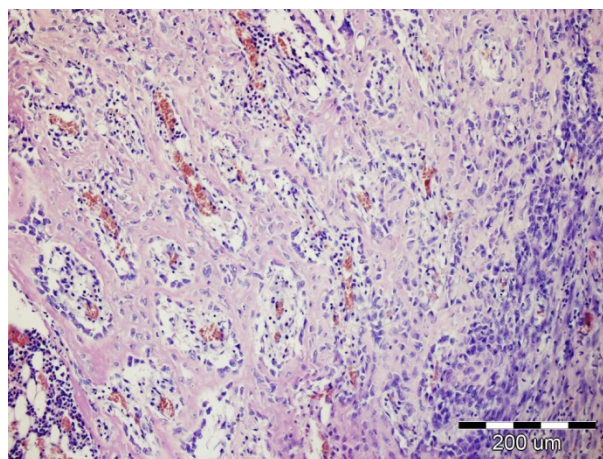
Výsledky

V histologických řezech kontrolního a experimentálního defektu kostní tkáně byla sledována celularita/osteoblastická aktivita v novotvořené kostní tkáni v místě defektu (měřeno v zorném poli při velkém zvětšení 400x) jako průměrný počet buněk v celkem 10-ti zorných polích.

U skupiny A (1 týden po operaci) a B (2 týdny po operaci – Obr. 1 a 2) je plocha novotvořené kostní tkáně u experimentálního defektu hustěji osídlena osteoblasty (průměrný počet buněk v zorném poli při zvětšení 400x u sk. A = 212, resp. u sk. B = 300) ve srovnání s kontrolním defektem (průměrný počet buněk v zorném poli při zvětšení 400x u sk. A = 132, resp. u sk. B = 176) ($P \leq 0.01$). Zároveň byla pozorována proliferace perivaskulárních a endoteliálních buněk cévních anastomóz s depozicí lamelární kosti a tvorbou osteonů.



Obr. 1: Histologický preparát z místa neošetřeného defektu distálního femuru, KONTROLNÍ defekt, sk. B – 2 týdny po vytvoření defektu, barvení HE, zvětšení 200x



Obr. 2: Histologický preparát z místa defektu distálního femuru vyplněného kompozitem peptigelu s nanovláknny, EXPERIMENTÁLNÍ defekt, sk. B – 2 týdny po vytvoření defektu, barvení HE, zvětšení 200x

U skupin C a D (4 a 6 týdnů po operaci) nebyly morfologicky pozorovány rozdíly ve stavbě kostní tkáně a kostní dřevě v místě defektu mezi experimentálním a kontrolním defektem. V místě defektu v lokalizaci periostu byla u skupin C a D (kontrolní i experimentální kostní defekt) pozorována depozice trámečků vláknité kosti aktivovanými periostálními osteoblasty (obecná reakce/proces hojení v místě narušení periostu).

Závěr

Výsledky ukazují mírně vyšší angiogenezi a celularitu v místě kostního defektu s nárůstem novotvořené kostní tkáně a rychlejší osídlování lamelárních kostních struktur buňkami kostní dřevě, a to převážně v časných fázích procesu hojení (stáří defektu 1-2 týdny). U experimentálních i kontrolních skupin v pozdější fázi hojení (stáří defektu 4-6 týdnů) je morfologicky vzhled dalšího procesu hojení a modelace kosti v místě defektu obdobný, tj. bez detekovatelných morfologických rozdílů.

Tato intenzivnější aktivita osídlování osteoblasty, projevující se v časně fázi hojení kostních defektů vyplněných kompozitem peptigelu s nanovláknem, by za příznivých podmínek mohla mít výrazný vliv na rychlost zhojení zejména u rozsáhlejších kostních defektů.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 140/2016/FVL.

Seznam literatury

1. Hulse D, Hyman B.: Fracture biology and biomechanics In: Slatter D.: Textbook of small animal surgery. Saunders, Philadelphia, 2nd ed., pp. 1785-1792, 1993.
2. Rosson J, Egan J, Shearer J, Monro P1991: Bone weakness after the removal of plates and screws – cortical atrophy or screw holes. J Bone Jt Surg 73-B: 283-286.
3. Crha M, Nečas A, Srnec R, Janovec J, Stehlík L, Raušer P, Urbanová L, Plánka L, Jančář J, Amler E 2009: Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Regeneration and Application to Bone Healing. Acta Veterinaria Brno 78(4): 635-642.
4. Nečas A, Plánka L, Srnec R, Raušer P, Urbanová L, Lorenzová J, Crha M, Jančář J, Gál P 2008: Biomaterials and stem cells in the treatment of articular cartilage, meniscal, physeal, bone, ligamentous and tendineous defects. Acta Veterinaria Brno 77(2): 277-284.
5. Srnec R, Fedorová P, Pěňčík J, Vojtová L, Sedlinská M, Nečas A 2016: Ex vivo testování mechanických vlastností metakarpálních/metatarzálních kostí psů po simulovaném vyjmutí implantátů. Acta Chir Ortop Traumatol Czech 83(2): 111-116.

Vliv nedostatku železa na ukazatele oxidačního stresu selat

Zdeněk Fajt¹, Jonáš Vaňhara¹, Jan Vašek¹, Martin Svoboda¹, Zdenka Kazatelová¹, Karolína Pišťková², Martin Hostovský³, Jana Blahová³

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno², Ústav ochrany zvířat a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³

Úvod

Anémie prasat z nedostatku železa představuje závažný problém v chovech prasat. Příčinou vzniku anémie jsou nedostatečné zásoby železa u selat po narození a nedostatečný příjem železa z mléka (Egeli and Framstad 1998). Bez dotace železa se u sajících selat za 10 až 14 dní po narození vyvíjí mikrocytární hypochromní anémie. Z tohoto důvodu je nutno podávat železo sajícím selatům vždy formou přípravků obsahujících železo. Ionty železa ovlivňují bezpočet základních reakcí nezbytných pro život. Některé aspekty vlivu nedostatku železa na organismus selat jsou doposud málo známy. Předkládaný projekt by měl navazovat na naše předchozí experimenty, ve kterých jsme se zaměřili na výzkum vlivu nedostatku železa na imunitu selat a funkci štítné žlázy, kde jsme mimo jiné zjistili, že u selat s deficitem železa dochází k výraznému poklesu hladin thyroideálních hormonů v krevní plazmě (Fajt et al. 2016). Doposud neprobádanou oblastí zůstává vliv nedostatku železa na oxidační stres u selat a stupeň jejich antioxidační ochrany, což bylo cílem i tohoto projektu. Poznatky získané z humánní medicíny a pokusů na laboratorních potkanech jsou doposud rozporuplné. Někteří autoři uvádějí, že nezjistili rozdíl v peroxidaci lipidů u pacientů s nedostatkem železa ve srovnání s kontrolní skupinou (Isler et al. 2002). Naproti tomu jiní autoři zaznamenali zvýšenou oxidační zátěž u pacientů s tímto deficitem (Kumerova et al. 1998, Aslan et al. 2006).

Materiál a metodika

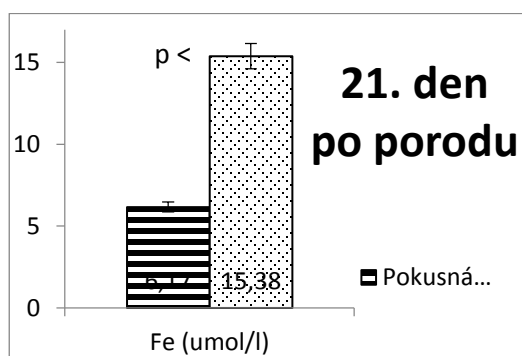
Odebírané vzorky

Celkem bylo použito 20 selat ze dvou vrhů. První (pokusné) skupině 10 selat s deficitem železa nebylo aplikováno železo až do věku 21 dní. Ve věku 21 dnů bylo těmto selatům aplikováno železo ve formě dextranu železa v dávce 200 mg i. m. Druhé (kontrolní) skupině 10 selat bylo ve věku tří dnů aplikováno 200 mg Fe i. m. ve formě dextranu železa. Selata byla odstavena ve věku 28 dnů. Vzorky na hematologické, biochemické a specifické antioxidační vyšetření byly odebrány ve věku

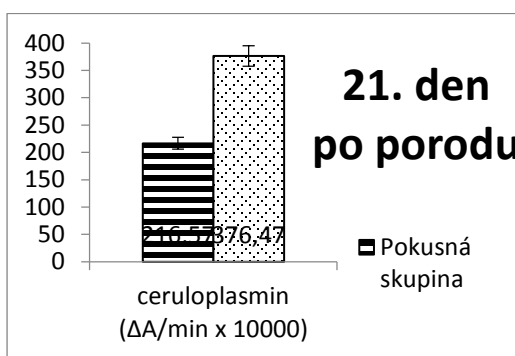
3, 21 a 35 dnů z *vena cava cranialis*. Hematologické vyšetření zahrnovalo tyto parametry: koncentrace hemoglobinu, počet erytrocytů, hematokrit, počet bílých krvinek, diferenciální počet bílých krvinek, MCV (střední objem erytrocytu), MCH (střední objem hemoglobinu) a MCHC (střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech). Jako biomarkery poškození biologických systémů volnými radikály byly stanovovány produkty peroxidace lipidů (malondialdehyd) a karbonylové deriváty proteinů sloužící jako markery oxidace proteinů. Biomarkery antioxidační ochrany zahrnují enzymové systémy schopné odstranit ROS, kterými jsou superoxid dismutáza (SOD), kataláza (CAT) a glutathion peroxidáza (GPx). Dále byla stanovována celková antioxidační kapacita krevní plazmy (TAS). Biochemická vyšetření zahrnovala stanovení koncentrace železa v krevní plazmě a za účelem komplexního zhodnocení stavu organismu byly do analýz zahrnuty další biochemické parametry, tzn. aktivity ALP, ALT, AST, GMT, CK, LDH a koncentrace kreatininu a močoviny, glukózy, celkové bílkoviny a laktátu v krevní plazmě.

Výsledky a Závěr

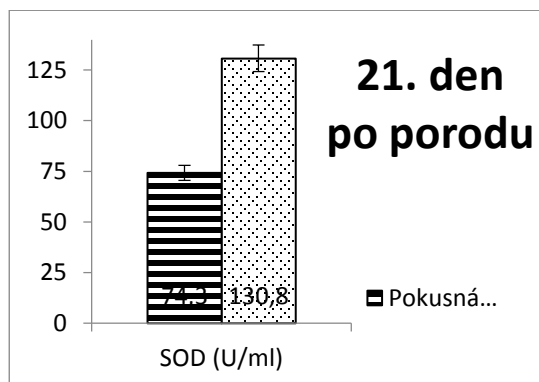
Mezi kontrolní a pokusnou skupinou byly zjištěny statisticky významné rozdíly v hematologických ukazatelích od prvního do posledního odběru ve věku 35 dnů, kdy došlo k postupnému srovnávání mezi skupinami. Ve vybraných parametrech biochemického profilu jsme naopak nezaznamenali rozdíly na úrovni statistické významnosti ve všech fázích pokusu, kromě koncentrace železa, která se lišila u obou sledovaných skupin, od 3. dne, ale nejvíce 21. den po narození, po aplikaci železa pokusné skupině (Obrázek 1.). Mezi vybranými parametry oxidačního stresu jsme zjistili statisticky významné rozdíly především v ukazatelích SOD a ceruloplazminu (Obrázek 2. a 3.), které tak představují nejpřínosnější hodnocení pokusu a potvrzují domněnku vlivu nedostatku železa na antioxidační aktivitu selat.



Obrázek 1.



Obrázek 2.



Obrázek 3.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 111/2016/FVL.

Seznam literatury

Aslan M, Horoz M, Kocyigit A, et al. (2006) Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutat Res* 601, 144–149.

Egeli, A. K., Framstad, T., Morberg, H. Clinical biochemistry, haematology and body weight in piglets. *Acta Vet Scand* 1998;39:381-393.

Fajt Z, Banoch T, Vasek J, et al. (2016) Influence of iron deficiency on thyroidal hormone production in piglets before weaning. *IN PRESS*

Isler M, Delibas N, Guclu M, et al. (2002) Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Coat Med J* 43, 16–19.

Kumerova A, Lece A, Skesters A, et al. (1998) Anaemia and antioxidant defence of the red blood cells. *Mater Med Pol* 30, 2–15.

Metody odběru, vyšetření a mrazení ejakulátu oslích hřebců (*Equus asinus*)

Michal Vyvial, Miroslava Mráčková, Eliška Horáčková, Markéta Sedlinská

Klinika chorob koní VFU FVL Brno

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

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

Úvod

Oslí jsou velmi starým zvířecím druhem, jejichž objevení a popsání spojené s domestikací se datuje již někdy kolem roku 4,5 tisíc př. Kr. (1,2). Oslí byli a dnes stále jsou především v zemích třetího světa využíváni jako prostředek pro transport nákladu (1). V zemích s lepší ekonomickou situací se osel stal zájmovým zvířetem, ať už jako mazlíček nebo jako objekt pro zvýšení atraktivity agroturistického podnikání.

Ve středoevropském pojetí chovu oslů je pouze ojedinělé, když je oslí hřelec součástí stáda klisen a plemenitba tak probíhá přirozeným způsobem. Stále častěji jsou veterinární lékaři žádáni o provedení inseminace oslic držných bez přítomnosti hřebce. Roste tak poptávka po zajištění čerstvé nebo mražené inseminační dávky oslího spermatu. Vzhledem k tomu, že v našich podmínkách je rozvoj chovu oslů teprve v počátcích, není v oblasti reprodukce oslů dostatek zkušeností ani informací.

Odběr ejakulátu spolu s umělou inseminací jakožto techniky asistované reprodukce mají však i dalekosáhlejší cíle. Můžeme mezi ně řadit například transport genetického materiálu na velkou vzdálenost, čímž se snižuje riziko příbuzenské plemenitby, uchování genetického materiálu cenných a ohrožených plemen, kontrola venerických onemocnění a další (3). Přínosem odběru ejakulátu od oslích hřebců je i možnost laboratorního andrologického vyšetření a diagnostika poruch plodnosti či nezabřezávání mající původ na straně samce.

Materiál a metodika

Pokusná zvířata

Do pokusu bylo průběhu měsíců březen až květen 2016 postupně zařazeno 5 dospělých oslích hřebců ve věku 4 až 16 let. Hřebci byli zapůjčeni od soukromých chovatelů a pocházeli z prostředí s různou reprodukční minulostí (chováni bez či v přítomnosti oslích klisen a s různými

reprodukčními zkušenostmi). Před zařazením do studie a ani v jejím průběhu u žádného z hřebců nebyly pozorovány příznaky jakéhokoli onemocnění. Během studie byli ustájeni i krmeni individuálně v boxech.

Odběr ejakulátu

Hřebci byli postupně seznamováni s prostředím odběrového místa. V prostředí odběru se pohybovali na ohlávce a nauzděni, vedeni z bezpečnostních důvodů dvěma ošetřovateli. Po návyku na toto prostředí, byla u nich stimulace sexuální aktivity opakovaně ověřována pomocí přítomnosti říjící klisny, neříjící oslice, říjící oslice a navádění na fantom potřísněný močí říjící oslice. Samice byly přiváděny ošetřovatelkou, na ohlávce a podle potřeby s udidlem. Hřebcům byl umožněn kontakt, jak v oblast hlavy, tak (u říjících a svolných samic) v oblasti zevních pohlavních orgánů.

Žádný z uvedených postupů nevyvolal u žádného z oslích hřebců pohlavní reflexy.

Z toho důvodu by postup modifikován. Před vlastním odběrem byl hřebcům umožněn krátký (10 - 15 minut) pobyt s říjící klisnou na volno v bezpečném a ohrazeném prostoru (v jezdecké hale). Tento kontakt byl dostatečný ke stimulaci pohlavních reflexů a všichni hřebci byli následně úspěšně odebráni po vzeskoku na říjící oslici a za použití umělé pochvy (typ Missouri). Umělá pochva byla připravena stejným způsobem, jako pro odběr hřebců koní (přiměřený tlak, teplota 40 -42 °C, lubrikace).

Zpracování a posouzení ejakulátu

Získaný ejakulát byl po získání zhodnocen makroskopicky (objem, barva, příměsi), mikroskopicky (motilita) a následně změřena koncentrace spermií v ejakulátu pomocí fotometru.

Mrazení ejakulátu

Příprava ejakulátu na mrazenou inseminační dávku, spočívala v rozdělení objemu spermatu do sterilních plastových zkumavek ve stejných dílech a odstředění. Po centrifugaci byla semenná plazma odsáta a zamrazena pro další vyšetření, sedimentované spermie byly manuálně rozmíchány a rozředěny pomocí ředidla (*Gent, Equine extender for semen freezing*).

Naředěné semeno bylo manuálně plněno do pejet o objemu 0,5 ml, tyto následně přesunuty na 2 hodiny od času ředění do chladničky, poté vyjmuty respektive uloženy do stojanu mrazící soustavy a vloženy do tekutého dusíku.

Rozmrazení a hodnocení zmrazené inseminační dávky

Dávky byly rozmrazeny standartním způsobem ve vodní lázni (38°C) 25 sekund a byla vyšetřena motilitu a koncentrace spermií (Bürkerova komůrka).

Výsledky

Naplánovaná metodika odběru oslích hřebců zcela selhala. Pro dosažení sexuální aktivity a úspěšného odběru ejakulátu bylo nutné metodiku modifikovat a umožnit oslím hřebcům v dostatečné míře projevit jejich přirozené sexuální návyky. Odběr byl uskutečnitelný až po umožnění volného kontaktu oslího hřebce s říjící oslicí.

Od pěti oslích hřebců bylo získáno celkem 11 vzorků ejakulátů. Počet provedených odběrů ejakulátů u jednotlivých oslích hřebců a stanovení objemu, koncentrace, motility a motility po rozmrazení je uveden v tabulce č. 1.

Tab č. 1.: Vyhodnocení vzorků ejakulátů

Jméno hřebce	pokus	Objem (ml)	Koncentrace (x 10 ⁶)	Motilita (%)	Motilita po rozmrazení (%)
Pepa	1	110	91	90	40
	2	100	62	80	40
Relente	1	150	136	80	30
	2	135	149	80	x
Drákula	1	x	x	x	x
	2	20	439	90	5
Amoreto	1	300	136	60	10
	2	200	171	80	x
	3	120	202	90	35
Oskar	1	75	214	70	x
	2	120	207	70	x
	2	150	221	70	50

Závěr

V průběhu pokusu se všechny naplánované varianty metodiky odběru oslího hřebce „z ruky“ (hřelec i klisna či oslice jsou drženi a ovládáni ošetřovateli) ukázaly jako zcela nevhodné. Aby bylo vůbec možné získat ejakulát, muselo být přistoupeno k modifikaci metodiky. Pro úspěšné vyvolání reflexu vysunutí pyje a erekce bylo nutné umožnit oslím hřebcům pobyt s říjící oslicí ve volnosti (v hale). Každému z následných odběrů ejakulátu pak vždy předcházela „rituál“ při kterém se oslí hřelec poměrně agresivním způsobem zakousnul oslici do tukového hřebene krku, naskočil na ni a donutil ji nehybně stát a tak prověřil ochotu samice se pářit. To vše bez prolapsu pyje a erekce. Teprve poté, po chvilce relaxace, nastoupily pohlavní reflexy a hřelec jevil snahu o páření. V této chvíli byla oslice fixována ošetřovatelem a hřebci bylo umožněno na ni skočit. Ejakulát byl odebrán vychýlením pyje a zavedením do umělé pochvy. Pro snazší manipulovatelnost měla oslice ocas omotaný obinadlem a vyvázaný mezi pánevní končetiny, aby se zabránilo nechtěnému vniknutí pyje do pochvy oslice. Námi modifikovaná metodika odběru byla úspěšná v 91,6% (pouze 1 neúspěšný pokus ze 12).

Přes poměrně výrazný úspěch modifikované metodiky nebylo dosaženo splnění vytýčeného cíle, tedy sestavení metodiky běžně použitelné v terénních podmínkách. Přesto práce přinesla mnoho nových a důležitých poznatků, využitelných v dalším bádání v oblasti reprodukce oslů.

Studie dále potvrdila, že následné zpracování ejakulátu odebraného pomocí umělé pochvy lze provádět obdobným postupem jako při zpracovávání semene hřebců koní. Tato pilotní studie nastínila oblast dalšího výzkumu, tj. vzájemné závislosti parametrů získaného ejakulátu a jeho mrazitelnosti. Pro statistické zpracování bude třeba získat a posoudit větší množství vzorků.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 150/2016/FVL.

Seznam literatury:

1. Shackelford L., Marshall F., Peters J.: Identifying donkey domestication through changes in cross-sectional geometry of long bones, *Journal of Archaeological Science*, 40 (12), 2013: 4170-4179

2. Kefena E., Dessie T., Tegegne A., Beja-Pereira A., Yusuf Kurtu M., Rosenbom S., Han L. J.: Genetic diversity and matrilinear genetic signature of native Ethiopian donkeys (*Equus asinus*) inferred from mitochondrial DNA sequence polymorphism, *Livestock Science*, 167, 2014: 73-79
3. Singh I., Balhara, K. A.: New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India, *Theriogenology*, 86 (1), 2016: 194-199

Rozdiely v bakteriálnej mikrobiote trusu u koní zdravých a koní trpiacich hnačkovým ochorením.

Zuzana Kecerová¹, Štěpán Bodeček¹, Ludmila Kohoutová², Tomáš Hlavinka¹, Jiří Slavík²

*Klinika chorob koní¹, Ústav infekčných chorob a mikrobiologie²,
Fakulta veterinárneho lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Mikrobiológii gastrointestinálneho traktu u koní je v odbornej literatúre venované len málo pozornosti, či už sa jedná o kone zdravé, alebo trpiace ochorením (Garrett 2002). Ochorenia, ktoré postihujú gastrointestinálny systém sú jednou z hlavných príčin úmrtí koní a črevná mikroflóra zohráva pritom zrejme významnú úlohu (Costa et al. 2015) Výskyt hnačkových ochorení u hospitalizovaných koní je veľkým problémom veterinárnych a referenčných kliník. Jedná sa o potencionálne komplikácie pacientov hospitalizovaných kvôli chirurgickým alebo iným terapeutickým zákrokom a môžu zvýšiť morbiditu a mortalitu koní s gastrointestinálnymi problémami alebo s inými ochoreniami, ktoré nesúvisia so zažívacím traktom. Bohužiaľ, môže byť zložité určiť presnú príčinu, ktorá vyvolá akútnu hnačku alebo kolitídu a vo väčšine prípadov je etiologické agens len predpokladané alebo vôbec neurčené (Chapman 2009). Infekčné a neinfekčné zápalové ochorenia gastrointestinálneho traktu, klinicky sa prejavujúce hnačkou, sú etiologicky veľmi variabilné a zahŕňujú bakteriálnych, vírusových, parazitárnych pôvodcov, pieskovú enteropatiu, dietetické chyby spojené s dismikrobiou alebo iatrogenne spôsobené kolitídy aplikáciou liečiv (aplikácia nesteroidných antiflogistík, antimikrobiálnych látok). Medzi najčastejších bakteriálnych pôvodcov hnačiek u dospelých koní patrí: *Clostridium perfringens* typ C, *Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Ehrlichia risticii*, *Lawsonia intracellularis*. Infekcie vírusového pôvodu sú reprezentované Rotavírusom a Coronavirusom. *Cryptosporidium* spp., *Strongylus vulgaris*, *Cyathostoma* spp. sú zástupcami parazitárnej etiológie a pri zvýšenej infestácii môžu vyvolať hnačku (Uzal 2015). *Clostridium difficile* je gram-pozitívna spóry tvoriaca, striktno anaeróbna baktéria, ktorá býva častou príčinou hnačky vyvolanej nazokomiálnou infekciou. Kontaminácia rezistentnými spórmi môže viesť k asymptomatickému nosičstvu alebo ku klinickým príznakom miernej alebo závažnej hnačky v niektorých prípadoch až k životohrozujúcej pseudomembranóznej kolitíde. U ľudí sa asymptomatické nosičstvo vyskytuje v 8% populácie a riziko rozvoja infekcie *Cl. difficile* je u kolonizovaných pacientov signifikantne vyššie ako u pacientov bez kolonizácie touto baktériou (Janoir 2016).

Materiál a metodika

Kultivačné vyšetrenie: Vzorky trusu koní boli odoberané s použitím jednorazovej rukavice z *ampula recti* alebo ako čerstvý trus do jednorazovej sterilnej vzorkovnice. Jednorazová vzorkovnica bola úplne naplnená aby sa zamedzilo oxidácii vzorky. V priebehu 1 hodiny od odberu bola vzorka spracovaná v mikrobiologickom laboratóriu. Zamrazené vzorky boli pôvodne odoberané v roku 2015 za iným účelom vyšetrenia a každá vzorka bola *ana partes aequales* zmiešaná a homogenizovaná v pufrovanom fyziologickom roztoku s 10 % glycerínu a zmrazená na -20 °C.

Salmonella spp.: Skrátené, 25 g vzorky trusu koní s klinickým príznakom hnačky bolo predmnožené v 225 ml pufrovanej peptónovej vode (Oxoid, VB) pri 37°C 18-24 hodín, následne bolo 100 µl očkovaných do stredu Petriho misky modifikovaným polotuhým médiom podľa Rappaport-Vassiliadis, v ktorom bola vzorka selektívne pomnožená pri 41,5°C ±0,5°C do druhého dňa. Vzorky, ktoré vytvorili okolo inokula halo efekt, boli subkultivované na agar s xylózou, lyzínom a dezoxycholátom sodným (XLDA) (Oxoid, VB).

Clostridium difficile: spóry *Cl. difficile* v truse koní boli preukazované už dávnejšie popísaným postupom (Blanco a kol., 2013). Približne 0,5 g vzorky trusu bolo pomnoženej v 5 ml bujónu s cykloserínom, cefoxitínom, fruktózou a taurocholátom sodným v anaeróbnom boxe (Concept 300, Ruskin, VB) po dobu 2 až 3 týždňov. Následne sa 1 ml pomnoženej vzorky zmiešal s 1 ml koncentrovaného etanolu a vzorka sa nechala preparovať 30 min. pri laboratórnej teplote za občasného pretrepania. Následne sa vzorka odstredila (1520 x g po dobu 10 minút). Získaný sediment bol tampónom kultivovaný na selektívny agar ChromID™ *C. difficile* (Biomerieux, Francie). Suspektné kolónie boli subkultivované na anaeróbný krvný agar a získané čisté subkultúry boli následne identifikované hmotnostnou spektrometriou na zariadení MALDI TOF Biotyper (Bruker, Nemecko). Metódou PCR bola potvrdená druhová identifikácia a preukazovaná prítomnosť génov kódujúcich toxín TcdA (enterotoxín), toxín TcdB (cytotoxín) a binárneho toxínu CDT.

Clostridium perfringens: Vzorky trusu koní s príznakom hnačky boli priamo kultivované na anaeróbný krvný agar a inkubované pri 37°C 18-24 hodín za anaeróbnych podmienok. Morfológicky typické kolónie boli identifikované hmotnostnou spektrometriou na zariadení MALDI TOF Biotyper (Bruker, Nemecko).

Zloženie mikrobiómu (bude uskutočnené): Na základe klinického a laboratórneho vyšetrenia pacientov, ktorí boli sledovaní v priebehu riešenia projektu, boli vybrané vhodné vzorky trusu na stanovenie zloženia mikrobiómu. Zo vzoriek trusu bude extrahovaná DNA komerčnou súpravou QIAamp DNA stool minikit. Metódou PCR budú amplifikované gény variabilných oblastí V3/V4 génov pre 16S rRNA s využitím KAPA Taq HotStart PCR kit (Kapa Biosystems). Na indexovanie produktov PCR bude použitý podľa pokynov výrobcu Nextera XT index kit (Illumina). Sekvenovanie bude uskutočnené s využitím súpravy MiSeq reagent kit v3 a zariadenie MiSEQ 2000 (Illumina).

Výsledky

V priebehu riešenia projektu bolo vyšetrených 35 koní hospitalizovaných na Klinike chorob koní VFU Brno. Súčasne boli odobrané stery z prostredia Kliniky chorob koní v celkovom počte 10 kusov. Ďalej bolo vyšetrených 178 zamrazených vzoriek trusu koní odobraných v roku 2015 za účelom izolácie *Escherichia coli* produkujúcich betalaktamázy širokého spektra. Z týchto dlhodobomrazených vzoriek 25 pochádzalo od pacientov Kliniky chorob koní VFU Brno, 15 od pacientov Kliniky Heřmanův Městec a zvyšných 138 vzoriek pochádzalo od koní ošetrovaných veterinárnymi lekármi u majiteľa, pri športových akciách a v jazdeckých oddieloch. Kultivačným vyšetrením trusu 35 koní hospitalizovaných na Klinike chorob koní VFU Brno sa nepodarilo preukázať vylučovanie *Salmonella spp.* a *Cl. perfringens*. Výsledky kultivácie týchto vzoriek zamerané na dôkaz *Cl. difficile* sú dokumentované v tabuľke č. 1. Hromadný odber vzoriek bol vykonaný v troch termínoch. Pri prvom odbere vzoriek trusu boli 3 kone zo 7 pozitívne, pri druhom odbere 8 vzoriek žiadny *Cl. difficile* nevylučoval. Pri treťom odbere vzoriek bolo 11 koní z 19 vyšetrených pozitívnych. Nakoniec jedna samostatne odoberaná vzorka bola pozitívna. Z 15 získaných izolátov *Cl. difficile* bolo 12 vybavených génmi kódujúcimi obidva alebo len jeden z toxínov A a B. V 10 vzorkách z prostredia kliniky nebolo *Cl. difficile* zistené. Vyšetrením 178 zamrazených vzoriek bolo *Cl. difficile* preukázané v 4 (2, 25 %) z nich. Dva toxinogénne izoláty (TcdA+TcdB+CDT-) pochádzali z kliniky Heřmanův Městec, jeden toxinogénny (TcdA+TcdB+CDT-) a jeden na toxíny negatívny izolát boli zistené u koní liečených antibiotikami. Vzťah nálezu *Cl. difficile* ku klinickému nálezu hnačky je potrebné posúdiť s ohľadom na prítomnosť génov kódujúcich príslušné toxíny. Odobrané vzorky trusu na Klinike chorob koní, od zdravých a koní trpiacich hnačkovým ochorením nepreukázali žiadneho špecifického patogénneho činiteľa, nakoľko *Cl. difficile* bolo izolované aj v truse zdravých koní a koní bez príznakov hnačky.

Tabuľka č.1. Záchyt *Cl. difficile* v truse koní hospitalizovaných na KCHK VFU Brno

Pacient	Klinické číslo/ meno pacienta	Nález <i>Cl. difficile</i>	Hospitalizácia (dni)	Celkový zdravotný stav/ dôvod hospitalizácie	ATB terapia	Klinický príznak hnačky
1.	160777	+(TcdA+TcdB +CDT-)	1	TFK/ sepsa	-	+
2.	160749	+(TcdA+TcdB -CDT+)	0	Bez alterácií	-	-
3.	160702	+(TcdA+TcdB -CDT+)	17	CHZ	PNC+GMC / TS	-
4.	Gabra	+(TcdA+TcdB +CDT-)	0	Bez alterácií	-	-
5.	160731	+(TcdA+TcdB -CDT+)	29	CHZ	-	-
6.	160737	+(TcdA+TcdB -CDT+)	7	CHZ	TS	-
7.	Princ	+(TcdA+TcdB -CDT+)	0	Bez alterácií	-	-
8.	Rastafa	+(TcdA+TcdB -CDT+)	0	Bez alterácií	-	-
9.	160743	+(TcdA+TcdB -CDT+)	11	CHZ	TS	-
10.	160719	+(TcdA+TcdB +CDT-)	15	K	PNC+GMC + M	+
11.	160747	+(TcdA+TcdB -CDT+)	9	CHZ	TS	-
12.	160738	+(TcdA+TcdB -CDT+)	39	CHZ	PNC	-
13.	160563	+ (TcdA- TcdB-CDT-)	11	CHZ	PNC+GMC / M	+
14.	160514	+ (TcdA- TcdB-CDT-)	15	CHZ	PNC+GMC / TS	-
15.	160321	+ (TcdA- TcdB-CDT-)	63	CHZ	ENRO	-

EK: enterokolitída; CHZ: chirurgický zákrok (kone prijaté za účelom plánovaného alebo akútneho chirurgického zákroku bez klinického príznaku hnačky); TFK: tyflokolitída; K: kolitída; ENRO: enrofloxacín, GMC: gentamicín, M: metronidazol, PNC: benzylpenicilín, TS: trimetoprim a sulfadiazín

Iný špecifický infekčný (bakteriálny) agens spôsobujúci hnačky u koní nebol preukázaný. Z celkového počtu koní a vyšetrených vzoriek trusu bolo 48,39 % pozitívnych na záchyt *Cl. difficile*, z ktorých len u 20% koní sa vyskytol klinický príznak hnačky. Diagnóza tyflokolitídy, kolitídy a enterokolitídy bola stanovená na základe klinického obrazu pacienta (klinické príznaky: hnačka, endotoxémia), ultrasonografického vyšetrenia, hematologického a biochemického vyšetrenia krvi, stanovenia sérového amyloidu, vylúčenia hnačky spôsobenej parazitárnou infestáciou alebo neinfekčnými agens.

Záver

Kultivačné vyšetrenie trusu 35 koní hospitalizovaných na Klinike chorob koní VFU Brno nepreukázalo vylučovanie *Salmonella spp.* a *Cl. perfringens*, čo zodpovedá výsledkom kultivačných vyšetrení dlhodobu dokumentovaných na KCHK VFU Brno.

V tomto projekte bola prvý krát uskutočnená cieľená depistáž výskytu vylučovania *Cl. difficile* medzi pacientami KCHK VFU Brno a v súbore 178 koní rôzneho pôvodu s dokumentovanou anamnézou. Naše výsledky potvrdili staršie údaje o záchytoch *Cl. difficile* u koní v súvislosti s hospitalizáciou a predchádzajúcou antibiotickou terapiou. Asociácia výskytu *Cl. difficile* a výskytu hnačky bola skôr výnimočná. Bolo by vysoko žiadúce pokračovať v sledovaní tohto agens s ohľadom na zabezpečenie prevencie vzniku prípadných nozokomiálnych infekcií tohto typu. Riešenie projektu umožnilo predbežný výber vzoriek trusu koní vhodných na stanovenie mikrobiomu.

Tato práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 131/2016/FVL.

Zoznam literatúry

BLANCO, J. L., ÁLVAREZ-PÉREZ, S. & GARCÍA, M. E. (2013) Is *Clostridium difficile* prevalence in animals underestimated? *The Veterinary Journal*, 2013, 197, 694-698.

COSTA, M. C., et al. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *The Veterinary Journal*, 2015, 205.1: 74-80.

GARRETT, Lynsey A.; BROWN, Robert; POXTON, Ian R. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Veterinary microbiology*, 2002, 87.1: 81-88.

CHAPMAN, Ann M. Acute diarrhea in hospitalized horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2009, 25.2: 363-380.

UZAL, Francisco A.; DIAB, Santiago S. Gastritis, Enteritis, and Colitis in Horses. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2015, 31.2: 337-358.

JANOIR, Claire. Virulence factors of *Clostridium difficile* and their role during infection. *Anaerobe*, 2016, 37: 13-24.

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Nejvýznamnější nákazy obojživelníků ve volné přírodě a v záchranných chovech

Vojtech Baláž¹, Michaela Múdrá¹, Renáta Podmolová¹

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

Úvod

Infekční nemoci obojživelníků hrají významnou roli v úbytku biodiverzity této skupiny obratlovců. Největší význam mají houbové patogeny *Batrachochytrium dendrobatidis*, *B. salamandrivorans* (Martel et al. 2014) a DNA viry ze skupiny ranavirů (Price et al. 2014). *B. dendrobatidis* má globální rozšíření a pravděpodobně stojí za vyhnutím více než 150 druhů žab. *B. salamandrivorans* byla nedávno zavlečena do Evropy pravděpodobně obchodem s asijskými ocasatými čeledi Salamandridae a způsobila vyhnutí mloků v Nizozemsku, úspěšně se šíří na nová území a má potenciál redukovat populace ocasatých v celé Evropě (Martel et al. 2014; Spitzen-van der Sluijs et al. 2016). Ranaviry jsou schopné infikovat druhy napříč třídami obratlovců a jejich virulentní linie pak mohou působit rozvrat celých společenstev obojživelníků a plazů (Price et al. 2014). V oblasti střední a východní Evropy je rozšíření všech tří zmíněných patogenů dosud nedostatečně prozkoumané a o případných dopadech na populace a průběh onemocnění u volně žijících druhů existuje minimum informací (Baláž et al. 2014). V případě ohrožení populace šířícím se onemocněním je jedním z možných ochranných kroků založení záchranného chovu, kde je část populace držena v karanténě, případně léčena (Mendelson et al. 2006). V České republice jsou přechodně v zajetí chovány druhy chráněných obojživelníků v Herpetologické stanici firmy NaturaServis. Obojživelníci v těchto chovech jsou původem z volné přírody a do zajetí jsou odchyceny v rámci záchranných transferů. Taková situace umožňuje sledovat infekční status dané populace a průběh onemocnění u jedinců infikovaných v přirozených podmínkách. Projekt se věnoval dvěma otázkám ve výzkumu nemocí obojživelníků. Prvním cílem bylo potvrdit výskyt cílových patogenů v zemích střední a východní Evropy, kde jim byla dosud věnována minimální pozornost. Druhým cílem bylo sledovat vývoj infekce u obojživelníků v zajetí a pokusit se kultivovat symbiotické bakterie, které mají inhibiční účinky na *B. dendrobatidis*.

Materiál

Přehled vzorků použitých pro mapování výskytu cílových patogenů:

Země	Počet vzorků	Počet druhů	Počet lokalit	Testované patogeny
Česko	53	3	NA – jedinci z chovů ČR	Ranavirus
Polsko	375	8	13	<i>B. dendrobatidis</i> , <i>B. salamandrivorans</i> , Ranavirus
Bělorusko	569	4	27	<i>B. dendrobatidis</i> , <i>B. salamandrivorans</i> , Ranavirus
Chorvatsko	64	3	5	<i>B. dendrobatidis</i> , <i>B. salamandrivorans</i> , Ranavirus
Černá Hora	184	6	6	<i>B. dendrobatidis</i> , <i>B. salamandrivorans</i> , Ranavirus

K sledování vývoje infekce u obojživelníků v zajetí bylo použito 30 jedinců *Triturus carnifex* (15poz, 15 neg) a 60 jedinců *Bombina bombina* (40 poz., 20 neg). Jedinci byli drženi ve dvou typech prostředí, které se lišily v míře zastínění chovných nádob. Proběhla tři opakovaná vzorkování s odstupem 2 týdnů.

Metodika

Vzorky pro účely mapování výskytu cílových patogenů byly odebírány několika způsoby. Pro detekci *B. dendrobatidis* a *B. salamandrivorans* byly odebírány kožní stěry pomocí tamponů MW 100 (Medical Wire). Vzorky jater pro detekci ranaviru, byly původem z uhynulých jedinců získaných z chovů, nebo nalezených v přírodě. Detekce cílových patogenů byla provedena pomocí real-time qPCR na přístrojích Roche Light Cycler 480 a BioRad Mini Opticon. Stěrové vzorky pro detekci *B. dendrobatidis* a *B. salamandrivorans* byly analyzovány pomocí duplexové qPCR (Bloom et al. 2013). Pro průkaz ranaviru byla použita dosud nepublikovaná qPCR vyvinutá na Institute of Zoology, ZSL London. V případě pozitivních nálezů ranaviru byl vzorek následně odeslán do laboratoře IoZ a tam genotypizován. Odběry bakterií byly provedeny z obojživelníků v zajetí zapojených v sledování vývoje infekce *B. dendrobatidis*. Bakterie byly kultivovány na R2A agaru a následně použité v inhibičních testech s kulturou *B. dendrobatidis*.

Výsledky

V rámci mapování cílových patogenů jsme rozšířili známé areály *B. dendrobatidis* a ranaviru o Bělorusko a Polsko. Z polských vzorků pochází záchyt ranaviru ve smíšené populaci *Pelophylax lessonae* a *Pelophylax esculentus*, která je zároveň pozitivní na *B. dendrobatidis*. Tato populace vykazuje sníženou velikost jedinců, klinicky nemocná zvířata a pokles v početnosti. Detekovaný ranavirus patří dle sekvenčních dat do nedávno popsané linie CMTV, která působí v západní Evropě populační poklesy u několika druhů obojživelníků a pravděpodobně se šíří (Price et al. 2014). Přestože jsme měli k dispozici relativně velký soubor vzorků z uhynulých jedinců rodu *Pelophylax* z Česka, neprokázali jsme výskyt ranaviru na našem území. Výsledky analýz z Balkánu potvrzují výskyt *B. dendrobatidis* v této oblasti, ranavirus jsme zde ale také nedetekovali. Žádný z analyzovaných vzorků nebyl pozitivní na *B. salamandrivorans*. Nejčastěji infikovanou skupinou obojživelníků v případě *B. dendrobatidis* a ranaviru byli skokani rodu *Pelophylax*. Infekce *B. dendrobatidis* u přírodně nakažených *Triturus carnifex* a *Bombina bombina* byla v průběhu sledování potlačena u všech sledovaných jedinců. Kvůli metodickým potížím se ale nepovedlo vykultivovat symbiotické bakterie, které by prokazatelně inhibovaly růst *B. dendrobatidis*.

Závěr

Výsledky projektu potvrzují předpoklad o plošném rozšíření *B. dendrobatidis* v Evropě. Sledování vývoje infekce u *Triturus cristatus* a *Bombina bombina* zároveň prokázalo, že alespoň tyto dva druhy jsou schopné se infekce zbavit bez lidských zásahů. Výskyt ranaviru je dle našich výsledků mnohem vzácnější, než jsme předpokládali. Situace kdy v jedné polské lokalitě zároveň působí dva patogeny, mělo pozorovatelné dopady na zdravotní stav populace a vedlo ke klinickým projevům onemocnění. Jako stěžejným taxonem pro výzkum nových nemocí obojživelníků v Evropě se v našem případě prokázal rod *Pelophylax*. To, že jsme v průběhu projektu nezaznamenali výskyt *B. salamandrivorans* potvrzuje předpoklad, že se jedná o teprve nedávno introdukovaný patogen, který se v Evropě teprve začíná šířit.

Děkujeme za spolupráci kolegům: Marie Doležálková, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i.; Jelena Kulikova, Belarusian Academy of Sciences, Belarus; Dragica Šalamon, Hyla, Croatia; Krzysztof Kolenda, University of Wrocław, Poland; Stephen Price, Institute of Zoology, Zoological Society of London, United Kingdom.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 224/2016/FVHE.

Seznam literatury

- BALÁŽ, V., et al. 2014. *Assessing risk and guidance on monitoring of Batrachochytrium dendrobatidis in Europe through identification of taxonomic selectivity of infection.* Conservation Biology **28**:213-223.
- BLOOI, M., F. et al. 2013. *Duplex real-Time PCR for rapid simultaneous detection of Batrachochytrium dendrobatidis and Batrachochytrium salamandrivorans in amphibian samples.* Journal of Clinical Microbiology **51**:4173-4177.
- MARTEL, A. et al. 2014. *Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders.* Science **346**:630-631.
- MENDELSON, J. R. et al. 2006. *Biodiversity - Confronting amphibian declines and extinctions.* Science **313**:48-48.
- PRICE, S. J. et al. 2014. *Collapse of amphibian communities due to an introduced ranavirus.* Current Biology **24**:2586-2591.
- SPITZEN-VAN DER SLUIJS, A. et al. 2016. *Expanding Distribution of Lethal Amphibian Fungus Batrachochytrium salamandrivorans in Europe.* Emerging Infectious Diseases. **22**:1286-1288

Posouzení zdravotního stavu dravců a sov v záchranných centrech: biochemická, hematologická a parazitologická studie

Hana Bandouchová, Vladimír Piaček, Marie Štěrbová, Tomáš Heger

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

Úvod

V posledních letech vzrůstá v ČR snaha o záchranu poraněných volně žijících živočichů. Stres může v těchto případech vést ke zhoršení zdravotního stavu konkrétního jedince a to v důsledku např. rozvoje oportunních infekcí. Z hlediska procentuálního představují dravci a sovy významnou část pacientů záchranných center. Primárním cílem záchranných stanic pro poraněná zvířata je zpětné vypuštění zvířat do volné přírody. Pro efektivní terapii je velmi důležité správně posoudit aktuální zdravotní stav zvířete při příjmu, aby mohla být provedena adekvátní terapie (Samour, 2008). V rámci tohoto vyšetření lze považovat za optimální kombinaci hematologického, biochemického a parazitologického vyšetření (Tully, 2000; Atkinson, 2008). Rovněž před vypuštěním je vhodné zkontrolovat stav každého jedince stejným způsobem. Cílem projektu bylo posouzení výsledků vyšetření ve vztahu k charakteru poranění, délce držení v zajetí a druhu dravce nebo sovy. Dílčí cíle byly: stanovení biochemických a hematologických parametrů u dravců a sov, provedení a zhodnocení parazitologického vyšetření.

Materiál a metodika

Ve spolupráci se záchrannými stanicemi pro poraněné živočichy byl proveden odběr vzorků krve pro hematologické a biochemické vyšetření a vzorků trusu pro parazitologické vyšetření, aby bylo možné posoudit vliv konkrétního zdravotního problému na krevní parametry. Krev byla ptačím pacientům odebírána z *vena cutanea ulnaris* nebo z *vena jugularis*. Biochemické hodnoty krve byly zpracovány přenosným biochemickým analyzátozem VetScaniSTAT 1 a Abaxis (USA) a z části vzorku bylo provedeno standardní hematologické vyšetření. Parazitologické vyšetření zahrnovalo koprologické vyšetření, konkrétně flotační metodu. Vzhledem k tomu, že u některých druhů není možné rozlišit pohlaví na základě pohlavního dimorfismu, bylo pohlaví stanoveno s využitím metody PCR.

Výsledky

Hodnoty biochemických parametrů byly rozděleny do dvou skupin, a to do skupiny klinicky zdravých zvířat a do skupiny klinicky nemocných. V rámci těchto dvou skupin byly rozděleny dále do souborů dle čeledí (*Accipitridae*, *Falconidae* a *Strigidae*). Vyšetřených bylo celkem 82 vzorků. Z čeledi *Accipitridae* to bylo 21, z toho klinicky nemocných 6. Z čeledi *Falconidae* bylo vyšetřeno 41 vzorků, z toho klinicky nemocní byli 4 jedinci (Tab. č. 1) a z čeledi *Strigidae* 20 vzorků, z toho klinicky nemocní byli 4 jedinci.

Parametr	průměrná hodnota ± SO		<i>Falco tinnunculus</i> 1.6.2016 1.	<i>Falco tinnunculus</i> 5.8.2016 1.	<i>Falco tinnunculus</i> 14.6.2016 1.	<i>Falco rusticolus</i> x <i>Falco cherrug</i>
AST μ kat/L	0,73	- 1,53	1,1	35,1	3	1,6
CK μ kat/L	6,65	- 17,62	52,8	0	54,3	5,3
UA μ mol/L	142,90	- 505,91	743	190	805	216
GLUmmol/L	15,12	- 19,67	11,4	16	12,3	15
CAmmol/L	2,05	- 2,43	1,57	1,98	1,57	2,43
PHOSmmol/L	0,38	- 1,27	0,78	0,93	0,31	1,47
TP g/L	26,67	- 35,49	12	29	19	41
ALB g/L	17,35	- 29,10	9	10	14	0
GLOB g/L	2,11	- 11,11	0	0	0	0
Nammol/L	145,68	- 152,32	121	117	128	147
Kmmol/L	3,40	- 4,80	4,8	22	3,1	2,3
Clmmol/L	112,95	- 120,24	97	96	100	106

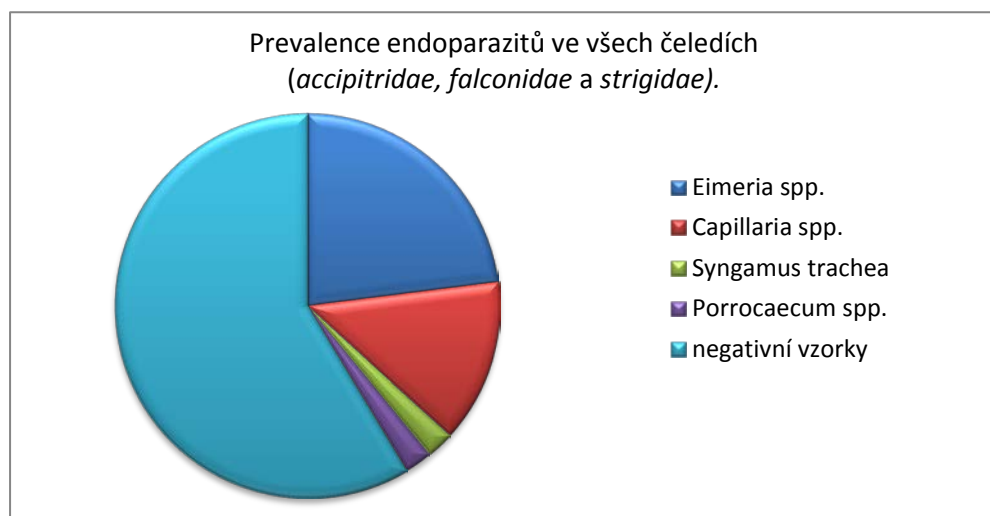
Tabulka č. 1. Porovnání skupiny klinicky nemocných jedinců s hodnotami rozptylu klinicky zdravých zvířat v testované skupině (*Falconidae*)

U skupiny druhu *Falco peregrinus* o počtu dvaceti jedinců byly porovnány vybrané biochemické parametry se zahraniční studií zabývající se stanovením referenčních hodnot biochemických parametrů u sokolů stěhovavých (Lumeij 2007).

Parametr	průměr ± SO (<i>Falconidae</i>) (Lumeij 2007)	Parametr	průměr ± SO (<i>Falconidae</i>) vzorek 1. - 41.
Glukóza (mmol/l)	18,9 ± 1,7	Glukóza (mmol/l)	17,39 ± 2,28
Kyselina močová (μmol/l)	606 ± 467	Kyselina močová (μkat/l)	324,41 ± 181,51
Na (mmol/l)	159 ± 6,6	Na (mmol/l)	150,35 ± 4,44
Cl (mmol/l)	125 ± 10,5	Cl (mmol/l)	116,59 ± 3,64
Ca (mmol/l)	2,17 ± 0,18	Ca (mmol/l)	2,24 ± 0,19
P (mmol/l)	1,00 ± 0,34	P (mmol/l)	0,82 ± 0,44
Celkový protein (g/l)	29,6 ± 4,9	Celkový protein (g/l)	31,08 ± 4,41
Albumin (g/l)	17,0 ± 2,8	Albumin (g/l)	23,22 ± 5,87
AST (U/l)	51 ± 25	AST (μkat/l)	1,13 ± 0,40

Tabulka č. 2. Porovnání referenčních hodnot vybraných biochemických parametrů (Lumeij 2007) s námi získanými hodnotami u druhu *Falco peregrinus*

Parazitologickému vyšetření bylo podrobena celkem 82 vzorků, z toho bylo pozitivních 31 jedinců, tj. 25,42% z celkového počtu. Zastoupené byly rody *Eimeria*, *Capillaria*, *Porrocaecum* a druh *Syngamus trachea* (graf č. 1). U šesti jedinců z čeledí *Accipitridae* a *Falconidae* byla prokázána kombinovaná invaze vícero druhů parazitů. Ošetřovatelům byla následně po vyšetření odeslána zpráva o parazitologickém vyšetření, kde byli seznámeni s výsledky vyšetření a v případě potřeby jim bylo doporučeno podání vhodných antiparazitik.



Graf č. 1. Prevalence endoparazitů v testované skupině

U druhů, u kterých nebylo možné určit pohlaví pomocí standardních neinvazivních postupů, bylo pohlaví určeno pomocí metody PCR. Celkem bylo takto určeno pohlaví u čtyř druhů dravců (*Falco biarmicus*, *Falco cherrug*, *Accipiter gentilis*, *Buteo buteo*) a dva druhy sov

(*Tyto alba*, *Asio otus*). Byly použity primery P2 + P8, P2 + NP, P2 + NP + MP a 2550F + 2718R. U primerů 2550F + 2718R byla pozorována vyšší přesnost.

Závěr

Porovnáním biochemických hodnot získaných vyšetřením souboru klinicky zdravých a nemocných jedinců jsme zjistili, že se hodnoty nemocných zvířat statisticky významně lišily v podstatě u většiny sledovaných parametrů, a to u všech čeledí, od stanoveného rozmezí hodnot biochemických parametrů skupiny zdravých jedinců. Zejména jsme zjistili rozdíly v hodnotách albuminu, globulinu, kreatinkinázy, Cl a hemoglobinu. Lze také předpokládat, že pokud bude do budoucna navýšen počet zdravých zvířat, dojde ke zpřesnění referenčního rozmezí. Při porovnání referenčních hodnot vybraných biochemických parametrů u sokola stěhovavého, které publikoval Lumeij (2007), s naší skupinou téhož druhu čítající 20 jedinců (tab. č. 2), jsme na základě statistické analýzy dospěli k závěru, že se tyto výsledky vzájemně statisticky neliší. Parazitologickému vyšetření bylo podrobena celkem 82 vzorků, z toho bylo pozitivních 31 jedinců. Nejčastěji se objevovaly rody *Capillaria*, *Eimeria*, *Syngamus* a *Porroceacum*. Ošetřovatelům byla doručena zpráva o parazitologickém statutu a doporučena případná vhodná antiparazitární terapie. U druhů, u kterých nebylo možné určit pohlaví pomocí standardních neinvazivních postupů, bylo provedeno určení pohlaví pomocí metody PCR. Jako nejúčinnější se jeví použití primerů 2550F + 2718R, a to také u řádu *Strigiformes*.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 230/2016/FVHE.

Seznam literatury

- ATKINSON CT, THOMAS NJ, HUNTER D (2008): *Parasitic diseases of wild birds*. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 595 pp. ISBN 0813820812
- COOPER J (2002): *Birds of prey: health & disease*. Malden, MA: Blackwell Science, 345 pp. ISBN 0632051159
- LUMEIJ JT, REMPLE JD, REMPLE CJ, RIDDLE KE (2007):) *Plasma chemistry in peregrine falcons (Falco peregrinus): Reference values and physiological variations of importance for interpretation*. Avian Pathology, 129-132pp. DOI:10.1080/03079459808419313
- SAMOUR J (2008): *Avian medicine*. Edinburgh: Mosby Elsevier, 525 pp. ISBN 978-0-7234-3401-6
- TULLY TN, LAWTON MP, DORRESTEIN G (2000): *Avian medicine*. Boston: Butterworth-Heinemann, 411 pp. ISBN 0750635983

Salt reduction in sushi meal

Dorđević Dani¹, Buchtová Hana¹, Macharáčková Blanka², Abdullah Fouad A. A¹

¹Department of Meat Hygiene and Ecology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

²Department of Gastronomy, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of
Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic

Introduction

The number of meals belonging to the group of so called “nontraditional meals” is getting lower due to globalization. Sushi meal is probably the best example of globalization influence on meal spreading and acceptance in countries where it was totally unknown meal only a few decades ago. Sushi meal is already represented as worldwide known global brand. Therefore, the manipulation with sushi meal and making it more functional meal can certainly affect broad numbers of consumers. Sodium reduction in food is the subject of many studies. Salt substitutes are used for fulfilling this task, though they should not disturb sensory characteristics of meal, especially saltiness, which highly influence meal acceptance and purchase (Liem et al., 2011; Czarniecka-Skubina and Nowak, 2014). Products based on regular sodium chloride (NaCl) are getting more present on the market since their technology allows retaining meal original sensory characteristics. Soda-Lo is the product produced from regular NaCl crystals which are expanded to smaller particles with lower density (Guinard et al., 2016). The aim of the study was to evaluate how the usage of salt substitutes in sushi preparation influences its salt/sodium content and sensory properties.

Material and methods

The study was carried out in two parallel stages: i) salt/sodium determination in sushi samples; ii) sensory evaluation of sushi samples. Sensory evaluation same as salt/sodium determination were carried out on two sushi types: nigiri (n=1180) and maki (n=1180). Nigiri and maki sushi samples were prepared with three seafood types: salmon (*Salmo salar*), tuna (*Thunnus albacares*) and shrimp (*Pleoticus muelleri*). Salmon and tuna were included as raw pieces in sushi preparation but shrimp samples were cooked before sushi preparation. Sushi rice was prepared in 5 different batches; salt types and concentrations were changed. The first and fifth batches were prepared without salt and with 3% sodium chloride (NaCl), respectively. They

served as control samples for other three batches: 2% NaCl, Mary (potassium chloride: KCl) and Soda-Lo.

The study included following physico-chemical analysis: water activity, pH, salt content determination according to Volhard (ČSN ISO 1841-1:1999) and sodium content determination was carried out using ContrAA 700 high resolution –continuum source atomic absorption spectrometer (Analytik Jena AG, Jena, Germany).

In the study were included 40 panelists that evaluated sensory characteristics of sushi samples. Sushi samples were sensory evaluated in the laboratory equipped in the way that meets requirements of standard ISO 8589:2008. The protocol used for the sensory evaluation was composed of two parts. In the first part panelists determined saltiness of samples by comparison with control samples (I control sample: sushi prepared without salt; II control sample: sushi prepared with 3% NaCl), and in the second part they assessed following parameters: bitterness, juiciness, consistency, smell and appearance. Statistical significance at $p < 0.05$ was evaluated by one-way ANOVA analysis of variance, and post hoc Tukey test for finding differences within groups. SPSS 20 statistical software (IBM Corporation, Armonk, USA) was used.

Results

Values of pH in sushi samples ranged from 4.06 ± 0.15 (maki tuna prepared with 2% NaCl) to 5.41 ± 0.12 (maki shrimp prepared with 2% NaCl). Water activity was very similar in all sushi samples and ranged from 0.94 ± 0.01 to 0.96 ± 0.01 . Results of sensory characteristics and salt/sodium contents of investigated sushi samples are shown in Tables 1-2 and Figures 1-4.

Table 1. Saltiness of sushi samples expressed by respondents' comparison with sushi samples prepared without salt and 3% salt content in rice

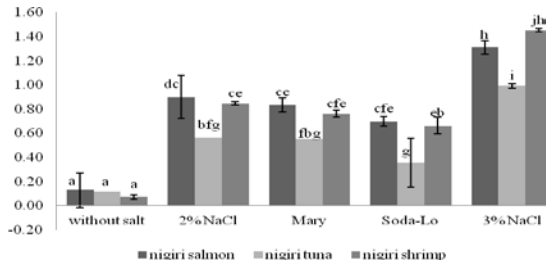
	Salt types		
	Soda-lo	Mary	2% NaCl
Nigiri salmon	45.24±24.05	56.99±74.91	54.62±22.03
Nigiri tuna	56.20±16.82	49.59±17.47 ^b	61.11±15.75 ^a
Nigiri shrimp	71.94±94.13	53.28±19.21	59.83±18.79
Maki salmon	47.05±20.78	49.28±19.62	49.47±18.43
Maki tuna	53.83±18.35	49.48±19.34	59.22±18.57
Maki shrimp	54.88±20.36	56.04±18.64	62.49±16.95

*different lowercase letters (a, b) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples prepared with different salts

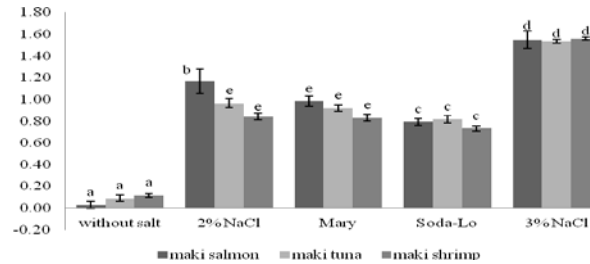
Table 2. Organoleptic characteristics of nigiri and maki sushi prepared with different salt types and concentrations

	Nigiri salmon				
	Without salt	2% NaCl	Mary	Soda-Lo	3% NaCl
Bitterness	15.60±22.61	12.17±17.94	25.04±29.09	13.80±20.83	16.43±24.05
Juiciness	17.75±17.24	15.45±16.94	18.36±19.94	18.42±17.35	17.07±20.05
Consistency	16.40±14.94	15.03±16.09	16.83±17.89	17.70±17.56	19.27±22.34
Smell	50.81±33.60	47.31±29.33	49.38±22.13	47.88±25.12	50.56±30.09
Appearance	8.63±11.30	3.56±5.97	6.25±8.82	9.25±12.13	12.13±17.05
Nigiri tuna					
Bitterness	14.73±16.99	15.96±23.96	28.18±29.51	15.43±21.67	15.68±20.54
Juiciness	18.05±14.90	12.54±11.69	14.55±13.24	16.39±15.53	18.52±16.73
Consistency	14.52±14.87	11.80±10.43	14.39±12.16	14.04±11.75	17.09±17.16
Smell	40.44±24.52	57.75±17.03	48.38±25.32	57.13±21.31	57.50±18.12
Appearance	13.63±19.82	23.88±21.74	14.63±13.14	15.19±22.85	11.00±11.15
Nigiri shrimp					
Bitterness	16.98±22.35	16.79±23.44	28.60±32.02	20.04±26.83	16.35±23.35
Juiciness	15.89±14.37	11.71±11.58	14.54±11.83	11.26±10.93	11.03±10.09
Consistency	15.63±15.96	12.78±16.42	14.73±12.25	12.66±16.15	11.70±12.12
Smell	56.25±22.95	65.31±18.68	64.56±21.52	60.75±21.47	58.13±25.17
Appearance	6.50±8.29	7.06±7.54	9.88±10.16	7.75±7.89	6.06±7.60
Maki salmon					
Bitterness	12.58±17.21	12.17±16.33	23.36±25.74	13.13±16.78	12.81±16.52
Juiciness	22.44±22.21	17.45±20.71	20.53±22.10	16.56±15.75	24.55±24.39
Consistency	22.83±21.83	15.58±16.15	17.56±19.01	17.44±19.51	20.75±23.70
Smell	49.29±21.14	60.71±14.66	53.00±18.80	55.29±22.63	39.29±16.01
Appearance	13.29±18.55	16.14±21.64	8.50±8.12	20.14±26.97	12.21±16.17
Maki tuna					
Bitterness	11.93±11.46	11.17±15.67	21.50±26.53 ^a	9.11±7.31 ^b	11.93±11.89
Juiciness	18.50±15.59	13.33±12.29	18.54±14.04	14.46±11.59	16.46±15.83
Consistency	15.74±11.01	14.11±10.87	14.67±10.54	13.43±11.16	17.09±17.00
Smell	52.75±24.55	61.88±15.89	64.63±16.22	63.69±18.06	53.25±29.21
Appearance	11.69±12.20	17.13±10.91	12.50±6.48	11.88±6.75	15.38±21.21
Maki shrimp					
Bitterness	12.70±15.84	7.91±8.80 ^b	21.48±28.01 ^a	16.19±20.79	10.51±15.57
Juiciness	17.99±18.04	14.64±15.94	14.23±15.48	16.30±17.10	16.96±19.32
Consistency	18.94±19.79	12.75±12.59	14.46±14.46	14.70±15.89	14.39±16.22
Smell	67.50±18.10	64.88±14.07	60.25±18.50	56.38±18.70	65.69±23.96
Appearance	12.88±14.97	14.13±18.59	12.50±9.72	12.19±13.51	11.19±17.97

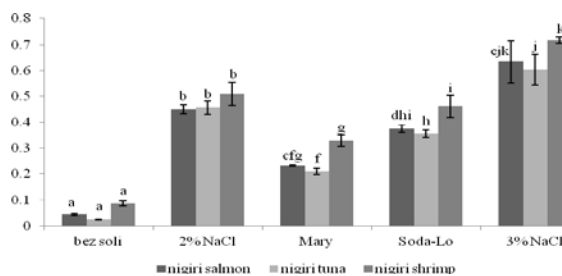
*different lowercase letters (a, b) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples prepared with different salts



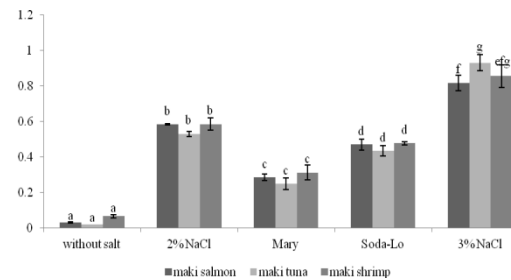
*different lowercase letters (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples
Figure 1. Salt content in nigiri sushi prepared with different seafood and salts



*different lowercase letters (a, b, c, d, e) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples
Figure 2. Salt content in maki sushi prepared with different seafood and salts



*different lowercase letters (a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples
Figure 3. Sodium content in nigiri sushi prepared with different seafood and salts



*different lowercase letters (a, b, c, d, e, f, g) indicate significant statistical ($p < 0.05$) difference between sushi samples
Figure 4. Sodium content in maki sushi prepared with different seafood and salts

Conclusions

The study clearly showed possibility of salt substitute application in the preparation of sushi meal, since results indicated lower salt/sodium contents in samples prepared with Mary and Soda-Lo. Soda-Lo salt substitute gained better marks because its usage did not interfere with other sensory characteristics of sushi meal.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 201/2016/ FVHE

References:

- Czaniecka-Skubina, E., Nowak, D. (2014): Japanese cuisine in Poland: attitudes and behavior among Polish consumers. *International Journal of Consumer Studies*, 38, 62-68.
- Guinard, J. X., Miller, A. M., Mills, K., Wong, T., Lee, S. M., Sirimuangmoon, C., Schaefer, S. E., Drescher, G. (2016). Consumer acceptance of dishes in which beef has been partially substituted with mushrooms and sodium has been reduced. *Appetite*, 105, 449-459.
- Liem, D. G., Miremedi, F., Keast, R. S. J. (2011). Reducing sodium in foods: the effect on flavor. *Nutrients*, 3, 694-711.

Vliv solné koupele na vybrané ukazatele pstruha duhového při léčbě proliferativního onemocnění ledvin

Vladimíra Enevová¹, Jana Blahová¹, Helena Modrá², Miroslava Palíková³, Taťána Otisková³,
Zdeňka Svobodová¹

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav teritoriálních studií, Fakulta regionálního rozvoje a teritoriálních studií, Mendelova univerzita v Brně², Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb, včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³

Úvod

Proliferativní onemocnění ledvin (PKD) je endoparazitární onemocnění vyvolané původcem *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Vyskytuje se především u pstruhů duhových a dalších druhů lososovitých ryb a jeho výskyt může být doprovázen vysokou mortalitou. Hlavním cílovým orgánem jsou ledviny, kde dochází k bujení intersticiální tkáně a k mizení ledvinných kanálků. Podobné změny lze pozorovat i v jiných orgánech, zejména ve slezině. Průběh onemocnění je chronický, ryby jsou apatické, nepřijímají potravu a dochází ke zvětšení tělní dutiny a tvorbě exudátu. Původce onemocnění, *T. bryosalmonae*, je dvouhostitelským parazitem. Infekční stádia jsou uvolňována z mechovek (*Bryozoa*) do vody, kde následně plavou a pronikají přes žábry a kůži do těla ryb (Clifton-Hadley et al. 1984; Svobodová a kol. 2007; Schmidt-Posthaus et al. 2012). V současnosti nejsou registrována žádná léčiva, která lze při léčení PKD využít. Pro léčení bylo prozatím vyzkoušeno pouze přidání chloridu sodného nejprve do koncentrace 0,8 % a následné zvyšování až na 1,2 %. Jako prevence je doporučováno zamezit kontaktu plůdku s ostatními rybami. Významným vlivem, který ovlivňuje intenzitu onemocnění a tím i mortalitu v chovu, je teplota vody. Se snižující se teplotou dochází k redukci klinických příznaků a zároveň bylo potvrzeno, že ryby jsou schopny regenerace parenchymu ledvin (Svobodová a kol. 2007; Bettge et al. 2009).

Materiál a metodika

Ve spolupráci s firmou BioFish s.r.o. (Pravíkov) byl realizován pokus, ve kterém byl hodnocen vliv NaCl koupele při léčbě PKD u pstruha duhového a následná regenerace organismu. Firma BioFish s.r.o. se specializuje na intenzivní chov a prodej lososovitých ryb a v předchozím období opakovaně řešila problémy s výskytem PKD a s tím spojeného následného úhynu obsádky.

Vlastní experiment byl realizován v recirkulačním systému Ústavu ekologie a chorob zvířete, ryb, včel. Do pokusu byly zařazeny ryby, u kterých byly zaznamenány klinické příznaky PKD. Ryby byly rozděleny do dvou skupin. Jedna skupina nebyla ošetřena a u druhé skupiny byla zavedena terapie s využitím NaCl. Během prvních čtrnácti dnů byl do vody ošetřované skupiny ryb dávkován chlorid sodný až do doporučené koncentrace 1,2 %. V průběhu experimentu bylo u obou skupin zaznamenáno hynutí ryb, které bylo ovšem u léčené skupiny výrazně nižší. Po 14 dnech byla terapie ukončena a po dobu dalších 7 dnů byla sledována mortalita ryb a reakce ryb na solnou koupel. Odběry ryb byly provedeny po 14 dnech (15 kusů z každé skupiny) a na konci experimentu (27 kusů ze skupiny podrobené terapii NaCl, 22 kusů ze skupiny bez terapie NaCl). Rybám byla nejprve odebrána z ocasní cévy krev a následně byly usmrceny a podrobeny patoanatomickému vyšetření. Dále byly odebrány vzorky vybraných tkání pro další vyšetření. Pro histologické vyšetření byly do 10% formaldehydu odebrány vzorky ledvin, jater a sleziny. Dále byly odebrány vzorky jater, ledviny a žaber pro stanovení vybraných ukazatelů oxidativního stresu a zamraženy (-85 °C). Vzorky krve byly odstředěny a separovaná plazma byla zamražena a skladována v mrazicím boxu při -85 °C. Ve vzorcích plazmy bylo provedeno vyšetření vybraných imunologických parametrů (koncentrace celkových imunoglobulinů, bakteriolytická aktivita komplementu, oxidativní vzplanutí fagocytů). Dále byla v krevní plazmě provedena analýza základních biochemických ukazatelů (glukóza, celkový protein, albumin, ALT, AST, ALP, fosfor, CK, LDH, laktát, amoniak, cholesterol) a ukazatelů oxidativního stresu (ceruloplasmin, redukční potenciál plazmy – FRAP). Ve vybraných vzorcích tkání byly stanoveny ukazatele oxidativního stresu. Statistické zpracování získaných výsledků bylo provedeno pomocí statistického programu Unistat 5.6. Data byla testována pomocí Shapiro-Wilk testu pro ověření normality a rozdíly mezi léčenou a neléčenou skupinou po aplikaci NaCl a následně mezi léčenou a neléčenou skupinou po fázi regenerace byly hodnoceny pomocí nepárového t-testu a Mann-Whitney testu. Data byla testována na hladině významnosti $p < 0,05$ a $p < 0,01$.

Výsledky a diskuze

Při biochemickém vyšetření krevní plazmy byly zaznamenány statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) mezi léčenou a neléčenou skupinou u většiny sledovaných ukazatelů. Po 14 dnech od počátku přidání NaCl bylo u neléčené skupiny zjištěno statisticky významné zvýšení aktivity ALT, AST a LDH. Dále pak bylo u neléčené skupiny zjištěno statisticky významné snížení

obsahu triacylglycerolů, glukózy, amoniaku a vápníku. Po 7 dnech od ukončení terapie NaCl bylo u neléčené skupiny zjištěno statisticky významné zvýšení aktivity LDH a snížení obsahu amoniaku, glukózy a vápníku. U dalších sledovaných ukazatelů (albumin, ALP, fosfor, CK, laktát, cholesterol, celková bílkovina) nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Výsledky ukazatelů krevní plazmy, které byly hodnoceny jako statisticky významné, jsou uvedeny v tabulce 1.

Dále bylo provedeno analytické stanovení vybraných ukazatelů oxidativního stresu. Nejvýznamnější rozdíly byly zjištěny v případě ukazatelů oxidativního stresu, které byly hodnoceny v krevní plazmě. Po 14 dnech od počátku přidání NaCl bylo zjištěno statisticky významné zvýšení FRAP a ceruloplasminu u léčené skupiny. Po 7 dnech od ukončení terapie NaCl bylo zjištěno statisticky významné zvýšení ceruloplasminu u neléčené skupiny. Uvedené výsledky jsou prezentovány v tabulce 1. Dále byly analyzovány vybrané tkáně pro stanovení aktivity antioxidantních enzymů. Při statistickém zpracování byly nejvýznamnější rozdíly zaznamenány v jaterní tkáni.

Tabulka 1: Výsledky vybraných biochemických ukazatelů a ukazatelů oxidativního stresu v krevní plazmě. Data jsou uvedena jako průměr \pm střední chyba průměru. Statistické porovnání bylo prováděno samostatně mezi léčenou a neléčenou skupinou po aplikaci NaCl a následně mezi léčenou a neléčenou skupinou po fázi regenerace.

Sledované parametry	Fáze léčení (14 dnů)		Fáze regenerace (7 dnů)	
	Léčená skupina	Neléčená skupina	Léčená skupina	Neléčená skupina
ALT (μ katal/l)	0,27 \pm 0,04	0,38 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
AST (μ katal/l)	6,35 \pm 0,48	8,22 \pm 0,54	6,81 \pm 0,42	7,96 \pm 0,39
LDH (μ katal/l)	15,73 \pm 3,35	24,38 \pm 2,03	15,80 \pm 1,54	19,95 \pm 1,44
Triacylglyceroly (g/l)	1,72 \pm 0,18	1,06 \pm 0,10	2,23 \pm 0,25	1,88 \pm 0,21
Glukóza (mmol/l)	3,78 \pm 0,28	3,10 \pm 0,15	5,37 \pm 0,28	3,57 \pm 0,28
Amoniak (μ mol/l)	162,83 \pm 10,92	135,97 \pm 6,31	234,22 \pm 18,36	169,84 \pm 11,52
Vápník (mmol/l)	2,43 \pm 0,04	2,22 \pm 0,04	2,62 \pm 0,04	2,47 \pm 0,04
FRAP (μ mol/l)	580,06 \pm 35,00	479,05 \pm 32,42	515,61 \pm 28,72	449,13 \pm 23,56
Cerulplasmin (Δ A/min x 10000)	143,64 \pm 7,77	117,53 \pm 8,77	138,95 \pm 6,51	171,94 \pm 10,48

Postupné zvyšování NaCl snížilo mortalitu léčených ryb o více jak 50 % oproti neléčeným rybám. Ačkoliv počty parazitů detekovaných pomocí IHC byly nižší u léčených ryb oproti neléčeným rybám v ledvinách (1.6 vs. 2.5) i ve slezině (0.6 vs. 0.7), nebyl tento pokles statisticky významný. V rámci sledovaných imunitních parametrů došlo k ovlivnění aktivity komplementu po 14 dnech od počátku terapie NaCl ve smyslu snížení aktivity léčených ryb oproti neléčeným (94.0 x 98.5 min⁻¹; p≤0.05) a v obou odběrových termínech (14 a 21 dnů) byla vlivem přídatku NaCl výrazně ovlivněna koncentrace lysozymu v kožním slizu (p≤0.001). V rámci histologického vyšetření byly u obou skupin zaznamenány proliferativní změny v ledvinné tkáni, avšak zatímco u léčených ryb měly tyto změny charakter proliferativně-reparatorní, u neléčených ryb byly spíše jako změny reaktivní než reparatorní a rozsah poškození parenchymu je zřetelně větší, než u skupiny léčené NaCl.

Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že přidání NaCl až do výše 1,2 % snižuje mortalitu ryb a pozitivně ovlivňuje průběh onemocnění. Terapie NaCl by tedy mohla být vhodná pro léčení proliferativního onemocnění ledvin vyvolané původcem *Tetracapsuloides bryosalmonae*.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno 207/2016/FVHE.

Seznam literatury:

Bettge, K., Wahli, T., Segner, H., Schimdt-Posthaus, H. Proliferative kidney disease in rainbow trout: time and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2009, 4:363-377.

Clifton-Hadley, R.S., Bucke, D., Richards, R.H. Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *Journal of Fish Diseases*, 1984, 7:363-377.

Del-Pozo, J., Turnbull, J. F., Crumlish, M., Ferguson, H.W. A study of gross, histological and blood biochemical changes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with rainbow trout gastroenteritis (RTGE). *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33:301-310.

Schmidt-Posthaus, H., Bettge, K., Foserster, U., Segner, H., Wahli, T. Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2012, 97:207-218.

Svobodová, Z. a kol. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb. Informatorium, Praha, 2007, 264

Identifikace *Helicobacter* spp. s využitím metody sekvenování

Nesvadbová, M., Bořilová, G., Fašiangová, M.

*Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta hygieny a technologie, Veterinární a farmaceutická
univerzita Brno*

Úvod

Bakterie *Helicobacter pylori* byla poprvé popsána v roce 1980 a od této doby se počet známých druhů rodu *Helicobacter* výrazně zvýšil. V současné době je identifikováno 45 různých druhů helikobakterů (Flahou *et al.*, 2016). Bakterie, které jsou zařazeny do tohoto rodu, lze rozdělit do dvou hlavních skupin – žaludeční a enterohepatické druhy. *Helicobacter* spp. byl detekován u téměř 150 druhů obratlovců (Schrenzel *et al.*, 2010). Avšak tento patogen je charakteristický svou vysokou citlivostí, a proto je, v celosvětovém měřítku, k dispozici nízký počet *in vitro* izolátů (Haesebrouck *et al.*, 2009). Některé druhy mají, kromě patogenního potenciálu u různých zvířecích hostitelů, také schopnost způsobit onemocnění u člověka (zoonotický potenciál).

U zvířat v zájmovém chovu (pet zvířata) se udává prevalence výskytu žaludečních druhů 67-86 % u klinicky zdravých psů, 61-100 % u psů s chronickým zvracením a 41-100% u klinicky zdravých koček i koček vykazujících chronické zvracení (Haesebrouck *et al.*, 2009; Tabrizi *et al.*, 2010). Ghil *at al.* (2009) uvádí, že výskyt *Helicobacter* spp. u divokých koček byly přibližně dvojnásobně vyšší než u koček domácích. Psi a kočky jsou přirozeně infikovány několika žaludečními druhy helikobakterů (Haesebrouck *et al.*, 2009). Jako první byl ze žaludku psů a koček izolován *H. felis*. Dále byly ze sliznice žaludku psů izolovány *H. bizzozeronii*, *H. salomonis*, *H. cynogastricus*, *H. heilmannii*, *H. bilis*, *H. canis*, *H. cinaedi*, *H. fennelliae* a *H. rappini* (Flahou *et al.*, 2016). U drůbeže byl prokázán výskyt *H. pullorum* (Stanley *et al.*, 1994) a *H. canadensis* (Fox *et al.*, 2000).

Tato práce je zaměřena na optimalizaci a zavedení eseje pro přesnou druhovou identifikaci *Helicobacter* spp. v klinických vzorcích získaných ze symptomatických i zdravých psů a drůbeže, pomocí metody sekvenování vybraného úseku DNA molekul. V současné době je k identifikaci bakterií pomocí molekulárně-genetických metod používán především gen *16S rRNA*. Avšak použití tohoto genu k identifikaci jednotlivých druhů helikobakterů není pro identifikaci

příliš vhodné kvůli nízké variabilitě sekvencí mezi jednotlivými druhy, a proto je třeba nalézt vhodnější úseky DNA (Drancourt & Raoult, 2002).

Materiál a metodika

Analyzované vzorky

Pro účely této studie bylo testováno 150 vzorků faeces ze psů s klinickými příznaky gastrointestinálních onemocnění před zahájením jejich antibiotické léčby a 76 vzorků obsahů slepých střev brojlerových kuřat. Izolace DNA ze vzorků byla provedena pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) dle standardních pokynů výrobce. Detekce *Helicobacter* spp. byla provedena kultivačně dle Manfreda *et al.* (2006) s následnou PCR detekcí dle Fox *et al.* (2000). *Helicobacter* pozitivní vzorky ($n = 63$) byly dále podrobeny další analýze pomocí metody sekvenování DNA.

Design primerů a polymerázová řetězová reakce (PCR)

Na základě bioinformatické analýzy genomových sekvencí jednotlivých druhů helikobakterů (AQFW01000015.1, AZJJ01000001.1, FQ670179.2, DS990393.1, CM000776.2, BASD01000029.1, JNOB01000007.1) byly vybrány geny, jejichž sekvence jsou vysoce variabilní, a proto jsou vhodné pro identifikaci jednotlivých druhů – gen *feoB* (ferrous iron transport protein B), *rpoD* (RNA polymerase sigma factor RpoD) a *tuf* (elongation factor Tu). Primery pro PCR a sekvenování byly navrženy podle dostupných sekvencí pomocí programu OLIGO v4.0 (National Biosciences Inc.) pro identifikaci *H. bilis*, *H. canis*, *H. felis*, *H. cinaedi*, *H. canadensis*, *H. fennelliae*, a *H. pullorum*. Reakční směs pro PCR o celkovém objemu 25 μ l obsahovala přibližně 50 ng DNA, 10x LA PCR reakční pufr (Top-Bio), 0,5 mM dNTP (Top-Bio), 2% DMSO (Top-Bio), 2,5 mM MgCl₂ (Top-Bio), 0,5 μ M přímého a zpětného primeru a 2,5 U LA DNA Polymerases Mix (Top-Bio). PCR produkty byly následně vizualizovány elektroforeticky na 3% agarózovém gelu.

Sekvenování

PCR produkty byly purifikovány pomocí High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche). Pro sekvenační reakci byl použit kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Thermo Fisher Scientific). Sekvenační směs byla následně purifikována pomocí BigDye XTerminator Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) a analyzována v přístroji 3500 Series Genetic

Analyzer (Thermo Fisher Scientific). Získané sekvence byly vyhodnoceny pomocí programu Sequence Scanner Software v1.0 (Thermo Fisher Scientific) a porovnány pomocí programu ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html#>) a BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Výsledky

Tato práce je zaměřena na identifikaci jednotlivých druhů rodu *Helicobacter* pomocí metody sekvenování DNA. Na základě dostupných sekvencí vybraných druhů helikobakterů byly nalezeny vhodné úseky DNA a navrženy primery pro PCR reakci a následné sekvenování. Pro vývoj a optimalizaci metody byly využity referenční kmeny *H. bilis*, *H. canis*, *H. felis*, *H. cinaedi*, *H. canadensis*, *H. fennelliae*, a *H. pullorum*. Specifita primerů byla ověřena PCR amplifikací DNA z dalších bakterií rodu *Campylobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Arcobacter*. Výsledky testování navržených primerů prokázaly, že primery jsou druhově specifické pro cílenou identifikaci vybraných helikobakterů. Výsledky identifikace helikobakterů v testovaných vzorcích jsou uvedeny v Tabulce 1. Ve feaces z klinicky nemocných psů byla potvrzena přítomnost *H. pullorum*, *H. bilis*, *H. cinaedi* a *H. canis*. Průkaz těchto druhů s využitím metod molekulární genetiky potvrzuje také studie Arfaee *et al.* (2014). U drůbeže byl prokázán výskyt dvou druhů – *H. pullorum* a *H. cinaedi*. Podobné závěry potvrzující výskyt *H. pullorum* ve vysoké míře v trávicím traktu drůbeže uvádějí také Manfreda *et al.* (2011).

Tabulka 1: Druhová identifikace *Helicobacter* spp. ze vzorků faces psů a kura domácího pomocí metody sekvenování DNA

	<i>H. pullorum</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H. cinaedi</i>	<i>H. canis</i>	<i>H. canadensis</i>
pes domácí	4	7	20	5	0
drůbež	26	0	0	0	1

Na základě výsledků této studie bylo prokázáno, že metoda sekvenování je vhodnou metodou pro rychlou a přesnou identifikaci jednotlivých druhů rodu *Helicobacter* izolovaných z vybraných klinických vzorků. V rámci studia výskytu, patogeneze a virulentních faktorů zoonotických patogenů se metody molekulární genetiky stále více uplatňují jako vhodné aplikace vedle klasických kultivačních a biochemických metod.

Tato práce byla financovaná grantem IGA 202/2016/FVHE.

Seznam literatury:

- Drancourt, M., & Raoult, D. (2002). rpoB gene sequence-based identification of Staphylococcus species. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1333-1338.
- Flahou, B., Haesebrouck, F., & Smet, A. (2016). Non-Helicobacter pylori Helicobacter Infections in Humans and Animals. In Helicobacter pylori Research (pp. 233-269). *Springer Japan*.
- Fox, J. G., Chien, C. C., Dewhirst, F. E., Paster, B. J., Shen, Z., Melito, P. L., Woodward, D. L., & Rodgers, F. G. (2000). Helicobacter canadensis sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *Journal of clinical microbiology*, 38(7), 2546-2549.
- Ghil, H. M., Yoo, J. H., Jung, W. S., Chung, T. H., Youn, H. Y., & Hwang, C. Y. (2009). Survey of Helicobacter infection in domestic and feral cats in Korea. *Journal of veterinary science*, 10(1), 67-72.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Flahou, B., Chiers, K., Baele, M., Meyns, T., Decostere, A., & Ducatelle, R. (2009). Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 202-223.
- Manfreda, G., Parisi, A., Lucchi, A., Zanoni, R. G., & De Cesare, A. (2011). Prevalence of Helicobacter pullorum in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 479-484.
- Schrenzel, M. D., Witte, C. L., Bahl, J., Tucker, T. A., Fabian, N., Greger, H., Hollis, C., Hsia, G., Siltamaki, E., & Rideout, B. A. (2010). Genetic Characterization and Epidemiology of Helicobacters in Non-domestic Animals. *Helicobacter*, 15(2), 126-142.
- Stanley, J., Linton, D., Burnens, A. P., Dewhirst, F. E., On, S. L., Porter, A., Owen, R. J., & Costas, M. (1994). Helicobacter pullorum sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*, 140(12), 3441-3449.
- Tabrizi, A. S., Jamshidi, S., Oghalaei, A., Salehi, T. Z., Eshkaftaki, A. B., & Mohammadi, M. (2010). Identification of Helicobacter spp. in oral secretions vs. gastric mucosa of stray cats. *Veterinary microbiology*, 140(1), 142-146.

The effect of packaging on selected freshness parameters of chicken broilers meat from organic production system

Fouad A. A. Abdullah, Hana Buchtova, Dani Đorđević

*Department of Meat Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

Introduction

Modified atmosphere packaging (MAP) is one of the most attractive modern methods of packaging (Paramithiotis et al., 2009). Evaluation of freshness criteria are performed by detection of e.g. colour indicators, pH, water activity, ammonia and TBARS. Prolongation of meat freshness by MAP has many advantages including: decrease of aerobes proliferation and increased oxidative stability of meat as a result of oxygen elimination (Arvanitoyannis and Stratakos, 2012). The aim of this study was to evaluate the effect of MAP 70% N₂/30% CO₂ on the selected physical and chemical parameters in chilled meat of chickens from organic production system.

Material and Methods

Carcasses of chicken broilers were obtained from organic farm (Biopark s. r. o., Lipova, Czech Republic). 24 samples were packaged using MAP (70% N₂/30% CO₂) and 24 samples were packaged using polyolefin foil stretched over the tray with chicken meat (AIR). Samples were stored at a temperature of the $2 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 14 days. Analyses was conducted on 2nd day of storage and repeated on 7th, 10th and 14th days of storage. At each sampling day, three samples from each type of packaging were taken for analysis. Concentrations of N₂ and CO₂ were measured using the Check Point II gas analyser (PBI Dansensor AS, Ringsted, Denmark). The pH was measured with pH meter (Five Go2; Mettler-Toledo, Schwerzenbach, Switzerland). Water activity (a_w) was measured with a LabMaster-aw (Novasina Ltd., Switzerland). The ammonia content was determined by the Conway method (Helclová et al., 1990). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were quantified as malondialdehyde. Antioxidant capacity was determined by using free radical scavenging ability 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl according to Heilerova et al. (2003). The colour indicators (CIEL*a*b*) were measured by using Minolta CM 2600d (Konica Minolta, Japan). Statistical significance ($p < 0.05$) was estimated by t-test and ANOVA analysis of variance, with post hoc Tukey test for finding differences between independent variances using UNISTAT 6.0 (Unistat[®] Limited, London, England). Values in the same row

with different letters ^{a, b, c} are significantly among 2nd, 7th, 10th, 14th day of storage, values in the same column with different letters A,B are significantly different between MAP and AIR, *P < 0.05 (Tabs. 1-4).

Results

Production properties (weight in g / yield in %) of chicken's parts: alive bird 2006.24 ± 281.641g, carcass 1293.04 ± 158.76 g / 64.67 ± 2.84 %, half carcass 641.31 ± 81.89 g / 32.07 ± 1.83 %, breasts 302.86 ± 59.62 g / 15.07 ± 1.76 %, thighs 405.04 ± 58.04 g / 20.24 ± 1.61 %, skin of breasts 34.64 ± 8.14 g / 1.75 ± 0.43 %, skin of thighs 40.27 ± 7.27 g / 2.01 ± 0.27 %, wings 171.24 ± 25.49 g / 8.58 ± 0.90 %.

Table 1 Percentage of gases composition in MAP (Abdullah and Buchtova 2016)

gases	2 nd day	7 th day	10 th day	14 th day	Stat. sign.
N ₂	72.12±0.47 ^a	79.43±1.40 ^b	79.23±1.40 ^b	78.56±0.71 ^b	p<0.05
CO ₂	27.53±0.60 ^b	20.06±1.58 ^a	20.72±1.49 ^a	21.42±0.72 ^a	p<0.05
O ₂	0.33±0.23 ^b	0.29±0.26 ^b	0.05±0.09 ^a	0.02±0.03 ^a	p<0.05

Values in the same row with different letters _{a, b} are significantly different among 2nd, 7th, 10th, 14th

Table 2 Colour of breasts and thighs of organic chickens in MAP and AIR (Abdullah et al. 2016)

lightness (L*)			2 nd day	7 th day	10 th day	14 th day	S.s.
breast	muscle	MAP	58.21±2.34 ^{Aa}	59.81±1.56 ^{Aa}	59.45±0.75 ^{Aa}	59.55±2.15 ^{Ba}	NS
		AIR	58.55±3.90 ^{Aa}	58.46±1.88 ^{Aa}	58.00±1.87 ^{Aa}	57.83±2.18 ^{Aa}	NS
	skin	MAP	70.49±4.03 ^{Aa}	70.70±2.03 ^{Aa}	70.74±4.08 ^{Aa}	70.44±3.00 ^{Aa}	NS
		AIR	70.81±1.48 ^{Aa}	70.24±3.14 ^{Aa}	70.57±1.47 ^{Aa}	71.52±2.49 ^{Aa}	NS
thigh	muscle	MAP	57.02±1.72 ^{Aa}	59.00±3.48 ^{Ba}	58.80±1.28 ^{Ba}	58.60±1.47 ^{Ba}	NS
		AIR	57.40±1.35 ^{Ab}	56.40±1.18 ^{Aab}	56.09±3.60 ^{Aab}	55.66±1.61 ^{Aa}	*
	skin	MAP	68.35±3.39 ^{Aa}	68.58±1.85 ^{Aa}	71.85±1.89 ^{Bb}	70.02±2.06 ^{Aab}	*
		AIR	70.02±1.48 ^{Aa}	69.73±1.09 ^{Aa}	69.37±2.22 ^{Aa}	68.09±3.06 ^{Aa}	NS
redness (a*)							
breast	muscle	MAP	-0.92±0.64 ^{Aa}	-0.77±1.05 ^{Aab}	-0.56±0.37 ^{Aab}	-0.28±0.56 ^{Ab}	*
		AIR	-0.58±0.61 ^{Aa}	-0.31±0.70 ^{Aa}	-0.02±0.63 ^{Aa}	-0.02±0.44 ^{Aa}	NS
	skin	MAP	1.67±1.31 ^{Aa}	0.89±1.18 ^{Aa}	1.67±1.39 ^{Aa}	0.85±1.13 ^{Aa}	NS
		AIR	3.34±0.34 ^{Aa}	2.43±1.42 ^{Aa}	2.54±0.84 ^{Aa}	1.48±1.64 ^{Aa}	NS
thigh	muscle	MAP	1.69±1.27 ^{Aa}	2.05±1.30 ^{Aa}	2.25±0.59 ^{Aa}	2.33±0.32 ^{Aa}	NS
		AIR	1.84±0.52 ^{Aa}	2.20±0.86 ^{Aa}	2.88±0.95 ^{Aa}	2.93±0.40 ^{Aa}	NS
	skin	MAP	2.69±1.30 ^{Ab}	1.82±1.24 ^{Aab}	1.50±0.79 ^{Aab}	1.45±0.80 ^{Aa}	*
		AIR	2.42±0.39 ^{Bb}	2.36±1.13 ^{Aab}	1.84±1.65 ^{Aa}	1.26±1.02 ^{Aa}	*
yellowish (b*)							
breast	muscle	MAP	5.94±1.48 ^{Aa}	7.03±1.44 ^{Aab}	6.58±0.87 ^{Aab}	7.15±1.65 ^{Ab}	*
		AIR	7.14±2.08 ^{Aa}	7.51±0.60 ^{Ab}	8.36±0.99 ^{Bb}	10.62±1.38 ^{Bc}	*
	skin	MAP	13.85±2.39 ^{Aa}	13.14±1.51 ^{Aa}	13.91±1.95 ^{Aa}	11.70±3.60 ^{Aa}	NS
		AIR	17.14±1.21 ^{Aa}	15.67±2.64 ^{Aa}	16.80±2.14 ^{Aa}	18.08±2.64 ^{Ba}	NS
thigh	muscle	MAP	5.49±0.88 ^{Aa}	6.82±1.18 ^{Aab}	6.34±0.67 ^{Aab}	7.39±0.98 ^{Ab}	*
		AIR	5.34±0.57 ^{Aa}	7.29±1.12 ^{Aab}	7.67±1.82 ^{Ab}	8.50±2.99 ^{Ab}	*
	skin	MAP	12.86±2.07 ^{Aa}	12.27±1.23 ^{Aa}	11.34±1.90 ^{Aa}	10.68±1.61 ^{Aa}	NS

		AIR	13.19±0.66 ^{Aa}	12.17±0.52 ^{Aa}	12.59±1.69 ^{Aa}	14.42±2.77 ^{Ba}	NS
Statistical significance			*	*	*	*	

Table 3 Selected parameters of organic chickens in MAP and AIR (Abdullah and Buchtova 2016)

parameters			2 nd day	7 th day	10 th day	14 th day	S.s.		
pH	breast	muscle	MAP	5.87 ± 0.13 ^{Aa}	5.80 ± 0.13 ^{Aa}	5.83 ± 0.09 ^{Aa}	5.79 ± 0.10 ^{Aa}	NS	
			AIR	5.85 ± 0.11 ^{Aa}	5.87 ± 0.07 ^{Aa}	5.89 ± 0.10 ^{Aa}	5.84 ± 0.14 ^{Aa}	NS	
		skin	MAP	6.29 ± 0.18 ^{Ab}	6.13 ± 0.19 ^{Aab}	6.09 ± 0.14 ^{Aa}	6.04 ± 0.16 ^{Aa}	*	
			AIR	6.25 ± 0.18 ^{Aa}	6.37 ± 0.30 ^{Ba}	6.68 ± 0.24 ^{Bb}	7.18 ± 0.36 ^{Bc}	*	
	thigh	muscle	MAP	6.50 ± 0.16 ^{Ab}	6.28 ± 0.26 ^{Aa}	6.31 ± 0.13 ^{Aa}	6.32 ± 0.10 ^{Aa}	*	
			AIR	6.43 ± 0.21 ^{Aa}	6.60 ± 0.21 ^{Ba}	6.59 ± 0.25 ^{Ba}	6.52 ± 0.18 ^{Ba}	NS	
		skin	MAP	6.28 ± 0.22 ^{Aa}	6.31 ± 0.18 ^{Aa}	6.33 ± 0.13 ^{Aa}	6.29 ± 0.06 ^{Aa}	*	
			AIR	6.43 ± 0.08 ^{Ba}	6.78 ± 0.27 ^{Bb}	7.36 ± 0.36 ^{Bc}	7.42 ± 0.32 ^{Bc}	*	
water activity	breast	muscle	MAP	0.943±0.006 ^{Aa}	0.943±0.006 ^{Aa}	0.942±0.006 ^{Aa}	0.942±0.007 ^{Aa}	NS	
			AIR	0.947±0.013 ^{Aa}	0.947±0.004 ^{Aa}	0.942±0.006 ^{Aa}	0.947±0.006 ^{Aa}	NS	
		skin	MAP	0.943±0.006 ^{Aa}	0.944±0.006 ^{Aa}	0.940±0.003 ^{Aa}	0.942±0.005 ^{Aa}	NS	
			AIR	0.942±0.004 ^{Aab}	0.945±0.004 ^{Ab}	0.942±0.003 ^{Aab}	0.939±0.001 ^{Aa}	*	
	thigh	muscle	MAP	0.944±0.004 ^{Aa}	0.946±0.005 ^{Aa}	0.942±0.005 ^{Aa}	0.945±0.004 ^{Aa}	NS	
			AIR	0.944±0.004 ^{Aa}	0.947±0.006 ^{Aa}	0.946±0.004 ^{Aa}	0.947±0.007 ^{Aa}	NS	
		skin	MAP	0.946±0.004 ^{Aa}	0.944±0.005 ^{Aa}	0.947±0.004 ^{Aa}	0.945±0.005 ^{Aa}	NS	
			AIR	0.944±0.005 ^{Aa}	0.943±0.002 ^{Aa}	0.942±0.005 ^{Aa}	0.942±0.004 ^{Aa}	NS	
	TBARS	breast	muscle	MAP	1.20±0.30 ^{Aa}	2.56±1.27 ^{Ab}	1.49±0.45 ^{Aa}	2.47±0.91 ^{Ab}	*
				AIR	1.73±1.08 ^{Aa}	2.33±0.76 ^{Ab}	1.71±0.64 ^{Aa}	2.85±1.26 ^{Ab}	*
			skin	MAP	3.79±0.42 ^{Aa}	8.64±2.95 ^{Bc}	5.75±0.90 ^{Ab}	5.91±1.04 ^{Ab}	*
				AIR	4.02±1.16 ^{Aa}	5.67±0.77 ^{Aab}	7.73±3.74 ^{Abc}	8.89±2.76 ^{Bc}	*
thigh		muscle	MAP	1.14±0.16 ^{Aa}	1.74±0.80 ^{Aa}	1.68±0.72 ^{Aa}	2.50±0.65 ^{Ab}	*	
			AIR	1.08±0.46 ^{Aa}	1.81±0.51 ^{Aab}	1.45±0.58 ^{Aa}	2.36±1.40 ^{Ab}	*	
		skin	MAP	3.49±0.88 ^{Bab}	4.31±0.79 ^{Ab}	3.23±0.26 ^{Aa}	8.05±1.29 ^{Bc}	*	
			AIR	2.02±0.36 ^{Aa}	3.77±0.84 ^{Ab}	5.25±1.76 ^{Bc}	4.52±1.57 ^{Abc}	*	
Ammonia	breast	muscle	MAP	21.326±3.39 ^{Aa}	24.438±4.50 ^{Ab}	21.307±2.70 ^{Aab}	23.441±5.05 ^{Aab}	*	
			AIR	24.329±4.87 ^{Ba}	22.704±2.04 ^{Aa}	29.051±3.70 ^{Bb}	40.724±7.77 ^{Bc}	*	
		skin	MAP	14.563±4.19 ^{Ba}	13.203±3.51 ^{Aa}	12.523±1.64 ^{Aa}	17.850±5.57 ^{Ab}	*	
			AIR	10.359±1.36 ^{Aa}	20.136±4.27 ^{Bb}	31.507±6.89 ^{Bc}	40.894±3.72 ^{Bd}	*	
	thigh	muscle	MAP	19.323±4.34 ^{Aa}	20.551±5.86 ^{Aa}	19.399±1.52 ^{Aa}	21.836±2.67 ^{Aa}	NS	
			AIR	19.456±1.83 ^{Aa}	22.421±5.43 ^{Aa}	38.480±10.87 ^{Bb}	54.853±7.41 ^{Bc}	*	
		skin	MAP	12.712±3.44 ^{Ba}	13.619±1.45 ^{Aab}	12.640±1.95 ^{Aa}	15.904±3.94 ^{Ab}	*	
			AIR	9.875±2.12 ^{Aa}	19.172±4.32 ^{Bb}	32.160±11.37 ^{Bc}	55.156±6.53 ^{Bd}	*	
antioxidant capacity	breast	muscle	MAP	26.72±2.81 ^{Aa}	31.22±5.40 ^{Ab}	26.45±1.68 ^{Aa}	27.18±1.65 ^{Aa}	*	
			AIR	26.46±1.70 ^{Aa}	31.44±6.23 ^{Ab}	27.27±1.87 ^{Aa}	27.35±1.72 ^{Aa}	*	
		skin	MAP	29.11±2.60 ^{Aab}	30.57±4.69 ^{Ab}	25.88±1.54 ^{Aa}	26.77±2.86 ^{Aa}	*	
			AIR	29.39±2.38 ^{Ab}	29.40±2.45 ^{Ab}	26.82±1.87 ^{Aa}	27.15±2.14 ^{Aab}	*	
	thigh	muscle	MAP	33.36±5.24 ^{Aab}	37.75±5.27 ^{Ab}	31.64±1.36 ^{Aa}	31.84±2.91 ^{Aa}	*	
			AIR	31.90±2.29 ^{Aa}	35.95±5.17 ^{Ab}	32.22±1.91 ^{Aa}	33.61±1.88 ^{Aab}	*	
		skin	MAP	30.97±2.99 ^{Abc}	32.72±2.97 ^{Ac}	27.93±2.23 ^{Aa}	28.93±2.15 ^{Aab}	*	
			AIR	30.83±1.87 ^{Aab}	31.47±2.50 ^{Ab}	28.90±1.47 ^{Aa}	29.49±1.33 ^{Aab}	*	

Statistical significance	*	*	*	*	
--------------------------	---	---	---	---	--

Conclusion The results of present study indicated the positive effects of MAP on the colour parameters, pH values, and ammonia of organic chicken meat. It seen that MAP avoided the organic meat samples from spoilage and protein breakdown.

Table 4 Selected parameters of chicken wings in MAP and AIR (Abdullah and Buchtova 2016)

parameters		2 nd day	7 th day	10 th day	14 th day	S.s.
pH	MAP	6.23 ± 0.20 ^{Aa}	6.14 ± 0.20 ^{Aa}	6.22 ± 0.16 ^{Aa}	6.19 ± 0.19 ^{Aa}	NS
	AIR	6.13 ± 0.24 ^{Aa}	6.20 ± 0.19 ^{Aa}	6.42 ± 0.13 ^{Bb}	6.45 ± 0.22 ^{Bb}	*
water activity	MAP	0.945±0.003 ^{Aa}	0.945±0.006 ^{Aa}	0.941±0.004 ^{Aa}	0.946±0.006 ^{Aa}	*
	AIR	0.945±0.005 ^{Aa}	0.951±0.004 ^{Ba}	0.943±0.006 ^{Aa}	0.945±0.008 ^{Aa}	*
TBARS	MAP	1.91±0.44 ^{Ba}	2.83±0.90 ^{Aa}	2.57±1.78 ^{Aa}	2.44±0.32 ^{Aa}	NS
	AIR	1.40±0.33 ^{Aa}	3.35±1.43 ^{Abc}	2.19±1.62 ^{Aab}	3.84±2.07 ^{Bc}	*
ammonia	MAP	14.941±2.29 ^{Aa}	17.907±7.90 ^{Aa}	16.384±2.46 ^{Aa}	18.473±4.09 ^{Aa}	NS
	AIR	14.915±2.16 ^{Aa}	27.049±6.86 ^{Bb}	39.874±9.68 ^{Bc}	55.514±8.42 ^{Bc}	*
antioxidant capacity	MAP	30.28±5.54 ^{Ab}	34.21±5.68 ^{Ab}	29.28±1.88 ^{Aa}	31.06±2.71 ^{Aab}	*
	AIR	27.52±2.01 ^{Aa}	32.69±3.19 ^{Ac}	28.73±2.65 ^{Aab}	31.27±3.80 ^{Abc}	*
Statistical significance		*	*	*	*	

Acknowledgment.

Financial support was provided by IGA VFU Brno: 208/2016/ FVHE.

References

- ABDULLAH, F. A. A., BUCHTOVÁ, H. Effect of modified atmosphere packaging on the selected physical and chemical parameters in organic chicken meat. In Zborník publikácií zo XVIII. ročníka odbornej konferencie s medzinárodnou účasťou Manažment bezpečnosti a kvality potravinárskych výrobkov, Košice: ELSEWA, s.r.o., 2016, p.
- ABDULLAH, F. A. A., BUCHTOVÁ, H., Đorđević Đ. Effect of modified atmosphere packaging (MAP) on the colour indicators of organic chicken's meat. In Zborník publikácií zo Hygiena a technologie potravín XLVI Lenfeldovy a Hoklovy dny, Brno:VFU, 2016, p. 18.
- ARVANITOYANNIS, I. S., STRATAKOS, A. C. Application of modified atmosphere packaging and active/smart technologies to red meat and poultry: A review. *Food Bioprocess Tech.* 2012, Vol. 5, pp. 1423–1446.
- HEILEROVA, L., BUCKOVA, M., TARAPCIK, P., ŠILHAR, S., LABUDA, J. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Oreganum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech Journal of Food Sciences.* 2003, vol. 21, p. 78-84.
- HELCLOVÁ, M., KLÍMOVÁ, M., PAVELKA, J., ÁSIK, M., ÎLKOVÁ, J. Veterinary laboratory methods. *Food Chemistry - special section.* SVS ČR a ŠVS SR Bratislava. 1990, pp. 137.
- PARAMITHIOTIS, S., SKANDAMIS, P.N., NYCHAS, G.J.E. (2009). Insights into fresh meat spoilage. In F. Toldra (Ed.), *Safety of meat and processed meat* (pp. 55–82). New York, NY: Springer.

Vliv imunostimulantů na míru oxidativního stresu u pstruha duhového po infekci bakterií *Aeromonas salmonicida*

Kristýna Jánová¹, Eva Jelínková¹, Miroslava Palíková¹, Lucie Bláhová²

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita Brno²

Úvod

Ryby v intenzivních chovech jsou často vystaveny velkému stresu, jehož následkem je snížení odolnosti ryb vůči chorobám a také zvýšení míry oxidačního stresu. Důležitým parametrem oxidativního stresu je změna koncentrace nízkomolekulárních látek (Luschak 2011). U nich jsou často stanovovány markery oxidativního stresu jako glutation (GSH) a jeho oxidovaná forma (GSSG) a malondialdehyd (MDA) – produkt lipidní peroxidace. Glutation je nejvýznamnější intracelulární antioxidant neenzymové povahy, je součástí nejrozšířenějšího redoxního systému eukaryot. U jedinců pstruha duhového byl sledován vliv krmiva s imunostimulanty a krmiva s obsahem rostlinných komponent na míru oxidativního stresu. Sledována byla také míra oxidativního stresu po experimentální challenge bakterií *Aeromonas salmonicida* – původci furunkulózy. Pozitivní ovlivnění nespecifické imunity imunostimulanty u pstruha duhového již bylo pozorováno (Siwicki 1994). Míru oxidativního stresu ryb po ovlivnění imunostimulanty sledovali i další autoři (Djordjevic 2009, Jeney 1997, Kiron 2004, Puangkaew 2004).

Materiál a metodika

Jedinci pstruha duhového byli odchováni v recirkulačním zařízení na Mendelově univerzitě v Brně ve třech chovných nádržích o objemu 1000 litrů. Voda v nádržích byla saturována kyslíkem na průměrnou hodnotu 8,17 mg.l⁻¹ tj. 85,7 %, teplota vody byla průměrně 16,6°C, hodnota pH 7,76; N-NH₄⁺ 0,06; N-NO₂ 0,22; Cl⁻ 70,67 mg.l⁻¹ (obsah chloridů sledován z důvodu stanovení tzv. „chloridového čísla“). Do nádrží byly ryby nasazeny začátkem května 2015 a po adaptaci byl 12. 5. 2015 zahájen odchov s třemi různými krmivými.

Jednalo se o krmiva:

1. 920 – standardní extrudované krmivo pro chov lososovitých ryb – BioMar EFICO Enviro 920, velikost peletek 4,5 mm
2. Focus – standardní extrudované krmivo BioMar EFICO Enviro 920 doplněné probiotiky, velikost peletek 4,5 mm
3. Advance – extrudované krmivo pro chov lososovitých ryb BioMar EFICO Enviro 920 Advance, velikost peletek 4,5 mm

Krmivo Advance je svým složením a živinami podobné krmivu 920, ale obsahuje vyšší podíl rostlinných komponent a nižší podíl rybí moučky (pod 10 %). Intenzita krmení byla řízená doporučením dodavatele krmiv – dánská firma BioMar a pohybovala se v rozmezí 1,26-1,28 % hmotnosti ryb. Krmení bylo prováděné 3x denně. Odchov byl ukončen po 28 dnech (9. 6. 2015), ryby byly poté převezeny na VFU Brno, kde byly následně podrobeny challenge bakterií *Aeromonas salmonicida* v dávce 2.10² CFU na rybu. Ryby ze všech tří variant byly infikovány intraperitoneálně a sledovány po dobu 20 dnů od aplikace. Po 20 dnech byla rybám

odebrána krev z ocasních cév a ryby byly usmrceny. Následně byly odebrány vzorky tkání jater, ledvin, střev a svaloviny. Střevo byla propláchnuta a zbavena vnitřního obsahu. Vzorky tkání byly zamrazeny a skladovány při teplotě -85°C v mrazicím boxu. Při stanovení GSH a GSSG byly zmražené tkáně krájeny na ledu a homogenizovány v roztoku KCl 1,15% ledové s EDTA II v koncentraci 10mg/100µl. Principem metody je reakce thiolektivní reagentie (DTNB = 2,2-dinitro-5,5-dithiobenzoová kyselina) s volnými -SH skupinami v neutrálním nebo mírně zásaditém pH v přítomnosti chelatačního činidla, které zároveň zabrání oxidaci GSH během extrakce a analýzy. Volné -SH skupiny jsou ve vzorku přítomny v molekule redukovaného glutationu - GSH. Redukovaný i oxidovaný glutation je po konjugaci redukované formy a vysrážení proteinů thiosalicylovou kyselinou stanoven pomocí LC/MS/MS (Waters). Výsledné koncentrace byly uvedeny v nmol.g⁻¹ tkáně. Při stanovení lipidní peroxidace (marker MDA) pomocí TBARS testu (thiobarbituric acid reactive substances = látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou – TBA) byly vzorky homogenizovány ve fosfátovém pufru v koncentraci 10mg/100µl. MDA reaguje s TBA za vzniku barevného komplexu. Analýza proběhla na kapalinovém chromatografu LC/DAD v butanolovém extraktu. Výsledky analýz byly zpracovány a vyhodnoceny v programu STATISTICA 12.

Výsledky

Při srovnání kontrolních skupin ryb u krmiv Focus a Advance s krmivem 920 pomocí jednocestné analýzy ANOVA byly zjištěny změny v koncentracích GSH a GSSG ($p < 0,05$). Významné změny v koncentracích GSH a GSSG [nmol.g⁻¹] a poměru GSH/GSSG jsou uvedeny v Tabulce 1.

V koncentracích GSH a GSSG u krmiv Focus a Advance ve svalovině nebyly významné rozdíly oproti kontrolnímu krmivu 920, což bylo způsobeno velkou variabilitou dat. V další části experimentu byl hodnocen vliv challenge bakterie *Aeromonas salmonicida* na koncentrace GSH a GSSG u krmiv 920, Focus a Advance V programu STATISTICA 12 byly vyloučeny odlehle hodnoty a analýzou dat byly pomocí t-testu skupiny kontrol a challenge srovnány pro jednotlivé orgány ($p < 0,05$). V Tabulce 2 jsou uvedeny významné rozdíly mezi kontrolami a challenge u analyzovaných markerů u jednotlivých krmiv.

		GSH [nmol.g ⁻¹]	GSSG [nmol.g ⁻¹]	GSH/GSSG
Játra	Focus	↑ 42 %	x	x
	Advance	↑ 85 %	↓ 55 %	↑ 189 %
Ledviny	Focus	↑ 23 %	↑ 66 %	x
	Advance	x	↓ 35 %	↑ 84 %
Střevo	Focus	x	x	x
	Advance	↑ 23 %	↓ 38 %	↑ 120 %
Sval	Focus	x	x	x
	Advance	x	↓ 49 %	↑ 49 %

Tabulka 1 Srovnání významných změn v koncentracích GSH a GSSG a poměru GSH/GSSG u kontrol krmiv Focus a Advance ve srovnání s kontrolním krmivem 920.

		GSH [nmol.g ⁻¹]	GSSG [nmol.g ⁻¹]	GSH/GSSG
játra	K1xCH1	↑ 12 %	x	x
	K2xCH2	x	↓ 38 %	↑ 61 %
ledviny	K1xCH1	x	x	↑ 44 %
	K2xCH2	↑ 19 %	↓ 57 %	↑ 167 %
střevo	K1xCH1	x	x	↑ 51 %
sval	K3xCH3	x	↓ 53 %	↑ 95 %

Tabulka 2 Srovnání významných změn v koncentracích GSH a GSSG a poměru GSH/GSSG v jednotlivých orgánech mezi kontrolami a challenge *Aeromonas salmonicida* u krmiv 920 (K1, CH1) Focus (K2, CH2) a Advance (K3, CH3).

Srovnání hodnot koncentrací MDA [nmol.g⁻¹] u kontrolních skupin ryb krmiv Focus a Advance se skupinou kontrolního krmiva 920 neprokázalo u jater, ledvin a svalu významný nárůst hodnot ($p < 0,05$). Ve tkáni střeva bylo prokázáno významné zvýšení koncentrace MDA o 54 % u krmiva Advance ($p < 0,05$) oproti kontrolnímu krmivu 920. Srovnání skupin kontrol a challenge pro jednotlivé orgány ukázalo významný nárůst koncentrací MDA [nmol.g⁻¹] u krmiva 920 ve střevě o 83 %, u krmiva Focus ve svalu o 19 % a u krmiva Advance v ledvinách o 83 %.

Závěr

Krmivo Advance se zvýšeným obsahem rostlinných komponent vykazovalo významné změny koncentrací markerů oxidativního stresu GSH, GSSG ve srovnání s kontrolním krmivem 920. K významnému zvýšení koncentrace MDA došlo u krmiva Advance v tkáni střeva. Krmivo Advance s rostlinnými komponenty pravděpodobně negativně ovlivňuje hladinu oxidativního stresu. Ve tkáni střeva nebyl u krmiva Focus s obsahem probiotik pozorován významný rozdíl v poměru GSH/GSSG mezi kontrolní skupinou a skupinou challenge *Aeromonas salmonicida*. U kontrolního krmiva 920 naopak ke zvýšení poměru GSH/GSSG docházelo. U markeru K významnému zvýšení koncentrace MDA po experimentální challenge došlo u krmiva 920 ve tkáni střeva, u krmiva Focus ve tkáni svalu a u krmiva Advance ve tkáni ledvin. Lze předpokládat, že imunostimulanty obsažené v krmivě Focus mají příznivý vliv na buňky střevní tkáně a pozitivně ovlivňují jejich redoxní stav – markery GSH/GSSG.

Seznam literatury

DJORDJEVIC, Brankica, et al. Modulation of splenic immune responses to bacterial lipopolysaccharide in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed lentinan, a beta-glucan from mushroom *Lentinula edodes*. *Fish & shellfish immunology*, 2009, 26.2: 201-209.

JENEY, Galina, et al. Prevention of stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing different doses of glucan. *Aquaculture*, 1997, 154.1: 1-15.

KIRON, V., et al. Antioxidant status and nonspecific immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed two levels of vitamin E along with three lipid sources. *Aquaculture*, 2004, 234.1: 361-379.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101.1: 13-30.

PUANGKAEW, J., et al. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. *Fish & shellfish immunology*, 2004, 16.1: 25-39.

SIWICKI, Andrzej K.; ANDERSON, Douglas P.; RUMSEY, Gary L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 1994, 41.1: 125-139.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 220/2016/FVHE.

Antibiotická rezistence ichtyo-patogenních kmenů aeromonád v kaprovém rybníkářství

Eva Jelínková¹, Ludmila Kohoutová², Monika Dolejská², Martina Benešová², Alois Čížek²,

Kristýna Jánová¹, Miroslava Palíková¹

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Zástupci rodu *Aeromonas* spp. mohou u ryb vyvolávat septikémie, hemoragické a ulcerativní choroby, často doprovázené mortalitou a ekonomickými ztrátami v chovech ryb (1). K léčbě se využívají antibiotika, na která si však bakterie postupně vytvářejí rezistenci (2; 3; 4). Cílem tohoto projektu bylo izolovat z nemocných ryb v kaprovém rybníkářství aeromonády a u získaných izolátů stanovit fenotyp a genotyp antibiotické rezistence. Dalším cílem bylo u těchto izolátů zjistit zastoupení genů virulence.

Materiál a metodika

Odběr vzorků a mikrobiologické vyšetření

V období od března do září 2016 jsme celkem vyšetřili 154 ryb (133 jedinců druhu *Cyprinus carpio*, 13 jedinců druhu *Carassius auratus*, 8 jedinců druhu *Silurus glanis*) ze dvou hospodářství a jednoho soukromého rybníka. Po humánním usmrcení bylo provedeno patologicko-anatomické vyšetření, během kterého byl vždy získán stěr z kůže, případně z kožních lézí a tkáň sleziny dle metodiky pro odběr vzorků pro bakteriologické vyšetření (5). Metodika mikrobiologického vyšetření vzorků probíhala podle standardizovaných protokolů zavedených na pracovišti a uvedených v předchozích studiích (2; 3).

Získané izoláty byly subkultivovány a identifikovány hmotnostní spektrometrií na zařízení MALDI-TOF Biotyper (BrukerDaltonic, Německo). Identifikované čisté kultury byly uchovány v kryoprotektivním médiu při -70°C a postupně byly charakterizovány i jejich fenotypové a genotypové vlastnosti.

Testování rezistence k antimikrobiálním látkám

Diskovou difúzní metodou byla stanovena citlivost vůči 6 vybraným antimikrobiálním látkám schváleným pro potravinové ryby v ČR nebo EU (oxytetracyklin, florfenikol,

sulfametoxazol/trimetoprim, flumequin, enrofloxacin a kyselina oxolinová). Dále byla u všech kmenů zjištěna MIC k ciprofloxacinu metodou zředování v bujonu (Mikrolatest MIC Ciprofloxacin, Erba Lachema, ČR) (6).

Detekce genů rezistence k antimikrobiálním látkám a detekce genů virulence

Teplotní lyzí byla izolována DNA rezistentních kmenů, která sloužila jako templát pro identifikaci genů rezistence a virulence metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Metodou PCR byl u rezistentních izolátů proveden průkaz genů kódujících rezistenci vůči tetracyklinům (*tetA* až *G*), k sulfonamidům (*sulI* až *3*) a trimetoprimu (*dhfrA17*, *dhfrA1*, *dhfrA12*), k chinolonům vázanou na plazminech (*qnrA* až *D*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB*, *aac(6′)-Ib-cr*) a k amfenikolům (*catA1*, *cmlA* a *floR*). Dále byla PCR provedena detekce genů kódujících integrázy (*intI1* a *intI2*). K vizualizaci produktů PCR byla použita gelová elektroforéza.

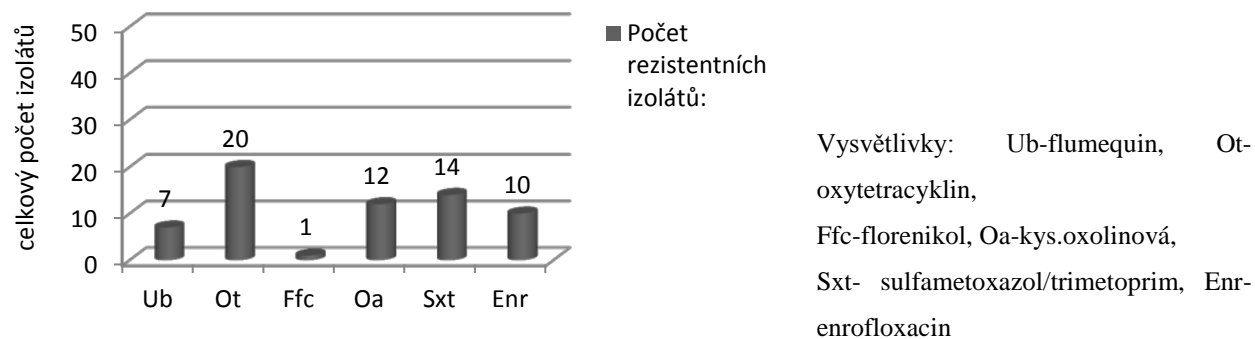
Izoláty se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu ($MIC_{cip} \geq 0,05$ mg/l) byly testovány na přítomnost PMQR genů s následnou sekvenací.

Všechny izoláty aeromonád byly podrobeny vyšetření na přítomnost 7 vybraných genů virulence (*ahh1*, *asa1*, *act*, *ast*, *ascV*, *eno*, *aexT*) metodou PCR.

Výsledky

U 17 % ze 154 ryb byly při patologicko-anatomickém vyšetření nalezeny kožní léze ve formě povrchových nekrotů až po vředy zasahující do svaloviny. Některé léze byly ve stádiu hojení, což ukazuje na již prodělané infekční onemocnění. U zhruba 8 % vyšetřovaných ryb byla zaznamenána atrofie zadní části plynového měchýře a u necelých 5 % meziorgánové srůsty. Ryby byly, až na výjimky, v dobrém výživném stavu. Výsledky kultivačního vyšetření a charakterizace získaných izolátů jsou dokumentovány v Tabulce 1. Kultivačním vyšetřením 154 ryb bylo celkem získáno 50 bakteriálních izolátů. Všechny bakteriální izoláty byly získány ze sleziny. 104 ryb bylo kultivačně negativních.

Diskovou difúzní metodou byla fenotypová rezistence izolátů (n=50) prokázána nejčastěji k oxytetracyklinu – u 20 izolátů (40 %), naopak rezistence k florfenikolu jen u 1 izolátu (2 %). K sulfametoxazolu/trimetoprimu byla prokázána rezistence u 14 izolátů (28 %), ke kyselině oxolinové u 12 izolátů (24 %), k enrofloxacinu u 10 izolátů (20 %) a k flumequinu u 7 izolátů (14 %).



Graf 1. Početní zastoupení izolátů rezistentních k antimikrobiálním látkám v testovaném souboru ryb z kaprového rybníkářství

Tabulka 1. Souhrn charakteristik 50 izolátů ryb z kaprového rybníkářství

* *Shewanella baltica*, *Plesiomonas shigelloides*, *Stenotrophomonas rhizophila*
 △ "-"...negativní výsledek

Číslo izolátu	Bakteriální druh	Druh ryby	Fenotyp rezistence	Genotyp rezistence	Geny virulence
1	<i>A. bestiarum</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	- △	-	<i>act, ahh1, eno</i>
2	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, eno</i>
3	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, eno</i>
4	<i>Shew. baltica</i> *	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	-
5	<i>Shew. baltica</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	-
6	<i>A. veronii</i>	<i>Carassius auratus</i>	Sxt	-	<i>asa, act, eno</i>
7	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetE</i>	<i>asa, act, eno</i>
8	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetA</i>	<i>asa, act, eno</i>
9	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Sxt	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
10	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>act, ascV, aexT, eno</i>
11	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Oa, Ot, Sxt	<i>tetE</i>	<i>asa, act, ascV, eno</i>
12	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot, Sxt	<i>tetE</i>	<i>asa, act, eno</i>
13	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>Carassius auratus</i>	Sxt	-	<i>asa, act</i>
14	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>Carassius auratus</i>	Sxt	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
15	<i>A. veronii</i>	<i>Carassius auratus</i>	Oa, Ot	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
16	<i>A. ichthiosmia</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr, Oa, Ot, Sxt	<i>tetE</i>	<i>asa, act, eno</i>
17	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
18	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Oa, Ot, Ub	<i>tetE</i>	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
19	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	-	-	<i>asa, act, aexT, eno</i>
20	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Enr, Oa, Ot, Ub	<i>tetE</i>	<i>asa, act, aexT, eno</i>
21	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Enr	-	<i>asa, act, eno</i>
22	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
23	<i>A. hydrophila</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Sxt	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
24	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr, Oa, Sxt	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
25	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
26	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot, Sxt	<i>tetE</i>	<i>asa, act, eno</i>
27	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
28	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
29	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>

30	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Sxt	-	<i>asa, act, eno</i>
31	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ffc, Oa	-	<i>eno</i>
32	<i>P. shigelloides*</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
33	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr, Sxt	-	<i>asa, act, eno</i>
34	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr, Sxt	-	<i>asa, act, aexT, eno</i>
35	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetE</i>	<i>eno</i>
36	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>eno</i>
37	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetE</i>	<i>asa, act, aexT, eno</i>
38	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetA</i>	<i>asa, act, aexT, eno</i>
39	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetE</i>	<i>asa, act, eno</i>
40	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>tetE</i>	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
41	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
42	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, eno</i>
43	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>act, aexT, eno</i>
44	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Enr, Oa, Ot, Ub	<i>tetA</i>	<i>asa, act, eno</i>
45	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	Ot	<i>qnrS, tetE</i>	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
46	<i>A. veronii</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	-	-	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
47	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Enr, Oa, Ot, Sxt, Ub	<i>qnrS, sul2, int11, dhfrA1. tetA</i>	<i>eno</i>
48	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Enr, Oa, Ot, Ub	<i>qnrS, tetA</i>	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
49	<i>A. veronii</i>	<i>Silurus glanis</i>	Oa, Ot, Ub	<i>tetE</i>	<i>asa, act, ascV, aexT, eno</i>
50	<i>S. rhizophila*</i>	<i>Silurus glanis</i>	Oa, Ot, Ub	-	-

Metodou PCR bylo zjištěno, že 18 izolátů (n=50) neslo alespoň jeden gen rezistence. Celkem 18 izolátů (36 %) neslo gen rezistence vůči tetracyklinům (*tetE* u 13 izolátů, *tetA* u 5 izolátů), 3 izoláty (6 %) nesly gen rezistence vůči chinolonům (*qnrS*), 1 izolát nesl geny rezistence k sulfonamidům, včetně potencovaných (*sul2* a *dhfrA1*). Gen *int11* byl detekován u jednoho izolátu, gen *int12* nebyl nalezen. Deset izolátů mělo MIC_{cip} ≥ 0,05 mg/l. Zjištěné hodnoty se u těchto izolátů pohybovaly v rozmezí 0,06 – >4 mg/l.

U jednotlivých izolátů aeromonád se vždy vyskytoval jeden až pět genů virulence. Gen *ast* nebyl detekován u žádného izolátu. Přítomnost vyššího počtu genů virulence lze hodnotit jako potenciální vyšší virulenci daných izolátů.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že k oxytetracyklinu, který je registrován jako jediné antibiotikum k léčbě bakterióz kaprovitých ryb, byla zjištěna poměrně vysoká rezistence, naopak florfenikol užívaný v pstruhovém rybníkářství by mohl být k tomuto antibiotiku adekvátní alternativou.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 219/2016/FVHE.

Seznam literatury:

1. JANDA, J. M. and ABBOTT, S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2010, vol. 23, no. 1, p. 44-45.
2. ČÍŽEK, A. et al. Antimicrobial resistance and its genetic determinants in aeromonads isolated in ornamental (koi) carp (*Cyprinus carpio koi*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Veterinary Microbiology*, 2010, vol. 142, p. 437-438.
3. DOBIASOVA, H. et al. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology*, 2014, vol. 171, p. 413-421.
4. SINGH, A. K. et al. Bacterial resistance to oxytetracycline in different life stages of Indian freshwater carp aquaculture system. *International Journal of Microbiology Research*, 2009, vol. 1, p. 25-34.
5. PIAČKOVÁ, V. a kol. *Odběr vzorků pro bakteriologické a virologické vyšetření ryb*. České Budějovice: FROV JCU, 2014, 26 s.
6. CLSI, 2006. *Methods for antimicrobial disk susceptibility testing of bacteria isolated from aquatic animals; approved guideline*. *CLSI document M42-A*, vol. 26, no. 23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 43 s.

Molekulární taxonomie všenek (Phthiraptera) ptáků Latinské Ameriky

Stanislav Kolenčík, Ivan Literák

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

Úvod

Znalosti o celkové biodiverzitě ektoparazitů volně žijících ptáků v Neotropické oblasti jsou i přes neustále se zvyšující množství výzkumů věnujících se této oblasti stále jen velmi kuse. Systematika všenek prochází v poslední době velkými změnami. Z tradice jsou do této skupiny řazeny dva podřády luptouši (*Amblycera*) a péřovky (*Ischnocera*), které se sice zásadně liší způsobem života, avšak problémy týkající se jejich taxonomie jsou často společné. Systematika obou skupin je dosud založena převážně na morfologii, na rozdíl od jiných skupin organismů je zde např. použití metod molekulární biologie teprve v začátcích. V probíhajícím výzkumu všenek rodu *Myrsidea* můžeme u mnohých druhů pozorovat výraznou fenotypovou plasticitu, jako je to například u druhu *Myrsidea serini* (Séguy, 1944), u kterého můžeme pozorovat různé odchylky v morfometrických charakteristikách na nálezech v minulých (Klockenhoff, 1984; Price & Dagleish, 2007; Cicchino & Valim, 2015) i probíhajících studiích. To je důvodem, proč je potřeba mít určení druhů na základě morfometrických znaků podložené také molekulárně genetickými daty (genotypizace).

Materiál a metodika

Celkem jsme zpracovali 99 vzorků všenek získaných při terénních sběrech v Latinské Americe. DNA byla izolována s využitím kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Původně měly být sledovány čtyři markery genetické diverzity – úsek mitochondriálního genu CO1, jaderných genů jaderných genů EF-1 α , *hyp* a TMEDE6. Protože se nám u rodu *Myrsidea* nezdařilo pomocí polymerázové řetězové reakce amplifikovat geny *hyp*, TMEDE6 a VATP21, byly dodatečně testovány také gen *wingless* (Wg), část genu pro 18S rDNA a delší úsek mitochondriálního genu CO1. Geny byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a vybrané pozitivní produkty byly následně sekvenovány. Získané sekvence byly upraveny použitím programu Geneious 9.1.6 (Kearse et al., 2012) a porovnány s databází GenBank použitím

„BLAST“ algoritmu (Altschul et al., 1990). Následně z nich bude vyvozeno fylogenetické postavení zkoumaných taxonů. Vybrané sekvence byly vloženy do GenBank.

Výsledky

Tab. č. 1. Výsledky PCR.

Marker	Vyšetřeno	Pozitivní	Negativní	Úspěšnost PCR v %
CO1	99	71	28	71,7
EF-1 α	99	49	50	49,5
wingless	99	59	40	59,6
delší úsek CO1	99	64	35	64,6
18S rDNA*	47	47	0	100

*marker byl testován jen na části vzorků

Dva ze čtyř původně sledovaných markerů genetické diverzity - jaderné geny *hyp* a *TMEDE6* vykazovaly negativní výsledky. Následně byl testován marker *VATP21*, který se také jako předchozí dva u luptoušů rodu *Myrsidea* nepodařil reakcí PCR dokázat. Zmíněné geny byly navrženy k použití, protože byly v minulosti dokázány při všenkách z podřádu péřovky (*Ischnocera*). Dále tedy byly zkoušeny markery *wingless*, část genu pro 18S rDNA a jiný (delší) úsek genu CO1. 100% úspěšnost byla zaznamenána u části genu 18S rDNA, který byl testován jen na části vzorků. Protože variabilita byla velmi nízká a některé vzorky vykazovaly známky kontaminace, rozhodli jsme se s dalšími vzorky nepokračovat. Nejlepší výsledky v rámci všech vzorků byly zaznamenány na úseku mitochondriálního genu CO1 (71,7 %), následně podjednotka na delším úseku genu CO1 (64,6 %). Více než 50% úspěšnost byla zaznamenána také u genu *wingless* a nejslabší výsledky vykazoval elongační faktor (EF-1 α) se 49,5 % (Tab. č. 1). Nižší úspěšnost mohla být způsobena stářím vzorků (některé vzorky byly z roku 2006), případně také nesprávným uskladněním (vyšší teplota, světlé prostředí), případně nevhodností markerů pro danou skupinu živočichů.

Pozitivní PCR produkty byly sekvenovány a sekvence přidány do GenBank databáze (přístupová čísla KY113129-KY113137) a budou použity pro mezi- a vnitrodruhové porovnání a tedy zpracování fylogenetických analýz všenek rodu *Myrsidea*. Získaná molekulární data jsou také

významným doplněním morfometrických studií. Příkladem je popis nového druhu *Myrsidea* sp., který je morfometricky velmi podobný druhu *Myrsidea laciniesternata*. Avšak nám se podařilo dokázat molekulární rozdíl na úseku genu CO1 17,9 %, který je podle našeho názoru dostačující pro vymezení nového druhu.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 215/2016/FVHE.

Seznam literatury:

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- Cicchino, A.C. & Valim, M.P. (2015) Notes on taxonomy and distribution of *Myrsidea serini* (Séguy, 1944) (Phthiraptera: Amblycera: Menoponidae) on southern South American passerine birds (Aves: Passeriformes). *Papéis Avulsos de Zoologia*, 55, 231–243.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. & Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28, 1647-1649.
- Klockenhoff, H.F. (1984) Redescription of *Myrsidea serini* (Mallophaga: Menoponidae), a parasite from passerine birds. *New Zealand Journal of Zoology*, 11, 17–22.
- Price, R.D. & Dalgleish, R.C. (2007) *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from the Emberizidae (Passeriformes), with descriptions of 13 new species. *Zootaxa*, 1467, 1–18.

***In vitro* buněčný model pro hodnocení účinku léčiv na vybrané druhy zvěře**
Veronika Kováčová, Ehdaa Abdelsalam, Petr Linhart, Vladimír Piaček, Jiří Pikula
Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Důvodem imobilizace volně žijících zvířat je uskutečnění různých zákroků – odchyt, klinické vyšetření, sběr vzorků, léčba či transport zvířat. Je zřejmé, že zvolený postup imobilizace by měl být stanoven tak, aby zajistil dostatečnou délku, stupeň a zároveň šetrnost ke zdraví daného zvířete, neboť použití anestetik u volně žijících zvířat je většinou extra-label (AMDUCA, 1994). Způsob podání, koncentrace a objem látky, trvání a kvalita anestézie, potenciální vedlejší účinky a dostupnost antagonistů, jsou důležité aspekty při výběru vhodné kombinace léčiv (Machin, 2007; Turner et al., 2011). Roli při vlivu anestézie hraje také tělesná hmotnost a zdravotní stav zvířat v okamžiku jejich odchyty, jelikož u volně žijících zvířat nejsou většinou k dispozici žádné výsledky z klinického vyšetření, krevní biochemie a hematologie. Dnes jsou pro imobilizaci využívány různé chemické látky na bázi opioidů, cyklohexaminů či α 2-adrenoreceptorových agonistů, jako etorfin hydrochlorid, xylazin hydrochlorid, kombinace ketamin hydrochloridu a xylazin hydrochloridu. Vlastnosti těchto látek jsou zkoumány a porovnávány mezi sebou, neboť byly popsány jejich rozdílné účinky, popřípadě jejich potencionální účinky nejsou zaznamenané (Rodrigues et al., 2006; Saha et al., 2007; Wolfe et al., 2014). Pro porozumění účinku různých anestetik využívaných při imobilizaci volně žijících zvířat jsou vhodné *in vitro* buněčné modely, jelikož jsou považovány za cutting-edge nástroj v biomedicínském výzkumu (He et al., 2014).

Materiál a metodika

V *in vitro* modelu byly zkoumány cytotoxické účinky ketaminu, xylazinu a ketamin-xylazinu (Hellabrunnská směs) na buňkách z tkáně jater, srdce a ledvin připravených z daňka evropského (*Dama dama*). Vzorky pro izolaci buněk byly získány na základě výkonu práva myslivosti. Kvantifikace cytotoxicity byla založena na laktát dehydrogenáze, uvolněné z cytosolu poškozených buněk a to pomocí Cytotoxicity Detekce Kitu (Roche, Basel, Switzerland). Cytotoxicita byla odhadnuta s použitím ELISA reader ELx808 (BioTek, 166 VT, USA).

Izolace buněk

Vybrané buněčné kultury byly připraveny následovně: Po usmrcení samce daňka evropského byly orgány vyjmuty a vloženy do nachlazeného fyziologického roztoku doplněného penicilinem (100 IU/ml) a streptomycinem (100 µg/ml). Tkáně byly mechanicky rozvolněny skalpelem na malé kousky a vloženy do média Dulbeco Eagle (DMEM) (Biosera, Boussens, France) obsahující 1 mg/ml kolagenázy (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 1 mg/ml trypsinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Následně byly tkáně inkubovány při teplotě 37 °C v třepacím termobloku po dobu 45 min, po inkubaci byly buňky odděleny nylonovým filtrem 100 µm. Rozptýlené buňky byly dvakrát promyty médiem doplněné 10 % (v/v) fetálním hovězím sérem (FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) k zastavení enzymatického trávení. Adherentní buňky byly kultivovány po dobu 8 dní.

Léčiva a jiné materiály

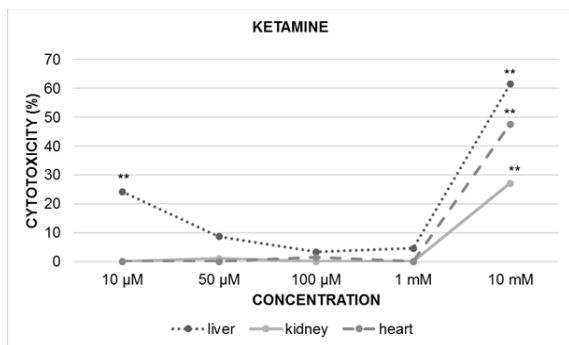
Anestetika, která byla použita k testování cytotoxicity: ketamin hydrochlorid (Narketan inj a.u.v., 100 mg/ml, Vétoquinol s.r.o., Nymburk, Česká Republika), xylazin (Xylased 500 mg lyophilized, Bioveta, Ivanovice na Hane, Česká Republika), Hellabrunnská směs, byla připravena rozpuštěním lyofilizovaného prášku xylazinu 10% s roztokem ketaminu, jehož výsledkem je 100 mg ketaminu k 125 mg xylazinu, na 1 ml směsi.

Expozice buněk léčivami

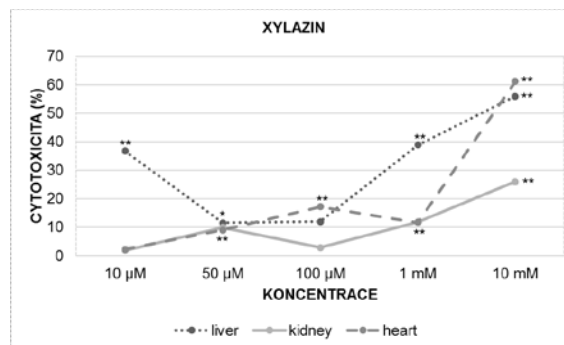
V souladu s předběžnými studiemi byli buňky vystaveny ketaminu (10 µM, 50 µM, 100 µM, 1 mM and 10 mM) (Bosnjak et al. 2012), roztoků xylazinu (10 µM, 50 µM, 155 100 µM, 1 mM and 10 mM) a směsi ketamin-xylazinu (0.025+0.02 mg/ml, 0.05+0.04 mg/ml, 0.75+0.06 mg/ml, 157 0.1+0.08 mg/ml and 0.125+0.1 mg/ml). Buňky byly inkubovány s testovanými substancemi při 37°C a 5 % CO₂ po dobu 2 hodin. Médium pro experimenty DMEM s L-glutaminem bez pyruvátu.

Výsledky

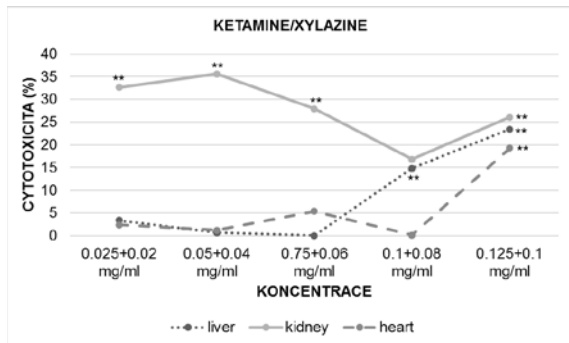
Srovnání účinků léčiv a reakcí specifických buněk odvozených z daňka evropského jsou uvedeny na obrázcích 1-3 a 4-6. Výsledky ukazují, že na buněčné úrovni se anestetika významně liší v jejich cytotoxických účincích.



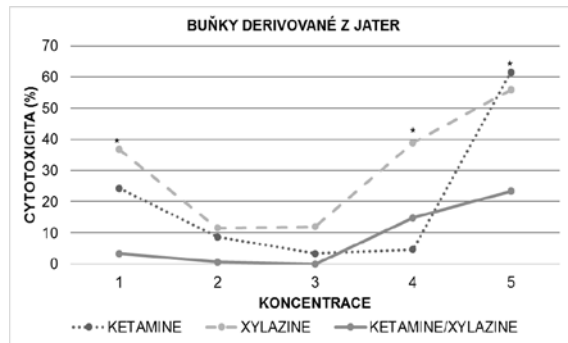
Obrázek 1. Cytotoxicita ketaminu pro buňky derivované z jater, ze srdce a ledvin z daňka evropského. Buňky byly exponovány ketaminem o koncentraci od 10 µM do 10 mM, ** = p<0.01, když porovnááme s kontrolní skupinou (data nejsou zobrazena).



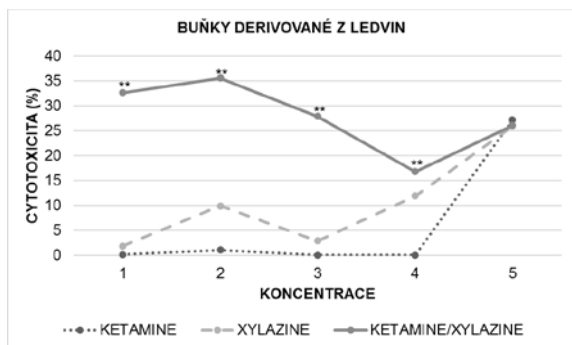
Obrázek 2. Cytotoxicita xylazinu pro buňky derivované z jater, ze srdce a ledvin z daňka evropského. Buňky byly exponovány xylazinem o koncentraci od 10 µM do 10 mM, * = p<0.05; ** = p<0.01, když porovnááme s kontrolní skupinou (data nejsou zobrazena).



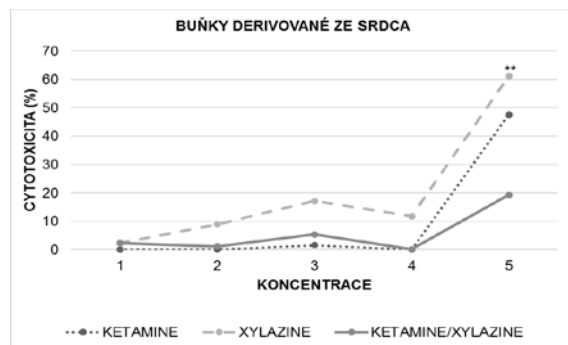
Obrázek 3. Cytotoxicita Hellabrunnské směsi (100 mg ketaminu plus 125 mg xylazinu na 1 ml DMEM média) pro buňky derivované z jater, ze srdce a ledvin z daňka evropského. Buňky byly exponovány rostoucí koncentrační řadou ketaminu-xylazinu v pevném poměru. ** = p<0.01, když porovnááme s kontrolní skupinou (data nejsou zobrazena).



Obrázek 4. Cytotoxicita ketaminu, xylazinu a Hellabrunnské směsi pro buňky derivované z jater z daňka evropského. Buňky byly exponovány anestetiky o koncentraci od 10 µM do 10 mM. Účinky anestetiky byly porovnány v rámci každé koncentrace. Významnost (*= p<0.05) dokumentuje rozdíl mezi anestetiky s nejvyšší a nejnižší cytotoxicitou. Skupiny jsou označeny 1, 2, 3, 4, 5, což znamená 10 µM nebo 0,025 + 0,02 mg/ml, 50 µM nebo 0,05 + 0,04 mg/ml, 100 µM nebo 0,75 + 0,06 mg/ml, 1 mM nebo 0,1 + 0,08 mg/ml, 10 mM nebo 0,125 + 0,1 mg/ml ketaminu a xylazinu nebo Hellabrunnské směsi, v daném pořadí.



Obrázek 5. Cytotoxicita ketaminu, xylazinu a Hellabrunnské směsi pro buňky derivované z ledvin z daňka evropského. Buňky byly exponovány anestetiky o koncentraci od 10 μ M do 10 mM. Účinky anestetik byly porovnány v rámci každé koncentrace. Významnost (*= $p < 0.05$) dokumentuje rozdíl mezi anestetiky s nejvyšší a nejnižší cytotoxicitou. Skupiny jsou označeny 1, 2, 3, 4, 5, což znamená 10 μ M nebo 0,025 + 0,02 mg/ml, 50 μ M nebo 0,05 + 0,04 mg/ml, 100 μ M nebo 0,75 + 0,06 mg/ml, 1 mM nebo 0,1 + 0,08 mg/ml, 10 mM nebo 0,125 + 0,1 mg/ml ketaminu a xylazinu nebo Hellabrunnské směsi, v daném pořadí.



Obrázek 6. Cytotoxicita ketaminu, xylazinu a Hellabrunnské směsi pro buňky derivované ze srdce z daňka evropského. Buňky byly exponovány anestetiky o koncentraci od 10 μ M do 10 mM. Účinky anestetik byly porovnány v rámci každé koncentrace. Významnost (*= $p < 0.05$) dokumentuje rozdíl mezi anestetiky s nejvyšší a nejnižší cytotoxicitou. Skupiny jsou označeny 1, 2, 3, 4, 5, což znamená 10 μ M nebo 0,025 + 0,02 mg/ml, 50 μ M nebo 0,05 + 0,04 mg/ml, 100 μ M nebo 0,75 + 0,06 mg/ml, 1 mM nebo 0,1 + 0,08 mg/ml, 10 mM nebo 0,125 + 0,1 mg/ml ketaminu a xylazinu nebo Hellabrunnské směsi, v daném pořadí.

Seznam literatury

- Animal Medicinal Drug Use Clarification Act (AMDUCA) (1994). Available at: <https://www.avma.org/KB/Resources/Reference/Pages/AMDUCA.aspx>. Accessed Nov 2, 2016.
- He X, Korytář T, Zhu Y, Pikula J, Bandouchova H, Zúkal J, et al (2014). Establishment of Myotis myotis cell lines - model for investigation of host-pathogen interaction in a natural host for emerging viruses. Plos One. **9**(10): e109795.
- Machin KI (2007). Wildlife analgesia. In: West G, Heard D, Caulkett N, editors. Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p. 43–60.
- Rodrigues SF, de Oliveira MA, Martins JO, Sannomiya P, de Cássia Tostes R, Nigro D, et al (2006). Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the s.c. route. Life Sci. **79**(17): 1630–1637.
- Saha DC, Saha AC, Malik G, Astiz ME, Rackow EC (2007). Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats. J Am Assoc Lab Anim Sci. **46**(2): 74–80.
- Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011). Administration of Substances to Laboratory Animals: Routes of Administration and Factors to Consider. J Am Assoc Lab Anim Sci. **50**(5): 600–613.
- Wolfe LL, Lance WR, Smith DK, Miller MW (2014). Novel combinations of nalbuphine and medetomidine for wildlife immobilization. J Wildl Dis. **50**(4): 951–956.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 226/2016/ FVHE.

Zdravotní problematika starších koček s ohledem na jejich potřeby

¹Simona Kovaříková, ²Marek Blaško

¹Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a etologie, ²student Fakulty veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Stárnutí je spojeno s fyziologickými změnami. Snižuje se celková tělesná kondice a kvalita smyslů, současně se mění chování i potřeby starších koček. Zvyšuje se také výskyt některých onemocnění, která se však nemusí klinicky projevit. Plně manifestovat se mohou až za několik let, kdy je řešení (nebo vyřešení) již obtížné nebo nemožné. I subklinické problémy navíc negativně ovlivňují welfare koček (1). Cílem projektu bylo zmapování zdravotního stavu starších koček v útulcích a následné vydání doporučení pro udržení welfare takových koček na základě výsledků vyšetření.

Materiál a metodika

Do studie byly zařazeny kočky soukromých majitelů, od každého majitele byl vyžadován souhlas s odběrem krve pro účely výzkumu a s využitím získaných výsledků pro vědecké a publikační účely. Projekt pokusu byl schválen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy pod číslem jednacím MSMT-14648/2016-6.

Do studie byly zařazeny kočky starší sedmi let bez klinicky zjevných zdravotních problémů a bez medikace. U těchto koček byla získána podrobná anamnéza, provedeno celkové klinické vyšetření. U všech byl zaznamenán výživný stav (BCS, *body condition score*) a množství svalové hmoty (MCS, *muscle condition score*). Od každé kočky byl odebrán vzorek krve (z *v. jugularis*, *v. cephalica antebrachii* nebo *v. saphena*). U každého vzorku krve byl proveden rychlý test pro diagnostiku infekčních chorob (FeLV, virus felinní leukémie; FIV, virus imunodeficience koček; Anigen Rapid FIV Ab/FeLV Ag, Biopro), hematologické a biochemické vyšetření (Klinická laboratoř pro malá zvířata, VFU Brno a IDEXX Laboratories).

Získané výsledky byly extrapolovány na kočky držené v útulcích pro zvířata.

Výsledky

Skupinu vyšetřovaných zvířat tvořilo celkem 56 koček starších sedmi let (věkový průměr 9,5 roku, směrodatná odchylka 2,2 roku, rozpětí 7-16 let). Jednalo se o 26 kocourů, z toho 25 kastrováných (Mk) a 30 koček, z toho 29 kastrováných (Fk). Nejpočetněji byly ve skupině zastoupeny kočky domácí krátkosrsté (*domestic shorthair*, DSH) - (47x), dále byly vyšetřeny 4 kočky britské, dvě domácí dlouhosrsté a po jednom zástupci plemen devon rex, sfynx a norská lesní.

U 29 koček (51,8 %) jsme vyhodnotili výživný stav jako dobrý (BCS 4-5/9), u 24 koček (42,9 %) jsme zjistili nadváhu nebo obezitu (BCS \geq 6/9), tři kočky měly výživný stav zhoršený (BCS \leq 3/9).

Množství svalové hmoty bylo u většiny koček v normě (43 koček, 76,8 %), mírná ztráta svalové hmoty byla pozorována u 7 koček (12,5 %), střední ztráta u 4 koček (7,1 %) a těžká ztráta u 2 koček (3,6 %).

Nejčastějším nálezem klinického vyšetření byla přítomnost zubního kamene a gingivitidy (24 koček, 42,9 %). U tří koček byl palpován útvar na krku, susp. zvětšená štítná žláza, u dvou koček byl identifikován útvar v podkoží (na pravé straně krku a na spodině břišní). U dvou koček byl auskultačně zjištěn systolický šelest.

U dvou koček byla pomocí rychlého testu zjištěna přítomnost FeLV, u jedné FIV. Výsledky hematologického a biochemického vyšetření jsou uvedeny v tabulce.

Diskuze

Z výsledků této práce je zřejmé, že by zdravotnímu stavu starších koček měla být věnována zvýšená pozornost. Všechny kočky byly majiteli považovány za zdravé, přesto byla u většiny z nich zjištěna nějaká abnormalita. Je zjevné, že majitelé velmi málo věnují pozornost výživnému stavu koček a obezitu nebo horší výživný stav nepovažují za problém. Přitom obezita je významným predispozičním faktorem pro vznik *diabetes mellitus* u koček, horší výživný stav je spojen s kratší dobou přežití (2,3). Problémem je i onemocnění dutiny ústní (zubní kámen, gingivitis): žádný z majitelů nepopisoval bolestivost dutiny ústní i přes přítomnost závažného problému v ní. Kočky jako predátoři mají tendence své problémy skrývat, takže v okamžiku, kdy se objeví klinické příznaky postižení zubů a dásní, se již jedná o velmi pokročilý proces. I bez klinických příznaků jde ale o bolestivý problém.

Nejčastější hematologickou abnormalitou bylo zvýšení hematokritu. Kočky nejevily při klinickém vyšetření známky dehydratace a ani podle ostatních parametrů krve nebyla přítomná hemokoncentrace. Je tedy pravděpodobné, že se jedná o normální stav a měl by vést k rozšíření referenčního rozmezí nebo vytvoření referenčního rozmezí pro staré kočky. Druhým nejčastějším nálezem byla trombocytopenie. V našem případě se pravděpodobně jednalo o pseudotrombocytopenii, která je u koček velmi častá a je charakterizovaná shlukováním trombocytů (4).

V biochemickém vyšetření byla nejčastěji nacházena zvýšená aktivita ALT, jednalo se však o zvýšení velmi mírné. Z klinického hlediska nejvýznamnějším biochemickým nálezem byla zvýšená koncentrace tyroxinu u 4 koček znamenající hypertyreózu. Podíl těchto koček ve skupině sledovaných zvířat se blíží údajům ze zahraničí, nicméně ty zahrnují případy subklinické i pacienty s klinickými příznaky (5,6). Je tedy možné, že prevalence hypertyreózy je u nás mnohem vyšší a jako podceňovaný problém není řádně diagnostikovaná.

Překvapivým výsledkem je velmi malý počet koček s abnormalitami parametrů ledvin (kreatinin, močovina). U žádné ze sledovaných koček nebyla zjištěna zvýšená koncentrace SDMA, pouze u dvou dosáhla horní hranice referenčního rozmezí. Tento parametr se však jeví jako velmi vhodný pro použití u kachektických zvířat.

Závěr

Výsledky studie ukazují, že zdravotní stav starších koček by měl být pečlivě sledován. V naší práci byly vyšetřeny kočky soukromých chovatelů. Tito chápou svou kočku jako člena rodiny a přesto si v mnoha případech nevšimli abnormalit zdravotního stavu nebo je nepovažovali za významný problém. Podobná situace je pravděpodobná i u starších koček umístěných v útulcích. Starší kočky obvykle nebývají novými majiteli adoptovány příliš často, takže tráví v útulcích dlouhou dobu. Pravidelnými prohlídkami můžeme včas určit i drobné odchylky zdravotního stavu a včas je začít řešit.

Seznam literatury

1. PITTARI, J., RODAN, I., BEEKMAN, G., et al. Senior care guidelines. American Association of Feline Practitioners. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2009, **11**, 763-778.
2. SCARLETT, J.M., DONOGHUE, S., SAIDLA, J., WILLS, J. Overweight cats: prevalence and risk factors. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 1994, **18**, S22-28.
3. PEREZ-CAMARGO, G. Cat nutrition: what's new in the old? *Compendium of Continuing Education Small Animal Practice*. 2004, **26** (Suppl A), 5-10.
4. RIOND, B., WASSMUTH, A.K., HARTNACK, S., HOFMANN-LEHMANN, R., LUTZ, H. Effective prevention of pseudothrombocytopenia in feline blood samples with the prostaglandin I₂ analogue Iloprost. *BMC Veterinary Research*. 2015, **11**, 183.
5. DEWET, C.S., MOONEY, C.T., THOMPSON, P.N., SCHOEMAN, J.P. Prevalence and risk factors for feline hyperthyroidism in Hong Kong. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2009, **11**, 315-321.
6. WAKELING, J., MELIAN, C., FONT, A., et al. Evidence for differing incidences of feline hyperthyroidism in London UK and Spain. In: *Congress Proceedings 15th ECVIM-CA*, Glasgow, Scotland, 2005, Poster 43, p 220.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 228/2016/FVHE.

Poznámka: Oproti původnímu záměru provést studii přímo v útulcích pro zvířata byl záměr změněn na provedení studie u koček soukromých majitelů. Důvodem změny studie byla skutečnost, že odběr krve pro výzkumné účely je považován za pokus na zvířeti, a legislativní podmínky neumožňují uskutečňovat pokusy na toulavých a opuštěných zvířatech. Tato změna neovlivnila zaměření a dosažené výsledky studie, naopak poznatky o zdravotní problematice starších koček u chovatelů rozšířily dopad studie, získané poznatky mají význam jak pro problematiku chovu koček u chovatelů, tak po jejich extrapolaci na útulky i pro problematiku držení koček v útulcích pro zvířata.

Tabulka: Výsledky hematologického a biochemického vyšetření krve

Parametr	Jednotky	Ref. rozmezí	Průměr + směrodatná odchylka	Minimální hodnota	Maximální hodnota	Počet koček s hodnotou nad ref. rozmezím	Počet koček s hodnotou pod ref. rozmezím
Leukocyty	10 ⁹ /l	6,8-16,5	10,7 ± 6,3	3,49	39,9	6 (10,7 %)	15 (26,8 %)
Erytrocyty	10 ¹² /l	4,9-9,8	9,6 ± 1,5	4,52	12,34	26 (46,4 %)	1 (1,8 %)
Hemoglobin	g/l	79-148	136,5 ± 20,5	74	174	20 (35,7 %)	2 (3,6 %)
Hematokrit	l/l	0,20-0,38	0,4 ± 0,1	0,218	0,561	43 (76,8 %)	0
Trombocyty	10 ⁹ /l	178-357	231 ± 140	38	572	0	41 (73,2 %)
Celk. bílkovina	g/l	57-95	76,3 ± 6,6	62,4	96	1 (1,8 %)	0
Albumin	g/l	23-35	27,1 ± 4,0	16,6	35	0	8 (14,3 %)
Glukóza	mmol/l	3,1-6,9	6,2 ± 2,1	3,2	16,1	13 (23,2 %)	0
Kreatinin	μmol/l	> 168	121,8 ± 27,7	172	74	2 (3,6 %)	-
Urea	mmol/l	5,7-13,5	9,5 ± 2,4	5,2	19,9	4 (7,1 %)	1 (1,8 %)
SDMA	μg/dl	> 14	9,9 ± 2,0	5	14	0	-
Bilirubin	μmol/l	0-7,0	3,1 ± 1,8	0,9	5,9	0	-
Na	mmol/l	150-160	156 ± 2,6	150	161,2	2 (3,6 %)	0
K	mmol/l	3,5-5,0	4,4 ± 0,4	3,4	5,3	5 (8,9 %)	1 (1,8 %)
Ca	mmol/l	2,30-3,0	2,6 ± 0,2	2,28	3,32	3 (5,4 %)	1 (1,8 %)
P	mmol/l	0,9-2,0	1,5 ± 0,3	0,9	2,16	3 (5,4 %)	0
ALT	μkat/l	0,1-1,0	1,2 ± 0,8	0,33	4,57	24 (42,3 %)	0
AST	μkat/l	0,1-1,0	0,3 ± 0,2	0,05	0,92	0	1 (1,8 %)
ALP	μkat/l	0,1-4,0	0,5 ± 0,3	0,2	1,49	0	0
Celkový tyroxin	nmol/l	12,9-51,5	29,6 ± 24,5	12,9	138	4 (7,1 %)	0

Endoparazitární infekce u střeoevropských netopýrů

Petr Linhart, Hana Bandouchová, Marie Štěřbová, Ehdaa Eltayeb Eltigani Abdelsalam, Vladimír Piaček, Jiří Pikula

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

Úvod

Parazitismus je jednou z životních strategií, kdy parazit žije na úkor svého hostitele. Vztah mezi hostitelem a parazitem je výsledkem různě dlouho trvajících společného vývoje obou v procesu koevoluce a charakterizuje ho jistá míra rovnováhy mezi oběma zúčastněnými. Není tedy překvapivé, že je u volně žijících živočichů mírná parazitární infekce zcela běžná a nepůsobí hostiteli závažnější zdravotní problémy, přestože může do jisté míry ovlivnit např. jeho reprodukční schopnosti a úspěšnost (Merino et al., 2000).

Netopýři představují velmi specifickou skupinu savců, a to nejen z hlediska způsobu života a fyziologických adaptací, ale rovněž z pohledu patogenů. Nejenže jsou považováni za rezervoár a původní hostitele celé řady virů (Calisher et al., 2006), ale v současné době se má za to, že jsou i původními hostiteli trypanosom podrodu *Schizotrypanum* (Hamilton et al., 2012a), kam patří i patogenní *Trypanosoma cruzi*, která v Latinské Americe způsobuje Chagasovu chorobu. Podrod *Schizotrypanum* zahrnuje druhy, které jsou v rámci vztahu parazit-hostitel vázány výhradně na netopýry, pouze u *Trypanosoma cruzi* došlo během evoluce k přeskoku na jiné savce. Jednou z teorií je, že vztah trypanosom podrodu *Schizotrypanum* a netopýrů je z hlediska evoluce velmi starý a k šíření této skupiny krevních parazitů prostřednictvím netopýrů došlo již v době před oddělením kontinentů, což dokazuje i fylogenetická analýza (Hamilton et al., 2012a). Hamilton et al. (2012b) v rámci analýzy 18S rDNA trypanosom získaných od netopýrů z Velké Británie zjistil, že *Trypanosoma dionisii* B z krve netopýra rezavého (*Nyctalus noctula*) je z fylogenetického hlediska bližší izolátům *T. dionisii* z Jižní Ameriky než *T. dionisii* A z krve netopýra hvízdavého (*Pipistrellus pipistrellus*) z Velké Británie (Hamilton et al., 2012b). Vzhledem k tomu, že výše zmíněná studie týkající se přítomnosti jednotlivých druhů trypanosom u evropských netopýrů je jednou z mála publikovaných, rozhodli jsme se provést analýzu vzorků krve od netopýrů rezavých odchycených v ČR.

Materiál a metodika

V rámci projektu byly odebrány a zpracovány vzorky krve netopýrů rezavých, kteří byli na začátku zimování předáni pracovníkům záchranné stanice z důvodu narušení hibernakula a dále netopýrů rezavých, kteří byli odchyceni pomocí nárazových sítí v rámci plánovaných odchytů, které provedli pracovníci Ústavu biologie obratlovců AV ČR (povolení AOPK ČR č.j. 01662/MK/2012 S/00775/MK/2012, č.j. 866/JS/2012). Netopýrům byl odebrán vzorek krve z v. saphena, místo odběru bylo ošetřeno tkáňovým lepidlem, aby nedošlo k nechtěným ztrátám krve. Před vypuštěním byly netopýrům doplněny tekutiny a energie perorální aplikací roztoku glukózy. Biochemické parametry krve byly zpracovány přímo v terénu mobilním hematologickým a biochemickým analyzátozem VetScan a iSTAT (Abaxis, USA). Část krevního vzorku byla odebrána pro následnou izolaci DNA, nested PCR diagnostiku trypanosom a sekvenaci. Rovněž byly zhotoveny krevní nátěry a vyhodnocen diferenciální rozpočet leukocytů. V rámci péče o trvalé handicap byl proveden monitoring vývoje parazitemie u 7 březích a následně laktujících samic netopýra rezavého a byly rovněž analyzovány vzorky krve získané od jejich mláďat. Vzorky byly odebrány celkem od 90 netopýrů rezavých.

Výsledky

V rámci této studie byly odebrány vzorky krve od celkem 79 netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*), a dále byly odebrány vzorky i od 11 mláďat trypanosoma-pozitivních samic. Ze 79 dospělých zvířat během celého roku bylo pomocí nested PCR zjištěna prevalence 43,59%, v rámci hibernace byla prevalence výskytu trypanosom v krvi 42,85% a u zvířat normotermických, odchycených během swarmingu byla prevalence 50%. Na základě sekvenace byly trypanosomy u netopýrů rezavých z ČR určeny jako *Trypanosoma dionisii* B. Vzorky od handicapovaných samic byly odebírány opakovaně v průběhu února až září. Množství trypanosom v periferní krvi samic kolísalo a dle krevních nátěrů byly počty trypanosom poměrně nízké, takže u některých zvířat byly v rámci sledovaného období některé vzorky vyhodnoceny jako negativní s tím, že při dalším odběru byl výsledek PCR vyšetření opět pozitivní. Všechna mláďata trypanosoma-pozitivních samic byla na PCR negativní. V rámci studie byly stanovovány rovněž hematologické a biochemické parametry krve. Při statistické analýze získaných dat byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly v hodnotách celkové bílkoviny a globulinů mezi pozitivními a negativními hibernujícími zvířaty.

Závěr

V rámci této studie byl poprvé na evropském kontinentu zachycen výskyt trypanosomy *T. dionisii* B, která byla dříve popsána pouze ve Velké Británii a dle fylogenetické analýzy je blíže

příbuzná izolátům z Jižní Ameriky (Hamilton et al., 2012b). Stejně tak jako Hamilton et al., (2012b) i my jsme tuto trypanosomu diagnostikovali u netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*). Ve vzorcích, které pocházely od zvířat z několika lokalit, jsme zjistili vysokou prevalenci této trypanosomy a v rámci vyšetření hematologických a biochemických parametrů nebyly zjištěny žádné výrazné změny oproti negativním zvířatům. Jediný rozdíl byl zjištěn u hladiny globulinů a s ní související celkové bílkoviny, kdy došlo u trypanosoma-pozitivních zvířat ke zvýšení hodnot obou těchto parametrů, což se shoduje s výsledky studie experimentální trypanosomiázy u nosálů (*Nasua nasua*). Na rozdíl od této studie však u námi sledovaných zvířat nebyla zjištěna anemie ani poškození jater v důsledku infekce (Herrera et al., 2002). Vysoká prevalence v populaci spolu s nízkou mírou parazitemie a dlouhodobou koexistencí hostitele a parazita svědčí pro jistou míru tolerance, která se zřejmě vyvinula během dlouhodobé koevoluce tohoto druhu trypanosomy a netopýra (Best et al., 2008). Pro toleranci infekce trypanosomami svědčí i absence změn hematologických a biochemických parametrů oproti trypanosoma-negativním zvířatům. Vzhledem k negativním výsledkům PCR opakovaných odběrů vzorků krve mláďat trypanosoma-pozitivních samic lze předpokládat, že u tohoto druhu trypanosomy nedochází k transplacentárnímu přenosu. Míra patogenity této trypanosomy je v současné době sporná, protože na jedné straně je tento druh schopen invadovat živé buňky a množit se v nich (Oliveira et al., 2009), ale na druhou stranu bylo u britských netopýrů zaznamenáno dlouhodobé přežívání bez zjevného ovlivnění zdravotního stavu (Hamilton et al., 2012b) a i my jsme sledovali 7 samic po dobu 8 měsíců a infekce u nich perzistovala po celou tuto dobu bez známek narušení celkového zdravotního stavu sledovaných zvířat. Do budoucna by bylo zajímavé ověřit interakce této trypanosomy s netopýřímí buněčnými liniemi a rovněž provést rozsáhlejší monitoring výskytu trypanosom u dalších evropských druhů netopýrů.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 221/2016/FVHE

Seznam literatury

1. Best A., White A., Boots M. Maintenance of host variation in tolerance to pathogens and parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008, vol. 105, issue 52, Pp. 20786-20791, 10.1073/pnas.0809558105
2. Calisher C. H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. Clinical Microbiology Reviews. 2006, vol. 19, issue 3, Pp. 531-545, 10.1128/CMR.00017-06

3. Hamilton P.B., Cruickshank C., Stevens J.R., Teixeira M.M.G., Mathews F. Parasites reveal movement of bats between the New and old Worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2012, vol. 63, issue 2, Pp. 521-526, 10.1016/j.ympev.2012.01.007
4. Hamilton P.B., Teixeira M.M.G., Stevens J.R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the ‘bat seeding’ hypothesis. *Trends in Parasitology* 2012, vol. 28, issue 4, Pp. 136-141, 10.1016/j.pt.2012.01.006
5. Herrera H.M., Alessi A.C., Marques A.E., Santana A.E., Aquino L.P.C.T., Menezes R.F., Moraes M.A.V., Machado R.Z. Experimental *Trypanosoma evansi* infection in South American coati (*Nasua nasua*): hematological, biochemical and histopathological changes. *Acta Tropica* 2002, vol. 81, issue 3, Pp. 203-210, 10.1016/S0001-706X(01)00204-2
6. Merino S., Moreno J., Sanz J.J., Arriero E. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). *Proc. R. Soc.Lond.* 2000, B 267:2507-2510, 10.1098/rspb.2000.1312
7. Oliviera M.P.C., Cortez M., Maeda F.Y., Fernandes M.C., Haapalainen E.F., Yoshida N., Mortara R.A. Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: Invasion, intracellular growth and nuclear localization. *Acta Tropica* 2009, vol. 110, issue 1, Pp. 65-74, 10.1016/j.actatropica.2009.01.008

Obsah cholesterolu a vybraných vitaminů v kobyílím mléce

Ivana Borkovcová¹, Pavlína Navrátilová¹, Lenka Kaniová¹, Sandra Dluhošová¹, Simona Horáková¹,

Jan Pospíšil¹, Tereza Kubíková¹, Jana Iwanuszková¹

¹Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Kobylí mléko je důležitou a tradiční potravinou živočišného původu v některých asijských regionech, ale zájem o kobylí mléko v současné době zažívá renesanci i v evropských zemích (Holandsko, Belgie, Norsko, Francie), kde vznikly i specializované podniky pro jeho průmyslové zpracování (horse dairies). Kobylímu mléku jsou přisuzovány specifické terapeutické vlastnosti. Protože se složení kobylího mléka více podobá mateřskému mléku než mléko přežvýkavců, je považováno za vhodnou alternativu mléka mateřského. Kobylí mléko se využívá pro výrobu mléčných výrobků (kumys, sýry), dále například v kosmetickém průmyslu a pro výrobu doplňků stravy. Údaje o obsahu minoritních nutrientů v kobyílím mléce jsou v literatuře méně časté a velmi rozdílné. Důvodem může být i skutečnost, že produkce kobylího mléka je více lokální záležitostí s velkou variabilitou v obsahu složek ovlivněnou řadou faktorů (plemeno, výživa, stádium laktace, režim krmení aj.) (Claeys *et al.*, 2014; Pieszka *et al.*, 2016). Zmíněné faktory jsou rovněž příčinou vysoké variability v údajích o obsahu vitaminů v kobyílím mléce. Obsah hydrofilních vitaminů je výživou více ovlivněn než obsah lipofilních, obsah cholesterolu a lipofilních vitaminů v mléce závisí na tučnosti mléka. Kobylí mléko obsahuje významně méně tuku než mléka přežvýkavců, nižší je proto i obsah lipofilních vitaminů a cholesterolu. S výjimkou vitaminu C, který je v kobyílím mléce relativně vysoký, je obsah vitaminů v kobyílím mléce celkově nižší, než v mléce přežvýkavců (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Obsah tuku, cholesterolu a vybraných vitaminů v mléce některých savců (Claeys *et al.*, 2014).

Složka	Mléko				
	mateřské	kobylí	kravské	ovčí	kozí
tuk (g/l)	21-40	3-42	33-54	50-90	30-72
cholesterol (mg/l)	140-200	50-88	131-314	140-290	107-181
retinol (µg/l)	300-2000	93-340	170-500	410-500	500-680
tokoferol (µg/l)	3000-8000	260-1113	200-1840	1200	neuvedeno
thiamin (µg/l)	140-170	200-400	280-900	280-800	400-680
riboflavin (µg/l)	200-600	100-370	1160-2020	1600-4290	1100-2100

Studie je příspěvkem k doplnění méně četných údajů o obsahu vybraných minoritních nutrientů kobyliho mléka a uvádí obsah cholesterolu, lipofilních vitaminů (tokoferolu, retinolu) a hydrofilních vitaminů (thiaminu a riboflavinu).

Materiál a metodika

Vzorky

Ve studii byly analyzovány vzorky kobyliho mléka získané od 10 klisen plemen český teplokrevník, moravský teplokrevník, trakénský a oldenburský kůň během 6 měsíců laktace. Celkem bylo analyzováno 63 vzorků kobyliho mléka.

Stanovení riboflavinu

Princip metody

Riboflavin je stanovován v supernatantu po odstranění tuku a precipitaci proteinů 10 % kyselinou octovou na pH 4,2 kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s použitím iontově párovacího činidla (IP RP-HPLC).

Příprava vzorku:

10 ml vzorku mléka centrifugujeme 10 min/5000ot/min/5 °C. Svrchní tukovou vrstvičku mechanicky odstraníme a ke vzorku pozvolna přidáváme za stálého míchání 10 % kyselinu octovou do pH=4,2. Reakční směs odstředíme 5 min/5000ot/min/5 °C, cca 2 ml supernatantu zfiltrujeme přes 0,45 nebo 0,22 µm nylonový filtr do vialek pro HPLC analýzu.

Podmínky HPLC stanovení

Stanovení provádíme na kapalinovém chromatografu, s fluorescenčním detektorem při vlnových délkách $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 450/520$ nm. Pro separaci je možné použít chromatografickou kolonu Zorbax Eclipse XDB C8, 4,6 x 150 mm, 5 µm. Teplota kolony je 35 °C, velikost nástřiku 10 µl. Pracujeme v modu gradientové eluce, mobilní fázi A je vodný roztok iontově párovacího činidla, kyseliny octové a triethylaminu v poměru 5 mmol : 1 % : 0,13 %. Mobilní fázi B je acetonitril.

Stanovení thiaminu

Princip metody

Thiamin, včetně jeho fosforylovaných forem, je po kyselé a enzymatické hydrolyze a převedení na thiochrom stanovován metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s fluorescenční detekcí.

Příprava vzorku

10 ml mléka odpipetujeme do 150 ml kádinky, přidáme 50 ml 0,1 M HCl a vložíme do vodní lázně 60 °C/30 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu upravíme pH reakční směsi na hodnotu 4,5 roztokem 2,5 M octanu sodného, kvantitativně převedeme do 250 ml Erlenmayerovy baňky, přidáme 1 ml vodné suspenze enzymu ClaraDiasa (0,250 g směsi enzymů Clara Diastase suspendujeme v 1 ml deionizované vody) a inkubujeme cca 16 hodin při 37 °C za stálého promíchávání. Po ochlazení na laboratorní teplotu převedeme směs do 100 ml odměrné baňky a doplníme objem po rysku vodou.

Oxidace thiaminu na thiochrom

Odebereme 1 ml roztoku po enzymatické hydrolýze do 15 ml zkumavky, přidáme 1 ml derivatizačního činidla (2 ml 1 % roztoku ferrikyjanidu draselného doplníme do 50 ml 15 % roztokem KOH). Deprivatizační činidlo připravujeme vždy čerstvé těsně před deprivatizací. Reakční směs vortexujeme 10 vteřin, necháme 1 minutu odstát, přidáme 1,5 ml isopropanolu/isobutanolu, vortexujeme 15 vteřin, necháme stát do oddělení vodné a alkoholové vrstvy. Z horní vrstvy pak odebíráme cca 1 ml pro HPLC stanovení. Stabilita thiochromu je omezená (cca 3-10 hodin), stanovení je nutné provádět v co nejkratší době po derivatizaci.

Podmínky HPLC stanovení

Pro analýzu byla použita chromatografická kolona Ascentis RP Amide, 150 x 4,6 mm, 3 μm (Supelco, USA). Mobilní fáze měla složení: fosfátový pufr, pH 7,2/acetonitril (80:20), průtok 0,8 ml/min, $T_k = 35\text{ °C}$, velikost nástřiku 10 ul, detekce při $\lambda_{exc/em} = 368//440\text{ nm}$. Vyhodnocení bylo prováděno metodou kalibrační přímky.

Stanovení lipofilních vitaminů A, E a cholesterolu

Princip metody

Celkový cholesterol a vitaminy A, E se stanovují po uvolnění z esterových vazeb alkalickou hydrolýzou (saponifikací) a extrakci nesaponifikovatelného podílu do nepolárního rozpouštědla metodou kapalinové chromatografie na reverzní fázi.

Příprava vzorku

K 1 g mléka, resp. mléčného tuku přidáme špetku kyseliny askorbové a hydrochinonu, 10 ml methanického KOH (1 díl 10 M KOH + 9 dílů methanolu p.a.) a saponifikujeme při 60 °C pod refluxem po dobu 30 min. Po ochlazení přidáme 5 ml deionizované vody a 10 ml hexanu jako extrakčního činidla a intenzivně třepeme 20 minut. Po oddělení vrstev odebereme maximální hexanový podíl, který promyjeme vodou do neutrální reakce a vysušíme bezvodým síranem sodným. Hexan odpaříme, odparek rozpustíme v methanolu a po filtraci přes membránový filtr analyzujeme metodou UHPLC.

Podmínky UHPLC stanovení

Pro finální chromatografické stanovení byla použita kolona s reverzní fází Acquity BEH C8, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm (Waters, Irsko). Mobilní fází byla směs methanolu a vody (93:7), průtok 0,4 ml/min. Detekce cholesterolu byla prováděna v UV oblasti při 205 nm, retinolu při 325 nm. Pro tokoferol byla použita fluorescenční detekce s dvojicí vlnových délek $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 295/340$ nm.

Výsledky

Tabulka č. 2. Obsah cholesterolu, retinolu, tokoferolu riboflavinu a thiaminu (mg/l) ve vzorcích kobylišho mléka

Analyt	\bar{x}	SD	medián	max.	min.
riboflavin	0,172	0,065	1,157	0,483	0,070
thiamin	0,291	0,111	0,265	0,751	0,205
cholesterol	29,1	16,4	27,5	75,5	2,8
retinol	0,228	0,131	0,308	0,665	0,221
tokoferol	0,771	0,526	0,644	1,914	0,181

V analyzovaných vzorcích kobylišho mléka byly nalezeny obecně nižší hodnoty sledovaných vitaminů a cholesterolu v porovnání s mlékem přežvýkavců (tabulky č. 1 a 2). K nejvýznamnějším faktorům, které ovlivňují obsah vitaminů v kobyliším mléce, patří stádium laktace a výživa (Pieszka *et al.*, 2016). Obsah sloučenin nesaponifikovatelného podílu, cholesterolu, retinolu a tokoferolu v analyzovaných vzorcích je rovněž velmi variabilní v závislosti na obsahu tuku. Ze skupiny lipofilních vitaminů jsou v kobyliším mléce nejvíce zastoupeny vitaminy retinol a tokoferol. Průměrné koncentrace tokoferolu a retinolu stanovené v naší studii byly v souladu s literárními údaji (Claeys *et al.*, 2014; Markiewicz-Keszycka *et al.*, 2014). Obsah tokoferolu je v kobyliším mléce podobný jako v kravském mléce, ale významně nižší než v mléce mateřském. Obsah retinolu je v mateřském mléce vyšší než v mléce kobyliším (Markiewicz-Keszycka *et al.*, 2014). Vitaminy riboflavin a thiamin byly stanovovány ve vodné frakci mléka po odstranění tuku a deproteinaci, jejich obsah není přímo závislý na tučnosti mléka. Průměrné hodnoty obsahu thiaminu byly nižší než udávané rozmezí koncentrací (Claeys *et al.*, 2014), průměrné hodnoty riboflavinu se pohybovaly v rozmezí hodnot uváděných koncentračních intervalů.

Závěr

Hodnoty sledovaných analytů odpovídaly literárním údajům a získané výsledky ukázaly vysokou variabilitu hodnot v průběhu sledovaného období i v rámci vyšetřených individuálních vzorků.

Seznam literatury

Seznam literatury je dispozici u autora navratilovap@vfu.cz

Poděkování

Práce byla financována grantem IGA VFU Brno 203/2016/FVHE

Vliv tepelného opracování na aktivitu stafylokokových enterotoxinů v mléce

Lenka Necidová, Šárka Bursová, Michaela Králová, Veronika Polková, Blanka Zábrodská, Eva Šotová

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Staphylococcus aureus je významným patogenem člověka i zvířat. Je schopený produkovat řadu toxických substancí, jako jsou např. stafylokokové enterotoxiny (SEs) způsobující onemocnění z potravin označované jako stafylokoková enterotoxikóza. Onemocnění má rychlý nástup i průběh. První symptomy intoxikace – zvracení, bolest hlavy, břicha a průjem se objevují za 1 – 6 hodin po požití potravin kontaminované SEs (Loir et al., 2003). *S. aureus* je jedním z hlavních etiologických agens způsobujících mastitidy u mléčného skotu (Rabello et al., 2007). Z tohoto důvodu může mléko a mléčné výrobky představovat zvýšené riziko pro konzumenty. V současnosti je známo 22 typů SEs označovaných písmeny A–V (Argudín et al., 2010). Za rizikové množství koagulázopozitivních stafylokoků, mezi jejichž hlavní zástupce se *S. aureus* řadí, je považován počet více než 10^5 KTJ/ml (g) potravin (Necidová et al., 2012; Nařízení komise (ES) č. 2073/2005). Významnou vlastností stafylokokových enterotoxinů je jejich odolnost k působení vyšších teplot (Bhunia, 2008), proto se mohou SEs vyskytovat i v tepelně opracovaných mléčných výrobcích, ve kterých nebyly prokázány bakterie *S. aureus*. Nicméně bylo prokázáno, že pasterační teploty jsou schopné SEs ve vzorcích mléka inaktivovat (Necidová et al., 2016). Cílem této práce bylo hodnocení termostability stafylokokových enterotoxinů v mléce ošetřeném teplotami 100, 110 a 121 °C.

Materiál a metodika

Jako zkoumanou matici jsme zvolili čerstvé pasterované mléko, zakoupené v tržní síti, u kterého byla předem testováním vyloučena přítomnost *S. aureus*.

Kmeny *S. aureus* použité k pokusům, pocházely ze syrového kravského mléka (35) a z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM 5765, CCM 5757, CCM 5971) (3). Celkem bylo použito 38 kmenů *S. aureus* s produkcí enterotoxinů SEA (13), SEB (11), SEC (14). U všech kmenů byla prokázána přítomnost genu kódujících tvorbu SEs: *sea*, *seb* nebo *sec*.

Toxigenními kmeny bylo zaočkováno pasterované mléko v počtech $4,89 \pm 0,31$ log KTJ.ml⁻¹. Takto zaočkované vzorky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, aby došlo k pomnožení *S. aureus* a k produkci stafylokokových enterotoxinů. U všech vzorků bylo po 24 hodinové inkubaci provedeno

stanovení počtu *S. aureus* dle ČSN EN ISO 6888-1 (1999) a prověřena přítomnost SEs imunofluorescenční metodou (ELFA). Pro stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*S. aureus*) byl určen Baird-Parker agar s vaječnou emulzí a teluricitanem draselným, používaný jako arbitrážní půda. Inokulované plotny byly inkubovány aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48 hodin. Následně byly vzorky pasterovány při různých teplotách (100, 110 a 121 °C), a to po dobu 1 min. Po tepelném ohřevu došlo ke zchlazení mléka a ke stanovení počtu *S. aureus* a přítomnosti SEs.

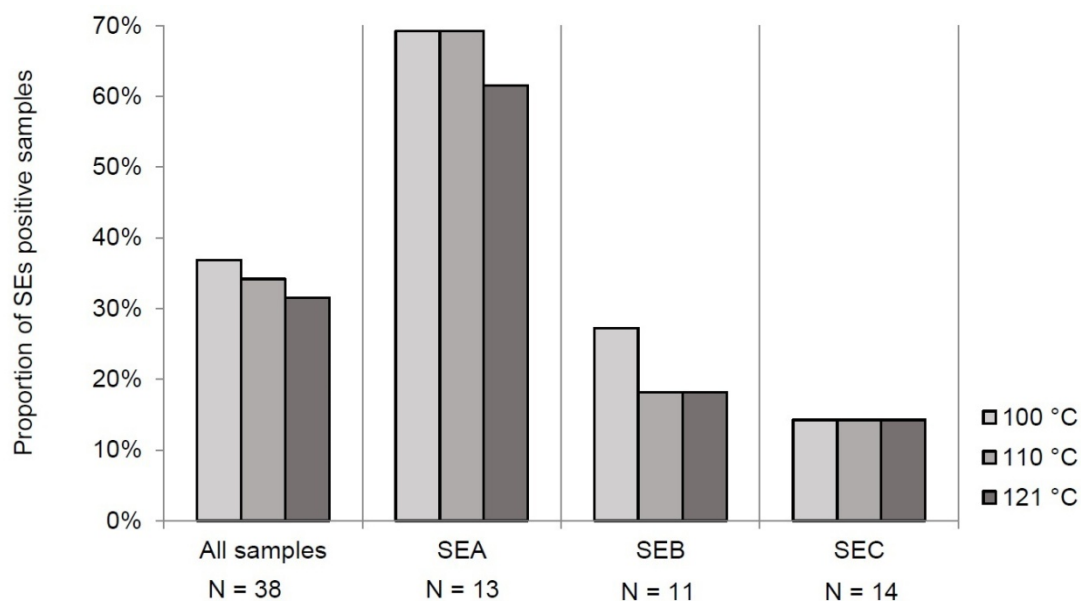
Průkaz stafylokokových enterotoxinů byl proveden fluorescenční imunologickou metodou ELFA (Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay) na přístroji miniVIDAS® (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Tento automatizovaný systém detekuje stafylokokové enterotoxiny typu AE jako sumu, s detekčním limitem 0,5 ng · g⁻¹ (ml⁻¹) potraviny pro SEA a SEB a s detekčním limitem 1,0 ng · g⁻¹ (ml⁻¹) pro SEC – SEE. ELFA metoda výsledky pro detekci SEs prezentuje jako pozitivní nebo negativní, ale současně lze z hodnot TV (Test Value), odpovídajících míře fluorescence, semikvantitativně posoudit množství SEs v testovaném vzorku.

Výsledky

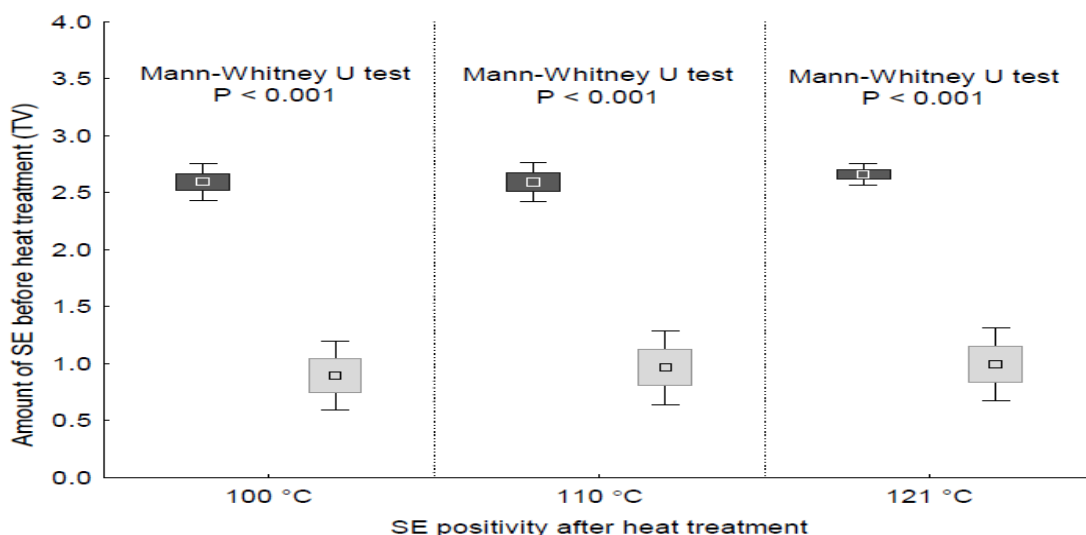
Počty *S. aureus* dosahovaly ve vzorcích mléka (n = 38) před tepelným opracováním hodnot 8,63 ± 0.47 log KTJ.ml⁻¹, u všech vyšetřovaných vzorků byla prokázána přítomnost SEs. Statistické vyhodnocení počtů *S. aureus* a množství SEs ukázalo, že množství SEs ve vzorcích mléka před pasterací nekorespondovalo s počty *S. aureus*. Nejvyšší množství SEs bylo zaznamenáno ve vzorcích mléka zaočkovaných kmeny schopnými produkovat SEA. Jak je patrné z Obrázku č. 1, po tepelném opracování 100 °C bylo pozitivních 36,8 % vzorků (14/38), po tepelném opracování 110 °C bylo pozitivních 34,2 % vzorků (13/38) a po tepelném opracování 121 °C bylo pozitivních 31,6 % vzorků (12/38). Množství SEs ve vzorcích po tepelném opracování klesalo. Inaktivace SEs tepelným opracováním závisela na množství SEs ve vzorku před tepelným opracováním (Obrázek č. 2). Hodnota TV před tepelným opracováním byla vyšší u vzorků, u kterých byl po tepelném opracování 100 °C pozitivní průkaz SEs než u vzorků, ve kterých byl SEs inaktivován (Mann-Whitney U test: P < 0.001).

Jednou ze základních charakteristik SEs je jejich odolnost k vysokým teplotám. Bhunia (2008) uvádí, že SEs jsou termorezistentní a zůstávají aktivní dokonce po 30 minutovém varu, v některých případech i po působení teploty 121 °C po dobu 28 minut. Larkin et al. (2009) a Argudín et al. (2010) uvádí, že stafylokokové enterotoxiny jsou odolné vůči podmínkám tepelného zpracování, které běžně ničí bakterie. Podle Claeys et al. (2013) nejsou termorezistentní enterotoxiny vytvořené *S. aureus* zničeny pasterací (např. 71 – 74 °C/15 – 40 s), ale sterilace (110 – 120 °C/10 – 20 min)

nebo UHT (135 – 140 °C/6 – 10 s pro nepřímý způsob a 140 – 150 °C/2 – 4 s pro přímý způsob) enterotoxiny v mléce ničí. V Japonsku byl příčinou alimentární intoxikace nebyvalého rozsahu SEA přítomný v sušeném mléce (Asao et al., 2003). V odstředěném mléce, použitém k výrobě sušeného mléka, které bylo minimálně dvakrát pasterováno při teplotě 130 °C po dobu 4 nebo 2 s, byl enterotoxin SEA částečně inaktivován, ale zachoval si jak imunologickou, tak biologickou aktivitu. Popsané onemocnění z potravin je ukázkou toho, že zatímco stafylokoky mohou být tepelným opracováním zničeny, stafylokokové enterotoxiny si v potravinách mohou udržet aktivitu a způsobit u konzumentů alimentární intoxikaci.



Obrázek 1. Počty SE-positivních vzorků před a po tepelném opracování



Obrázek 2. Množství SEs (vyjádřeno TV hodnotou) u vzorků před tepelným opracováním s pozitivním (tmavé obdélníky) a negativním (světlé obdélníky) průkazem přítomnosti SEs po tepelném opracování

Nejen teploty nad 100 °C mohou SEs inaktivovat. Studie Necidová et al. (2016) ukázala, že SEA, SEB a SEC lze inaktivovat teplotami běžně používanými při pasteraci mléka. V případě účinku teploty 72 °C po dobu 15 s byly SEs prokázány u 87,5 % vzorků mléka, při 85 °C (15 s) bylo po pasteraci pozitivních 52,5 % a po pasteraci 92 °C (15 s) bylo pozitivních 45,0 % vzorků.

Závěr

Studie potvrdila, že teploty nad 100 °C mohou SEs inaktivovat v závislosti na koncentraci toxinů ve vzorcích. Termorezistence stafylokokových enterotoxinů, uváděná odbornou i vědeckou literaturou jako jejich významná vlastnost, tak byla prokázána jen u části vzorků. Přestože tepelné opracování mléka má zásadní vliv na zajištění bezpečnosti této potraviny, hlavním preventivním krokem pro zabránění výskytu stafylokokové enterotoxikózy u konzumentů zůstává nepřerušování chladicího řetězce, jak požaduje platná evropská legislativa (nařízení (ES) č. 853/2004).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 213/2016/FVHE.

Seznam literatury:

- ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, vol. 2, p. 1751–1773.
- ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K., NAKAZAWA, H., KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 2003, vol. 130, p. 33–40.
- BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. 1st ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. P. 276. ISBN 978-0-387-74536-7
- CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., DE BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., DE ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y., HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 2013, vol. 31, p. 251–262.
- ČSN EN ISO 6888-1 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) - Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera, 1999.
- LARKIN, E. A., CARMAN, R. J., KRAKAUER, T., STILES, B. G. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 16, p. 4003–4019.
- LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, vol. 2, p. 63–76.
- NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Úřední věstník 2004; L 139: 55–205.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Úřední věstník L 338, 22/12/2005, S. 0001 – 0026.
- NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., KARPÍŠKOVÁ, R. Dynamics of staphylococcal enterotoxin production in model experiments simulating the fresh cheese environment. *Acta Veterinaria*, 2012, vol. 81, p. 391–396.
- NECIDOVÁ, L., BOGDANOVIČOVÁ, K., HARUŠTIAKOVÁ, D., BÁRTOVÁ, K. Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxins A, B, and C in milk. *Journal of Dairy Science*, 2016, vol. 99, no. 11, p. 8638–8643.
- RABELLO, R. F., MOREIRA, B. M., LOPES, R. M., TEIXEIRA, L., M., RILEY, L., W., CASTRO, A., C. Multilocus semence typik of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cos with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, vol. 56, p. 1505–1511.

Citlivost spor mikrosporidie *Nosema ceranae* k dezinfekčním činidlům

Ivana Papežíková¹, Petra Ondráčková², Veronika Kováčová¹, Hana Peterová¹, Anna Zachová¹

¹Ústav ekologie, chorob zvířet, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

Úvod

Nosematóza je onemocnění dospělých včel, způsobené mikrosporidii *Nosema apis* a/nebo *Nosema ceranae*. *Nosema apis* je původním parazitem včely medonosné (*Apis mellifera*). V posledních letech je tento druh vytlačován druhem *Nosema ceranae*, který pochází od včely východní (*Apis cerana*). Onemocnění má u nás vysokou prevalenci (50 – 70 %), a i když většinou nezpůsobuje drastické úhyny, značně snižuje užitkovost včelstev. Oba druhy mikrosporidií napadají žaludeční epitel dospělých včel a způsobují jeho destrukci, což vede k podvýživě včel, ke zkrácení jejich života a ke zvýšené náchylnosti k jiným chorobám. Výsledkem je pomalý jarní rozvoj včelstev, nedostatečné využití dostupné pastvy a snížení medného výnosu. K terapii nosematózy se u nás dřív používalo antibiotikum fumagilin. Dnes není v EU použití antibiotik u včel povoleno, a vzhledem k tomu, že zatím neexistuje žádná účinná alternativní léčba (Botías a kol., 2013), jsou včelaři odkázáni pouze na preventivní a zootechnická opatření. Základem prevence je správné ošetřování včel, kvalitní výživa a zmírňování infekčního tlaku snižováním počtu životaschopných spor, přítomných v prostředí.

Je popsáno několik metod, použitelných pro dezinfekci včelařského vybavení, kontaminovaného sporami *Nosema apis* (OIE Terrestrial Manual 2013), ale pro *Nosema ceranae* tyto postupy zatím chybějí. Cílem této práce bylo otestovat devitalizační účinky koncentrované kyseliny octové, doporučené k devitalizaci spor *Nosema apis*; dále kyseliny mravenčí a šťavelové, dvou organických kyselin, používaných k tlumení varroázy včel.

Materiál a metodika

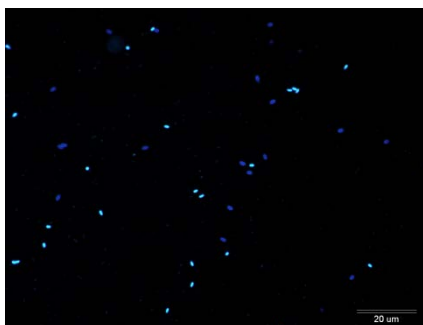
Spory *Nosema ceranae* byly získány z přirozeně infikovaných včel. Zadečky 50 včel byly zhomogenizovány v 5 ml vody a homogenát byl zfiltrován přes dvojitou vrstvu gázy. Poté byla opakovaně provedena gradientová centrifugace na médiu Percoll (95%, 75%, 50% a 25% Percoll, délka centrifugace 10 minut, 10 000 g, laboratorní teplota). Vyizolované spory byly rozsuspendovány v PBS a uskladněny při 4°C.

Druhá identifikace vyzolovaných spor

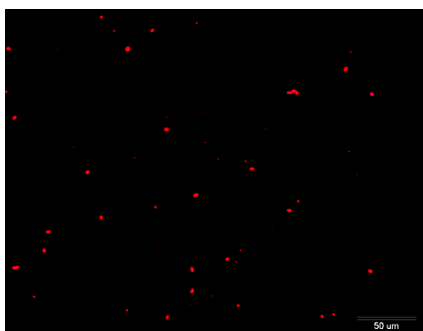
Získané spory byly identifikovány jako *Nosema ceranae* pomocí PCR (Tlak – Gajger, 2010).

Metody rozlišení živých a devitalizovaných spor

Byly vypracovány metody k rozlišení živých a devitalizovaných spor pomocí fluorescenčních barviv. Byly použity fluorochromy DAPI a propidium iodide (PI). Živé spory, obarvené DAPI, fluoreskují modře, mrtvé spory intenzivně modro-bíle. Po obarvení PI mrtvé spory fluoreskují



červeně, živé spory s nepoškozenou plazmatickou membránou PI nepřijímají a vykazují pouze slabou autofluorescenci. Pro rychlou vizuální kontrolu životnosti spor a účinnosti barvení byla použita fluorescenční mikroskopie, pro vyhodnocení devitalizačního účinku jednotlivých organických kyselin byla pro vyšší přesnost použita průtoková cytometrie.



Obrázky 1, 2: Spory, obarvené DAPI (nahore) a propidium iodidem (dole).

Vystavení spor dezinfekčním činidlům

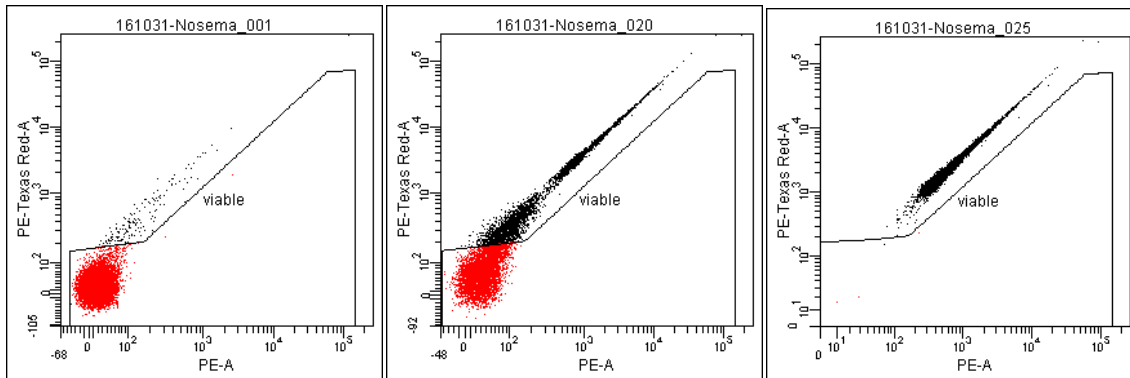
Purifikované spory byly napipetovány na skleněné Petriho misky. Po zaschnutí suspenze byly misky se sporami umístěny do úlů se včelami tak, aby byl umožněn přístup úlového vzduchu ke sporám, ale aby se ke sporám nedostaly včely. Do úlů byly umístěny krátkodobé odpařovače kyseliny mravenčí (Formidol 40) nebo dlouhodobé odpařovače kyseliny mravenčí (Nassenheider).

Další misky byly umístěny do úlů bez včel. Úlový prostor byl ošetřen 98% kyselinou octovou (20 ml/nástavek, aplikace odparem) anebo kyselinou šťavelovou (1 g/nástavek, aplikace sublimací).

Po uplynutí plánované doby expozice byly misky vyjmuty a spory byly z povrchu opláchnuty PBS (pH 7,1). Spory byly zcentrifugovány (10 000 g, 10 minut, laboratorní teplota), obarveny PI (10 μg/ml), promyty a použity pro měření (viz dále).

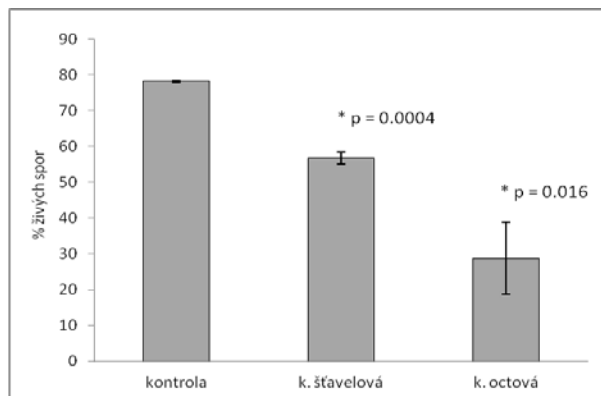
Pro stanovení citlivosti spor k pH bylo ke 30 μl suspenze přidáno 1 ml PBS o pH 3 – 13 (upraveno HCl/NaOH). Po hodinové expozici byly spory zcentrifugovány, supernatant odstraněn, spory byly promyty v PBS, obarveny PI (10 μg/ml), znovu promyty a použity pro měření.

Viabilita spor byla analyzována na průtokovém cytometru (FACScalibur, USA). V každém vzorku bylo vyhodnoceno 20 000 spor. Jako pozitivní kontrola (mrtvé spory) sloužila suspenze, inaktivovaná teplem (95°C, 30 minut).



Obrázek 3: Analýza životnosti spor na průtokovém cytometru, barvení PI. Vlevo: vzorek s 99 % živých spor, uprostřed: směs živých a mrtvých spor, vpravo: spory, usmrcené teplem.

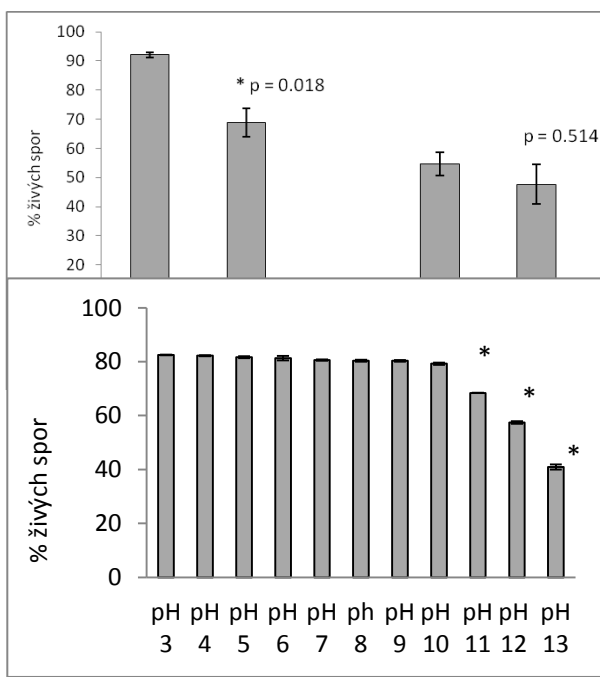
Výsledky



Všechny sledované organické kyseliny vykazovaly devitalizační účinek. Nejvýraznější efekt byl pozorován u 98% kyseliny octové, která během 72 hodin usmrtila 63 % spor. Kyselina šťavelová za stejnou dobu usmrtila 27 % spor (Obrázek 4).

Obrázek 4. Životnost spor *N. ceranae* po 72 h expozici kyselině šťavelové a kyselině octové. Data představují průměr ± SEM.

Efekt kyseliny mravenčí byl závislý spíše na její koncentraci, než na délce expozice. Krátkodobá expozice 85% kyselině mravenčí devitalizovala 25 % spor. Dlouhodobé vystavení 65% kyselině mravenčí nemělo významný efekt, přestože u dlouhodobé expozice bylo celkem odpařeno téměř trojnásobné množství kyseliny než při krátkodobém ošetření (Obrázek 5). Bylo zjištěno, že spory *N.*



ceranae, umístěné v úlovém prostředí, relativně rychle ztrácejí životnost (8 % za čtyři dny, 45 % za 21 dní).

Obrázek 5. Životnost spor *N. ceranae* po krátkodobé a dlouhodobé expozici kyselině mravenčí. Data představují průměr ± SEM.

Bylo zjištěno, že spory *N. ceranae* jsou vysoce odolné v širokém rozmezí pH. Přestože všechny organické kyseliny, testované v předchozích

experimentech, snižovaly životnost spor, hodinová expozice kyselému prostředí životnost spor významně neovlivnila; zdá se, že k alkalickému pH jsou mnohem citlivější než ke kyselému (Obrázek 6).

Obrázek 6. Životnost spor *N. ceranae* po hodinové inkubaci v roztocích o různém pH.

Závěr

Všechny sledované organické kyseliny byly schopny do určité míry usmrcovat spory *N. ceranae*. Ani jedna z testovaných látek však nebyla dost účinná na to, aby kompletně ozdravila úlové prostředí od infekčních spor. Jediný zásah, který spory zcela devitalizoval, bylo tepelné ošetření. Ošetření včelstev kyselinou mravenčí, případně šřavelovou, prováděné v rámci tlumení varroázy, může snížit podíl živých spor na plástech, rámcích a stěnách úlu a přispět tak ke snižování infekčního tlaku. Dojde – li k úhynu včelstva na nosematózu nebo ke znečištění úlu výkaly nemocných včel, je vhodné použít tepelné ošetření úlu a jeho vnitřního vybavení.

Citovaná literatura je k dispozici u autorů.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 222/2016/FVHE.

Hodnocení exotického a tuzemského ovoce českého trhu z pohledu kvality, antioxidační aktivity a fází zralosti

Jana Pokorná¹, Martin Král¹, Martina Ošádalová¹, Michaela Kořínková, Aneta Vybíralová,
Diana Mandincová, Nikol Svobodová

Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

V posledních letech se zvyšuje zájem o stanovení celkových fenolických látek a antioxidační aktivity u zeleniny a ovoce (Fu *et al.*, 2011). Fenolové sloučeniny jsou klíčovou skupinou metabolitů rostlin nalezených hojně v ovoci a zelenině (Tarko *et al.*, 2013), přičemž jejich bioaktivní vlastnosti hrají důležitou úlohu tím, že přispívají k barevnosti a zlepšují sensorické vlastnosti ovoce a zeleniny (Tarko *et al.*, 2013; Ignat *et al.*, 2011). Přírodní antioxidanty, které zahrnují fenolické sloučeniny a tokoferoly chrání buňky proti ataku volných radikálů, a pomáhají předcházet onemocnění srdce, rakoviny, šedému zákalu a omezují proces stárnutí (Tarko *et al.*, 2012). Tyto důvody násobí potřebu jejich determinace v matricích rostlinného původu (Ignat *et al.*, 2011). Důkladné studium obsahu vitamínů, kyselin, barviv, fenolických sloučenin a stanovení antioxidační aktivity přispívá k lepšímu pochopení možností a způsobů využití. Hladiny jednotlivých antioxidantů v potravinách nemusí nutně odrážet jejich celkovou antioxidační kapacitu, závisí to také na synergických a redoxních interakcích mezi různými molekulami přítomnými v potravinách. V neposlední řadě by měl být při hodnocení složení potravin z různých oblastí a regionů také brán ohled na vliv geografických rozdílů (Pellegrini *et al.*, 2003).

Ovoce bývá někdy z důvodu krátké údržnosti sklízeno v nezralém stavu a dozrává při exportu, případně jiným způsobem. Zpracování a skladování může mít podstatný dopad na strukturu tkáně, obsah účinných látek a výsledný obsah fenolických sloučenin.

Snahou vyšetření bylo tedy zjistit, v jaké fázi a kvalitě je obvykle ovoce na trh dodáváno, jaké mělo texturní vlastnosti a kolik nutričně významných látek obsahovalo, případně v něm bylo zachováno. Jednalo se tedy konkrétně o měření textury, stanovení vitamínu C, β -karotenu, pH, celkových kyselin, sušiny a celkových polyfenolů. Projekt byl zacílen na exotické druhy ovoce z důvodu jeho stále stoupající oblíbenosti u konzumentů, hodnocení jeho kvalitativních parametrů a srovnání s tuzemskými druhy ovoce, které lze snadno nakupujícími pořídit na českém trhu.

Materiál a metodika

Z projektu bylo pořízeno deset druhů ovoce cizokrajné i české provenience. Vzorky byly zakoupeny v tržní síti a následně skladovány třemi různými způsoby (A - při pokojové teplotě 26 °C, B - v lednici 6 °C a C - v chladicí komoře; simulující ideální teplotu dozrávání daných druhů ovoce; při 10 °C). Všechny vzorky byly vybrány náhodně a jejich přehled je uveden v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 Seznam vzorků ovoce a jejich charakterizace

	Krajina původu	Způsoby skladování	Kódování vzorků
Hrozny	Velké Pavlovice	Pokojová teplota 26 °C	CZ_A
Jablka	Velké Bílovice		
Hrušky	Velké Bílovice	Lednice 6 °C	CZ_B
Švestky	Hustopeče	Chladicí komora 10 °C	CZ_C
Broskve	Velké Pavlovice		
Physalis	Kolumbie	Pokojová teplota 26 °C	EX_A
Kiwi	Chile		
Fík	Španělsko	Lednice 6 °C	EX_B
Avokádo	Peru	Chladicí komora 10 °C	EX_C
Marakuja	Kolumbie		

Vzhledem k velkému počtu dat a výsledků je nebylo možné z obsahových důvodů rozepsat v příspěvku, proto je dále popsáno pouze měření textury, přičemž zbylé výsledky budou předmětem vědeckých publikací. Každý vzorek ovoce byl proměřován šestkrát pro všechna tři skladování, dvěma analýzami („Bioyield“ bod a jemnost dužniny) v pěti časových intervalech skladování. Celkem byl pouze z měření textury ovoce získán soubor 1800 výsledků.

U vzorků bylo dále měřeno pH, sušina, množství celkových kyselin, β -karoten, antioxidační aktivita metodou DPPH a měřením celkových polyfenolů, vitamín C a režimy skladování.

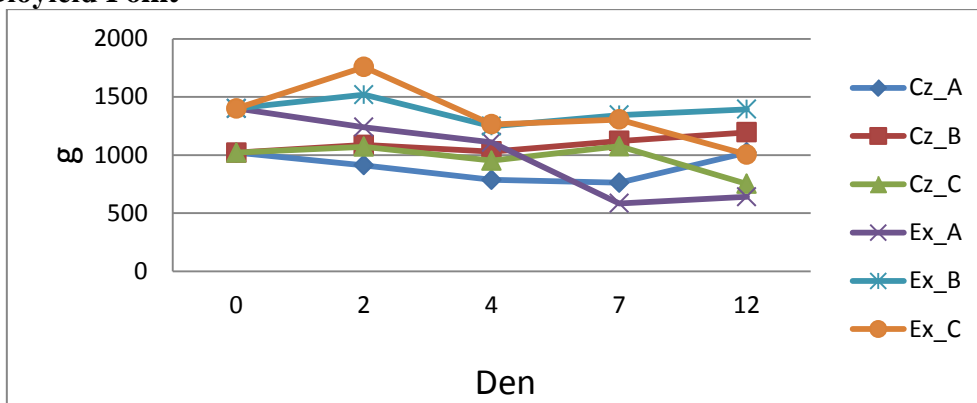
Měření texturních vlastností

Měření „Bioyield“ bodu a jemnosti dužniny bylo provedeno při pokojové teplotě pomocí TA.XTplus analyzáru textury (Stable Micro Systems, UK). Vzorky plodů byly centrálně umístěny na Circular Support Rig (A/CS) a pro test měření penetrace v oblasti středu ovoce byla použita

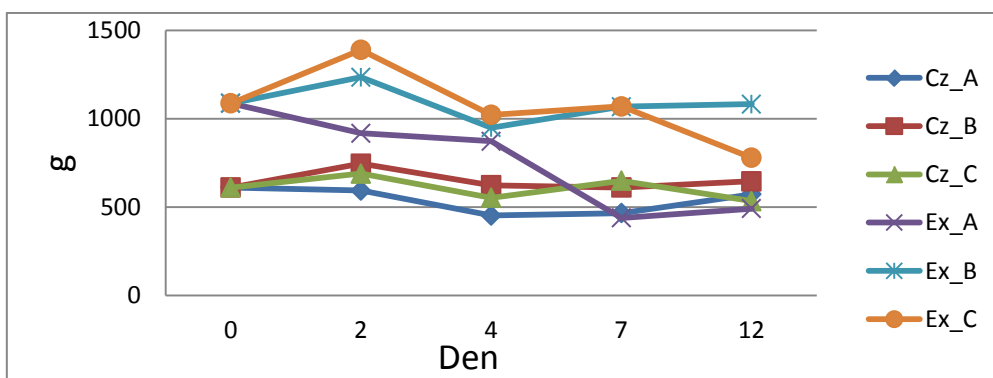
sonda s vpichem 5 mm (SMS P/5). Sondy pronikly ovocem do hloubky 5 mm, předtest a testovací rychlost byla nastavena na 1,5 mm/s a posttest rychlost byla 10,0 mm/s.

Výsledky

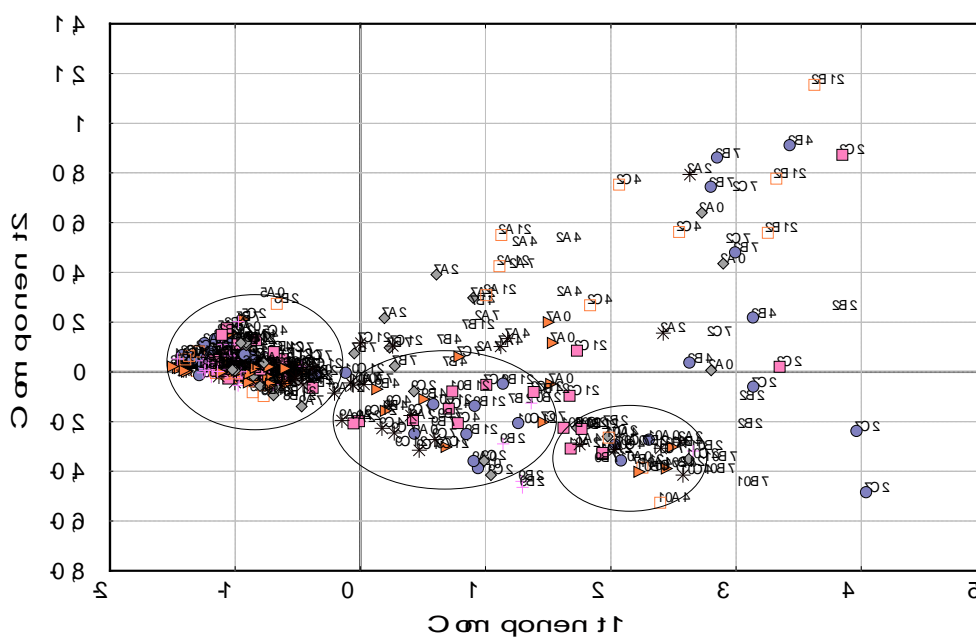
Graf č. 1 Bioyield Point



Graf č. 2 Jemnost dužniny



Graf č. 3 PCA texturních vlastností exotického a českého ovoce v závislosti na délce a způsobu skladování



Výsledky měření bioyield bodu vykazovalo vyšší hodnoty u exotického ovoce oproti českému ovoci, jehož hodnoty byly více vyrovnané. Největší výkyvy hodnot byly mezi vzorky exotického ovoce při skladování A a C, jak je patrné v grafu č. 1. Nejvyrovnanější bylo exotické ovoce skladované v lednici (EX_B), což je pro konzumenta hodnotná a užitečná informace.

Graf č. 2 ukazuje stejně jako u bioyield bodu vyšší hodnoty u exotického ovoce ve srovnání s českým. Exotické ovoce vykazovalo výrazné snížení jemnosti dužniny po dobu skladování. Po dvou dnech se jemnost dužniny mírně zvýšila a následným skladováním hodnoty klesaly; patrné to bylo především při skladování v lednici a klimatické komoře. Skladování při pokojové teplotě vykazovalo nižší hodnoty od druhého do sedmého dne měření především u vzorku EX_A, což značí měřitelné změny ve vzorcích ovoce, které snižují jeho kvalitu.

Graf č. 3 reprezentuje všechny měření s ohledem druhu vzorků, délku a způsob skladování.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 210/2016/FVHE.

Seznam literatury:

- PELLEGRINI, N., SERAFINI, M., COLOMBI, B., DEL RIO, D., SALVATORE, S., BIANCHI, M., BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 2003, vol. 133, p. 2812–2819.
- FU, L., XU, B.T., XU, X.R., GAN, R.Y., ZHANG, Y., XIA, E.Q., LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 2011, vol. 129, p. 345–350.
- IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 2011, vol. 126, p. 1821–1835.
- TARKO, T., DUDA-CHODAK, A., BEBAK, A. Aktywność biologiczna wybranych wytloków owocowych oraz warzywnych. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*, 2012, vol. 4, No. 83, p. 55–65.
- TARKO, T., DUDA-CHODAK, A., ZAJAC, N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by *In vitro* simulation methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig*, 2013, vol. 64, No. 2, p. 79–84.

Vliv zpracovatelských technologií a izolačních postupů na kvalitu DNA v tuňákových výrobcích

Eliška Pospíšilová^{1,2}, Zora Piskatá¹, Iva Steinhauserová²

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno¹, Ústav hygieny a technologie masa, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Ověřování autenticity potravin patří k zásadním otázkám v oblasti bezpečnosti potravin. Podle Nařízení Rady (EHS) 1536/1992 se tuňáci rozdělují na pravé tuňáky a nepravé tuňáky *bonito*, přičemž název druhu tuňáka musí být uveden na obalu výrobku. Detekce DNA živočišného druhu patří mezi základní postupy pro odhalení způsobů falšování potravin spočívajících v záměně jednotlivých druhů ryb rozdílné nutriční hodnoty i komerční ceny (Espineira et al., 2009). DNA může být vlivem technologických procesů používaných v potravinářství (vysoká teplota, působení tlaku, přídavek aditiv atd.) degradována na menší fragmenty (Lockley and Bardsley, 2000), jejichž velikost je limitujícím faktorem pro následnou PCR (Mackie et al., 1999). Cílem projektu bylo zjistit, do jaké míry může být DNA ovlivněna vlivem technologického procesu, a jak následná příprava vzorku a vlastní extrakční postup DNA molekuly ovlivní její kvalitativní a kvantitativní vlastnosti.

Materiál a metodika

Příprava vzorků

Vzorky tuňáka byly připraveny ze svalové tkáně tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), který byl zakoupen na českém trhu jako zmrazený steak. Jeho identifikace byla ověřena pomocí sekvenování podle dílčí sekvence genu pro cytochrom *b* (Seqme, Hradec Králové, Česká republika). Bylo vyrobeno celkem 9 vzorků, z toho vzorek 1 tvořil syrovou svalovinu bez jakékoliv úpravy. Vzorky 2 a 3 byly konzervovány při teplotě 121 °C, tlaku 200kPa po dobu 15 minut, přičemž u vzorku 2 byla použita celistvá svalovina, u vzorku 3 mechanicky opracovaná (mletá) svalovina. Rozdílem těchto vzorků byl v technologickém opracování, u vzorku 2 byla použita celá svalovina, kdežto u vzorku 3 mletá svalovina. Vzorek 4 se vařil při 70 °C a vzorek 5 při 90 °C / 10 minut. Vzorek 6 byl ošetřen uzením studeným kouřem, kde maximální teplota nepřesáhla 25 °C, vzorek 7 zase teplým kouřem při maximální teplotě 60 °C. Vzorek 8, tedy pomazánka byl vyroben z konzervované svaloviny ve vlastní šťávě s přídavkem majonézy, margarínu, cibule, soli a pepře. Paté, vzorek 9, byl připraven taktéž z konzervované svaloviny s přídavkem oleje, vody a soli vymixovaný do emulze. V další části byla vyrobena sada konzerv (2 x 23 vzorků opracovaných při teplotě 121 °C, tlaku 200kPa po dobu 15 minut) s přídavky různých ingrediencí pro celou svalovinu

a mletou svalovinu. Jednalo se o tyto ingredience: ve vlastní šťávě, se slunečnicovým olejem, s olivovým olejem, se sójovou omáčkou, se solankou, s octem, s jablečným octem, vinným octem, s citronem, s rajčatovým protlakem, s chilli kořením, s oreganem, s čerstvým česnekem, s česnekovým kořením, s cibulí, s kukuřicí, s hráškem, s fazolí, s mrkví, s rajčaty, s bílou a zelenou paprikou, s černými olivami, čerstvou chilli papričkou.

Dna izolace

Byly použity tři DNA extrakční metody: DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Německo) (kit A), DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Německo) (kit B) a Chemagic DNA Tissue 10 Kit (PerkinElmer, Německo) (kit C). Izolace probíhaly podle návodu výrobce.

Stanovení kvality DNA

Kvalita DNA byla hodnocena dle koncentrací DNA a poměrů absorbancí A260/A280 pomocí spektrofotometru (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific).

PCR analýza

Ukazatelem kvality DNA byla dále její amplifikovatelnost v následné PCR. Pomocí online dostupného programu na internetu Primer3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) bylo navrženo několik sad primerů amplifikujících úseky DNA rozdílné délky v počtu párů bazí (100, 200, 300 a 500 bp). Reakční směs se skládala z celkového objemu 20 µl: 10 µl Master mixu (Top Bio), 4 µl PCR vody (Top Bio), 10 pmol každého primeru (Generi Biotech) a 4 µl templátové DNA. Amplifikace byla provedena s úvodní denaturací 3 min 95 °C, následovanou 35 cykly 30 s 95 °C, 30 s při 60 °C a 50 s při 72 °C, s finální extenzí při 72 °C po dobu 5 min a konečné zchlazení na 4 °C. Vizualizace PCR produktů byla provedena elektroforeticky v 1,5 % agarózovém gelu v 0,5 X TBE pufru s obsahem 8 µl gel greenu. Byla zkoumána intenzita bandu při různě dlouhých PCR produktech, jako marker byl použit 100 bp Ladder.

Výsledky a diskuze

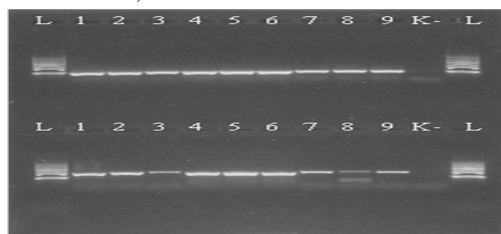
Na základě stanoveného množství (koncentrace) DNA spektrofotometrem můžeme určit rozdílnost v účinnosti jednotlivých kitů (viz tabulka 1). Obecně nejvyšší koncentrace byla zachycena v případě syrové svaloviny s výjimkou kitu A, což mohlo být způsobeno během procesu izolace DNA. Co se týká stanovení kvality DNA z hlediska výpočtu poměru absorbancí A 260/ 280, většina vzorků se nacházela v zadaném rozmezí 1,7 – 2,0 (Chapela et al., 2007) (tabulka 1). Vzorky mimo toto rozmezí mohou být kontaminovány bílkovinami a jinými složkami. Ze získaných hodnot uvedených v tabulce 1 lze považovat za optimální kit B, vzorky obsahovaly nejvíce vyizolované DNA (koncentrace) oproti ostatním a rozmezí čistoty DNA splnilo 7 vzorků z 9. Na obrázcích 1–6 jsou znázorněny výsledky PCR analýzy pro jednotlivé kity. Kratší úseky DNA byly zachytitelné téměř u všech vzorků (v závislosti na použitém kitu). Prokázalo se, že čím je delší amplifikovaný úsek (500

bp), tím je nižší pravděpodobnost detekce (viz obr. 1–6). Nejnižší amplifikovatelnost byla pozorována v případě vzorků pomazánky a paté, čemuž odpovídají i výsledky A 260/280, které byly mimo rozmezí 1,7 – 2,0. U kitu C byly hodnoty koncentrace pro tyto vzorky sice vyšší, ale to mohlo být způsobeno přítomností zbytkových reagensů a jiných nečistot, které se mohou zachytit během extrakčního postupu a které mohou dále navýšit záchyt při nastavené vlnové délce spektrometru a tím způsobit zdánlivé navýšení koncentrace DNA. Podle dostupných výsledků PCR analýzy se jeví jako vhodné kity A a B (viz obr. 1-4). Vliv přísady ingrediencí na kvalitu DNA i schopnost amplifikace v následné PCR byl odlišný v rámci jednotlivých kitů. Přítomnost některých surovin vyvolala inhibici nebo naopak stimulaci následné PCR. Obecně kratší PCR produkty byly zaznamenány u většiny vzorků bez ohledu na použitý izolační postup.

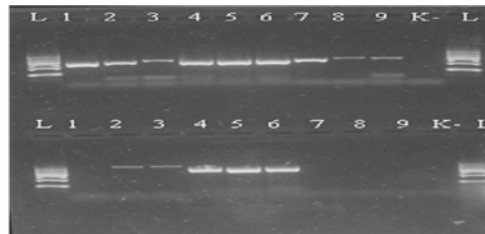
Tabulka 1: Stanovené koncentrace DNA a poměr absorbancí (A 260/280)

Vzorky Podmínky Vzorky	Technologické opracování svaloviny tuňáka								
	1 syrová	2 konzervovaná celá 121 °C	3 konzervovaná mletá 121 °C	4 vařená 70 °C	5 vařená 90 °C	6 uzená 25 °C	7 uzená 60 °C	8 pomazánka	9 Paté
KIT A									
c [ng/μl]	6,4	2,5	2,1	26,8	53,0	42,0	15,6	2,5	1,8
A 260/280	1,8	2,4	1,7	1,9	2,0	1,9	1,5	1,1	2,3
KIT B									
c [ng/μl]	51,1	8,2	6,5	27,2	9,2	51,5	5,8	0,2	2,8
A 260/280	1,7	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	2,0	2,1	2,0
KIT C									
c [ng/μl]	40,4	4,3	2,3	7,1	4,9	9	1,9	24,7	25,4
A 260/280	1,9	2,0	2,2	2,1	1,8	1,8	1,8	1,5	1,5

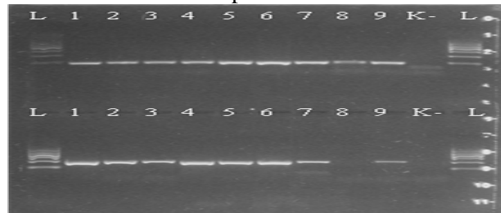
c-koncentrace, A-absorbance



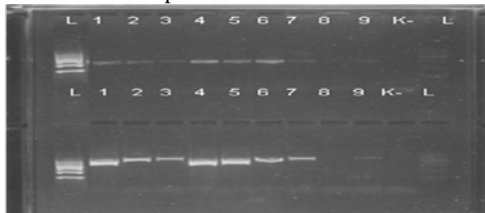
Obr. 1: Kit A 100/200 bp



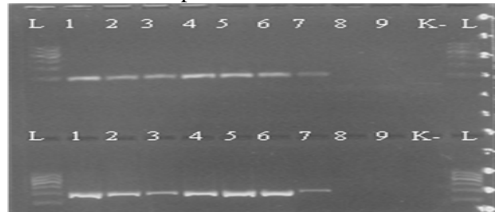
Obr. 2: Kit A 300/500 bp



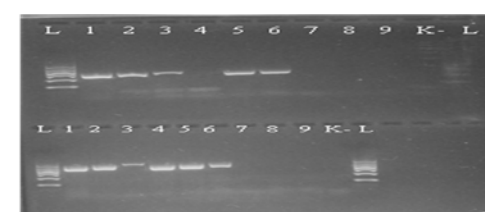
Obr. 3: Kit B 100/200 bp



Obr. 4: Kit B 300/500 bp



Obr. 5: Kit C 100/200 bp



Obr. 6: Kit C 300/500 bp

Obr.

syrová svalovina, 2. celá svalovina konzervovaná, 3. mletá svalovina konzervovaná, 4. vařená svalovina (při 70 °C), 5. vařená svalovina (při 90 °C), 6. uzená svalovina studeným kouřem (při 25 °C), 7. uzená svalovina studeným kouřem (při 60 °C), 8. pomazánka (použita konzervovaná svalovina ve vlastní šťávě), 9. paté (použita konzervovaná svalovina ve vlastní šťávě), L ladder

Závěr

Určení kvality DNA v tuňákových výrobcích závisí na daném opracování a na složení výrobků. Výsledky získané řešením projektu prokázaly míru degradace DNA ve výrobcích připravených pomocí různých technologických postupů. Porovnáním použitých izolačních metod byly zjištěny rozdíly v kvalitativních a kvantitativních parametrech DNA i následné schopnosti PCR amplifikace. Z tohoto důvodu je zapotřebí vyvíjet metody schopné izolovat a detekovat druhově specifickou DNA i ve vysoce technologicky upravených výrobcích.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno č. 229/2016 FVHE

Seznam literatury

Chapela, M., J., Scotelo, C., G., Pérez-Martín, R., I., Pardo, M., A., Pérez-Villareal, B., Gilardi, P., Riese, J. (2007): Comparison of DNA extraction methods from muscle of Cannes tuna for species identification. Food Control. vol. 18, p. 1211-1215.

Espineira, M., Gonzalez-Lavín, N., Vieites, J., M., Santaclara, F., J. (2009): Development of method for identification of sromboid and common substitute species in seafood products by Fins. Food Chemistry. vol. 117, p. 698-704.

Lockley, A., K., Bardsley, R., G. (2000): DNA-based methods for food authentication. Trends in Food Science and Technology, vol. 11, p. 67-77.

Mackie, I. M., Pryde, S. E., Gonzales-Scotelo, C., Medina, I., Pérez-Martín, R., Quentiero, J., Rey-Mendez, M., Rehbein, H. (1999): Challenges in the identification of species of canned fish. Trends in Food Science and Technology, vol.10, p. 9-14.

Nařízení Rady (EHS) 1536/1992, kterým se stanoví společně obchodně normy pro konzervované tuňáky a bonita

Rezidua antidepresiv v povrchových vodách – vliv na raná vývojová stádia ryb

Pavla Sehonová, Zdeňka Svobodová, Lucie Plhalová, Dagmar Farková, Lenka Večerková
*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Vzrůstající spotřeba antidepresiv a nedostatečná účinnost jejich odstranění v čistírnách odpadních vod je hlavní příčinou reziduí těchto látek v povrchových vodách. Ryby představují modelový necílový organismus vodního prostředí při testování vlivu kontaminantů povrchových vod v testech akutní i chronické toxicity (Lammer et al., 2009). Amitriptylin, nortriptylin a klomipramin jsou tricyklická antidepresiva, která se využívají v humánní medicíně k léčbě těžkých depresí. Jejich nevýhodou je celá řada vedlejších účinků na organismus. I když se rezidua těchto látek vyskytují v odpadních a povrchových vodách v poměrně nízkých koncentracích (6,7 µg/l – Kasprzyk-Hordern et al., 2009), jedná se o bioaktivní látky, které mohou mít při chronickém působení nezanedbatelné účinky na organismy vodního prostředí. Cílem této studie bylo posoudit efekt tricyklických antidepresiv amitriptylinu, nortriptylinu a klomipraminu a jejich kombinace na raná vývojová stádia ryb.

Materiál a metodika

Byl proveden 30denní embryolarvální test toxicity dle metodiky OECD 210 – Fish, Early-life Stage Toxicity Test na kapru obecném (*Cyprinus carpio*). Embryolarvální test byl proveden s tricyklickými antidepresivy amitriptylinem (A), nortriptylinem (N), klomipraminem (C) a s kombinací těchto léčiv (ANC). Testována byla environmentální koncentrace 10 µg/l (low – L) a dále odvozená koncentrační řada 50 (medium – M) a 100 (high – H) µg/l. Všechny účinky těchto antidepresiv na ryby v experimentálních skupinách byly porovnávány vůči kontrolní skupině, což byly ryby umístěné pouze v ředící vodě bez přidaných účinných látek. Kromě sledování mortality byly dále v průběhu testu odebírány vzorky pro posouzení délko-hmotnostních parametrů, rychlosti vývoje plůdku a vývojových deformit. Na konci testu byly navíc odebrány vzorky pro posouzení míry lipidní peroxidace a provedení histopatologického vyšetření.

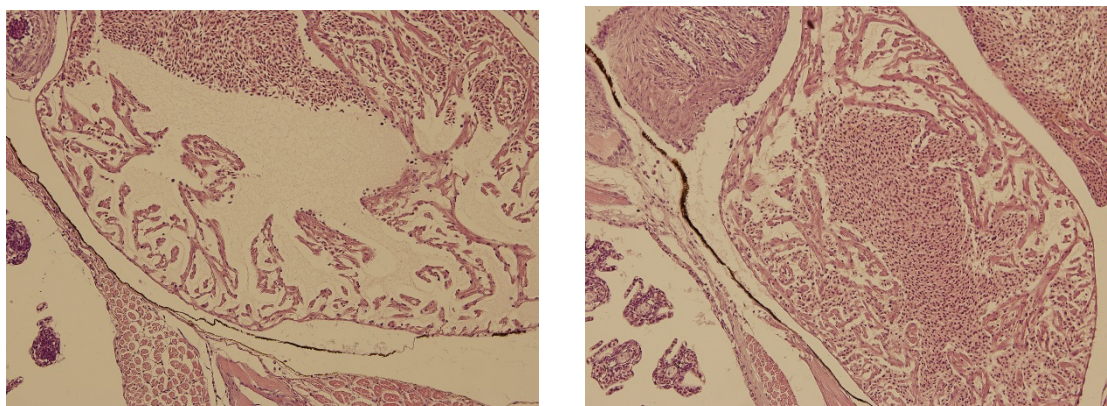
Výsledky

Jedním z nejvýznamnějších pozorovaných efektů testovaných látek na raná vývojová stádia kapra obecného byla mortalita (Tabulka 1). Mortalita u ryb v kontrolní skupině nepřesáhla 20 %, čímž byla splněna jedna z podmínek validity testu dle metodiky. U ryb v nejvyšších koncentracích (H) u všech testovaných antidepresiv včetně jejich kombinace byla mortalita 100 %. Kromě mortality byly dále sledovány významné subletální efekty. Retardace vývoje u jedinců z experimentálních

skupin ve srovnání s kontrolou byla patrna v průběhu celého testu. I na konci testu byly v exponovaných skupinách pozorováni jedinci, kteří ještě neměli naplněný plynový měchýř. Mezi významné vývojové deformity u exponovaných zástupců patří hydratace perikardu, deformace páteře a deformace ocasní ploutve. Tamponáda srdce byla pozorována u všech exponovaných jedinců včetně nejnižší testované koncentrace (Obrázek 1). Dále byla prokázána zvýšená lipidní peroxidace u environmentálně relevantních koncentrací látek, které byly testovány samostatně (A_L , N_L , C_L). Naopak, kombinace testovaných látek v koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$ (ANC_L) neovlivnila hodnotu lipidní peroxidace ve srovnání s kontrolou.

Mortalita (%)		
	Kontrola	14,3
A	A_L	14,7
	A_M	49,3
	A_H	100
N	N_L	15,3
	N_M	21
	N_H	100
C	C_L	22
	C_M	50,3
	C_H	100
ANC	ANC_L	32
	ANC_M	100
	ANC_H	100

Tabulka 1: Mortalita jedinců *C. carpio* (%) v jednotlivých experimentálních skupinách a v kontrole



Obrázek 1: Tamponáda srdce u *C. carpio* exponovaného 10 $\mu\text{g/l}$ klomipraminu (vlevo) ve srovnání s kontrolou (vpravo).

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že i nízké, environmentálně relevantní koncentrace testovaných antidepressiv mají při subchronickém působení nezanedbatelný vliv na organismy vodního prostředí. Jako hodnota LOEC byla stanovena koncentrace 10 µg/l u všech testovaných látek včetně jejich kombinace.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 205/2016/FVHE.

Seznam literatury:

KASPRZYK-HORDERN, B., R.M. DINSDALE a A.J. GUWY. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*. 2009, **43**(2), 363-380. DOI: 10.1016/j.watres.2008.10.047.

LAMMER, E., G.J. CARR, K. WENDLER, J.M. RAWLINGS, S.E. BELANGER a Th. BRAUNBECK. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Water Research*. 2009, **43**(2), 363-380. DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.11.006.

Stanovení základních chemických parametrů zvěřiny prasat divokých

Simona Tesařová^{1,3}, František Ježek¹, Radka Hulánková^{1,3}, Radim Plhal², Gabriela Bořilová^{1,3},
Iva Steinhauserová^{1,3}

Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Mendelova univerzita v Brně², CEITEC - Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³

Úvod

Počet ulovených divokých prasat (*Sus scrofa*) na území České republiky za účelem lidské spotřeby každý rok stoupá. V roce 2015 bylo podle oficiálních statistik uloveno 185 496 kusů černé zvěře (Český statistický úřad, 2016). Celosvětově je známo, že zvěřina má příznivé chemické složení – obsahuje méně nasycených mastných kyselin a naopak obsahuje více bílkovin (Strazdina et al., 2013). Při srovnání zvěřiny prasat divokých a masa prasat domácích bylo zjištěno, že zvěřina z černé zvěře se v mnoha ohledech vyznačuje lepší jakostí (Szmánko et al., 2007).

Cílem studie bylo stanovit základní chemické parametry (sušina, popel, bílkoviny a tuk) u vzorků svaloviny plece, srdce, jazyka a jater prasat divokých prasat a zjistit, zda jsou tyto parametry ovlivňovány intravitálními vlivy (věk, pohlaví, hmotnost).

Materiál a metodika

Vzorky jazyka, srdce, jater a svaloviny z mediální strany plece (*m. teres major*) byly odebrány ihned po ulovení jednotlivých kusů zvěře ve spolupráci s Mendelovou univerzitou v Brně, Lesnickou a dřevařskou fakultou. Analyzovány byly vzorky z celkem 56 kusů černé zvěře, z nichž bylo 26 kusů samčího pohlaví a 30 kusů samičího pohlaví. Odhadovaný věk jednotlivých kusů se pohyboval od 5 do 60 měsíců, živá hmotnost byla mezi 19 a 120 kg. Tyto hodnoty byly zjišťovány a zaznamenány zaměstnanci Lesnické a dřevařské fakulty Mendelovy univerzity v Brně. Odebrané vzorky jazyka, srdce, jater a svaloviny plece při dodržení chladírenských teplot přepraveny na Ústav hygieny a technologie masa FVHE VFU, kde byly zmrazeny a mrazírensky uskladněny. Před vlastními analýzami byly vzorky pozvolna rozmrazeny v chladícím zařízení s teplotou 2 ± 2 °C. Po rozmrazení byly vzorky homogenizovány na mlýnku a navažovány pro konkrétní stanovení. Obsah tuku byl stanoven na přístroji Soxtec 2055 (FOSS, Švédsko). Navážka vzorku byla 3 g a jako extrakční rozpouštědlo byl použit petrolether. Obsah celkových bílkovin (ČSN ISO 937) byl analyzován metodou podle Kjeldahla na analyzátoru Kjeltec 2300 (FOSS, Švédsko), navážka vzorku byla 0,5 g. Obsah sušiny (ČSN 57 6021) byl stanoven z navážky vzorku 10 g v sušárně (BINDER, Rakousko) při teplotě 103 ± 2 °C. Množství popelovin (ČSN ISO 936) bylo stanoveno po mineralizaci vzorku (3 g) v muflové peci (LAC, Česká republika). Ze zjištěných výsledků byla

dopočítána energetická hodnota jednotlivých odebraných částí podle koeficientů vycházejících z Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011. Statistická analýza výsledků byla uskutečněna v programu Microsoft Office Excel 2013 a Statistica 7.0, Statsoft, CZ.

Výsledky

Zjištěné hodnoty vybraných chemických parametrů jazyka, srdce, jater a plece jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Výsledky stanovení obsahu bílkovin v pleci a jazyku ukazují statisticky významný rozdíl ($p = 0,03$ resp. $p = 0,04$) mezi věkovými kategoriemi černé zvěře. Divoká prasata ve věku 0 až 12 měsíců měla nižší obsah bílkovin ve svalovině plece, ale obsahovala větší množství bílkovin ve svalovině jazyka než divoká prasata ve věku 13 až 60 měsíců. To souvisí se zjištěnou signifikantní pozitivní korelací ($r = 0,39$; $p = 0,003$) mezi obsahem tuku v jazyku a věkem

	Obsah tuku				Obsah bílkovin			
	plec (%)	jazyk (%)	srdce (%)	játra (%)	plec (%)	jazyk (%)	srdce (%)	játra (%)
Celkově	0,06 - 3,76	1,07 - 12,27	0,12 - 1,07	0,37 - 2,76	15,03 - 21,72	15,04 - 20,71	16,91 - 20,33	16,73 - 21,00
Samice	0,09-1,94	1,07 - 12,27	0,21 - 1,07	0,37 - 2,76	15,03 - 21,72	15,04 - 20,71	17,12 - 19,17	18,19 - 21,00
Samci	0,06 - 3,76	1,26 - 8,21	0,12 - 0,66	0,86 - 1,68	18,10 - 20,91	15,55 - 19,81	16,91 - 20,33	16,73 - 18,92
do věku 12-ti měsíců	0,14 - 3,76	1,07 - 9,46	0,21 - 0,66	0,61 - 1,68	15,03 - 21,72	15,94 - 20,71	16,91 - 20,33	17,65 - 19,19
od věku 13-ti měsíců	0,06 - 1,94	1,50 - 12,27	0,12 - 0,70	0,37 - 2,76	18,51 - 21,70	15,04 - 20,66	17,41 - 19,17	16,73 - 21,00

vyšetřovaných kusů.

Tabulka 1: Získané hodnoty tuků a bílkovin u kusů černé zvěře

Rozdíly v obsahu tuku v pleci, játrech a srdci mezi věkovými kategoriemi 0 až 12 a 13 až 60 měsíců nebyly shledány jako statisticky významné. Rozdíly byly zjištěny u obsahu tuku v jazyku, přičemž divoká prasata ve věku 0 až 12 měsíců obsahovala signifikantně ($p < 0,001$) méně tuku než starší kusy. Obsah tuku v jazyku významně koreloval s hmotností divokých prasat ($r = 0,32$; $p = 0,015$). U samčího pohlaví byla rovněž zjištěna pozitivní korelace ($p = 0,05$) mezi obsahem tuku v jazyku a odhadovaným věkem.

Vypočítaná energetická hodnota se pohybovala v rozsahu 372,07 až 533,76 kJ.100 g⁻¹ plece, 396,88 až 767,43 kJ.100 g⁻¹ jazyka, 328,26 až 370,06 kJ.100 g⁻¹ srdce a 343,23 až 474,77 kJ.100 g⁻¹ jater.

	Obsah sušiny				Obsah popela			
	plec (%)	jazyk (%)	srdce (%)	játra (%)	plec (%)	jazyk (%)	srdce (%)	játra (%)
Celkově	21,27 - 31,21	23,07 - 37,72	18,56 - 22,20	23,66 - 29,27	0,88 - 1,81	0,85 - 1,42	0,8 - 1,21	1,17 - 3,18
Samice	23,24 - 31,21	23,07 - 23,02	20,60 - 22,20	24,25 - 29,27	0,88 - 1,81	0,89 - 1,42	0,81 - 1,08	1,33 - 3,18
Samci	21,27 - 25,78	23,68 - 37,72	18,56 - 21,06	23,66 - 28,12	0,89 - 1,15	0,94 - 1,18	0,8 - 1,21	1,17 - 1,55
do věku 12 -ti měsíců	22,24 - 25,37	23,07 - 36,23	20,00 - 21,06	23,66 - 28,12	0,88 - 1,08	0,94 - 1,42	1,06 - 1,14	1,26 - 1,55
od věku 13- ti měsíců	21,27 - 31,21	26,75 - 37,22	18,56 - 22,20	25,08 - 29,27	0,94 - 1,81	0,85 - 1,03	0,80 - 1,21	1,17 - 1,68

Tabulka č. 2: Získané hodnoty obsahu sušiny a popela ve vzorcích pocházející z černé zvěř

Závěr

Práce je součástí rozsáhlejšího výzkumu v oblasti kvality zvěřiny divokých prasat. Prvotní zjištěné výsledky ukazují značnou variabilitu v hodnocených jakostních parametrech a vliv intravitálních faktorů na složení zvěřiny získávané v různých honitbách v ČR. Chemické složení ovlivňuje kvalitu zvěřiny i její energetickou hodnotu. Zjištění, která uvádí tato práce, budou využita pro další výzkum a budou dáována do souvislostí s dalšími faktory ovlivňující složení zvěřiny divokých prasat.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 225/2016/FVHE.

Seznam literatury

Český statistický úřad [online]. 2016 [cit. 2016-08-29]. Dostupné z:

<https://www.czso.cz/documents/10180/36741233/1000051606.pdf/e439c492-bddf-4506-8c54-547fd958e32f?version=1.0>

ČSN ISO 1443 Maso a masné výrobky. Stanovení celkového obsahu tuku. Český normalizační institut, 1994, 8 s.

ČSN ISO 936. Maso a masné výrobky - Stanovení celkového popela. Český normalizační institut, 2016 12 s.

ČSN ISO 937 Maso a masné výrobky - Stanovení obsahu dusíku (Referenční metoda). Český normalizační institut, 2002, 8s.

ČSN 57 6021. Metody zkoušení výrobků z masa a sterilovaných pokrmů v konzervách - Stanovení obsahu vody (Referenční metoda). Český normalizační institut, 1999, 8 s.

STRAZDINA, V., JEMELJANOV, A., STERNA, V., IKAUNIECE, D. Nutritional Value of Deer, Wild Boar and Beaver Meat Hunted in Latvia. *International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering*. 2013, **53**, 71-76, DOI: 10.7763/IPCBE.

SZMAŃKO, T., GÓRECKA, J., KORZENIOWSKA, M., MALICKI, A., EEREMENKO, E. Comparison of chosen quality parameters of meat from wild boar and domestic pigs. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2007, **57**, 4(C), 523-528.

NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 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, směrnice Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. In: Úřední věstník Evropské unie, L 304, s. 18 – 63.

Stanovení diverzity *Listeria monocytogenes* v potravinovém řetězci v České republice

Zuzana Tomáščíková^{1,2}, Tereza Gelbíčová², Renáta Karpíšková^{1,2}

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno²

Úvod

Listeria monocytogenes je původcem závažného onemocnění lidí. Bakterie se běžně vyskytuje v prostředí, významný je její výskyt v potravinách a v prostředí potravinářských podniků. Humánní listerióza se vyznačuje nízkou incidencí, avšak vysokou smrtností postižených osob. Vzhledem k dlouhé inkubační době a častému výskytu sporadických případů (Vázquez – Boland a kol. 2001) vyžadují epidemiologická šetření listerióz komplexní přístup s využitím moderních typizačních metod. Tyto metody mohou být používány nejen k epidemiologickým šetřením, ale také k detekci zdrojů a cest šíření *L. monocytogenes* v potravinovém řetězci (Gelbíčová a Karpíšková, 2009). Cílem studie bylo pomocí vybraných typizačních metod (sérotypizace, makrorestrikční analýza) charakterizovat kmeny *L. monocytogenes* získané z potravin a z prostředí potravinářských podniků v České republice. Dalším cílem bylo zavedení nových molekulárně biologických typizačních metod - klonální typizace a celogenomového sekvenování. Na základě výsledků byla stanovena diverzita kmenů a sledovány zdroje a cesty šíření *L. monocytogenes* v potravinovém řetězci v České republice.

Materiál a metodika

Bakteriální izoláty

Bylo vyšetřeno celkem 229 izolátů *L. monocytogenes* izolovaných v období 2013 – 2016 v České republice. Izoláty byly získány ze syrového masa (n = 91), masných výrobků (n = 68), syrového mléka (n = 8), mléčných výrobků (n = 19), lahůdek (n = 7), syrové zeleniny (n = 22), syrového ovoce (n = 1) a z prostředí potravinářských podniků s mléčnou (n = 4) a masnou výrobou (n = 9).

Sérotypizace

Izoláty byly typizovány kombinací metod rychlé sklíčkové aglutinace (stanovení sérotypu) s použitím komerčních antisér (Denka Seiken, Japonsko) a multiplex PCR (stanovení séroskupiny) (Doumith a kol. 2004).

Test citlivosti k antimikrobiálním látkám

Izoláty byly testovány diskovou difuzní metodou na Mueller - Hinton agaru (Oxoid, Anglie) na citlivost vůči sedmi antimikrobiálním látkám: penicilin (1U), erytromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), meropenem (10 µg), tetracyklin (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), ampicilin (2 µg). V případě detekce rezistence bylo u příslušných izolátů pro danou antimikrobiální látku provedeno stanovení minimální inhibiční koncentrace pomocí E – testu (Biomérieux, Francie). Výsledky byly hodnoceny dle mezinárodních standardů (EUCAST 2016), pro gentamicin a tetracyklin byly výsledky hodnoceny podle Vela a kol. (2001).

Makrorestrikční analýza

Makrorestrikční analýza následovaná pulzní gelovou elektroforézou byla provedena v souladu s Pulse-Net-Europe protokolem (2002) s využitím enzymu *AscI* (New England BioLabs, USA). Výsledky byly analyzovány programem Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Belgie).

Klonální typizace

Pro izoláty sérotypů 1/2a a 4b bylo provedeno zařazení do klonálních komplexů pomocí multiplex PCR (Chenal – Francisque a kol. 2015).

Celogenomové sekvenování

U 24 vybraných kmenů byla provedena extrakce DNA kitem MagAttract HMW DNA isolation kit (Quiagen, Německo) s následnou přípravou sekvenačních knihoven s využitím kitů Nextera XT (Illumina Inc., San Diego, USA). Vlastní sekvenace knihoven proběhla na přístroji MiSeq (Illumina, USA). Získaná data (FASTQ files) byla analyzována programem Ridom Seqsphere+ (verze 3.0, Ridom GmbH, Německo) pomocí cgMLST analýzy (core genome Multilocus Sequence Typing): typizace izolátů na základě analýzy 1701 vybraných genů *L. monocytogenes* (Ruppitsch a kol. 2015).

Výsledky

Výsledky vybraných typizačních metod (sérotypizace, klonální typizace a makrorestrikční analýzy) jsou uvedeny v tabulce č. 1. Grafické vyjádření výsledků cgMLST analýzy 24 vybraných kmenů je uvedeno v grafu č. 1. Pomocí programu Ridom Seqsphere+ bylo detekováno celkem 24 klastrových typů (cluster types). Všechny kmeny byly citlivé vůči všem testovaným antimikrobiálním látkám.

Tabulka č. 1: Vlastnosti kmenů *L. monocytogenes* na základě vybraných typizačních metod

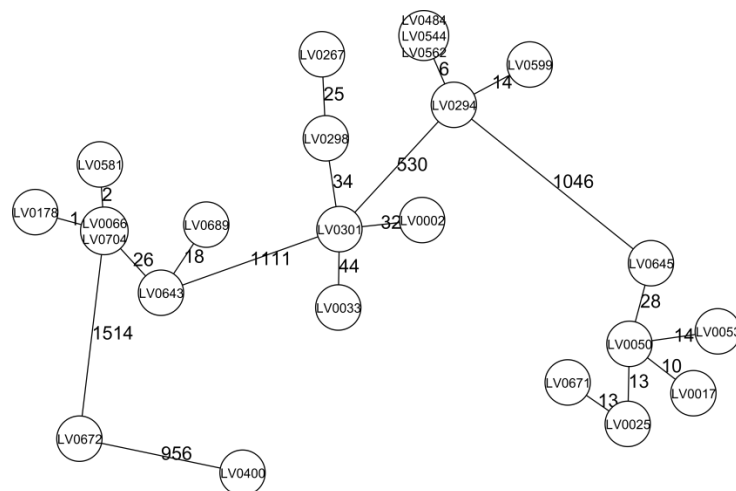
	Séroskupina (počet izolátů)	Sérotyp	Klonální komplex (počet izolátů)	Pulzotyp (počet izolátů)
PO	IIa (132)	1/2a	CC7 (13)	711 (5), 756 (2), 763 (3), 763A (2), 756A (1),

		CC8 (20)	717 (8), 731 (5), 758 (1), 832 (2), 798/810 (4)	
		CC121 (14)	701(4), 715 (4), 720 (5), 765 (1)	
		CC155 (1)	718 (1)	
		Nezařazeno (84)	700 (3), 713 (4), 716 (5), 719 (1), 720 (2), 721 (2), 733 (3), 735 (13), 738 (2), 739 (1), 744 (1), 746 (1), 748 (1), 749 (1), 754 (1), 755 (2), 757 (2), 760 (1), 762 (3), 769 (2), 770 (1), 773 (1), 775 (2), 786 (1), 788 (1), 792 (1), 809 (1), 812 (1), 812A (1), 815 (1), 821 (1), 826 (1), 827 (1), 828 (1), 830 (1), 831 (1), 835 (2), 837 (1), 707/815 (1), 709/816 (1), 722/784 (4), 787/825 (4), 811A (1), 816/709 (2)	
IIb (40)	1/2b	NA (39)	500 (8), 502 (2), 503 (3), 505 (1), 506 (1), 515 (4), 516 (2), 517 (1), 524 (2), 528 (1), 530 (1), 536 (1), 546 (2), 547 (1), 548 (1), 549 (2), 550 (1), 552 (1), 553 (1), 554 (2), 542A (1)	
		Rf	NA (1)	
IIc (16)	1/2c	NA (16)	1 (11), 6 (3), 13 (2)	
IVb (27)	4b	CC1 (8)	204 (3), 211 (1), 213 (2), 214 (1), 222 (1)	
		CC2 (3)	200 (3)	
		CC6 (4)	203 (4)	
		Nezařazeno (2)	223 (1), 229 (1)	
	Rf	CC2 (10)	200 (6), 201 (2), 201A (1), 228 (1)	
IVa (1)	4c	NA (1)	225 (1)	
PR	IIa (9)	CC121 (3)	701 (2), 715 (1)	
		Nezařazeno (6)	700 (1), 719 (3), 719B (1), 754 (1)	
	IIc (1)	1/2c	NA (1)	13 (1)
	IVb (3)	4b	CC6 (1)	203 (1)
Rf			CC2 (2)	200 (2)

PO – kmeny izolované z potravin PR – kmeny izolované z prostředí potravinářských podniků

Rf – kmeny *L. monocytogenes* v drsné (rough) fázi, netytovatelné metodou rychlé skličkové aglutinace

Graf č. 1: Minimum spanning tree (MST) sestavený programem Ridom SeqSphere+ na základě cgMLST analýzy 1701 klíčových genů (core genes) pro 24 kmenů *L. monocytogenes*



V jednotlivých kruzích MST jsou uvedeny názvy kmenů *L. monocytogenes*. Ve stejném kruhu jsou kmeny shodující se ve všech alelách 1701 analyzovaných genů. Čísla na spojnicích mezi kruhy označují počet rozdílných alel mezi izoláty či skupinami izolátů. Kmeny lišící se v maximálně deseti alelách jsou považovány za identické nebo vysoce příbuzné.

V rámci projektu bylo úspěšně charakterizováno 229 izolátů *L. monocytogenes* pomocí vybraných typizačních metod a byly úspěšně zavedeny dvě nové typizační metody. Na základě výsledků použitých metod byla zjištěna značná diverzita bakterií *L. monocytogenes* získaných z potravin a z prostředí potravinářských podniků v České republice.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 206/2016/FVHE.

Seznam literatury:

- DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, CH. AND MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2004, roč. 42, č. 8, s. 3819 – 3822.
- GELBÍČOVÁ, T., KARPÍŠKOVÁ, R. Occurrence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food from retail market in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences*. 2009, roč. 27, s. 3-7.
- CHENAL – FRANCISQUE, V., MAURY, M. M., LAVINA, M., TOUCHON, M. LECLERCQ, A., LECUIT, M. AND BRISSE, S. Clonogrouping, a rapid multiplex PCR method for identification of major clones of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2015, roč. 53, č. 10, s. 3355 – 3358.
- RUPPITSCH, W., PIETZKA, A., PRIOR, K., BLETZ, S., FERNANDEZ, H. L., ALLERBERGER, F., HARMSSEN, D.; MELLMANN, A. Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole - genome sequence – based typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of clinical microbiology*. 2015, roč. 53, č. 9, s. 2869 – 2876.
- VAZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMINIGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZALEZ-ZORN, B., WEHLAND, J. AND KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, roč. 14, s. 584-640.
- VELA, A. I., FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL, J. F., LATRE, M. V., RODRÍGUEZ, A. A., DOMÍNGUEZ, L., MORENO, M. A. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001, roč. 17, č. 3, s. 215-220.

Vliv porušení medu sacharidovými sirupy na jeho jakost a zdravotní nezávadnost

Blanka Zábrodská¹, Michaela Králová¹, Ivana Borkovcová¹, Ďani Đordevič², Lenka Vorlová¹,
Sandra Dluhošová¹

*Ústav hygieny a technologie mléka¹, Ústav hygieny a technologie masa², Fakulta veterinární
hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Med je jednou z nejstarších potravin lidstva. Obsahuje celou řadu nutričně významných látek, uplatňujících se v podpoře a obnově zdraví. Je charakterizován jako potravina přírodního sacharidového charakteru, do které dle platné legislativy nesmí být přidány, s výjimkou jiného druhu medu, žádné jiné látky ani aditiva (Codex Alimentarius, 2011).

V poslední době se med stává čím dál žádanější a nedostatkovější komoditou. Problémem nejsou pouze nevyhovující hodnoty fyzikálně-chemických parametrů, ale stále častější falšování medu. Spotřebitel často konzumuje zcela bezcennou náhražku, někdy však i nebezpečnou směs antibiotik, barviv a hydroxymethylfurfuralu (HMF) (Zábrodská a Vorlová, 2014).

Dle dozorových orgánů je téměř polovina vzorků medu v obchodní síti ČR nějakým způsobem porušena. V České republice převládá falšování medu přidáním sacharidových sirupů, vyrobených zejména z bramborového, kukuřičného a pšeničného škrobu, dále sirupů invertovaných a vysokofruktózových. Dalším problémem je přikrmování včel takovými roztoky nebo krystalickou sacharózou (SZPI, 2016).

Cílem práce bylo zjištění vlivu příměsí různých koncentrací sacharidových sirupů na jakost a zdravotní nezávadnost medu v průběhu půl roku skladování.

Materiál a metodika

Vzorky

Květové (n = 4) a medovicové medy (n = 4) byly nakoupeny v obchodních řetězcích dle dostupnosti na českém trhu v dubnu 2016. Jako deklarované země původu byly uvedeny Česká republika, Turecko – Egejská oblast, Toskánsko – Itálie, směs medů z zemí ES a zemí mimo ES a směs medů ze zemí mimo ES. Sacharidové sirupy Apifood a Apivital byly také nakoupeny v obchodních řetězcích dle dostupnosti na českém trhu v dubnu 2016. Medy i sirupy byly uchovány ve skleněných nebo plastových prodejních obalech při pokojové teplotě 25 ± 5 °C.

Vytvoření směsí

Okamžitě po nákupu byly vytvořeny směsi medů se sirupy Apifood a Apivital v koncentracích 10%, 15% a 20% do výsledných objemů 100 g.

Fyzikálně-chemická analýza

U vzorků medu, sirupů a u směsí medů se sirupy byly stanoveny základní fyzikálně-chemické parametry, tj. obsah vody, elektrická vodivost, titrační kyselost, obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF), aktivita diastázy a pH. Tyto parametry byly stanoveny dle metod popsanych v Harmonizovaných metodách Evropské komise pro med (Bogdanov, 2009). Analýzy proběhly opakovaně a to v dubnu, červenci a říjnu 2016.

Zpracování dat

Výsledky analýz byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) a statistickým softwarem SPSS verze 20 pro Windows (SPSS IBM Corporation, Armonk, USA) testem ANOVA.

Výsledky

Tabulka č. 1: Fyzikálně-chemické parametry vzorků medu, sirupů Apifood a Apivital a směsí medů se sirupy (základní statistické funkce) – 1. analýza

Medy	Voda [%]	Vodivost [mS/m]	Kyselost [mekv/kg]	HMF [mg/kg]	Diastáza [Schade]	Diastáza [Phadebas]	pH
Průměr	16,80 ^a	77,40	27,63	16,15	16,52	15,24	4,29
Max	18,00	145,16	40,00	27,12	23,11	23,31	4,65
Min	15,80	21,24	14,00	5,41	11,13	7,61	3,96
Median	16,70	64,86	28,00	14,47	16,51	15,43	4,31
SD	0,73	49,51	11,04	8,52	4,44	5,94	0,23
Apifood	21,20	1,43	4,00	41,20	0,22	0,05	3,51
Apivital	27,30	1,92	3,00	4,93	0,00	0,50	6,67
Směsi medy + Apifood - 10 %, 15 %, 20 %							
Průměr	17,55 ^b	62,83	23,79	17,28	14,99	12,74	4,27
Max	19,00	121,36	36,00	28,91	21,42	19,67	4,69
Min	16,40	17,70	11,00	5,90	10,11	5,84	3,96
Median	17,40	51,82	25,00	17,57	15,20	12,91	4,24
SD	0,71	37,60	9,06	7,13	3,63	4,77	0,25
Směsi medy + Apivital - 10 %, 15 %, 20 %							
Průměr	18,36 ^c	63,70	24,33	13,50	14,85	12,98	4,22
Max	19,80	119,53	38,00	25,57	21,68	21,41	4,61
Min	17,00	17,24	11,00	4,67	9,70	6,15	3,90
Median	18,40	52,22	25,00	10,63	14,52	12,22	4,19
SD	0,67	38,42	9,59	7,08	3,90	5,05	0,23

* rozdílná malá písmena (a, b, c) ukazují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$); SD – směrodatná odchylka

Tabulka č. 2: Fyzikálně-chemické parametry vzorků medu, sirupů Apifood a Apivital a směsí medů se sirupy (základní statistické funkce) – 2. analýza

Medy	Voda [%]	Vodivost [mS/m]	Kyselost [mekv/kg]	HMF [mg/kg]	Diastáza [Phadebas]	pH
Průměr	17,15 ^a	66,91	30,38	21,33	14,79	4,33
Max	18,40	124,86	44,00	38,77	23,07	4,75
Min	16,20	18,55	15,00	7,66	7,61	3,98
Median	17,00	55,95	31,75	17,78	14,79	4,27
Sm. Odch.	0,78	42,65	12,09	11,71	5,74	0,27
Apifood	21,20	1,73	6,50	44,49	0,09	3,45
Apivital	28,00	1,92	4,50	4,36	0,00	5,36
Směsi medy + Apifood - 10 %, 15 %, 20 %						
Průměr	17,93 ^b	58,23	27,35	17,28	12,08	4,27
Max	19,20	114,35	40,50	29,10	19,68	4,65
Min	16,60	16,05	13,00	6,77	5,53	3,97
Median	17,80	48,25	29,25	16,22	12,14	4,24
Sm. Odch.	0,72	35,22	9,89	7,50	4,58	0,23
Směsi medy + Apivital - 10 %, 15 %, 20 %						

Průměr	18,85 ^c	62,33	27,52	14,98	12,27	4,27
Max	20,60	122,15	41,00	27,23	19,50	4,65
Min	17,60	16,61	13,00	5,94	5,87	3,95
Median	18,80	51,13	29,00	12,73	11,83	4,25
Sm. Odch.	0,70	38,08	9,93	6,88	4,73	0,22

* rozdílná malá písmena (a, b, c) ukazují statisticky významný rozdíl (p < 0,05)

Tabulka č. 3: Fyzikálně-chemické parametry vzorků medu, sirupů Apifood a Apivital a směsí medů se sirupy (základní statistické funkce) – 3. analýza

Medy	Voda [%]	Vodivost [mS/m]	Kyselost [mekv/kg]	HMF [mg/kg]	Diastáza [Phadebas]	pH
Průměr	16,95 ^a	84,69	33,25	25,08 ^a	14,25	4,29
Max	18,40	158,58	46,50	44,85	22,48	4,67
Min	15,80	23,55	17,00	8,95	6,84	4,00
Median	16,70	70,67	35,25	23,95	14,45	4,26
Sm. Odch.	0,85	54,16	12,30	13,00	5,94	0,25
Apifood	20,80	2,29	10,50	44,59	0,15	3,46
Apivital	27,90	2,34	5,50	3,77	0,15	5,07
Směsi medy + Apifood - 10 %, 15 %, 20 %						
Průměr	17,76 ^b	72,74	31,67	18,19	11,84	4,29
Max	19,00	141,42	47,00	30,76	18,90	4,68
Min	16,40	19,21	16,00	8,17	5,44	4,01
Median	17,60	59,50	33,25	15,12	11,96	4,25
Sm. Odch.	0,78	43,39	11,34	7,46	4,46	0,23
Směsi medy + Apivital - 10 %, 15 %, 20 %						
Průměr	18,89 ^c	74,37	29,08	15,58 ^b	11,76	4,20
Max	20,60	145,81	41,00	28,38	19,19	4,59
Min	17,80	20,24	14,00	7,90	5,32	3,90
Median	18,90	61,33	31,75	13,41	11,64	4,18
Sm. Odch.	0,75	45,02	9,59	6,07	4,65	0,22

* rozdílná malá písmena (a, b, c) ukazují statisticky významný rozdíl (p < 0,05)

Tabulka č. 4: Procentuální rozdíly mezi průměrnými hodnotami medů a směsí medů se sirupy Apifood a Apivital

Analyt	Směs	1. analýza	2. analýza	3. analýza
Voda [%]	Apifood	+ 4,76 %	+ 4,55 %	+ 4,78 %
	Apivital	+ 9,52 %	+ 9,91 %	+11,45 %
Vodivost [mS/m]	Apifood	- 18,90 %	- 12,97 %	- 14,11 %
	Apivital	- 17,77 %	- 6,85 %	- 12,19 %
Kyselost [mekv/kg]	Apifood	- 13,86 %	- 10,3 %	- 4,75 %
	Apivital	- 12,05 %	- 9,47 %	- 12,54 %
HMF [mg/kg]	Apifood	+ 7 %	- 18,99 %	- 27,47 %
	Apivital	- 16,41 %	- 29,77 %	- 37,88 %
Diastáza	Apifood	- 9,26 %	x	x

[Schade]	Apivital	- 10,11 %	x	x
Diastáza [Phadebas]	Apifood	- 16,40 %	- 18,32 %	- 16,91 %
	Apivital	- 14,83 %	- 17,04 %	- 17,47 %
pH	Apifood	- 0,47 %	- 1,39 %	0 %
	Apivital	- 1,63 %	- 1,39 %	- 2,1 %

Závěr

Med je jednou z nejžádanějších komodit, vzhledem k jeho pozitivnímu vlivu na lidské zdraví. Proto je nezbytné zaobírat se vztahem porušení medu sacharidovými sirupy ke změnám jeho legislativních parametrů pro odhalení možného falšování. V průběhu studie byl zjištěn statisticky významný rozdíl u obsahu vody medů a směsí medů s přidavkem sacharidových sirupů v průběhu celé doby skladování a u obsahu HMF medů a směsí medů a Apivitalu po půl roce skladování. Nelze však opomenout ani vliv příměsí sirupů na aktivitu diastázy, vodivost a kyselost medu. Je tedy důležité pokračovat ve studii se zaměřením na možnosti detekce sacharidových sirupů v medu.

Seznam literatury

Seznam literatury je k dispozici u autora blankazabrodka@seznam.cz.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 214/2016/FVHE.

Příspěvky
Farmaceutické fakulty

Příprava inovativního nosiče pro enzymatickou detekci inhibitorů cholinesteráz

Jiří Zeman¹, David Vetchý¹

Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Inhibitory cholinesteráz, jako jsou organofosfátové nervové plyny (soman, sarin, tabun, VX, atd.), organofosfátové (parathion, malathion) a karbamátové (karbofuran) pesticidy, jsou velmi nebezpečné látky, které u zvířat a lidí mohou vyvolat vážné zdravotní potíže a mohou vést až k úmrtí intoxikovaného organismu (1). V současné době je z důvodu častých teroristických útoků a neustálých bojů na Blízkém východě vysoké riziko použití právě takovýchto bojových plynů. Z výše uvedených důvodů je vysoká potřeba levného, jednoduchého, přenosného, citlivého a spolehlivého detektoru těchto látek. Skleněné detekční trubičky jsou právě jedním z takovýchto detektorů využívaných i Českou armádou (2). Detekce je založena na enzymatické kolorimetrické Ellmanově reakci, jejíž nevýhodou je však málo intenzivní barevný přechod bílá/žlutá. Cílem práce tedy bylo vyvinout inovativní nosič, který by měl při detekci tuto barevnou změnu výraznější, při zachování vysoké citlivosti detektoru a dostatečné rychlosti reakce.

Materiály

Mikrokrytalická celulóza (Avicel PH 101, FCM Biopolymer, Irsko), mikrokrytalická celulóza a sodná sůl karboxymethylcelulosity (Avicel RC 581, FCM Biopolymer, Belgie), laktosa (Pharmatose[®] 200 M, DMV International, Nizozemsko), syntetický, amorfní magnesium aluminometasilikát (Neusilin[®] US-2, Fuji Chemical Industry, Japonsko), polyvinylpyrrolidon (Kollidon 90, AppliChem GmbH, Německo) a tlumivý roztok o pH 7,4 (ČL 2009) byly použity pro přípravu nosiče ve formě sférických pelet. Dihydrogen fosforečnan draselný, dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, dextran (Sigma-Aldrich, USA), minerální voda Magnesia[®] (Karlovarské minerální vody, a. s., Česká republika), butyrylcholinesteráza (Sigma-Aldrich, Švýcarsko), Slovasol SF-10 (Slovchema, Slovensko) byly použity pro impregnaci pelet. Pro účely zkoušky aktivity a inhibice byla použita 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) kyselina (Ellmanovo činidlo, Fluka Sigma-Aldrich, USA), S-butyrylthiocholin jodid (Sigma-Aldrich, Švýcarsko), fyzostigmin (Aldrich Chem. Co., USA) a čištěná voda (ČL 2009). Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty.

Metodika

Příprava pelet

Prášková směs byla nejprve pomocí mixéru Stephan UMC 5 electronic zhomogenizována (5 min, 1500 rpm) a poté bylo ke směsi přidáno vlhčivo (70 ml/min). Z navlhčené směsi byly pelety připraveny metodou extruze/sferonizace na jednošnekovém axiálním extrudéru a sferonizéru PharmTex 35T (extruze - 110 rpm, 1,00 mm mřížka; sferonizace - 1000 rpm, 20 min). Bylo připraveno dvakrát pět šarží o různém složení (Tab. 1), které byly sušeny v horkovzdušné sušárně Horo 038A při dvou různých teplotách - 30 °C/72 hod a 60 °C/24 hod.

Vzorek	N0-x*	N15-x*	N25-x*	N35-x*	N45-x*
Prášková směs (g)					
Pharmatose® 200 M	98,70	68,70	48,70	28,70	28,70
Neusilin® US-2	-----	30,00	50,00	70,00	90,00
Avicel PH 101	81,00	81,00	81,00	81,00	65,00
Avicel RC 581	20,30	20,30	20,30	20,30	16,30
Vlhčivo (g)					
Pufir pH 7,4	69,60	134,85	169,65	187,05	200,10
Kollidon 90	10,40	20,15	25,35	27,95	29,90

Tab. 1: Složení pelet

* kde x je 30 nebo 60 dle teploty sušení

Impregnace pelet

Připravené pelety se na 15 minut ponořily do impregnačního roztoku tvořeného 40 - 1200 µl zásobního roztoku butyrylcholinesterázy, 5 % dextranu, 0,5 % Slovasolu SF-10 a fosfátovým pufrem o pH 7,6. Na 100 g pelet bylo použito 80 ml tohoto roztoku. Pelety se následně sušily při 35 °C/24 hod.

Metody hodnocení pelet

Střední velikost částic (mm) byla vypočítána na základě výsledků síťové analýzy dle vzorce: $d = (\sum x_i \cdot d_i) / 100 [mm]$, kde x_i je aritmetický průměr (mm) velikostí ok dvou na sebe navazujících sít a d_i je hmotnostní procento částic o velikosti v rozmezí těchto dvou sít.

Pevnost (N) pelet byla změřena na přístroji pro měření pevnosti tablet s použitím nástavce pro měření pevnosti pelet. Změřila se pevnost deseti náhodně vybraných pelet a vypočítal se průměr.

Intrapartikulární porozita (%) se vypočítala z pyknometrické hustoty pelet (ρ_p) a jejich práškové směsi (ρ_{ps}) dle rovnice: $P_{INTRA} = (1 - \rho_p/\rho_{ps}) \cdot 100 [\%]$.

Sféricita byla vyhodnocena optickou analýzou 200 pelet každé šarže s použitím mikroskopu a daného softwaru dle rovnice: $S = 4\pi A/p^2$, kde A je povrch pelet (mm^2) a p je jejich obvod (mm).

Aktivita pelet byla vyhodnocena organolepticky dle Ellmanovy kolorimetrické reakce. Do skleněné detekční trubičky o poloměru 0,5 cm byly nasypány pelety o výšce sloupce cca 1 cm. Pelety se navlhčily 0,2 ml čištěné vody a po 2 minutách byl přidán roztok detekčního činidla o stejném objemu. Sledovala se barevná změna v časech 30, 60, 90, 120, 180 a 300 s. Enzym byl aktivní, pokud došlo k viditelnému žlutému zbarvení do 2. minuty. *Inhibice* se hodnotila obdobným způsobem, ale byly pelety nejprve inhibovány 0,2 ml roztoku fyzostigminu o různých koncentracích po dobu 10 min. Následně byl přidán stejný objem detekčního činidla. Enzym se považoval za inhibovaný, pokud nedošlo k vývoji žlutého zbarvení do konce 2. minuty.

Výsledky

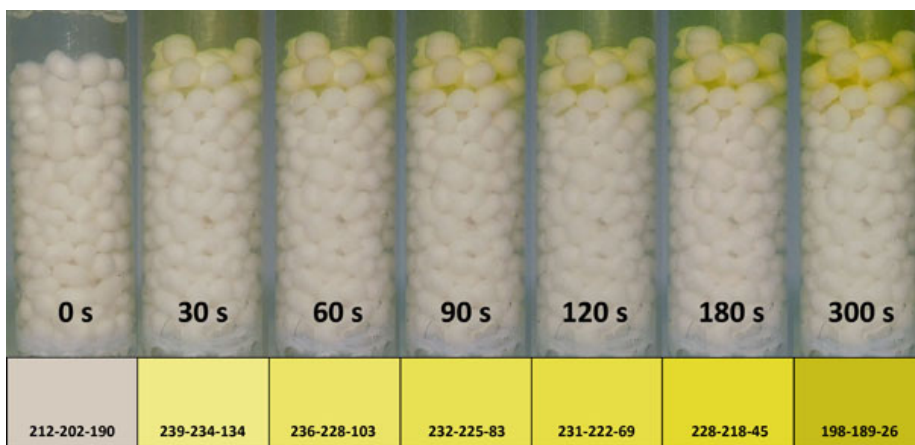
Naměřené výsledky jakostních parametrů, testů aktivity a inhibice pelet jsou shrnuty v Tabulce 2. Výraznější barevný přechod u pelet šarže N45-30 ve srovnání s šarží N0-30 neobsahující Neusilin[®] je znázorněn na Obrázcích 1 a 2.

Vzorek	Střední velikost částic (mm)	Pevnost (N)	Intrapartikulární porozita (%)	Sféricita	Aktivita (s)*	Inhibice ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)**
N0-30	0,80	8,58 ± 1,58	2,85	0,858 ± 0,061	20	0,25
N15-30	1,14	15,26 ± 3,07	4,74	0,944 ± 0,028	15	0,25
N25-30	1,21	17,57 ± 1,66	6,50	0,949 ± 0,033	15	0,5
N35-30	1,18	16,14 ± 3,11	6,62	0,908 ± 0,046	15	0,5
N45-30	1,22	14,74 ± 2,57	6,62	0,904 ± 0,050	10	0,5
N0-60	0,81	8,84 ± 1,34	3,19	0,841 ± 0,070	20	0,25
N15-60	1,03	15,03 ± 1,33	3,93	0,931 ± 0,046	10	0,5
N25-60	1,05	14,07 ± 1,24	4,58	0,946 ± 0,033	20	0,5
N35-60	1,05	16,27 ± 1,45	7,33	0,923 ± 0,046	20	0,5
N45-60	1,07	16,22 ± 2,04	14,91	0,932 ± 0,043	15	0,5

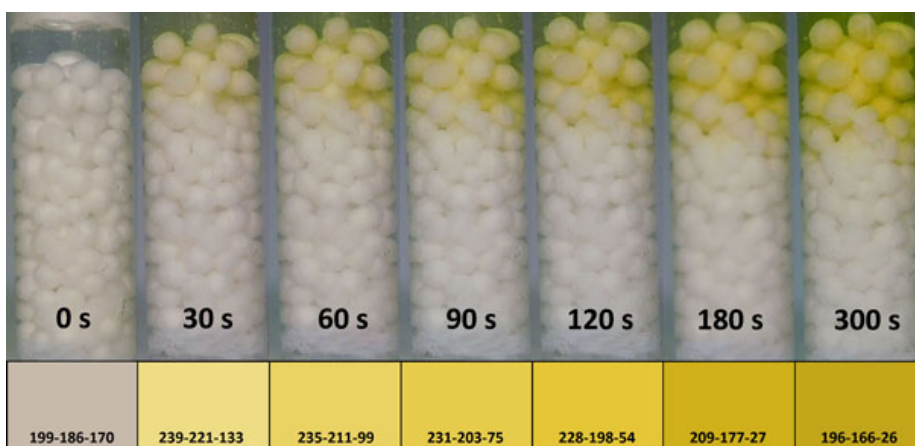
Tab. 2: Naměřené výsledky provedených zkoušek

* čas potřebný ke vzniku žlutého zbarvení pelet po aplikaci Ellmanova činidla

** koncentrace fyzostigminu, která inhibovala barevnou reakci po dobu alespoň 2 minut



Obr. 1: Test aktivity vzorku N0-30



Obr. 2: Test aktivity vzorku N45-30

Závěr

Experimentem byl zjištěn unikátní vliv Neusilinu[®] na vlastnosti připravených nosičů pro detekci inhibitorů cholinesteráz. Tento vliv se týká hlavně zlepšení pevnosti, intrapartikulární porozity, sféricity a aktivity u vzorků obsahujících Neusilin[®] ve srovnání se vzorky bez Neusilinu[®]. Navíc bylo dosaženo výraznějšího barevného přechodu bílá/žlutá ve srovnání se vzorky bez Neusilinu[®]. Vyšší teplota sušení pelet vedla k uzavření většího množství pórů ve struktuře nosiče, což vedlo ke snížení celkového povrchu pro impregnaci enzymem, a tím k nižší enzymatické aktivitě u těchto pelet.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 301/2016/FaF.

Seznam literatury:

- 1) VALE, Allister, MARRS, Timothy, RICE, Paul. Chemical terrorism and nerve agents, *Medicine*. 2016, **44**, 106-108. ISSN 1357-3039.
- 2) PITSCHMANN, Vladimír, HALÁMEK, Emil, KOBLIHA, Zbyněk, TUŠAROVÁ, Ivana, Development of detection tubes for chemical warfare agents in the Czech Republic. *Chemické Listy*. 2011, **105**, 334–345.

Obsahové látky *Coleus blumei* Benth. a *Coleus caninus* (Roth.) Vatke

Sabína Jurkaninová, Renata Kubínová

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Rod *Coleus* (*Lamiaceae*) zahŕňa viac ako 300 druhov rastlín pochádzajúcich z tropických a subtropických oblastí Ázie a je široko distribuovaný v Afrike, južnej Amerike a Austrálii. Rastliny tohto druhu oplývajú širokou škálou farieb a rôznym tvarom listov a pestujú sa ako okrasné rastliny v Európe.

Jedným z najvýraznejších je druh *Coleus blumei* Benth., zdroj látok flavonoidnej povahy, derivátov kyseliny kávovej a diterpénov. *Coleus caninus* (Vath.) Rotke obsahuje silice vykazujúce širokospektrálny antimikrobiálny účinok, *Coleus aromaticus* (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng) je široko využívaný v ľudovom liečiteľstve pre svoju antibakteriálnu, protinádorovú a antiflogistickú aktivitu (1).

Materiál a metodika

Extrakcia a separácia

Rastlinný materiál bol získaný zo skleníka ÚPL FaF VFU v Brne.

200 g zmrazených nadzemných častí rastlín *C. blumei* Benth. a Vatke bolo extrahovaných 1000 ml methanolu. Zahustený extrakt bol vytrepaný s chloroformom a ethylacetátom a získaný chloroformový a ethylacetátový podiel. Ďalších 100 g zmrazeného druhu *C. blumei* Benth. sa extrahovalo 400 ml étheru. 200 g *C. caninus* (Vath.) Rotke a *C. aromaticus* Benth. sa extrahovalo methanolom. Jednotlivé extrakty boli zahustené na rotačnej vákuovej odparke. Izolácia jednotlivých látok prebiehala pomocou preparatívnej HPLC a kolónovej chromatografie.

Inštrumentálne metódy

NMR spektrá boli zaznamenávané použitím Bruker DRX-400 (400 MHz) (BRUKER, USA) v CDCl₃. IČ spektrá boli zaznamenávané FTIR spektroskopiou 410 Nicolet (ThermoScientific, USA). HPLC/DAD/MS analýza sa prevádzala pomocou zariadenia Agilent technologies 1100 na kolóne Supelcosil ABZ+Plus 150 x 4,6mm; veľkosť častíc 3 μm, gradientovou elúciou. Prietok 1 ml/min. Nástrek 10 μl. MS-ESI – negatívny mód. Preparatívna HPLC bola prevádzaná na kolóne Ascentis 25 x 2,5 cm, veľkosť častíc 5 μm, gradientovou elúciou. Prietok 4 ml/min. Nástrek 30 μl. Stĺpcová chromatografia bola vykonávaná v sklenenej kolóne s použitím silikagélu. Eluovala

sa zmesou chloroformu s metanolom so vzrastajúcou polaritou. Antioxidačná, antiflogistická a hyaluronidázová aktivita boli merané Reader-om (BioTek Synergy HT, USA).

Stanovenie antioxidačnej aktivity

Zhášanie peroxynitritu produkovaného termolýzou (3-morfolinosydnonimin) SIN-1 (1mM) a peroxylového radikálu generovaného termolýzou AAPH (2,2'-diazobis(2-amidinopropan) dichlorid) (1mM) bolo testované chemiluminiscenčnou metódou s luminolom (1mM) (2,3). Meranie sa prevádzalo po dobu 30 minút. Zhášanie peroxidu vodíka bolo testované taktiež chemiluminiscenčnou metódou s luminolom (4). Meranie sa prevádzalo po dobu 5 minút. Zhášanie superoxidového radikálu (4) generovaného systémom xantín-xantínoxidáza (xantín, 30 μ M) bolo testované chemiluminiscenčnou metódou s lucigenínom (1mM). Meranie sa prevádzalo po dobu 5 minút.

Pri testovaní antioxidačnej aktivity sa stanovovala plocha pod krivkou (AUC). AUC vzorky (AUC_{vzorka}) sa stanovovala v štyroch opakovaníach. Ako kontrolný roztok sa použil metanol (AUC_{kontrola}). Zhášací efekt (%) sa počítal podľa vzorca: $\% = (1 - (AUC_{vzorka} / AUC_{kontrola})) * 100$

Stanovenie anti-hyaluronidázovej aktivity

Anti-hyaluronidázová aktivita bola testovaná Morgan-Elsonovou metódou (5) s menšími modifikáciami. Absorbancia zmesi sa stanovovala v 3 opakovaníach a bola meraná pri 585 nm. Slepá vzorka obsahovala namiesto enzýmu pufor, kontrola obsahovala metanol.

Enzymová aktivita (%) bola počítaná podľa vzorca: $\% = [1 - ((A_{vzorka} - A_{slepá}) / A_{kontrola})] * 100$

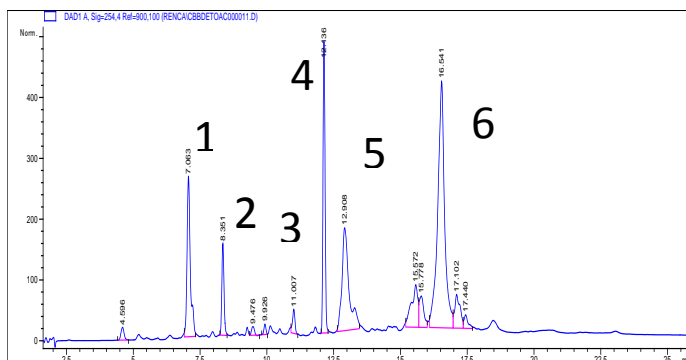
Stanovenie anticyklooxygenázovej aktivity

Anticyklooxygenázová aktivita sa zameriava na peroxidázovú zložku cyklooxygenázy (COX). Peroxidázová aktivita bola stanovená kolorimetricky monitorovaním oxidácie N,N,N',N'-tetrametyl-*p*-fenyléndiamínu (TMPD) pri 590 nm s využitím komerčne dodávaného kitu. Absorbancia zmesi sa stanovovala v 3 opakovaníach a bola meraná pri 590nm. Enzymová aktivita (%) bola počítaná podľa vzorca: $\% = [1 - ((A_{vzorka} - A_{slepá}) / A_{kontrola})] * 100$

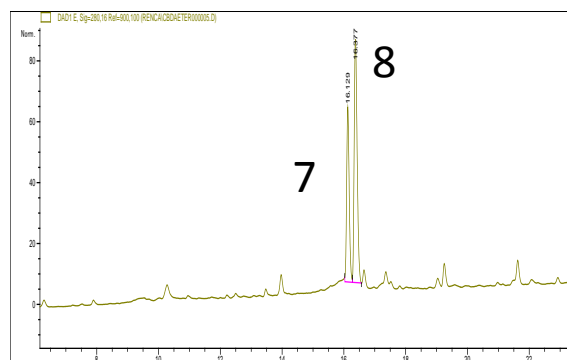
Výsledky

Z ethylacetátovej frakcie metanolického extraktu *C. blumei* Benth. (Obr. 1) sa nám podarilo preparatívnou HPLC vyizolovať 5 látok, kyselinu kávovú (1), luteolín-5-*O*-glukozid (2), diterpenoid (13S,15S)-6 β ,12 α -dihydroxy-13 β ,16-cyklo-8-abietén-11,14-dión-7-*O*- β -D-glukozid (3), kyselinu rozmarínovú (4), apigenín-7-*O*-(3''-*O*-acetyl)- β -D-glukuronid (5), apigenín-5-*O*-(3''-*O*-acetyl)- β -D-glukuronid (6). Identifikácia prebehla porovnaním so štandardmi, pomocou MS a FTIR spektroskopie (1, 2, 4). Ďalšie boli identifikované pomocou NMR (3, 5, 6). Látka 3 bola pomenovaná ako spirocoleon-7-*O*- β -D-glukozid. Z éterového extraktu *C. blumei* Benth. (Obr. 2) sa

nám podarilo vyizolovať 2 látky, luteolín (7) a nepetoidín B (8), identifikované porovnaním so štandardmi a pomocou MS spektroskopie (7) a NMR (8).

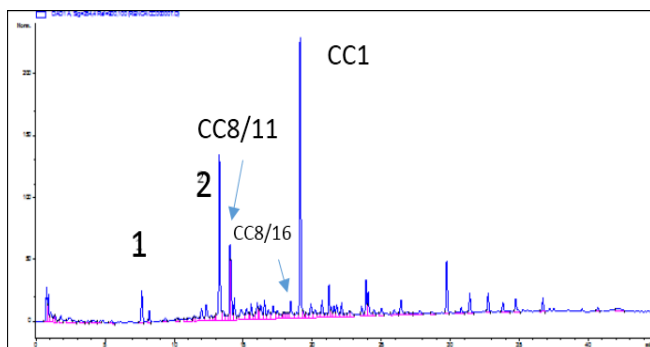


Obr.č.1: HPLC záznam ethylacetátového extraktu *C. blumei* Benth.

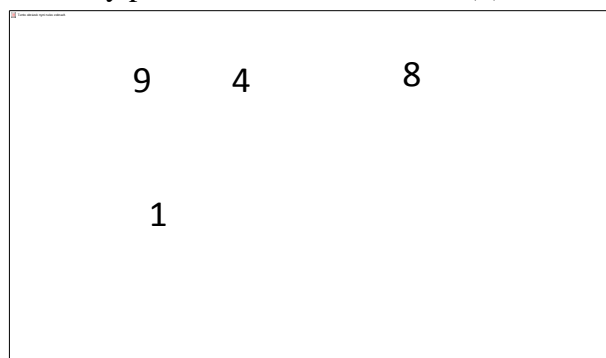


Obr.č.2: HPLC záznam éterového extraktu *C. blumei* Benth

Z chloroformovej frakcie methanického extraktu *C. blumei* Benth. sa podarilo kolónovou chromatografiou a preparatívnou HPLC vyizolovať látku CBCh 19/14 ($M_r=407$). Bolo zmerané NMR, identifikácia štruktúry však nie je ešte dokončená. V methanickom extrakte *C. caninus* (Vath.) Rotke (Obr. 3) sa nám podarilo identifikovať dve látky porovnaním so štandardmi a literatúrou, kyselinu kávovú (1) a kyselinu rozmarínovú (4). Kolónovou chromatografiou a preparatívnou HPLC sa podarilo vyizolovať látky CC8/11, CC8/16 a CC1, ktorých presnú štruktúru zatiaľ nepoznáme, na základe porovnania s literatúrou však predpokladáme, že sa jedná o látky terpenoidnej štruktúry. Rod *Coleus* je bohatý na diterpény a triterpény (1). V methanickom extrakte *C. aromaticus* (Obr. 4) sa podarilo identifikovať tri látky porovnaním so štandardmi a literatúrou, kyselinu kávovú (1), kyselinu rozmarínovú (4) a nepetoidín B (8). Preparatívnou HPLC bol potom vyizolovaný a identifikovaný pomocou NMR vicenín-2 (9).



Obr.č.3: HPLC záznam MeOH extraktu *C. caninus* (Vath.)Rotke



Obr.č.4: HPLC z. MeOH extraktu *C. aromaticus*. a UV spektrá

Do štúdie biologickej aktivity boli zaradené látky, ktorých identifikácia bola dokončená. Látky boli podrobené testovaniu antioxidantnej aktivity (Tab. 1) a inhibícii enzýmu hyaluronidáza a cyklooxygenáza (Tab. 2).

Tab. 1: Antioxidačná aktivita látok, kvercetín bol použitý ako štandard

60 μ M/zhášanie (%)	Peroxylový radikál	Peroxynitrit	Peroxid vodíka	Superoxidový radikál
Kyselina kávová	66,3 \pm 3,9	75,8 \pm 2,6	51,1 \pm 2,9	97,6 \pm 1,5
Kyselina rozmarínová	92,5 \pm 3,6	99,9 \pm 0,1	99,0 \pm 0,1	93,1 \pm 2,5
Luteolín-5-O-glukozid	66,1 \pm 3,4	89,2 \pm 3,4	52,1 \pm 6,3	96,8 \pm 0,3
Apigenín-7-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid	89,8 \pm 4,7	66,4 \pm 3,3	29,1 \pm 2,5	87,7 \pm 1,3
Apigenín-5-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid	63,6 \pm 6,1	48,6 \pm 2,3	Nezháša	54,4 \pm 3,9
Spirocoleon-7-O- β -D-glukozid	37,9 \pm 1,3	31,8 \pm 3,3	35,3 \pm 6,8	70,5 \pm 2,8
Nepetoidín B	81,6 \pm 2,8	99,3 \pm 0,2	94,2 \pm 1,5	97,2 \pm 0,2
Luteolín	84,9 \pm 1,0	99,4 \pm 0,1	78,9 \pm 1,5	97,9 \pm 1,3
Vicenín-2	62,6 \pm 1,4	22,6 \pm 3,4	Nezháša	10,6 \pm 1,4
Kvercetín	92,4 \pm 2,3	99,8 \pm 0,1	98,7 \pm 0,1	90,0 \pm 0,8

Tab. 2: Inhibícia enzýmov. Kvercetín a indometacín boli použité ako štandardy. Látky sú v koncentrácii 200 μ M pre hyaluronidázu a 100 μ M pre COX.

Látky	Hyaluronidáza (%)	COX-1 (%)	COX-2 (%)
Kyselina kávová	11,7 \pm 0,9	n.i.	n.i.
Kyselina rozmarínová	29,5 \pm 0,7	n.i.	n.i.
Luteolín-5-O-glukozid	10,6 \pm 2,0	n.i.	n.i.
Apigenín-7-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid	10,0 \pm 4,3	n.i.	n.i.
Apigenín-5-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid	13,9 \pm 4,4	n.i.	n.i.
Spirocoleon 7-O- β -D-glukozid	24,5 \pm 2,1	38,3 \pm 9,2	15,1 \pm 7,4
Nepetoidín-B	21,1 \pm 1,9	10,9 \pm 20,8	21,4 \pm 2,1
Luteolín	80,2 \pm 1,9	n.i.	n.i.
Vicenín-2	33,7 \pm 4,8	17,8 \pm 1,8	n.i.
Kvercetín	89,5 \pm 0,7	-	-
Indometacín	-	99,9 \pm 3,6	99,4 \pm 3,4

Záver

V rámci štúdie sa nám okrem známych polyfenolov podarilo z *C. blumei* izolovať a identifikovať po prvýkrát v rastlinnom materiáli apigenín-7-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid, apigenín-5-O-(3''-O-acetyl)- β -D-glukuronid a spirocoleon-7-O- β -D-glukozid. Tento diterpenoidný glykozid prispieva k antiflogistickej aktivite rastliny inhibíciou enzýmov hyaluronidázy, COX-1 a COX-2. Na biologickej aktivite *C. aromaticus*, využívanej v ľudovom liečiteľstve, sa významnou mierou podieľa vicenín-2, ktorý bol vyizolovaný z *C. aromaticus* po prvýkrát.

Tato práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 305/2016/FAF.

Zoznam literatúry:

1. LUKHOB, C.W. – SIMMONDS, M.S. – PATON, A.J. Plectranthus: a review of ethnobotanical uses. In *J Ethnopharmacol.* 2006, vol.103, no.1, p. 1-24.
2. PASCUAL, C. – REINHART, K. Effect of antioxidants on induction time of luminol luminiscence elicited by 3-morpholinolinosydnonimine (SIN-1). In *Luminiscence.* 1999, vol.14, no.2, p.83-89.
3. RITOV, V.B. et al. Antioxidant Paradoxes of Phenolic Compounds: Peroxyl Radical Scavenger and Lipid Antioxidant, Etoposide (VP-16), Inhibits Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase via Thiol Oxidation by Its Phenoxy Radical. In *Arch Biochem Biophys.* 1995, vol.321, no.1, p.140-152.
4. YEUNG, S.Y. et al. Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. In *Food Chem Toxicol.* 2002, vol.40, no.10, p.1403-1413.
5. RAHMAN, A. – CHOUDHARY, M.I. – THOMSEN, W.J. *Bioassay Techniques for Drug Development.* Harwood Academic Publishers, 2001. 139p. ISBN 90-5823-051-1.

Vývoj vaginální kroužků pro veterinární použití

Veronika Tkadlečková, Kateřina Kubová, Jakub Vysloužil, Darja Bučková

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

Úvod

Vaginální kroužky jsou prstencové pevné lékové formy určené pro vaginální aplikaci. Umožňují dlouhodobé uvolňování léčiva či léčiv s místním nebo systémovým účinkem. Základem kroužků je netoxický, biokompatibilní, stabilní, flexibilní a dlouhodobě nedráždivý polymerní nosič. Vhodnými materiály jsou např. polymery ze skupiny silikonů (1,2). Silikonové elastomery mají vynikající biokompatibilitu a dlouhou historii používání v medicíně (3). Mezi výhody vaginální aplikace patří redukce nežádoucích účinků, reverzibilita, neinvazivní způsob podání, eliminace interakcí s potravou nebo léčivy a další (4). V oblasti humánní medicíny se vaginální kroužky využívají zejména pro přívod ženských pohlavních hormonů za účelem kontracepce nebo substituce, ve fázi výzkumu také k terapii inkontinence nebo ochrany před infekcí virem HIV (1,2). V oblasti veterinární medicíny tato léková forma doposud používána není. Existují však možnosti využití vaginálních kroužků v oblasti farmakoterapie psů. Jednou z nich je zánětlivé onemocnění dělohy pyometra, která patří k častým onemocněním fen velkých i malých plemen.

Cílem projektu bylo navržení způsobu přípravy matricových vaginálních kroužků pro veterinární aplikaci. Vytvoření formy pro přípravu kroužků, výběr vhodného polymerního nosiče a zpracování léčiva. Zaměřili jsme se také na navržení neinvazivního způsobu reinzerce vaginálního kroužku z vaginální dutiny feny.

Materiál

Pro vytvoření matrice vaginálních kroužků byly použity silikonové elastomery Sylgard[®] 184 Sylgard[®] 164 (Dow Corning, USA). Pro reinzerci kroužku z vaginální dutiny byla použita polyamidová chirurgická nit (tloušťka 3, SERALON[®]). Pro zjištění lokalizace kroužků byla zpracována rentgen-kontrastní látka síran barnatý (SIGMA-ALDRICH, CZ). K omezení sedimentace léčiv v silikonu byl přidáván Aerosil[®] 106 (Evonik Industries, N). Jako léčivo k léčbě pyometry byl pořízen prostaglandin E₂ (Cayman Pharma, CZ). Vzhledem k enormní finanční nákladnosti léčiva, bylo *in-vitro* testování prováděno s modelovým léčivem kofein anhydriátem (Zentiva, CZ). K modifikaci uvolňování léčiva z kroužků byla použita laktosa monohydrát (SIGMA-ALDRICH, CZ), laktosa bezvodá (SIGMA-ALDRICH, CZ), Avicel PH 101 (FMC BioPolymer, USA), Avicel PH 200 (FMC BioPolymer, USA), Kollidon[®] 17 (BASF, N).

Metodika

Design formy: Výsledná velikost vaginálních kroužků pro veterinární použití byla zvolena 3 cm. Pro jejich výrobu kroužků byla navržena a sestrojena plastová forma o vnějším průměru 3 cm a výšce 0,4 cm. Forma byla dále upravována a pro zakomponování reinzerční pásky byly do středu boční strany přidány dva otvory ve vzdálenosti 1,5 cm.

Výběr polymeru: Pro přípravu prvních kroužků byl použit silikonový elastomer Sylgard[®] 184 (doba tuhnutí 48 hodin, poměr báze:katalyzátor - 10:1). V dalším experimentu byl nosný polymer nahrazen silikonovým elastomerem Sylgard[®] 164 (doba tuhnutí 15 minut, poměr 1:1).

Inkorporace reinzerčního aparátu: Vzhledem k tomu, že se jedná o nebiodegradovatelný polymer, zaměřili jsme se také na způsob reinzerce kroužku z vaginální dutiny. K tomuto účelu byla do kroužků různými způsoby zakomponována reinzerční nit (testováno na kroužcích připravených ze Sylgard[®] 184). Nit byla přivázána k hotovým kroužkům, zalita do kroužků s několika uzlíky na niti a zalita po obvodu kroužků.

Ověření mechanické odolnosti reinzerčního aparátu: Síla potřebná k vytržení reinzerční nitě z kroužků se hodnotila pomocí přístroje Texture analyzer CT3 4500. Vzhledem k překročení limitů výše uvedeného přístroje byl vybraný typ dále testován na přístroji ZWICK ROELL Z 010 na Chemické fakultě Ústavu chemie materiálů Vysokého učení technického v Brně.

Inkorporace rentgen-kontrastní látky: Pro možnost zjištění lokalizace kroužků v organismu byl do kroužků zapracován rentgen-kontrastní síran barnatý v procentuálním zastoupení 0,5%, 1%, 1,5% a 2%. Na základě testů na uhynulém zvířeti na Klinice malých zvířat Veterinární a farmaceutické univerzity Brno byla vybrána nejvhodnější koncentrace pro zobrazení.

Inkorporace modelového léčiva: Pro sledování uvolňování léčiva ze Sylgard[®] 184-kroužků bylo zapracováno 100 mg kofeinu jako modelového léčiva, a to ve formě i) bez upravené velikosti částic, ii) s upravenou velikostí částic pomocí rozmělnění ve třence, iii) s upravenou velikostí částic v kulovém mlýně (KM) Retsch PM 200 v 50 ml achátových mlecích nádobkách s 200 achátovými kuličkami po dobu 30 min, 60 min nebo 120 min a iv) přidáním Aerosilu[®] 106. Pro sledování uvolňování léčiva ze Sylgard[®] 164-kroužků se opět použilo 100 mg kofeinu v kombinaci s různými rozpustnými i nerozpustnými pomocnými látkami.

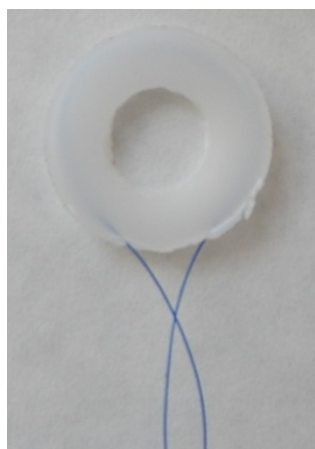
In-vitro disoluční charakteristika: Ke zjištění uvolňování léčiva z kroužků byla použita zkouška disoluce a následné měření absorbance při 275 nm na přístrojích Sotax AT7 Smart a spektrofotometru Perkin Elmer Instruments. Zkouška probíhala 72 hodin v 500 g disolučního média při pH 5,5 simulující vaginální tekutinu.

Výsledky

Obrázek 1 ukazuje nejvýhodnější zakomponování reinzerční nitě do vaginálního kroužku (Sylgard® 184), nit je vedena po obvodu kroužku v jeho polovině. K vytržení nitě z takového kroužku byla průměrně potřeba síla 39 N. K zjištění umístění kroužku ve vaginální dutině byl do kroužků zapracován síran barnatý. Nejvhodnější koncentrace umožňující viditelnost kroužku byla 2 % síranu barnatého (Obrázek 2).

U silikonových kroužků na bázi **Sylgard® 184** byla pozorována výrazná sedimentace částic léčiva během tuhnutí polymeru. Tuto sedimentaci jsme se pokoušeli zmírnit úpravou velikosti částic léčiva. Žádná z těchto úprav nevedla k omezení sedimentace částic v kroužku. Sedimentaci se podařilo odstranit přidáním pomocné látky Aerosilu® 106 (obtížné zacházení s materiálem). Během disoluční zkoušky (72 hodin, pH 5,5) byl u kroužků s kofeinem bez úpravy velikosti částic i s úpravou velikosti částic pozorován výrazný *burst efekt*, způsobený sedimentací částic léčiva k jedné ze stran vaginálního kroužku. Sedimentaci i *burst efekt* se však podařilo odstranit přidáním Aerosilu® 106, a to v minimální koncentraci 7,5 %, omezení rychlosti uvolňování léčiva však bylo příliš výrazné (pouze 14,3 % během 72 hodin).

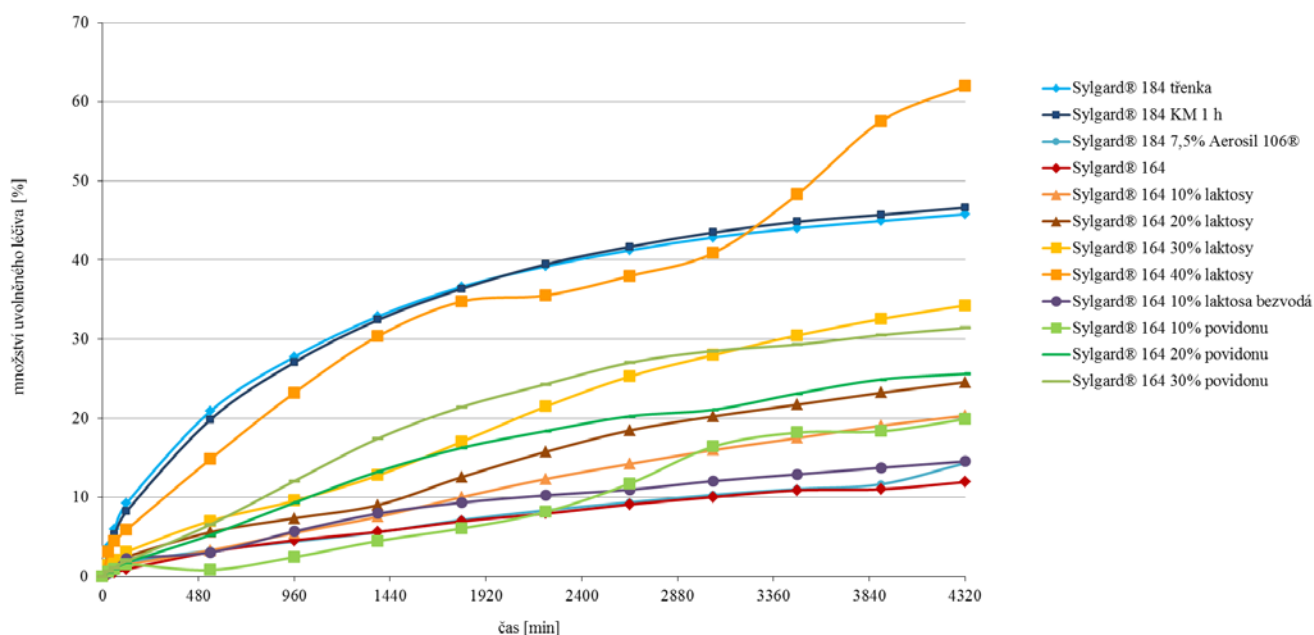
U kroužků připravených ze **Sylgard® 164** k sedimentaci vzhledem k rychlému tuhnutí materiálu nedocházelo. Ke zvýšení uvolňování léčiva z kroužků byly přidávány rozpustné i nerozpustné pomocné látky. Přidání nerozpustných látek v podobě Avicelu PH 101 a Avicelu PH 200 nevedlo ke zvýšení uvolňování léčiva. Uvolňování se podařilo zvýšit přidáním rozpustné laktosy monohydrátu v koncentraci 10 %, 20 %, 30 % a 40 %. Kroužky obsahující 40 % částic byly velmi křehké a docházelo k jejich lámání, maximální koncentrace pomocných látek proto byla stanovena na 30 %. Použití laktosy anhydrátu nevedlo k lepším výsledkům oproti monohydrátu. Zvýšení uvolňování léčiva se také podařilo docílit přidáním rozpustného povidonu. Obrázek 3 ukazuje průběh uvolňování léčiva z vaginálních kroužků.



Obrázek 1. Výsledný způsob zakomponování reinzerční nitě



Obrázek 2. Umístění vaginálního kroužku pro veterinární použití s obsahem 2% síranu barnatého



Obrázek 3. Průběh uvolňování léčiva z různých typů vaginálních kroužků

Závěr

V rámci projektu byla navržena a sestrojena vhodná forma pro přípravu vaginálních kroužků pro veterinární použití. K vyjmutí kroužků z vaginální dutiny byl vybrán nejlepší způsob zakomponování reinzerční nitě. Bylo zjištěno, že přidáváním rozpustných porogenů lze zvýšit uvolňování léčiva z matricových vaginálních kroužků. Dále budou do kroužků zapracovány prostaglandiny k léčbě zánětu dělohy.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 306/2016/FaF.

Seznam literatury:

1. Dvořáčková, K., Vetchý, D., Vaginální kroužky – jejich současnost a budoucnost. *Remedia*. 2014, 24, 122-125.
2. Friend, D., R., Intravaginal rings: controlled release systems for contraception and prevention of transmission of sexually transmitted infections. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 2011, 1, 185-193.
3. Malcolm R.K., Fetherson S.M., McCoy C.F., Boyd P. Major I. Vaginal rings for delivery of HIV microbicides. *Int. J. Wom. Health.* 2012, 4, 595-605.
4. Alexander, N.J., et al.: Why consider vaginal drug administration? *Fertility and Sterility*, 2004, 82(1), 1-12.

Enzymatické stanovení glukózy pro hodnocení disolučního profilu pelet s řízeným uvolňováním

Sylvie Pavloková, Jan Muselík, Aleš Franc, Dana Sabadková

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

Úvod

Hypoglykémie představuje závažnou komplikaci při léčbě diabetes mellitus, často může být zapříčiněna nerovnováhou mezi účinkem podaného inzulínu nebo perorálního antidiabetika v kombinaci s přijatou potravou a výdejem energie [1]. K prevenci hypoglykémie byly navrženy pelety s řízeným uvolňováním glukózy, pro které je zamýšleno podání po smísení s polotuhou potravou. Tato forma je výhodným řešením především pro dětské pacienty. Pelety jsou složeny z inertního jádra obsahujícího směs glukózy a osmoticky aktivní látky a potaženy polopropustnou membránou z ethylcelulózy.

Tato studie navazuje na předchozí práce popisující přípravu a hodnocení pelet o různých velikostech a složeních [2]. Z důvodu vyhovujícího disolučního profilu a především hodnoty *lag time* odpovídající diabetologické praxi byly vybrány dva vzorky (PEG, CMS) pro provedení stabilitních studií. Testován byl vliv přídavného enterosolventního potahu ve formě Eudragitu L, který by měl fungovat jako bariéra proti vlhkosti a k úpravě organoleptických vlastností. Zároveň bylo vyzkoušeno intenzivnější ošetření obalu (tzv. *curing*) vystavením pelet podmínkám zvýšené vlhkosti a teploty (40 °C / 75 % RV po dobu 24 hodin). Oba postupy by měly vést ke zvýšení stability pelet. Současně byl tento projekt zaměřen na využití enzymatické metody stanovení glukózy ve vzorku pro dosažení lepších validačních parametrů, úspory času a zjednodušení práce při zjišťování disolučních profilů.

Materiál

Látky potřebné pro přípravu pelet: glukóza anhydrát (Dr. Kulich Pharma, Česká republika); mikrokrytalická celulóza – MCC Avicel® PH 101 (FMC Biopolymer, Belgie); karboxymethylškob sodná sůl – Vivastar® P 5000 – CMS (JRS Pharma, Německo); makrogol 6000 – PEG 6000 (Merck Schuchardt, Německo); ethylcelulóza vodná disperze – Surelease® typ B NF (Colorcon, USA); Eudragit L30 D-55 (Evonik, Rakousko). Látky pro analýzu GOD-POD: glukózaoxidáza, peroxidáza (Sigma Aldrich, Velká Británie).

Metodika

Příprava pelet

Peletová jádra o dvou složeních (Tab. 1) byla připravena metodou extruze-sféronizace (integrovaná jednotka Pharmex 35 T Wyss & Probst Eng, Korsch, Německo) podle metodiky popsané v dříve publikované práci [2]. Výsledné potažení ethylcelulózou tvoří 35 % celkové hmotnosti pelety; část vzorků byla modifikována přidavným enterosolventním potahem (3 % Eudragitu L). V posledním kroku byly pelety sušeny v horkovzdušné sušárně při teplotě 60 °C po dobu 4 h (neošetřené vzorky) a dalších 24 hodin při 40 °C a vlhkosti 75 % (ošetřené vzorky).

složení	PEG	CMS
Glukóza bezvodá	75	80
Avicel PH 101	-	15
PEG 6000	25	-
CMS	-	5

Tabulka 1. Procentuální složení peletových jader (% w/w)

Stabilitní studie

Pelety byly adjustovány po 10 g do skleněných lahvíček. Stabilitní studie byly prováděny při dvou teplotách (40 °C / 75 % RV a 25 °C / 60 % RV) s využitím stabilitního boxu (Constant climate chamber Binder KBF 240, Německo). Porovnávány byly disoluční profily vzorků po době skladování 3 a 6 měsíců (výsledky v rámci doby trvání řešení projektu IGA, stabilitní studie probíhají i nadále).

Disoluční testy

Stanovení množství uvolněné glukózy z pelet v čase bylo provedeno pomocí disoluční aparatury (Sotax AT-7 Smart, Švýcarsko) s následujícími parametry: košíčková metoda, otáčky 100 rpm, disoluční médium voda v objemu 500 ml při teplotě $37,0 \pm 0,5$ °C v případě pH-nezávislé metody nebo 0,1M HCl s postupným přidáváním $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ u pH-závislé metody (pH 1,2 v čase 0; pH 4,5 po 60 min a pH 6,8 po 120 min). Analyzován byl přibližně 1 g pelet. Vzorky byly odebírány v časových intervalech 60, 120, 240, 360, 540 a 720 min a následně analyzovány na obsah glukózy pomocí enzymatické GOD-POD metody: 20 μl vzorku bylo smícháno s 1 ml reakčního roztoku (fenol, 4-aminoantipyrin, glukózaoxidáza, peroxidáza a fosfátový pufr o pH 7,5 v definovaném poměru). Absorbance výsledného červeně zbarveného chinonu v roztoku byla měřena při 500 nm (UV-VIS Spektrometr LAMBDA 25).

Výsledky

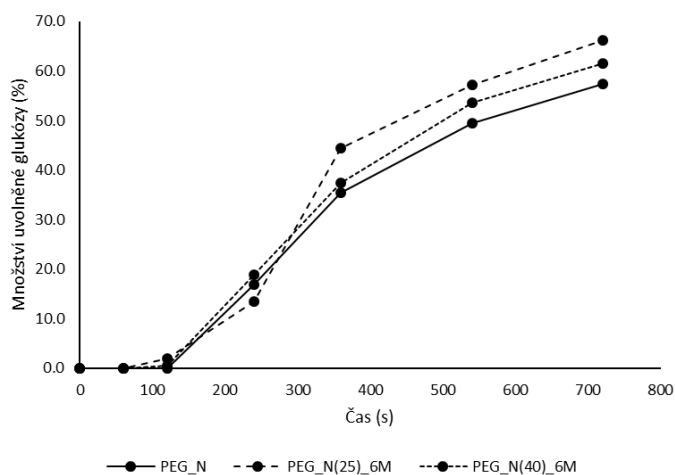
Obrázek 1 znázorňuje množství uvolněné glukózy v závislosti na čase u vzorku PEG bez ošetření (PEG_N; pH-nezávislá metoda) a vzorky po stabilitních testech PEG_N(25)_6M / PEG_N(40)_6M – skladováno 6 měsíců při teplotě 25 °C a 60 % RV, případně 40 °C a 75 % RV. Na první pohled je patrná podobnost disolučních křivek, což je potvrzeno i matematickým vyhodnocením pomocí faktoru podobnosti f_2 . Vzorky po zátěžových testech mohou být považovány za shodné s původním vzorkem pro obě testované teploty ($f_2 = 59,9$ pro 25 °C a 60 % RV; $f_2 = 77,0$ pro 40 °C). Na základě těchto výsledků bylo případné ošetření vzorku PEG shledáno jako nepotřebné.

Kvůli nedostatečné stabilitě v případě neošetřených vzorků CMS (CMS_N; pH-nezávislá metoda) byla u tohoto složení pelet testována modifikace potahu enterosolventní vrstvou a následné ošetření (CMS_OE; pH-závislá metoda). Z Obrázku 2 je zjevné jisté zvýšení stability pelet (6 měsíců, 25 °C a 60 % RV) po modifikaci ($f_2 = 48,0$ pro neošetřený vzorek; $f_2 = 57,7$ pro vzorek po modifikaci). Navíc bylo modifikací potahu s následným ošetřením pelet dosaženo udržení *lag time* na stejné hodnotě jako v čase 0, zatímco u neošetřených vzorků bylo pozorováno zrychlení uvolňování glukózy v čase po stabilitním testu.

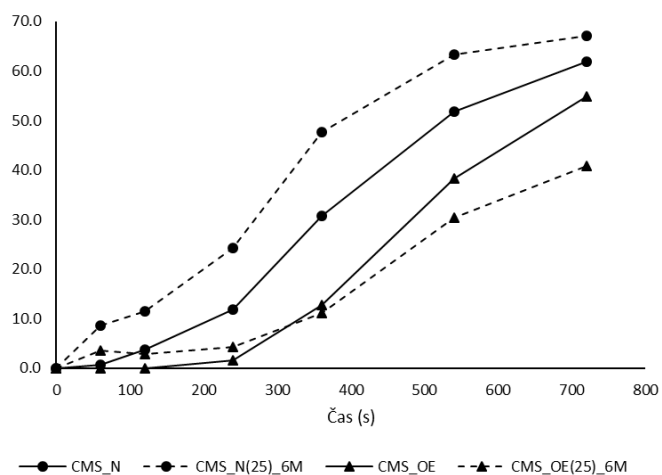
Horší stabilita vzorku CMS oproti PEG je pravděpodobně způsobena přítomností bobtnající látky, která může narušit potah vlivem působení vzdušné vlhkosti. Přídavný enterosolventní potah u vzorku CMS lze také s výhodou využít ke zlepšení organoleptických vlastností pelet (konkrétně ke snížení specifického pachu a chuti, které mohou být způsobeny přítomností plastifikátoru olejanu amonného v obalu).

V další fázi vývoje této lékové formy se předpokládá testování modifikace pelet nanášením disperze potahového materiálu z organického rozpouštědla, kde dochází k přímé tvorbě filmu bez nutnosti koalescence a obal je po nástřiku homogenní.

Z analytického hlediska byla prokázána funkčnost enzymatického stanovení s následnou spektrofotometrickou detekcí výsledného reakčního produktu a tím i přispění k vývoji lékové formy s řízeným uvolňováním glukózy k prevenci hypoglykemických stavů. Vyvinutá analytická metoda byla rovněž aplikována ke srovnání výsledků zkoušky disoluce (*in vitro*) s výsledky *in vivo* na pacientech (zajištěno FN Hradec Králové). Využití této analytické metody pro obdobné vzorky se plánuje i v budoucnu.



Obr. 1 Disoluční křivky (PEG)



Obr. 2 Disoluční křivky (CMS)

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 307/2016/FaF.

Seznam literatury:

1. FISHER, M.; FRIER, B. M. a RORY MC CRIMMON. *Hypoglycaemia in Clinical Diabetes*. 3rd Edition, John Wiley & Sons, 2014.
2. FRANC, A.; SABADKOVÁ, D.; NEUMANN, D., PAVLOKOVÁ, S., KOPECKÁ, P. a J. MUSELÍK. Interdiction of hypoglycemia in diabetic children by multiparticulate dosage form with controlled glucose release. *Pharm. Dev. Technol.* 2015, 1-8.

Syntéza derivátů 1,3,5-triazinu obsahujících nové chalkonové, triazolové a další dusíkaté strukturní motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „Zelené chemie“.

Eva Havránková¹, Jozef Csöllei¹, Pavel Pazdera²

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická Fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno²

Úvod

V současné době se analoga 1,3,5-triazinu (*s*-triazinu) stávají předmětem zájmu řady výzkumných týmů. Deriváty *s*-triazinu vykazují široké spektrum biologických aktivit, přičemž v několika posledních letech jsou v popředí zájmu zejména jejich anti-bakteriální, anti-tuberkulózní a anti-rakovinové vlastnosti. [1] U derivátů s těmito vlastnostmi se pak často vyskytují strukturní motivy typu substituovaných piperazinových, substituovaných chalkonových, substituovaných triazolových a dalších dusíkatých heterocyklických kruhů. [2, 3] V posledních letech bylo prokázáno, že zavedení heterocyklického kruhu na chalkonový nebo triazolový substituent *s*-triazinu zvyšuje biologickou aktivitu takovýchto derivátů. [4] Při syntéze sloučenin uvedeného typu a jejich prekurzorů je však v minimální míře využíváno metod „Zelené chemie“, jako jsou organokatalýza, metalokatalýza a kombinace obou, katalýza s imobilizovanými katalyzátory, různé typy couplingových reakcí, atd. [5]

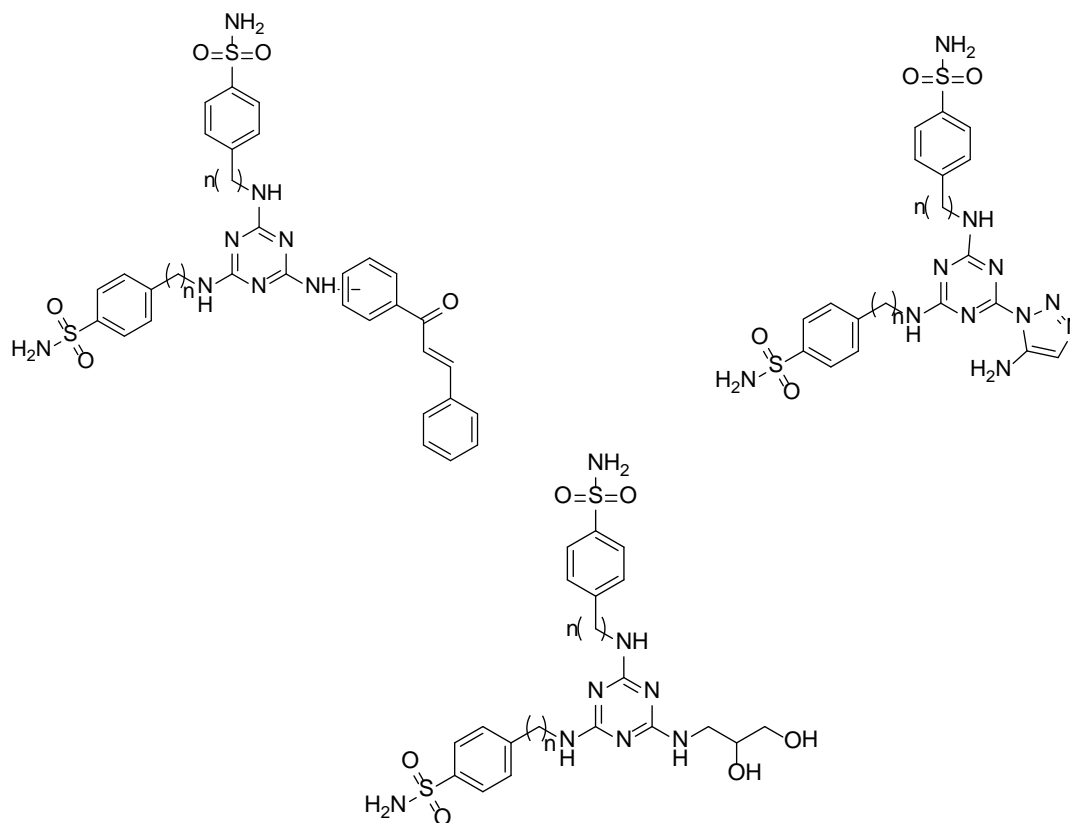
Při syntéze chalkonových a triazolových derivátů je možné využívat katalýzu d-kovy, příslušné katalyzátory (např. nano měď) jsou však poměrně ekonomicky náročné a pro syntézu farmaceuticky využitelných látek ne úplně vhodné. [6] d-Kovy imobilizované na slabě kyselém katexu se tak pro tyto typy syntéz jeví jako více než vhodné katalytické systémy.

Při současném vývoji chemického a farmaceutického průmyslu a tlaku na začleňování principů Zelené chemie do chemických výrob, je využití těchto principů již při návrhu syntézy nové účinné látky značnou výhodou. Vezmeme-li v úvahu také široké spektrum biologických aktivit analogů *s*-triazinu, jejich potenciál a nekompletnost současného stavu jejich poznání, získáváme velmi slibný a zajímavý předmět výzkumu.

Výsledky a diskuse

K predikci struktur vybraných piperazinových derivátů obsahujících *s*-triazinový skelet s potenciální biologickou aktivitou proti isozymu karboanhydrázy hCAIX (spojeného s nádorovým bujením) byly použity dopředné umělé neuronové sítě (Forwarded Artificial Neural Networks – FANNs). [7, 8] Pro ověření správnosti ANN modelu byla také stejná datová sada struktur podrobena predikci/dockingu selektivity $K_1(hCAII)/K_1(hCAIX)$ pomocí softwarového

balíku Schrödinger. S ohledem na dílčí výsledky predikce bylo navrženo několik modelových struktur těchto derivátů zahrnujících mimo jiné nové chalkonové, triazolové a další dusíkaté strukturní motivy (viz níže). Dále byl navržen syntetický design pro syntézu těchto struktur a dané deriváty byly připraveny a analyzovány pomocí $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ a IR spektroskopie.



Obrázek 1. Příklady vybraných modelových struktur substituovaných *s*-triazinů ($n=0-2$).

Cílové substituenty byly zaváděny na *s*-triazinový skelet prostřednictvím substituce atomů chloru ve výchozím, komerčně dostupném kyanurtrichloridu (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu). K substituci atomů chloru dochází *per partes* přes atom dusíku alifatické primární nebo sekundární amino skupiny daného substituentu. Substituce prvního, tedy nejreaktivnějšího, atomu chloru v kyanurtrichloridu může být provedena cestou nukleofilní aromatické substituce nebo výhodněji procesem katalyzovaným novým imobilizovaným Cu(I) komplexem (připraveným dle [9]). V případě katalýzy Cu(I) se jedná o cestu oxidativní adice - heterolytické adice - redukční eliminace. Substituce druhého a třetího atomu chloru pak byla prováděna výhradně cestou oxidativní adice - heterogenní adice - redukční eliminace. V principu se jedná o využití Ullmanovy syntézy (případ Buchwaldova-Hartwigova C-N-couplingu) v níž byl jako katalyzátor použit nový recyklovatelný, levný a stabilní katalyzátor, tj. ionty Cu(I) imobilizované na slabě kyselém makroporézním katexu polyakrylátového typu. Všechny tři substituční stupně lze provést

jako one-pot reakce za kontrolovaného teplotního režimu, s gradací teploty od prvního ke třetímu stupni. Gradace reakční teploty je nutná z důvodu poklesu reaktivity po zavedení příslušného dusíkatého substituentu. Pořadí zavedení substituentů bylo prováděno s ohledem na reaktivitu aminových prekurzorů tak, aby nejméně reaktivní reagoval v prvním nejvíce reaktivním syntetickém stupni, a naopak nejvíce reaktivní amin pak v posledním, nejméně reaktivním syntetickém stupni.

Závěr

K predikci *s*-triazinových derivátů vykazujících potenciální biologickou aktivitu proti hCAIX byly použity dopředné ANNs. S ohledem na dílčí výsledky predikce bylo provedeno několik modelových syntéz různě substituovaných *s*-triazinů (viz Obrázek 1.). Design všech syntéz uvedených modelových struktur byl navržen s ohledem na cíle a principy Zelené chemie. Výsledkem řešení je one-pot syntetický proces, v němž je dosahováno vyšších výtěžků při kratších reakčních časech, než je obvyklé u podobných substitucí na kyanurtrichloridu. Takto optimalizované syntetické postupy mohou být aplikovány při přípravě všech *s*-triazinových derivátů s drobnými obměnami s ohledem na reaktivitu jednotlivých aminových substituentů. Dalším krokem našeho týmu bude testování biologické aktivity již připravených derivátů.

Seznam literatury:

- [1] Kumar, R.; Singh, A. D.; Singh, J.; Singh, H.; Roy, R. K.; Chaudhary, A.; 1,2,3-Triazine Scaffold as a Potent Biologically Active Moiety: A Mini Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2014, **14**, 72-83.
- [2] Abonia, R.; Insuasty, D.; Castillo, J.; Insuasty, B.; Quiroga, J.; Nogueras, M.; Cobo, J.; Synthesis of novel quinoline-2-one based chalcones of potential anti-tumor activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **57**, 29-40.
- [3] Wang, Y.; Ai, J.; Wang, Y.; Chen, Y.; Wang, L.; Liu, G.; Geng, M.; Zhang, A.; Synthesis and c-Met kinase inhibition of 3, 5-disubstituted and 3, 5, 7-trisubstituted quinolines: identification of 3-(4-acetylpiperazin-1-yl)-5-(3-nitrobenzylamino)-7-(trifluoromethyl) quinoline as a novel anticancer agent. *J. Med. Chem.*, 2011, **54** (7), 2127-2142.
- [4] Herová, D.; Pazdera, P.; Efficient Solid Support Catalyzed Mono Aza-Michael Addition Reactions of Piperazine. *Monatshefte Chem.*, 2015, **146**(4), 653-661. ISSN 0026-9247. doi:10.1007/s00706-014-1379-2.
- [5] Havránková, E.; Pospíšil, P.; Pazdera, P.; Synergism of Metal and Organocatalysis in Condensation Reactions of Aromatic Aldehydes with Anilines Affording Imines: Effect of

Catalysts on the Base of a Supported Cerium(III) and Proline. *Science Journal of Chemistry, Special Issue, Green Chemistry: Synthesis and Its Uses*, 2014, 2 (1), 1-8.

[6] Alonso, F.; Moglie, Y.; Radivoy, G.; Yus, M.; Copper Nanoparticles in Click Chemistry: an Alternative Catalytic System for the Cycloaddition of Terminal Alkynes and Azides. *Tetrahedron Lett.*, 2009, 50, 2358-2362.

[7] Gurney, K.; An introduction to neural networks. London: UCL Press, 1997, xi, 234 p. ISBN 18-572-8503-4.

[8] Zelinka, K.; Šimbera, J.; Ševčík, R.; Havel, J.; Pazdera, P.; New Supported Catalytic Binary System for the Green and Sustainable Production of Cyanogen Fumigant Optimization Using Artificial Neural Network. *Journal of Chemical Engineering and Chemistry Research*, 2014, 1 (5), 302-313.

[9] Pazdera, P.; Zberovská, B.; Němečková, D.; Datinská, V.; Šimbera, J.; Catalyst for Chemical Syntheses Based on Metal Complex and Process for Preparing thereof, No: CZ 305277 (B6) 20150603, Year: 06/2015.

Děkuji Vladimíru Garajovi za predikci selektivity $K_1(hCAII)/K_1(hCAIX)$ daného datasetu struktur pomocí softwarového balíku Schrödinger (Katedra farmaceutické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského Bratislava, Odbojárov 10, 831 04 Bratislava, garaj1@uniba.sk).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 309/2016/FaF.

Studium duální inhibiční aktivity prenylovaných sloučenin z *M. alba*

Marie Pokorná¹, Karel Šmejkal¹, Alice Navrátilová¹, Šárka Mráčková²

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie²

Úvod

Předkládaná studie je zaměřena na hledání nových antimikrobiálních a potenciálně protizánětlivých složek izolovaných z kůry kořene *Morus alba*. Jedná se především o prenylované sloučeniny, které v dříve provedených studiích vykázaly inhibiční efekt na expresi genů spojených s TNF- α , IL-1 β a IL-1RA (Kollár et al., 2013) a působily jako inhibitory COX-1 a COX-2 (Hošek et al., 2011). Flavonoidy a benzofurany substituované prenylovým a/nebo geranylovým řetězcem vykazují taktéž zajímavý antibakteriální potenciál a jsou považovány za účinnou antimikrobiální skupinu, tzv. "Phytoanticipins" (Barron and Ibrahim, 1996). Naše studie je zaměřena na testování prenylovaných látek proti vybraným kmenům MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*).

Materiál a metodika

Testování potenciální antiflogistické aktivity

Inhibiční potenciál testovaných sloučenin na expresi genu COX-1 a COX-2 byl stanoven za využití komerčně dostupného kitu kolorimetricky s využitím Microplate readeru. Testy COX-1 a COX-2 byly provedeny ve dvou nezávislých experimentech se třemi replikáty. U testovaných látek byla stanovena IC₅₀, jako pozitivní kontrola byl zvolen cudraflavon B.

Testování antibakteriální aktivity

Třináct látek izolovaných z *M. alba* bylo testováno proti patnácti klinickým izolátům MRSA. Hodnota minimální inhibiční koncentrace MIC byla stanovena pomocí mikrodiluční metody v bujónu (CLSI 2009). Jako pozitivní kontrola byla využita antibiotika ciprofloxacin a ampicilin.

Výsledky

Výsledky testování potenciální protizánětlivé aktivity izolovaných sloučenin jsou uvedeny v tabulce 1. Cudraflavon B, prenylovaný flavonoid izolovaný z *M. alba*, působil v předchozích studiích jako silný inhibitor obou COX-1 a COX-2 isoenzymů a zároveň vykázal vyšší selektivitu vůči COX-2 než referenční indometacin. Z tohoto důvodu jsme ho v naší studii zvolili jako standard. Sanggenon H a skupina derivátů kuwanonu vykázala pouze malou anebo žádnou inhibiční aktivitu proti COX-1

a COX-2. Nově izolovaný benzofuran vykázal vyšší inhibiční aktivitu než standard cudraflavon B vůči oběma isoformám COX. Mulberrofuran A vykázal ve studii taktéž významný inhibiční potenciál.

Výsledky antimikrobiálního testování izolovaných sloučenin jsou uvedeny v tabulce 2. Na základě testování se jako nejvíce protiinfekční jeví látky sanggenon E a kuwanon C s MIC 2–4 $\mu\text{g/mL}$ a patří tak mezi neaktivnější látky vůči všem testovaným kmenům MRSA. Většina ostatních látek vykazovala větší než střední antibakteriální aktivitu (4–16 $\mu\text{g/mL}$) a z uvedených výsledků se jeví přítomnost prenylového/geranylového řetězce společně s hydroxylací v pozici C-5, C-7 a C-4' rozhodující pro anti-MRSA aktivitu. Na základě testování mohou být mnohé prenylované látky z *M. alba* vhodné k terapeutické léčbě infekcí způsobených MRSA a mohou najít uplatnění při vývoji nových antibakteriálních látek.

Tabulka 1. Výsledky potenciální protizánětlivé aktivity testovaných látek.

látka	Mw	IC50 [μM] \pm % SEM	
		COX-1	COX-2
kuwanon U	438	57.4 \pm 4.9	> 100.0
sanggenon H	354	90.0 \pm 2.2	> 100.0
kuwanon T	422	27.8 \pm 6.7	58.4 \pm 3.6
benzofuran	392	6.0 \pm 1.9	7.4 \pm 8.1
mulberrofuran A	392	17.6 \pm 6.2	29.3 \pm 1.7
kuwanon S	406	> 100.0	> 100.0
cudraflavon B	420	11.0 \pm 4.1	26.6 \pm 10.3

Tabulka 2. Výsledky antimikrobiálního testování izolovaných látek.

Sloučenina	Grampozitivní bakterie															
	MRSA 67755	MRSA 63718	MRSA 62097	MRSA 62059	MRSA 1098	MRSA 1380	MRSA 1664	MRSA 1679	MRSA 1903	MRSA 630	MRSA 3202	MRSA 4110	MRSA 4211	MRSA 287	MRSA 6975	
Mulberrofuran Y	8	8	8	8	8	8	8	8	8	4	4	8	8	8	8	
Mulberrofuran J	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
Kuwanon C	4	4	2	4	4	2	4	4	2	4	4	4	4	4	4	
Kuwanon E	16	8	16	16	16	>128	16	16	16	8	8	>128	16	16	16	
Kuwanon L	32	64	32	32	32	64	64	64	64	32	32	32	32	64	>128	

Methylkuwanon E	16	8	16	16	16	16	16	16	16	16	8	32	32	16	16
Kuwanon O	8	8	4	8	8	4	8	2	4	8	4	4	8	8	4
Morusinol	64	64	32	64	64	64	64	64	64	32	64	64	64	64	64
Sanggenon E	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2
Cudraflavon B	8	8	4	8	8	4	8	4	8	8	4	8	8	4	4
Albanol B	8	8	4	8	8	4	8	4	4	4	8	8	8	16	4
Moracin M	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
Moracin C	16	16	8	8	16	8	16	16	8	16	16	16	16	16	8
Ampicillin	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	1	16	>16
Ciprofloxacin	0.25	>8	0.25	0.25	0.25	8	0.25	0.25	8	>8	>8	0.125	0.25	0.5	>8

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 310/2016/FaF.

Seznam literatury:

- Bassetti, M., Nicco, E., Mikulska, M. Why is community-associated MRSA spreading across the world and how will it changed clinical practice? *International Journal of Antimicrobial Agents Physiology*. 2009, 105, 731–738.
- Barron, D., Ibrahim, R. K. Isoprenylated flavonoids-a survey. *Phytochemistry*. 1996, 43, 921–982.
- Wayne, P. A. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard- 8th ed. 2009. In:CLSI document M07-A8, USA.
- Hošek, J., Bartoš, M., Chudík, S. et al. Natural Compound Cudraflavone B Shows Promising Anti-inflammatory Properties in Vitro. *Journal of Natural Products*. 2011, 74, 614–619.
- Kollár, P., Bárta, T., Hošek, J. et al. Prenylated Flavonoids from *Morus alba* L. Cause Inhibition of G1/S Transition in THP-1 Human Leukemia Cells and Prevent the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013, 2013, 1–13.

Hodnocení nově syntetizovaných antibakteriálních chemoterapeutik

Šárka Pospíšilová^{1,2}, Josef Jampílek¹, Hana Michnová², Kristýna Bezoušková², Sonia Riahiová²

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Zvyšující se rezistence původců infekčních onemocnění vyvolává nutnost výzkumu nových účinných a bezpečných antimikrobiálních látek. V předchozích letech byl proveden screening řady potenciálních antimikrobiálních chemoterapeutik^[1-3], z nichž nejúčinnější byly salicylanilidové (2-hydroxybenzamidové) deriváty. V návaznosti na tyto výsledky byl proveden screening řady nově syntetizovaných látek, a to jak strukturních derivátů hydroxybenzoové kyseliny, tak i dalších struktur vytvořených na základě racionálního designu.

Materiál a metodika

V rámci projektu bylo provedeno stanovení antibakteriální a antifungální aktivity látek ze skupiny derivátů thiosemikarbazonů, hydroxynaftalenkarboxamidů a arylkarbamoylnaftalen-2-yl karbamátů. U salicylanilidových derivátů, jejichž antimikrobiální účinnost byla ověřena v předchozích letech^[1], byla studována jejich synergická aktivita v kombinaci s běžně užívanými antimikrobiálními látkami.

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita bujónová mikrodiluční metoda; při vlastním vyšetření se postupovalo podle metodik CLSI^[4]. Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a ředěny na požadovanou koncentraci (koncentrační řada 256–0,008 µg/ml). Mikrotitrační destička byla zaočkována požadovaným mikroorganismem a kultivována v termostatu. Po uplynutí kultivační doby byla vizuálně vyhodnocena hodnota MIC, čili nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, při které nedošlo k viditelnému nárůstu mikroorganismu. Pro stanovení minimální baktericidní koncentrace (MBC) byl obsah jamek přenesen na agarovou plotnu. Jako baktericidní byla stanovena nejnižší koncentrace látky, při které došlo po inkubaci k úhynu $\geq 99,9$ % CFU/ml vzhledem k původnímu inokulu. Antimikrobiální aktivita nově syntetizovaných látek byla hodnocena proti souboru referenčních kmenů bakterií: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922. Jako zástupci multirezistentních bakterií byly použity klinické izoláty methicilin-rezistentní *S. aureus* (MRSA) a vankomycin-rezistentní *E. faecalis* (VRE). Rychlerostoucí *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084 a zástupci pomalu rostoucích mykobakterií *M. marinum* CAMP 5644 a *M. kansasii*

DSM 44162 sloužily jako modelové druhy k ověření účinku potenciálních chemoterapeutik k léčbě tuberkulózy. Antifungální účinek byl testován na kulturách *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258 a *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Aktivní karbamátové deriváty byly v rámci stáže na Farmaceutické fakultě Univerzity v Ljublani testovány jako inhibitory gyrasy B a topoisomerasy.

Pro stanovení synergického účinku byla využita 96-jamková mikrotitrační destička, kdy bylo postupným ředěním dosaženo v každé jamce unikátní koncentrace testované látky a konvenčně užívaných antimikrobiálních látek (vankomycinu, tetracyklinu a ciprofloxacinu). Vzájemný účinek kombinace dvou testovaných látek byl vyhodnocen prostřednictvím hodnoty FIC indexu^[5].

Výsledky

N-Fenyl-2-hydroxynaftalen-1-karboxamidy vykazovaly aktivitu proti *S. aureus* a MRSA až stonásobně vyšší než referenční chemoterapeutikum ciprofloxacín. Nejúčinnější látky byly na fenylovém jádře substituované strukturně objemnou elektron-akceptorovou skupinou CF₃. Lipofilita molekuly je tedy základním předpokladem pro její aktivitu^[6]. Podobná závislost byla zjištěna u antimykobakteriální aktivity *N*-(alkoxyfenyl)-2-hydroxynaftalen-1-karboxamidů a jejich polohových izometů *N*-(alkoxyfenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamidů^[7].

Z 26 hodnocených nitro- a chlor-substituovaných karbamátů vykazovaly nejvyšší aktivitu vůči stafylokokům deriváty substituované na dusíku ethylovou skupinou, jejichž aktivita byla srovnatelná s ampicilinem. Deriváty substituované nitroskupinou na anilidovém jádře vykazovaly oproti chlorovaným substituentům aktivitu 4–8× vyšší proti methicilin-citlivému kmeni *S. aureus* ATCC 29213. To je pravděpodobně způsobeno interakcemi nitroskupiny se specifickými biologickými strukturami vyskytujícími se u *S. aureus*, ale ne u MRSA. Tyto interakce jsou pravděpodobně možné pouze u molekul s nepříliš objemnými substituenty, jako je ethyl-, propyl- nebo isopropyl-karbamát. Z hlediska antimykobakteriální aktivity byly nejaktivnější ethyl-karbamáty; propyl- a butyl-karbamáty vykazovaly střední aktivitu. Na rozdíl od předchozích studií se tedy aktivita nezvyšuje se zvyšující se lipofilitou, a nepředpokládá se tedy povrchová aktivita těchto látek jako jejich základní mechanismus účinku. Vzhledem ke strukturním podobnostem se salicylanilidy je předpokládán mechanismus účinku interakce s dýchacím řetězcem, energetickým metabolismem nebo specifické poškození buněčné stěny bakterií^[8]. Výrazná interakce s enzymy gyrasy B a topoisomerasa IV nebyla prokázána.

Antifungální aktivita byla zjištěna u thiosemikarbazonových derivátů, kdy 12 ze 13 hodnocených látek vykazovalo aktivitu v rozmezí 0,25–8 µg/ml alespoň na jeden z testovaných kmenů *Candida spp.* Z hlediska vztahu struktury a účinku se prokázalo, že pro aktivitu je nutná

přítomnost piperazinu a substituce arylu elektron-akceptorovou skupinou. Předpokládaným mechanismem účinku je chelatace kovů v metaloenzimech, což vede k inhibici metabolických drah v buňce. Za vlastní účinek je pravděpodobně odpovědná thiosemikarbazonová část molekuly konjugována s aminopyridinem, lipofilní část zodpovídá za průnik do buňky^[9].

Salicylanilidové deriváty, u kterých byla v minulých studiích prokázána silná antistafylokoková^[1] a antienterokoková^[10] aktivita, byly hodnoceny z hlediska schopnosti synergického účinku v kombinaci s konvenčně užívanými antimikrobiálními látkami. Prokázalo se, že dané látky vykazují silný bakteriostatický účinek na všechny VRE izoláty, který je aditivní nebo synergický s vankomycinem.^[11]

Závěr

Z výsledků projektu je patrné, že hodnocené substituované thiosemikarbazony, hydroxynaftalenkarboxamidy a arylkarbamoylnaftalen-2-yl karbamáty mohou představovat slibné kandidáty antibakteriálních a antifungálních látek účinných i proti multirezistentním mikroorganismům. Zjištěné výsledky budou dále rozpracovány, a to formou studia dynamiky antibakteriálního účinku látek, jejich schopností působit v kombinaci s jinými antimikrobiálními látkami nebo schopnosti inhibovat a degradovat bakteriální biofilm. Na základě získaných dat budou dále vyhodnoceny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou SAR/QSAR, což je nezbytný předpoklad pro směrování dalšího výzkumu Ústavu chemických léčiv v oblasti syntézy potenciálních antimikrobiálních chemoterapeutik.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 311/2016/FaF.

Seznam literatury:

- [1] Zdražilová, I.; Pospíšilová, Š.; Pauk, K. et al. In vitro bactericidal activity of 4- and 5-chloro-2-hydroxy-N-[1-oxo-1-(phenylamino)alkan-2-yl]benzamides against MRSA. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 349534.
- [2] Goněc, T.; Zdražilová, I.; Nevin, E. et al. Synthesis and biological evaluation of N-alkoxyphenyl-3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* **2015**, *20*, 9767-9787.
- [3] Zdražilová, I.; Pospíšilová, Š.; Masaříková, M.; et al. Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high *in vitro* activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Eur. J. Pharm. Sci.* **2015**, *77*, 197-207.

- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement*. CLSI document M100-S16, CLSI, Wayne, Pa, USA, 2006.
- [5] Bonapace, C.R.; Bosso, J.A.; Friedrich, L.V. et al. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *44*, 363-366.
- [6] Michnová, H.; Pospíšilová, Š.; Goněc, T.: Antimikrobní účinek derivátů N-fenyl-2-hydroxynaftalen-1-karboxamidu proti MRSA. In Sborník: *Tomáškovy dny mladých mikrobiologů 2016*, Brno, Česká republika, 2-3.6.2016.
- [7] Goněc, T., Pospíšilová, Š., Kauerová, et al. N-alkoxyphenylhydroxynaphthalenecarboxamides and their antimycobacterial activity. *Molecules* **2016**, *21*, 1068.
- [8] Goněc, T.; Pospíšilová, Š.; Holaňová, L. et al. Synthesis and Antimicrobial Evaluation of 1-[(2-substituted phenyl)carbamoyl] naphthalen-2-yl carbamates. *Molecules* **2016**, *21*, 1189.
- [9] Pospíšilová, Š.; Riahiová, S.; Rejmund, M. et al. Deriváty thiosemikarbazonu jako látky s potenciálním antimykotickým účinkem. In Sborník: *Tomáškovy dny mladých mikrobiologů 2016*, Brno, Česká republika, 2-3.6.2016.
- [10] Zdražilová, I.; Pospíšilová, Š.; Pauk, K. et al. Antibacterial activity of novel salicylanilides against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VRE). Book of Abstracts: *The 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2015)*, Copenhagen, Denmark, April, 2015, EV0211.
- [11] Pospíšilová, Š.; Pauk, K.; Imramovsky, A. et al. Synergetic activity of salicylanilides against vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. Book of Abstract: *IV International Conference on Antimicrobial Research (ICAR 2016)*, Torremolinos-Malaga, Španělsko, 29.6-1.7.2016

Vplyv olanzapínu na sérové koncentrácie adipokínov u animálneho modelu schizofrénie.

Petra Pokrivčáková, Hana Kotolová, Karolína Sochorová, Jiří Procházka, Kateřina Horská

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ÚVOD

Olanzapín ako atypické antipsychotikum (AAP) sa používa pri terapii schizofrénie. Benefitom AAP oproti 1. generácii typických antipsychotik je nižšia prítomnosť extrapyramídového syndrómu, avšak rozvíjajú sa u nich metabolické nežiadúce účinky. Vplyvom týchto metabolických nežiadúcich účinkou, rozvoja metabolického syndrómu a kardioavaskulárnej morbidity je u schizofrenikov zaznamenaná zvýšená mortalita. Mechanizmy, ktorými AAP vyvolávajú tieto metabolické nežiadúce účinky zatiaľ nie sú úplne objasnené. Pozornosť sa upriamuje na rolu metabolizmu tukového tkaniva a neurohormonálnu reguláciu.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bolo použitých 40 samíc laboratórneho potkana (albino Sprague-Dawley) vo veku 8 týždňov, o hmotnosti 200-225g.

Zvieratá boli rozdelené do 4 skupín:

- krátkodobá štúdia : kontrolná skupina (n= 7)
skupina liečená olanzapínom (n=8)
- dlhodobá štúdia: kontrolná skupina (n=10)
skupina liečená olanzapínom (n=15)

Olanzapín (Zypadhera®) bol zvieratám podávaný v depotnej forme, intramuskulárne v dávke 100mg/kg každých 14 dní po dobu 8 týždňov.

V priebehu experimentu bola zvieratám odoberaná periférna krv z retrobulbárneho plexu každé 2 týždne (v 14. dni, 28. dni, 43. dni a 57. dni) a následne použité na analýzu. Zvieratá boli po krátkej anestézii isofluranom usmrtené dekapitáciou a to v 8. a 57. dni experimentu. Základné biochemické parametre boli stanovené spektrofotometricky pomocou automatického biochemického analyzátora (Dimension Xpand Plus®, kity Siemens®). Adipokíny, hormóny a cytokíny boli stanovené použitím imunochemickej metódy (ELISA) s využitím komerčných súprav (BioVendor®) a Bio-Plex® Multiplex systém (imunoassay kity Bio-Rad®).

Všetky činnosti v rámci experimentu boli uskutočnené v súlade s platnou legislatívou upravujúcou ochranu zvierat proti týraniu.

VÝSLEDKY

Spotreba krmiva a hmotnosť zvierat

Pri sledovaní zmien v hmotnosti laboratorných zvierat liečených olanzapínom oproti kontrolnej skupine v priebehu celého experimentu, sme zaznamenali štatisticky významný nárast hmotnosti u liečenej skupiny. Tento nárast bol zaznamenaný od 6. dňa, okrem posledného týždňa experimentu, kedy nebola zaznamenaná štatistická významnosť. Napriek štatisticky významnému nárastu hmotnosti v olanzapínom liečenej skupine sme nezaznamenali rozdiel v spotrebe krmiva pri porovnaní týchto dvoch skupín.

Lipidový profil

V priebehu experimentu boli zaznamenané štatisticky významné zmeny lipidového spektra, zníženie hladiny LDL a zvýšenie hladiny TAG u skupiny liečenej olanzapínom iba na začiatku (v 8.dni) experimentu. V ďalších meraniach nedošlo k štatisticky významným zmenám lipidového spektra.

Hladiny cytokínov a hormónov

Zaznamenali sme štatistickú významnosť pri porovnávaní hladín leptínu medzi liečenou a kontrolnou skupinou, a to na konci experimentu, v 57 dni. Štatisticky významný pokles sérových hladín GLP-1 a glukagónu u liečenej skupiny oproti kontrolnej skupine bol zaznamenaný v 29.dni experimentu.

ZÁVER

V našej štúdií sme počas celej doby jej trvania zaznamenali zvýšenie hmotnosti u skupiny liečenej olanzapínom, napriek štatisticky nevýznamným zmenám v spotrebe krmiva. Narozdiel od iných štúdií, ktoré udávali hyperfágiu a vyššiu spotrebu krmiva za sprievodný jav k nárastu hmotnosti sme v našej štúdií toto tvrdenie nepotvrdili. Existujú však štúdie, ktoré zaznamenali podobné výsledky a nepotvrdili štatisticky významnú spotrebu krmiva a ani nárast hmotnosti napriek zvýšenému množstvu tukového tkaniva.

Chronicky podávané AAP majú vplyv na lipidové spektrum, zvyšujú hladiny TAG a to nezávisle na náraste hmotnosti (Zugno et al., 2012). Akútne podanie olanzapínu má taktiež vplyv na zmeny lipidového spektra, kedy dochádza k zvýšeniu sérovej hladiny voľných mastných kyselín, TAG a zníženiu hladín cholesterolu (Jassim et al., 2012), čo sme potvrdili aj v našom experimente. AAP môžu spôsobovať hypertriglyceridémiu priamym pôsobením AAP na TAG metabolizmus rovnako

ako aj nepriamo prostredníctvom regulácie energetickej homeostázy centrálnym nervovým systémom (Yan et al., 2013).

Leptín je anorexigénny hormón, ktorého hladina je zvýšená u obezity v dôsledku leptínovej rezistencie (Klok et al., 2007). V začiatkovej fáze štúdie sme zaznamenali zvýšenú hladinu leptínu bez významného zvýšenia hmotnosti. V ďalších meraniach bola zvýšená hladina leptínu zaznamenaná spolu so signifikantným nárastom hmotnosti. Existujú rôzne výsledky štúdií, u ktorých efekt AAP na hladiny leptínu je buď bez zmien alebo hladina leptínu je signifikantne zvýšená po chronickom podaní AAP. Výsledky sa môžu líšiť v závislosti od metodológie, dávky AAP a trvania experimentu.

Ghrelín podobne ako leptín je zapojený do regulácie funkcií CNS a je spájaný taktiež s psychiatrickými ochoreniami (Wittekind et al., 2015). Podľa klinických štúdií sa hladina ghrelínu znižuje na začiatku terapie AAP, naopak dlhodobé podanie AAP zvyšuje jeho hladinu (Hegedus et al., 2015, Zhang et al., 2013). V našom experimente sme nezaznamenali dysreguláciu ghrelínu po chronickom podaní olanzapínu. Leptín spolu s ghrelínom sú schopné modulovať anorexigénny účinok GLP-1, avšak nie je úplne jasné akým spôsobom dochádza k týmto interakciám (Ronveaux et al., 2015). Leptín stimuluje sekréciu GLP-1 v závislosti na jeho množstve. Hladina GLP-1 je u obeznych jedincov na základe koncepcie leptínovej rezistencie znížená (Anini and Brubaker, 2003). Na základe zvýšenej hladiny leptínu v našej štúdii sme predpokladali, že dôjde k zníženiu sérovej koncentrácie GLP-1. Túto domnienku sme potvrdili iba čiastočne a to v 29. dni experimentu. Vysvetlením môže byť možná interakcia a časovo závislá zmena sekrécie GLP-1 počas chronického podania olanzapínu. Napriek tomu, že u obezity sa hladina FGF-21 zvyšuje a to nezávisle na lipidovom profile (Zhang et al., 2008) sme v našej štúdii podobné výsledky nezaznamenali.

Chronické podanie olanzapínu u potkanov v štúdii Victoriano et al., 2010 viedlo k zvýšeniu tukového tkaniva a vzniku nízkeho stupňa zápalu sprevádzaného zvýšenou expresiou TNF- α v tukovom tkanive a zvýšenými hladinami TNF- α a IL-1 v plazme. (Victoriano et al., 2010) Napriek tomuto zisteniu sme v našej štúdii nezaznamenali štatisticky významné zmeny v hladinách IL-1a, IL-6 a TNF- α . Efekt AAP môže prispievať k pro-zápalovému stavu, ktorý je spájaný so schizofréniou (Kucerova et al., 2015), avšak chronické podanie AAP môže zvýšiť signalizáciu proti-zápalových cytokínov (Meyer et al., 2011).

Zhoršená endokrinná funkcia tukového tkaniva prispieva k mechanizmom, ktoré sú zodpovedná za vznik metabolických nežiadúcich účinkov AAP. Pre stanovenie vhodných markerov ako prediktorov metabolických nežiadúcich účinkov AAP je nevyhnutné lepšie porozumieť neurohumorálnej regulácii a mechanizmom, ktoré sú zapojené do tejto regulácie.

Referencie:

- ANINI, Younes; BRUBAKER, Patricia L. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*, 2003, 52.2: 252-259.
- HEGEDŰS, Csaba, et al. Effect of long-term olanzapine treatment on meal-induced insulin sensitization and on gastrointestinal peptides in female Sprague–Dawley rats. *Journal of Psychopharmacology*, 2015, 29.12: 1271-1279.
- JASSIM, Goran, et al. Acute effects of orexigenic antipsychotic drugs on lipid and carbohydrate metabolism in rat. *Psychopharmacology*, 2012, 219.3: 783-794.
- KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews*, 2007, 8.1: 21-34.
- KUCEROVA, Jana, et al. The common pathophysiology underlying the metabolic syndrome, schizophrenia and depression. A review. *Biomedical papers*, 2015, 159.2: 208-214.
- MEYER, Urs; SCHWARZ, Markus J.; MÜLLER, Norbert. Inflammatory processes in schizophrenia: a promising neuroimmunological target for the treatment of negative/cognitive symptoms and beyond. *Pharmacology & therapeutics*, 2011, 132.1: 96-110.
- RONVEAUX, Charlotte C.; TOMÉ, Daniel; RAYBOULD, Helen E. Glucagon-like peptide 1 interacts with ghrelin and leptin to regulate glucose metabolism and food intake through vagal afferent neuron signaling. *The Journal of nutrition*, 2015, 145.4: 672-680.
- VICTORIANO, Montserrat, et al. Olanzapine-induced accumulation of adipose tissue is associated with an inflammatory state. *Brain research*, 2010, 1350: 167-175.
- WITTEKIND, Dirk Alexander; KLUGE, Michael. Ghrelin in psychiatric disorders - a review. *Psychoneuroendocrinology*, 2015, 52: 176-194.
- YAN, Hu; CHEN, Jin-Dong; ZHENG, Xiao-Yan. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced hypertriglyceridemia. *Psychopharmacology*, 2013, 229.1: 1-7.
- ZHANG, Xinmei, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes*, 2008, 57.5: 1246-1253.
- ZHANG, Qingsheng; DENG, Chao; HUANG, Xu-Feng. The role of ghrelin signalling in second-generation antipsychotic-induced weight gain. *Psychoneuroendocrinology*, 2013, 38.11: 2423-2438.
- ZUGNO, Alexandra I., et al. Energy metabolism, leptin, and biochemical parameters are altered in rats subjected to the chronic administration of olanzapine. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 2012, 34.2: 168-175.

Tato práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 312/2016/FaF

Vliv risperidonu na sérové hladiny adipokinů u animálního modelu schizofrenie

Karolína Sochorová, Kateřina Horská, Petra Pokrivčáková, Jiří Procházka, Hana Kotolová

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Risperidon je léčivo patřící do skupiny atypických antipsychotik (AAP). AAP mají nezastupitelnou roli v terapii psychiatrických onemocnění, ale jejich použití je spojeno s četnými metabolickými nežádoucími účinky, mezi něž patří přibývání na váze, dyslipidémie, inzulinová rezistence a rozvoj metabolického syndromu. Zároveň, metabolické komorbidity jsou ve srovnání se zdravou populací častější u psychiatricky nemocných a značně se u nich podílí na zkrácení očekávané doby dožití.

Změny v produkci adipokinů (hormonů tukové tkáně) a hormonů gastrointestinálního traktu jsou zkoumány v souvislosti s metabolickými nežádoucími účinky AAP. Leptin je adipokin, který snižuje apetit a jeho hladiny odráží množství tukových zásob v organismu [1]. Grelin je gastrointestinální hormon, který je významný pro zachování energetické homeostázy [2]. Cílem experimentu bylo objasnit vliv risperidonu na adipokiny a další hormony zapojené do regulace energetické homeostázy organismu.

Materiál a metodika

25 samic potkana Sprague-Dawley (věk 8 týdnů, m=225–250 g na počátku experimentu) bylo umístěno ve standardních polykarbonátových boxech po čtyřech. Standardní krmivo a voda byly k dispozici *ad libitum*. Veškeré činnosti v rámci experimentu byly provedeny v souladu s platnou legislativou upravující ochranu zvířat proti týrání.

Zvířata byla rozdělena do čtyř pokusných skupin:

- kontrolní, 4 týdny – VEH-4 (n=5)
- risperidon, 4 týdny – RIS-4 (n=7)
- kontrolní, 6 týdnů – VEH-6 (n=5)
- risperidon, 6 týdnů – RIS-6 (n=8)

Risperidon byl podán v depotní formě (Risperdal Consta®) i.m. v dávce 40 mg/kg 4týdenní skupině jednorázově a 6týdenní skupině dvě aplikace v rozestupu 14 dní. Kontrolním skupinám bylo aplikováno vehikulum. Zvířata byla usmrcena vždy měsíc po poslední aplikaci.

Hmotnost zvířat byla monitorována týdně a odečítáním hodnoty z týdne 0 od hodnot získaných dále byly vypočítány kumulativní hmotnostní přírůstky.

Zvířata byla usmrcena vykrvením pod vlivem celkového anestetika (isofluran) po předešlém 12hodinovém lačnění. Krev byla zachycena a centrifugací získané sérum bylo podrobeno biochemické analýze. Základní biochemické parametry, stanovené pomocí automatického spektrofotometrického analyzátoru (Dimension Xpand Plus®, kity Siemens®), byly: glukóza, celkový cholesterol, LDL, HDL a triacylglyceridy (TAG). Adipokiny, hormony a cytokiny byly stanoveny pomocí Bio-Plex® Multiplex System (imunoanalytické kity Bio-Rad®) a imunochemickou metodou ELISA za použití komerčních kitů (BioVendor®).

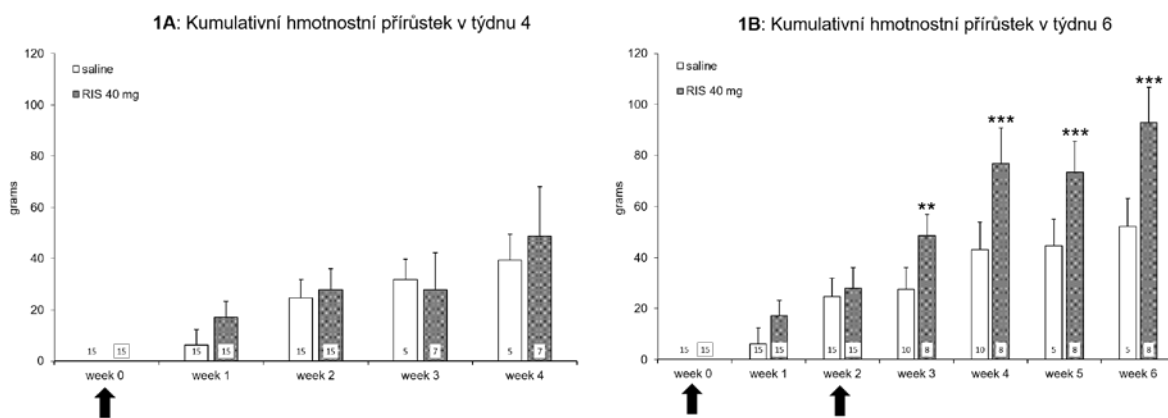
Základní statistické metody (t-test a Mann-Whitney U test) byly doplněny o ANOVA analýzu dat kumulativní hmotnosti, kde při detekci signifikantního rozdílu byl použit Tukey post-test.

Výsledky

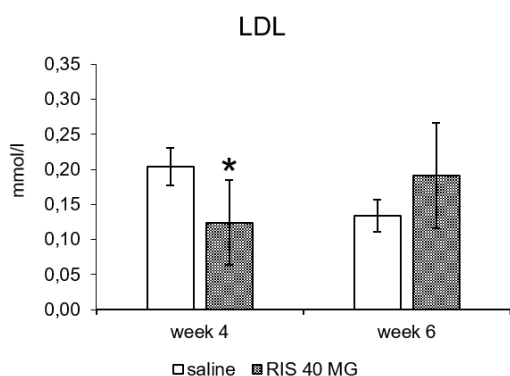
Obrázek 1 znázorňuje kumulativní hmotnostní přírůstek po 4 a 6 týdnech od první aplikace depotního risperidonu. V případě 4týdenní studie odhalila ANOVA signifikantní efekt týdne ($p=0,000$) a efekt interakce léčby a týdne ($p=0,005$). Tukey *post-hoc* test zde nepodal další signifikantní rozdíl. Data z delší, 6týdenní studie dle ANOVA prokazují signifikantní vliv léčby ($p=0,000$), týdne ($p=0,000$) a interakce léčby a týdne ($p=0,000$). Tukey *post-hoc* testem interakce léčby a týdne byly zjištěny vysoce signifikantní rozdíly počínaje týdnem 3 až po týden 6.

V lipidovém profilu jsme našli snížení koncentrace LDL v týdnu 4 (MWU test, $p=0,05$), které je graficky znázorněno na obrázku 2. V týdnu 6 došlo ke zvýšení koncentrace TAG (t-test, $p=0,008$), viz obrázek 3, v důsledku čehož vzrostl i AIP (aterogenní index plazmy, t-test, $p=0,031$). Celkový cholesterol, ani HDL ovlivněny nebyly.

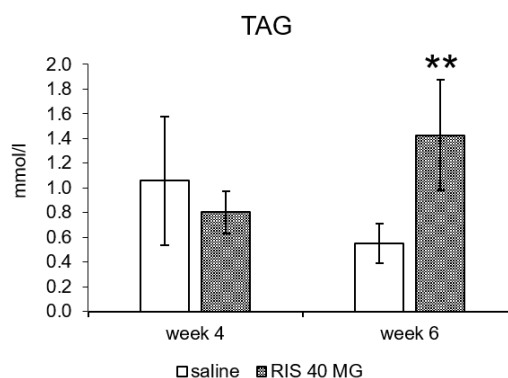
Depotní aplikace RIS vedla k předpokládanému nárůstu leptinu v týdnech 4 i 6 (MWU test, $p=0,03$ a $p=0,004$), což znázorňuje obrázek 4. Obrázek 5 ilustruje detekované zvýšení grelinu (t-test, $p=0,04$) v týdnu 6, kdy jsme zaznamenali rovněž signifikantně zvýšenou koncentraci IL-6 (MWU test, $p=0,004$). Glukagon, glucagon-like peptid (GLP) a IL-1 zůstaly bez významné změny.



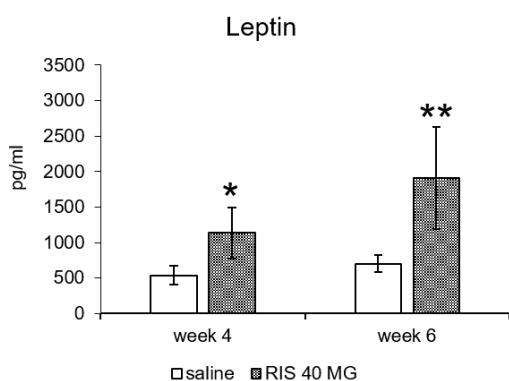
Obrázek 1: Kumulativní hmotnostní přírůstky po depotní aplikaci RIS v 4. a 6. týdnu



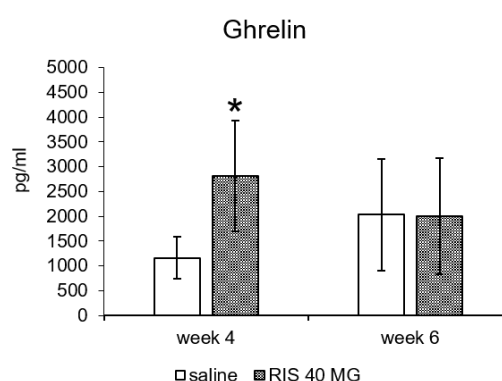
Obrázek 2: Sérové koncentrace LDL



Obrázek 3: Sérové koncentrace TAG



Obrázek 4: Sérové koncentrace leptinu



Obrázek 5: Sérové koncentrace grelinu

Závěr

V této práci jsme se zaměřili na metabolické nežádoucí účinky a změny adipokinů a dalších hormonů v návaznosti na depotní podávání risperidonu u samic potkana Sprague-Dawley v dávce 40 mg/kg v experimentu trvajícím 4 a 6 týdnů. Efekt risperidonu na hmotnostní přírůstek byl signifikantní po druhé aplikaci od týdne 3 a přetrvával do týdne 6, jednorázová aplikace v 4týdenní skupině však tento efekt neměla. Námi zjištěný pokles LDL cholesterolu v týdnu 4 je ve shodě s literaturou a podporuje hypotézu, že po podání risperidonu dochází k inhibici biosyntézy cholesterolu [3]. Dále jsme pozorovali zvýšení TAG a AIP po 6 týdnech u zvířat exponovaných 40 mg/kg RIS. Diskutuje se možný mechanismus navýšení TAG skrze aktivaci sterol-regulatory binding proteinu (SREBP), která by vznikala právě v reakci na inhibici syntézy cholesterolu [3]. Elevace leptinu byla pozorována v týdnu 4 a 6, nezávisle na přírůstku hmotnosti, což značí, že změny v plazmatické koncentraci leptinu tomuto přírůstku předchází. Koncentrace grelinu byla signifikantně vyšší v týdnu 4, ale ne už v týdnu 6, podobný výsledek po administraci RIS osmotickou pumpou samcům potkana uvádí jiná práce [4]. Důvodem následného poklesu grelinu

může být snížení jeho sekrece přímým supresivním účinkem leptinu, které bylo již dříve popsáno [5]. Prezentovaná práce přinesla první data o hormonální dysregulaci indukované depotně podávaným risperidonem.

Seznam literatury:

- [1] CRUJEIRAS, Ana B. et al. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. *Life Sciences* [online]. 2015, roč. 140, s. 57–63. ISSN 1879-0631.
- [2] QUARTA, Davide a Ilse SMOLDERS. Rewarding, reinforcing and incentive salient events involve orexigenic hypothalamic neuropeptides regulating mesolimbic dopaminergic neurotransmission. *European journal of pharmaceutical sciences* [online]. 2014, roč. 57, s. 2–10 [vid. 10. květen 2016]. ISSN 1879-0720.
- [3] CANFRÁN-DUQUE, Alberto et al. Atypical antipsychotics alter cholesterol and fatty acid metabolism in vitro. *Journal of lipid research* [online]. 2013, roč. 54, č. 2, s. 310–24 [vid. 15. listopad 2016]. ISSN 1539-7262.
- [4] SECHER, Anna et al. Risperidone treatment increases CB1 receptor binding in rat brain. *Neuroendocrinology* [online]. 2010, roč. 91, č. 2, s. 155–68 [vid. 15. listopad 2016]. ISSN 1423-0194.
- [5] KAMEGAI, Jun et al. Effects of insulin, leptin, and glucagon on ghrelin secretion from isolated perfused rat stomach. *Regulatory Peptides* [online]. 2004, roč. 119, č. 1, s. 77–81 [vid. 15. listopad 2016]. ISSN 0167-0115.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 313/2016/FAF.

Syntéza inhibitorů protein kinas jako nových potenciálních antimikrobiálních sloučenin

Markéta Havelková¹, Hana Pížová¹

¹Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Od 90. let 20. století lze zaznamenat postupné zvyšování výskytu infekcí způsobované různými skupinami patogenů i původně nepatogenními kmeny. Za touto skutečností stojí jednak celkově snížená imunita světové populace způsobená genetickým vývojem i léčbou jiných onemocnění, ale především exponenciálně rostoucí rezistence na stávající protiinfekční léčiva, přičemž se nejedná pouze o rezistenci proti chemoterapeutikům 1. volby, ale i proti léčivům 2. a 3. řady. Častým jevem je výskyt rezistentních, resp. multirezistentních bakteriálních, mykobakteriálních i fungálních kmenů¹. Není příliš obtížné navrhnout, s využitím poznatků o vztazích mezi strukturou a aktivitou, potenciálně účinnou proinvasivní sloučeninu ze známých skupin léčiv a připravit tak „me-too“ léčivo. V současné době i přes pokroky molekulární biologie a příbuzných oborů je ale stále těžší projektovat nová protiinfekční chemoterapeutika s novým mechanismem účinku². Velmi slibným cílem se jeví protein kinasy, enzymy katalyzující přenos fosfátu a ovlivňující řadu vitálních pochodů jak eukaryotní tak prokaryotní buňky³. Kromě známých a k terapii onkologických nemocí používaných inhibitorů tyrosin kinas³, existují i další kinasy, např. serin, threonin, prolin, histidin kinasy, z nichž mnohé vykazují specifitu pro prokaryotní buňky a jejich inhibice může vést k inhibici proliferace těchto organismů³⁻⁵.

Metodika

Cílem práce byla příprava série 25 monosubstituovaných derivátů Z-L-prolinu s různou substitucí na aromatickém jádře anilidu (tj. fluor, chlor, brom, nitro, methoxy, methyl, trifluoromethyl a hydroxy skupina).

Syntéza vycházela z (2S)-1-[(benzyloxy)karbonyl]pyrrolidin-2-karboxylové kyseliny (Z-L-prolinu). V prvním kroku byl připraven z kyseliny anilid reakcí s vhodně substituovaným anilinem pomocí T3P⁶ (Schéma 1). Metoda byla již dříve ověřena na reakci s nesubstituovaným anilinem a probíhala v jednom kroku ve vysoké čistotě s 86 % výtěžkem⁶. Pro přípravu derivátů s hydroxy skupinou na aromatickém jádře anilinu byla tato metoda neúspěšná. Ty byly připraveny reakcí přes směsný anhydrid pomocí ethylchlorformiátu a triethylaminu v THF⁷. Ve druhém stupni bylo plánované odstraňování benzyloxykarbonylové chránící skupiny z dusíku v kruhu pyrrolidinu hydrogenací s katalyzátorem Pd/C v methanolu⁷.

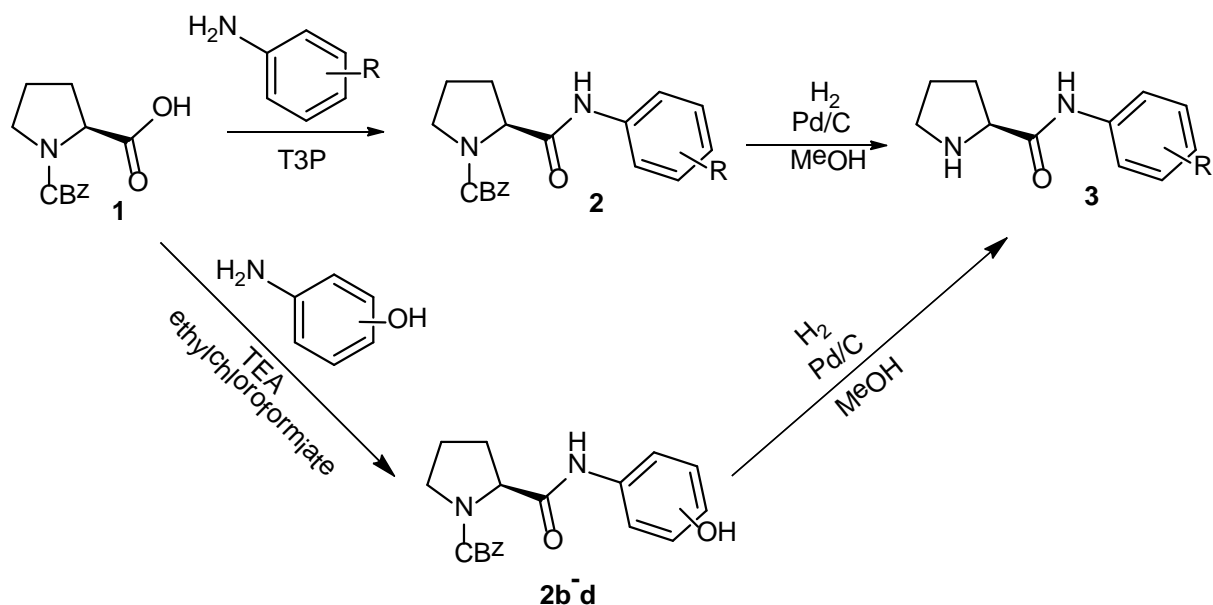


Schéma 1

Výsledky

První krok syntézy byl optimalizován a bylo dosaženo relativně vysokých výtěžků: Z-L-prolin (2,0059 mmol) byl rozpuštěn v 5 ml bezvodého ethylacetátu. Byl přidán příslušný substituovaný anilin (3,0089 mmol, 1,5 eq) a katalyzátor - 50% roztok T3P v ethylacetátu (4,0119 mmol, 2 eq). Reakční směs byla zahřívána při 80°C 24 hodin pod atmosférou inertního plynu. Konverze reakce byla sledována pomocí TLC. Po zpracování reakční směsi bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce a surový produkt byl vyčištěn triturací (diethylether/petrolether), nebo sloupcovou chromatografií.

V případě hydroxy derivátů byl předchozí postup neúspěšný a byl nahrazen následující metodou: V baňce byl rozpuštěn Z-L-prolin (2,0059 mmol) v bezvodém THF. Reakční směs byla zchlazena na -5°C. Za stálého míchání byl přidán ethylchloroformiát (1 eq) a příslušný anilin a směs byla míchána 1 hodinu při -5°C a dalších 16 hodin při laboratorní teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Reakční směs byla zpracována a produkty přečištěny.

Vzniklé produkty byly charakterizovány spektrálními metodami (NMR, IR a HRMS). Přehled prvních 25 látek je uveden v Tabulce 1. Na partnerských pracovištích bylo prováděno testování biologické aktivity. Látky byly testovány in vitro proti *Mycobacterium marinum* CAMP 5644, *M. kansasii* DSM 44162 a *M. smegmatis* ATCC 700084. Z výsledků lze vidět, že pro zvýšení antimykobakteriální aktivity je nezbytná přítomnost lipofilní nebo elektron-akceptorní skupiny v poloze 4 na anilidovém kruhu.

Sloučenina	R	Výtěžek [%]	t.t. [°C]	MIC [μM]		
				M. smegmatis ATCC 700084	M. kansasii DSM 44162	M. marinum CAMP 5644
2a	H	80	140-141	790	395	395
2b	2-OH	98	olej	753	753	753
2c	3-OH	81	153-157	753	753	753
2d	4-OH	60	193-194	753	753	753
2e	2-OCH ₃	67	74-76	723	723	723
2f	3-OCH ₃	79	118-120	723	362	723
2g	4-OCH ₃	58	122-124	723	181	181
2h	2-CH ₃	72	115-117	757	757	757
2i	3-CH ₃	65	101-103	757	379	757
2j	4-CH ₃	76	143-146	757	379	757
2k	2-F	96	113-115	749	749	749
2l	3-F	96	82-84	749	374	374
2m	4-F	96	122-124	749	374	749
2n	2-Cl	85	76-78	715	358	358
2o	3-Cl	79	101-103	715	179	179
2p	4-Cl	76	121-123	715	179	179
2q	2-Br	83	77-79	635	318	635
2r	3-Br	75	124-126	635	159	159
2s	4-Br	93	109-111	635	159	159
2t	2-CF ₃	65	82-84	653	327	653
2u	3-CF ₃	63	86-88	653	163	163
2v	4-CF₃	62	106-109	82	82	82
2x	2-NO ₂	72	olej	694	173	694
2y	3-NO ₂	60	101-104	694	347	694
2z	4-NO ₂	99	144-148	694	694	694
INH	-	-	-	117	29	467

Tabulka 1

V druhém kroku syntézy se odstraňovala chránící benzyloxykarbonylová skupina hydrogenací za pomoci 10 % Pd/C v methanolu. Při této reakci vznikala směs látek a proto je potřeba optimalizovat reakční podmínky.

Závěr

Podářilo se získat 25 různě monosubstituovaných anilidů Z-L-prolinu v dobrých výtěžcích a vysoké čistotě. Syntéza byla optimalizovaná a látky byly plně charakterizovány pomocí instrumentálních metod. Tyto látky byly podrobeny biologickému testování. Ukázalo se, že látka **2v**, tedy derivát s 4-CF₃ substitucí, vykazoval největší aktivitu proti *M. marinum* a *M. smegmatis*. Tato látka může být použita jako model pro budoucí optimalizace struktury.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 315/2016/FAF.

Seznam literatury:

1. WHO – Antimicrobial resistance: Global report on surveillance, 2014.
2. East, S.P.; Silver, L.L. *Expert Opin Drug Discov.* **2013**, *8*, 143-156.
3. Cheng, H.C.; Qi, R.Z.; Paudel, H.; Zhu, H.J. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, Article ID 794089.
4. Mueller-Premru, M.; Zidar, N.; Spik, V.C.; Kropce, A.; Kikelj, D. *Chemotherapy* **2009**, *55*, 414-417.
5. Malhotra, V.; Agrawal, R.; Duncan, T.R.; Saini, D.K.; Clark-Curtiss, J.E. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 8294-8309.
6. Pizova, H., Bobal, P. *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 2014-2017.
7. Rhyoo, H. Y., Yoon, Y. A., Park, H. J., Chung, Y. K. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 5045-5048.

Vliv derivátů hydroxynaftalenkarboxanilidu na enzymatickou aktivitu DNA topoizomeráz

Aneta Krejčí¹, Zuzana Bábková¹, Lucie Hadačová¹, Veronika Říhová¹, Lenka Michalová¹, Alena Polášková¹, Jiří Kos², Tomáš Goněc², Josef Jampílek², Marie Brázdová¹

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita²

Úvod

Infekční onemocnění způsobená patogeny rezistentními na dosud známou léčbu představují celosvětovou hrozbu, proto je důležité věnovat se vývoji nových látek s možným antimikrobiálním potenciálem, jako jsou deriváty hydroxynaftalenkarboxanilidu. Ve své základní struktuře mají v těsné blízkosti hydrofobního zbytku amidovou skupinu, která je charakteristická pro spoustu antibakteriálních, antimykobakteriálních a antiparazitických látek [1, 2]. Bakteriální topoizomerázy jsou enzymy nezbytné pro regulaci topologie DNA během klíčových buněčných procesů, jako je replikace nebo transkripce, což z nich dělá vhodné cíle v rozvoji nových antibakteriálních látek a zároveň i látek s možnou protirakovinnou aktivitou. Cílem práce bylo testování vlivu derivátů hydroxynaftalenkarboxanilidu na funkci enzymů ovlivňujících superhelikální vinutí DNA. Za potenciální cíle antibakteriálního působení testovaných derivátů byla vybrána DNA topoizomeráza, katalyzující rozvolnění negativního superhelikálního vinutí DNA, a enzym DNA gyráza, který naopak negativní vinutí zavádí. Bylo ukázáno, že aktivita eukaryotické DNA topoizomerázy může být výrazným způsobem modulována proteinem p53, kdy tento nádorový supresor ovlivňuje afinitu DNA topoizomerázy k superhelikální DNA [3]. Proto byl dále testován inhibiční účinek látek na eukaryotickou topoizomerázu I a vliv proteinu p53 na účinek eukaryotické DNA topoizomerázy I.

Materiál a metodika

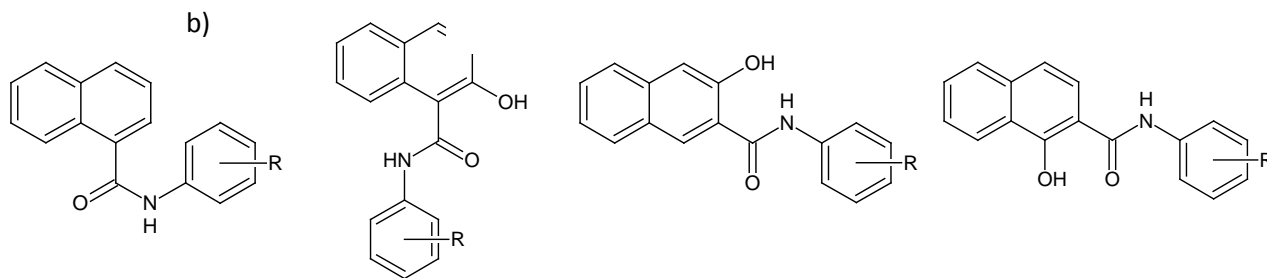
Deriváty hydroxynaftalenkarboxanilidu byly syntetizovány na Ústavu chemických léčiv FaF VFU Brno pod vedením Doc. Jampílka. Zásobní vzorky testovaných látek byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na výslednou koncentraci 100 mM. DNA topoizomeráza I (*E.coli*), DNA gyráza (*E.coli*) a DNA topoizomeráza I (*Calf thymus*) byly zakoupeny od firmy New England BioLabs. Plasmidy pBluescript, pMK47 a pMK90 (pro produkci rekombinantní DNA gyrázy) byly izolovány z TOP10 *E.coli* buněk pomocí kitu Nucleospin Plasmid od firmy Macherey-Nagel. Příprava relaxované DNA, substrátu pro DNA gyrázu, byla provedena dle [4].

Pro inhibiční test enzymové aktivity bylo použito 200 ng DNA a po optimalizaci postupu 0,5 U/μg DNA topoizomerázy I a 3,75 U/μg DNA gyrázy. Testované látky byly nejprve

preinkubovány 15 minut s enzymem při pokojové teplotě a následně byla směs inkubována se substrátem po dobu 30 min při 37 °C. Látky byly testovány v rozmezí koncentrací 25 – 500 μM a srovnávány s ciprofloxacinem [5]. Získané výsledky byly vyhodnocovány denzitometricky v programu Image J, jehož pomocí byla stanovena reziduální aktivita enzymu. Dále byl testován inhibiční účinek látek na eukaryotickou topoizomerázu I a vliv nádorového supresorového proteinu p53 na účinek DNA topoizomerázy I.

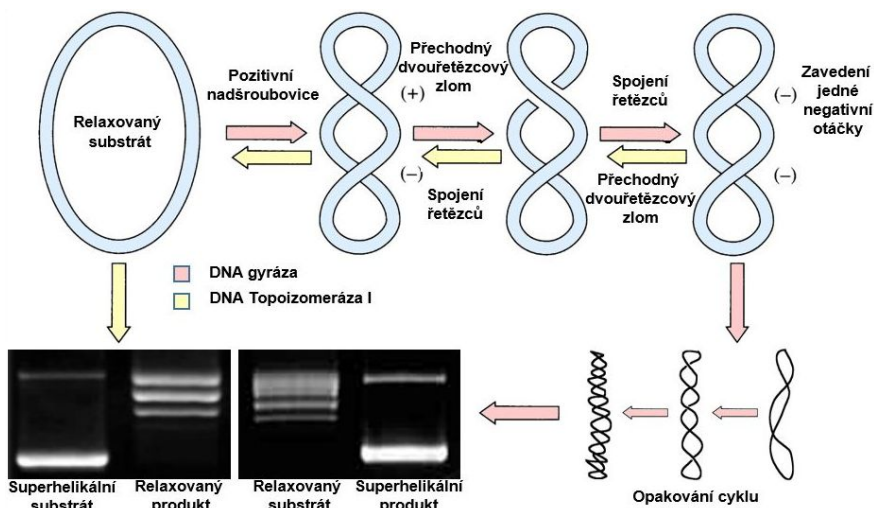
Výsledky

Celkem bylo testováno 53 nově syntetizovaných derivátů majících stejnou základní strukturu. Látky se lišily pouze v pozici karboxanilidové a hydroxylové skupiny na naftalenovém kruhu struktury. První dvě skupiny látek (BG a CP) obsahují karboxanilidovou skupinu v poloze 1, látky skupiny CP mají navíc ve struktuře i hydroxylovou skupinu v pozici 2. Skupina látek BG hydroxylovou skupinu postrádá. Látky skupiny JK a NM obsahují v poloze 2 karboxanilidovou skupinu a liší se pouze polohou hydroxylové skupiny, která je v případě látek NM vázána v poloze 1, zatímco u látek JK v poloze 3 (obr. č. 1).



Obrázek č. 1.: Základní struktury testovaných derivátů hydroxynaftalenkarboxanilidu: a) BG b) CP c) JK d) NM.

Schopnost látek inhibovat bakteriální enzymy DNA topoizomerázu I a DNA gyrázu byla zkoumána pomocí inhibičního enzymového testu založeného na detekci změn elektroforetické mobility substrátu DNA (obr. č. 2). Experiment spočíval ve sledování změny superhelicity DNA po preinkubaci sledovaných látek s enzymem a inkubaci s DNA substrátem, vliv látek na superhelicitu DNA po působení enzymu byl sledován na agarózovém gelu. Inhibiční účinek látek byl srovnáván se známým inhibitorem bakteriálních topoizomeráz, ciprofloxacinem [5]. Mezi nejúčinnější studované látky patřil derivát NM25 (obr. č. 3 a-c). Zjistili jsme, že inhibiční účinek látek je závislý na množství enzymu, které vstupuje do reakce. V případě DNA topoizomerázy I (*E. coli*) (obr. č. 3 a) byl inhibiční efekt látek pozorován v rozmezí aktivit enzymu 0,25 – 1,25 U/μg substrátu DNA.

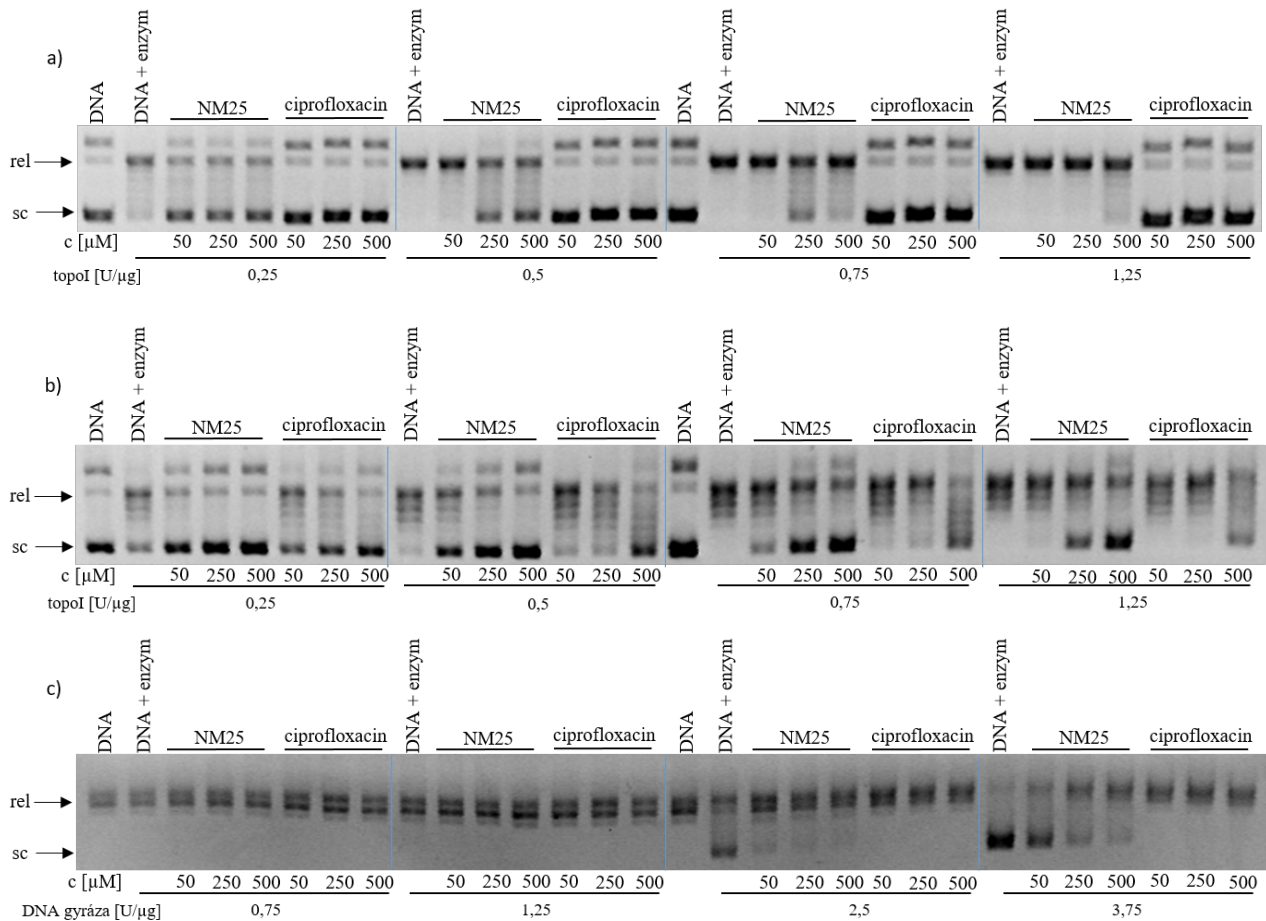


Obr. č. 2: Schéma působení DNA gyrázy (oranžově) a topoiomerázy I (žlutě) na DNA.

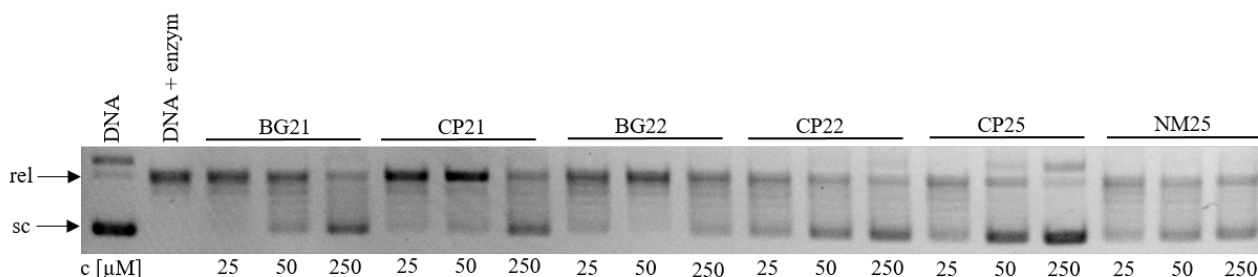
V případě

eukaryotické DNA topoiomerázy I (obr. 3 b) byl inhibiční účinek látek pozorován pro 0,25 – 1,25 U/μg substrátu. DNA gyráza

byla z testovaných enzymů nejméně citlivá, ale také relativně nejméně účinná, bylo nutno používat 2,5 - 3,75 U/μg DNA substrátu (obr. č. 3 c). Byly srovnávány strukturně příbuzné látky BG s CP a JK s NM. Ze získaných výsledků vyplývá, že jak typ látky BG, CP, JK či NM, tak i substituent hraje roli při inhibici DNA topoiomeráz (obr. č. 4). Neúčinnější byly látky NM25, JK25 a CP25.



Obr. č. 3: Stanovení optimální koncentrace a) bakteriální topoiomerázy I b) eukaryotické topoiomerázy I a c) gyrázy.



Obr. č. 4: Srovnání vlivu látek BG/CP na aktivitu DNA topoizomerázy I (*E.coli*) v koncentraci 0,5 U/μg.

Závěry

Cílem projektu bylo zjistit, jaký vliv mají deriváty hydroxynaftalenkarboxanilidu na schopnost DNA topoizomeráz a DNA gyrázy ovlivňovat nadšroubovicové vinutí DNA. Z výsledků vyplývá, že deriváty ovlivňují jak aktivitu bakteriální, tak i eukaryotické DNA topoizomerázy I, i bakteriální DNA gyrázy. Působení látek na DNA topoizomerázy je výrazně ovlivněno dobou expozice a koncentrací enzymu. Zjistili jsme, že jak charakter látky, typ derivátu JK, NM, CP a BG, tak i typ substituentu či efektoru (protein p53), ovlivňuje aktivitu studovaných enzymů.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 316/2016/FaF.

Seznam literatury:

- [1] Kos, J., Nevin, E., Soral, M., Kushkevych, I., Gonec, T., Bobal, P., Kollar, P., Coffey, A., O'Mahony, J., Liptaj, T., et al. (2015). Synthesis and antimycobacterial properties of ring-substituted 6-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 2035–2043.
- [2] Zadrazilova, I., Pospisilova, S., Masarikova, M., Imramovsky, A., Ferriz, J.M., Vinsova, J., Cizek, A., and Jampilek, J. (2015). Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Eur J Pharm Sci* 77, 197–207.
- [3] Gobert, C., Skladanowski, A., and Larsen, A.K. (1999). The interaction between p53 and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 10355–10360.
- [4] Brázdová, M., Navrátilová, L., Tichý, V., Němcová, K., Lexa, M., Hrstka, R., Pečinka, P., Adámik, M., Vojtesek, B., Paleček, E., et al. (2013). Preferential Binding of Hot Spot Mutant p53 Proteins to Supercoiled DNA In Vitro and in Cells. *PLoS One* 8.
- [5] Tabary, X., Moreau, N., Dureuil, C., and Le Goffic, F. (1987). Effect of DNA gyrase inhibitors pefloxacin, five other quinolones, novobiocin, and clorobiocin on *Escherichia coli* topoisomerase I. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1925–1928.

Stanovení vybraných fyzikálně-chemických vlastností derivátů arylkarboxyloxyaminopropanolů separačními technikami

Filip Dlouhý, Klára Odehnalová

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Česká republika*

Úvod

Fyzikálně-chemické vlastnosti aktivních farmaceutických látek jakými jsou lipofilita ($\log P$), distribuční koeficient ($\log D$) a disociační konstanta (pK_a) patří ke klíčovým parametrům, které ovlivňují osud léčiva v biologickém systému, jeho absorpci, distribuci, metabolismus a vylučování (ADME) [1,2]. Existuje zde řada komerčně dostupných výpočetních programů, pomocí kterých můžeme tyto parametry predikovat, ale výsledky predikcí se mohou od sebe navzájem lišit v závislosti na algoritmu použitém při výpočtu [3]. Ačkoliv jsou predikované hodnoty cennými parametry při navrhování designu nového léčiva, měli by být v brzkém stádiu vývoje léčiv nahrazeny daty naměřenými.

Cílem tohoto projektu bylo stanovení disociačních konstant a indexů lipofility $\log k_w^{7.4}$ a $\log k_w$ nových derivátů arylkarboxyloxyaminopropanolů, látek s potenciální kardiovaskulární aktivitou. Disociační konstanty léčiv byly stanoveny metodou kapilární zónové elektroforézy (CE), kdy jsou hodnoty pK_a stanoveny na základě monitorování závislosti efektivní mobility analytu na pH základního elektrolytu (BGE) [4,5]. Pro stanovení indexů lipofility byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC). Principem stanovení je sledování logaritmu retenčního faktoru analytu jako funkce obsahu organického podílu v mobilní fázi [6,7].

Materiál a metody

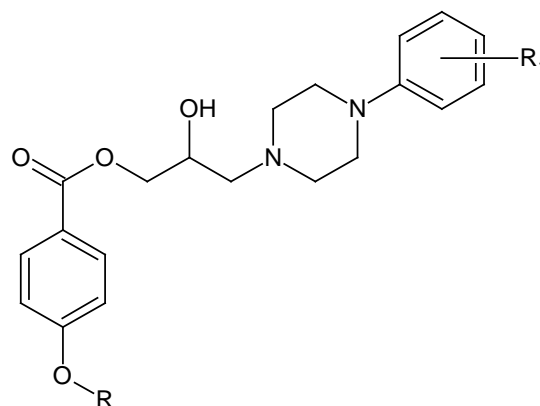
Disociační konstanty byly stanoveny pomocí přístroje Agilent 3D CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) vybaveném detektorem diodového pole, ovládaném 3D-CE ChemStation softwarem. Separace byla provedena v křemenné kapiláře (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) s celkovou délkou 33 cm (délka k detektoru byla 24,5 cm) a vnitřním průměrem 50 μm . V průběhu separace byla kapilára chlazena vzduchem na teplotu 25°C. Roztok vzorku ($c \sim 5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, v základním elektrolytu) byl dávkován hydrodynamicky s použitím tlaku 40 mbar po dobu 4 s. K separaci bylo použito napětí 15 kV, látky byly detekovány při 254 nm. Jako marker elektroosmotického toku byl použit mesityloxid. Mobilita každého analytu byla měřena v systému devíti pufrů s konstantní iontovou silou ($I = 10 \text{ mM}$) v rozsahu pH 4 – 8,5. Hodnoty $\log k_w^{7.4}$ byly

měřeny na přístroji Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) HPLC kontrolovaném Chromeleon® Chromatography Data systémem (verze 7.2). Separace byla provedena na koloně Zorbax Extended-C18 (3,5 μm , 3 x 150 mm; Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Mobilní fáze se skládala z pufru (0,02 M 3-morpholinopropansulfonová kyselina s přidavkem 0,15% n-decylaminu; pH = 7,4; složka A) a metanolu, ke kterému bylo přidáno 0,25 % n-octanolu (složka B). Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na hodnotu 0,4 ml/min, teplota kolony byla 25°C. K detekci byla vybrána vlnová délka 254 nm. Objem nástřiku byl 1 μl vzorku (c = 0,1 mg/ml v 50% metanolu). Retenční faktory byly měřeny isokraticky v rozsahu 20:80 – 50:50 (A:B; v/v). Lineární regresní analýzou byly vypočítány hodnoty $\log k_w^{7.4}$, a z těchto následně hodnoty $\log k_w$ dle následující rovnice: $\log k_w = \log k_w^{app} + \log(1 + 10^{pK_a - pH})$

Výsledky

Struktury jednotlivých analyzovaných derivátů arylkarbonyloxyaminopropanolů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1) a jejich schéma znázorněno na Obr. 1.

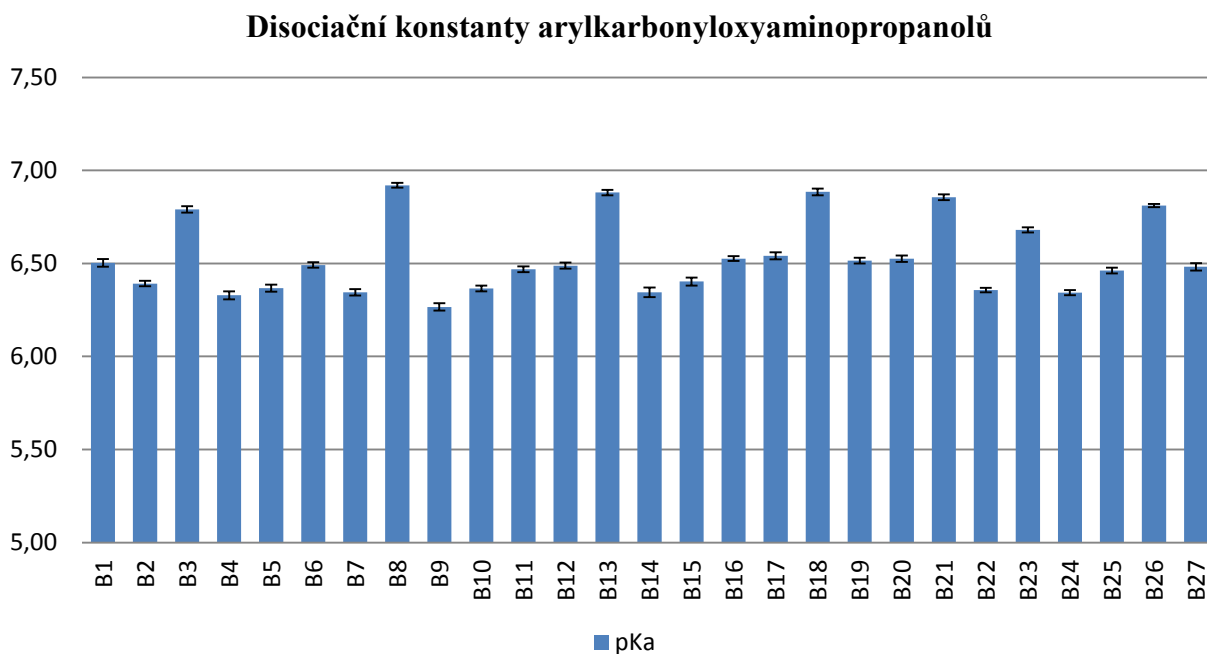
označení	R	R1
B1	propoxyethoxy	bez subst.
B2	propoxyethoxy	<i>p</i> -methoxy
B3	propoxyethoxy	<i>o</i> -methoxy
B4	propoxyethoxy	<i>p</i> -fluoro
B5	propoxyethoxy	<i>o</i> -fluoro
B6	isopropoxyethoxy	bez subst.
B7	isopropoxyethoxy	<i>p</i> -methoxy
B8	isopropoxyethoxy	<i>o</i> -methoxy
B9	isopropoxyethoxy	<i>p</i> -fluoro
B10	isopropoxyethoxy	<i>o</i> -fluoro
B11	alyloxyethoxy	bez subst.
B12	alyloxyethoxy	<i>p</i> -methoxy
B13	alyloxyethoxy	<i>o</i> -methoxy
B14	alyloxyethoxy	<i>p</i> -fluoro
B15	alyloxyethoxy	<i>o</i> -fluoro
B16	methoxyethoxy	<i>o</i> -methoxy
B17	methoxyethoxy	<i>p</i> -methoxy
B18	methoxyethoxy	2,6-dimethoxy
B19	ethoxyethoxy	<i>o</i> -methoxy
B20	ethoxyethoxy	<i>p</i> -methoxy
B21	ethoxyethoxy	2,6-dimethoxy
B22	propoxy	bez subst.
B23	propoxy	<i>p</i> -methoxy
B24	propoxy	<i>o</i> -methoxy
B25	isopropoxy	bez subst.
B26	isopropoxy	<i>p</i> -methoxy
B27	isopropoxy	<i>o</i> -methoxy



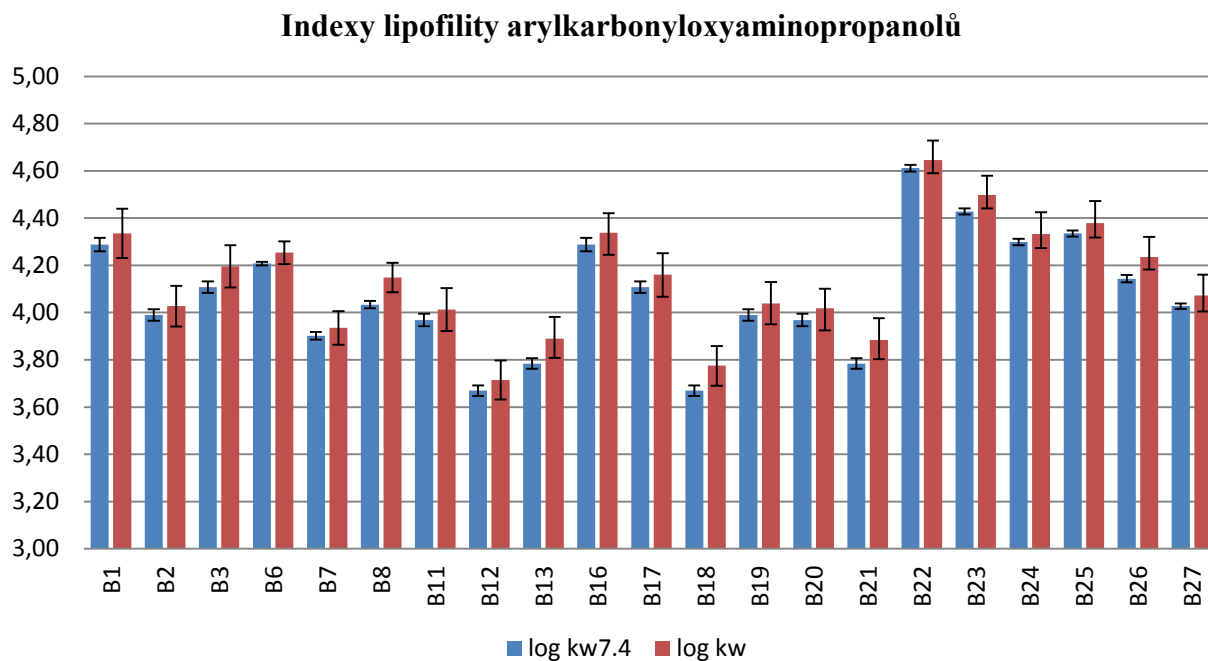
Obr. 1

Tab. 1: Přehled analyzovaných derivátů

Experimentálně stanovené hodnoty pK_a metodou CE jsou znázorněny na *Obr. 2*. Determinační koeficienty stanovení jsou $\geq 0,99$ a směrodatné odchylky měření pak $\leq 0,03$ ($n = 4$). Disociační konstanty derivátů obsahujících piperazinovou strukturní jednotku se pohybují v rozmezí 6,33 až 6,88.



Obr. 2: Experimentální hodnoty pK_a ($n = 4$)



Obr. 3: Experimentální hodnoty $\log k_w^{7.4}$ ($n = 2$) a hodnoty $\log k_w$

Naměřené hodnoty $\log k_w^{7.4}$ a vypočítané hodnoty $\log k_w$ jsou znázorněny na *Obr. 3*. Determinační koeficienty stanovení jsou $\geq 0,99$ a směrodatné odchylky měření $\leq 0,03$ ($n = 2$). Hodnoty $\log k_w$ sledovaných derivátů se pohybují v rozmezí 3,72 až 4,65.

Závěry

V rámci projektu byly naměřeny disociační konstanty 27 nových potenciálních léčiv a indexy lipofility 21 látek. Byla vypracována metodika měření fyzikálně-chemických vlastností těchto typů látek, která bude v budoucnu použita pro analýzu obdobných struktur.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 318/2016/FaF.

Seznam literatury

1. Mälkiä, A.; Murtomäki, L.; Urtti, A.; Kontturi, K. Drug permeation in biomembranes *In vitro* and *in silico* prediction and influence of physicochemical properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2004**, *23*, 13-47.
2. Alavijeh, M.S.; Chishty, M.; Qaiser, M.Z.; Palmer, A.M. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx* **2005**, *2*, 554-571.
3. Mannhold, A.; Waterbeemd, H. Substructure and whole molecule approaches for calculating log P. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2001**, *15*, 337–354.
4. Kapustikova, I.; Tengler, J. Determination of Acid-base Dissociation Constant of Selected β -blockers Using Capillary Zone Electrophoresis, RP-HPLC and $^1\text{H-NMR}$. *Chem. Listy* **2014**, *108*, 1073-1079.
5. Poole, S.K.; Patel, S.; Dehring, K.; Workman, H.; Poole, C.F. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 445-454.
6. Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review. *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.* **2008**, *31*, 79-96.
7. Lombardo, F.; Shalaeva, M.Y.; Tupper, K.A.; Gao, F. ElogDoct: A tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 2490-2497.

Izolace obsahových látek *Sceletium tortuosum* a stanovení jejich protizánětlivé a antibakteriální aktivity

Veronika Rjašková, PharmDr. Karel Šmejkal, Petra Kaucká

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Sceletium tortuosum (Aizoaceae) je sukulentní trvalka vyskytující se v Jižní Africe.^{1,2} Doposud provedená fytochemická analýza této rostliny prokázala přítomnost různých alkaloidů (např. mesembrin, mesembrenon, mesembrenol, mesembranol). Některé z těchto alkaloidů (mesembrin, mesembrenol) inhibují zpětné vychytávání serotoninu, u mesembrenonu byla kromě toho prokázána i inhibice fosfodiesterázy 4A a 4B.^{2,3,4} Obsahové látky však zatím nebyly testovány na protizánětlivou aktivitu. V patologii zánětu má důležitou funkci enzym cyklooxygenáza (COX) vyskytující se ve dvou formách. Pomocí konstitutivní cyklooxygenázy (COX1) vznikají produkty s mnoha fyziologickými funkcemi. Inducibilní cyklooxygenáza (COX2) se aktivuje při zánětu a produkuje zápalové mediátory jako prostaglandiny. V současnosti nejsou známy selektivní inhibitory COX2, které by zároveň neměly závažné nežádoucí účinky.⁵ Cílem práce byla separace látek z 2 vzorků různého původu a srovnání jejich obsahových látek, protizánětlivé a antibakteriální aktivity.

Materiál a metodika

Jako vzorek č. 1 byla použita celá sušená rostlina *S. tortuosum* získána v Jižní Africe. Sběr, sušení a identifikaci rostliny provedl profesor Alvaro Viljoen (Department of Pharmaceutical Sciences, Tshwane University of Technology).

Vzorek č. 2 byl prášek z rostliny *S. tortuosum* o hmotnosti 3 kg, zakoupený přes internetový obchod na stránce <http://sceletiumtortuosum.co.za/>.

Z obou vzorků byl připraven methanolický extrakt (SCT1, SCT2), který byl vytřepáváním s nemísitelnými kapalinami rozdělen na extrakt hexanový (SCT1A, SCT2A), chloroformový (SCT1B, SCT2B), etylacetátový a vodní. Zbytek rostlinného materiálu byl extrahován 10% H₂SO₄. Tento extrakt byl pak po filtraci alkalizován a vytřepán do chloroformu. Celkem tak bylo získáno 5 extraktů na každý vzorek.

Osm extraktů bylo testováno na protizánětlivou aktivitu metodou inhibice cyklooxygenázy. Na testování byl použit COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), který měří aktivitu peroxidázového komponentu COX. Aktivita peroxidázy je vyhodnocována kolorimetricky na základě přítomnosti oxidovaného N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-fenylendiaminu při 590 nm.

Na základě výsledků testu inhibice COX byly k separaci látek vybrány 3 extrakty: SCT1A, SCT2A a SCT1B. Tyto byly dále zpracovány sloupcovou chromatografií. Pro separaci extraktu SCT1A byla použita kolona o rozměrech 7 × 88 cm a mobilní fáze ve složení benzen-chloroform v počátečním poměru 40:60 (v/v). Pro separaci extraktu SCT2A byla použita kolona o rozměrech 3,8 × 70 cm a mobilní fáze ve složení benzen-chloroform v počátečním poměru 40:60 (v/v). Pro separaci extraktu SCT1B byla použita kolona o rozměrech 3,8 × 70 cm a mobilní fáze ve složení benzen-chloroform v počátečním poměru 25:75 (v/v). Na urychlení separace byli všechny mobilní fáze několikrát spolárněny. Pro všechny tři separace byl použit silikagel o velikosti zrn 40–63 μm.

Tenkovrstevní chromatografie byla provedena za použití desek Silikagel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 0,2 mm (Merck). Byli použity mobilní fáze ve složení benzen-chloroform-methanol a toluen-chloroform-methanol v různých poměrech.

Výsledky

Protizánětlivá aktivita byla testována celkem u 8 extraktů. Nejlepší výsledky byly zjištěny u lipofilních extraktů hexanových a chloroformových (tab. č.1). Chloroformový extrakt celé rostliny byl schopen inhibovat obě formy COX, s určitou preferencí vůči COX2. Naproti tomu chloroformový extrakt komerčního vzorku inhiboval jenom COX1. Vzhledem k tomu, že COX1 produkuje látky s řadou fyziologických funkcí, není její selektivní inhibice žádoucí. U hexanových extraktů to bylo podobně, s tím rozdílem, že hexanový extrakt komerčního vzorku byl selektivnější vůči COX2. U polárnějších extraktů etylacetátových a vodních nebyla prokázána inhibice COX v měřitelné koncentraci. Výjimkou byl etylacetátový extrakt komerčního vzorku, u kterého byla zjištěna schopnost inhibice COX při koncentraci na horní hranici měřitelnosti.

Tab. č.1: Výsledky testování protizánětlivé aktivity. IC₅₀ je koncentrace extraktu, při které je enzym inhibován z 50 %. SEM je směrodatná odchylka udávána v %.

	IC50 [mg/ml] ± % SEM*	
	COX1	COX2
SCT1 CHCl3	4.5 ± 8.3	< 1.25
SCT2 CHCl3	< 1.25	> 5.0
SCT1 AcOEt	> 5.0	> 5.0
SCT2 AcOEt	4.6 ± 10.0	> 5.0
SCT1 HEX	1.3 ± 7.0	< 1.25
SCT2 HEX	> 5.0	2.8 ± 2.6
SCT1 H2O	> 5.0	> 5.0
SCT2 H2O	> 5.0	> 5.0

K separaci obsahových látek byly použity hexánová a chloroformová frakce methanolického extraktu celé rostliny a hexánová frakce methanolického extraktu komerčního vzorku. Tyto frakce byly podrobeny sloupcové chromatografii za použití různých mobilních fází. Separací extraktu SCT1A bylo získáno 308 frakcí, SCT2A 136 frakcí a SCT1B 259 frakcí. Jednotlivé frakce jsou v současnosti analyzovány tenkovrstevnou chromatografií a na základě podobností jsou spojovány. U spojených frakcí bude dále provedeno opětovné testování antiflogistické aktivity. Na základě jeho výsledků se pak vyberou frakce k další separaci látek. U těchto frakcí, příp. u izolovaných látek bude také otestována antimikrobiální aktivita.

Vzhledem k časové náročnosti sloupcové chromatografie a následného spojování frakcí jsme nestihli provést testování antibakteriální aktivity. Tato bude proto otestována v navazujícím projektu.

Závěr

V práci jsme se zaměřili na separaci obsahových látek *Sceletium tortuosum* a testování jejich protizánětlivé aktivity. Z osmi otestovaných extraktů byla aktivita naměřena u těch s obsahem lipofilních látek. Tyto extrakty pak byli separovány sloupcovou chromatografií. Získané frakce jsou v současné době spojovány na základě podobností zjištěných pomocí tenkovrstevné chromatografie. U spojených frakcí bude provedena další separace a testování jak protizánětlivé, tak i antibakteriální aktivity.

Seznam literatury

- [1] Gericke N., Viljoen A.: *Sceletium – A review update*. In *Journal of Ethnopharmacology*. 119 (2008), 653-663.
- [2] Scott, G. and Springfield, E. P. (2004). *Pharmaceutical monographs for 60 South African plant species used as traditional medicines*. South African National Biodiversity Institute (SANBI) Plant Information. [cit. 2015-12-3] Dostupné z:
<http://www.plantzafrica.com/medmonographs/sceletort.pdf>
- [3] Harvey A. L., Zoung L. C., Viljoen A. M., Gericke N. P.: *Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant Sceletium tortuosum and its principal alkaloids*. In *Journal of Ethnopharmacology*. 137 (2011) 1124-1129
- [4] Jeffs P. W., Capps T. M., Redfearn R.: *Sceletium Alkaloids. Structures of Five New Bases from Sceletium namaquense*. In *Journal of Organic Chemistry*. 47 (1982) 3611-3617
- [4] Lincová, D., Farghali, H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2. vydání. Praha: Galén, 2007. 672 s.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 320/2016/FaF.

Testování nově syntetizovaných lokálně hemostatických látek

Alice Paprskářová, Pavel Suchý, Marta Chalupová, Žaneta Vlachynská

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

V chirurgii je stále více vyžadována rychlá zástava krvácení. Běžně aplikované fyzikální metody jsou často v tomto ohledu nedostačující, což dává prostor nově vyvíjeným hemostatickým látkám. V současnosti je vyžadována nejen účinná hemostáza, ale také příznivý účinek na obnovu poškozené tkáně, který umožní potřebné hojení rány [1]. Zároveň se stupňují další požadavky, např. na biodegradabilitu materiálu, ve snaze přiblížit se parametrům „ideálního hemostatika“ pro chirurgické účely. Vzhledem k rozličným vlastnostem je třeba dané látky před vstupem do praxe řádně otestovat na vhodném animálním modelu. Cílem naší práce bylo zhodnotit efekt nově vytvořených lokálně hemostatických látek na modelu parciální nefrektomie potkana [2,3].

Materiál a metodika

Testované vzorky

V experimentu byly použity látky na bázi oxidované celulózy s různým stupněm substituce (P03, P07) a s přidavkem viskózy (VCSP) a materiály složené z oxycelulózy (OX), nebo karboxymethylcelulózy s kyselinou hyaluronovou s případným převrstvením aktivní hemostatickou látkou etamsylátem (ET).

In vivo provedení pokusu

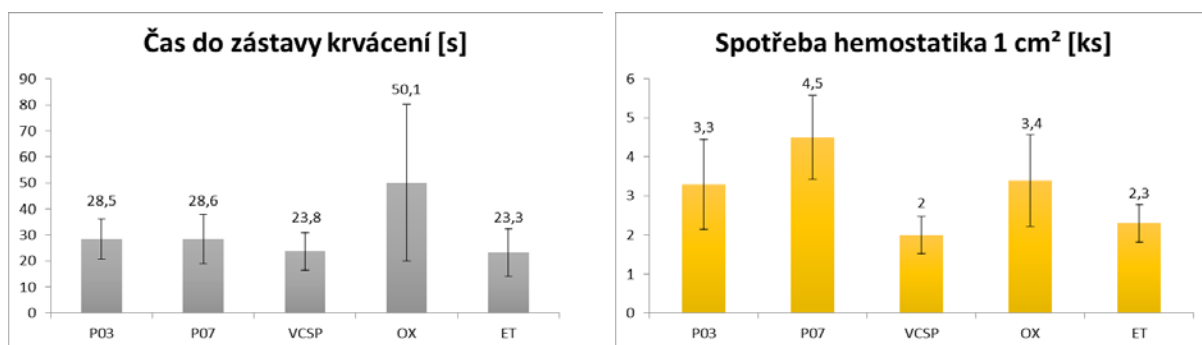
Experiment byl proveden na 50 laboratorních potkanech kmene Wistar. Zvířata byla rozdělena do 5 skupin po 10 kusech. První den pokusu byli potkani uvedeni do celkové anestezie intramuskulární aplikací tiletaminu a zolazepamu (Zoletil® inj. sicc. ad us. vet.) v dávce 65 mg/kg, následně bylo otevřeno peritoneum a provedena excise kaudálního pólu levé ledviny. U zvířat jednotlivých pokusných skupin byla na krvácející ránu aplikována nově vyvíjená lokálně působící hemostatika. Vždy byl sledován a zaznamenáván čas do úplné hemostázy spolu se spotřebou dané látky. Poté byla ledvina reponována zpět do retroperitonea s následnou suturou peritonea a kůže. Po 72 hodinách od provedení zákroku byla polovina experimentálních zvířat z každé dané skupiny utracena aplikací přípravku T61 v celkové inhalační anestezii (Isofluran). Druhá polovina potkanů zařazených do experimentu byla stejným způsobem utracena po 30 dnech od zahájení pokusu.

Analýzy

U utracených zvířat bylo provedeno patologickoanatomické vyšetření s odběrem tkáně pro následná histologická vyšetření a molekulárně biologická vyšetření a s odběrem krve pro stanovení parametrů krevního obrazu za použití hematologického analyzátoru Mythic 18 (Orphee, Švýcarsko). Při molekulárně biologickém stanovení budou v závislosti na informacích získaných z histologického hodnocení sledovány především markery zánětu, tvorby vaziva a angiogeneze.

Výsledky

Na základě provedeného experimentu byly zjištěny časy nutné k zástavě krvácení při zákroku (graf 1) a množství materiálu potřebného k dosažení hemostázy (graf 2). Obě veličiny společně poukazují na nejlepší efekt u látky VCSP s přidavkem viskózy a materiálu ET s obsahem aktivní hemostatické látky etamsylátu. Se vzorkem ET se také dobře manipulovalo během zákroku a při ukončení pokusu po 30 dnech nebyla ani v jednom případě látka nalezena, což značí pravděpodobnou biodegradabilitu materiálu (tabulka 1).

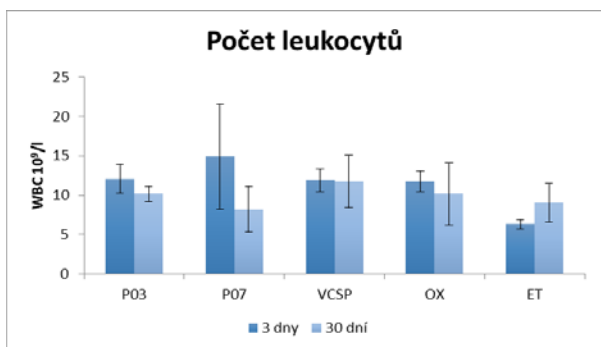


Graf 1 Čas do hemostázy u testovaných látek Graf 2 Spotřeba testovaných látek při zákroku

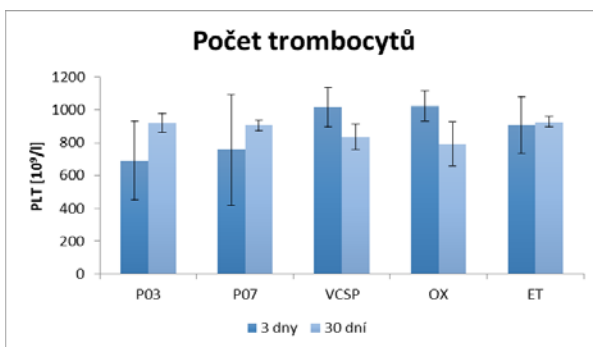
Tabulka 1 Hodnocení patologických nálezů po 3 a 30 dnech u daných skupin – vstřebatelnost látky

Hemostatická látka	Vstřebatelnost látky - 3 dny	Vstřebatelnost látky - 30 dní
P03	ne	ne
P07	ne	ne
VCSP	ne	ne
OX	1 x ne, 4 x ano	ano
ET	2 x ne, 3 x ano	ano

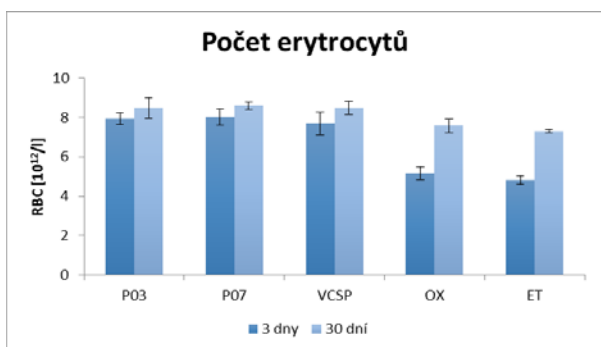
Krevní obraz nepoukázal na signifikantní rozdíly mezi sledovanými skupinami. Ztráty krve korelovaly u skupiny OX se sníženým počtem erytrocytů i trombocytů, tento výsledek se však u skupiny ET nepotvrdil. U zvířat s delším časem do hemostázy se ztráty krve promítly především do červeného krevního obrazu, ve kterém byly patrné po třech dnech od zákroku nižší hladiny erytrocytů, spolu se sníženým hematokritem a množstvím hemoglobinu. Po 30 dnech od zákroku byly již hodnoty stabilizovány v normě. Poměrově nejnižší hladina leukocytů byla zaznamenána u skupiny ET. Jednotlivé hematologické parametry po 3 a 30 dnech znázorňují grafy 4 až 8.



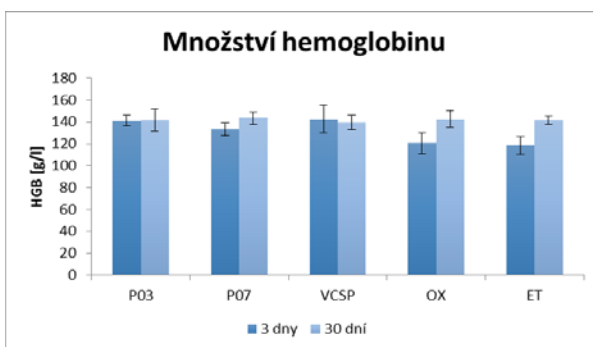
Graf 4 Počet leukocytů u daných skupin



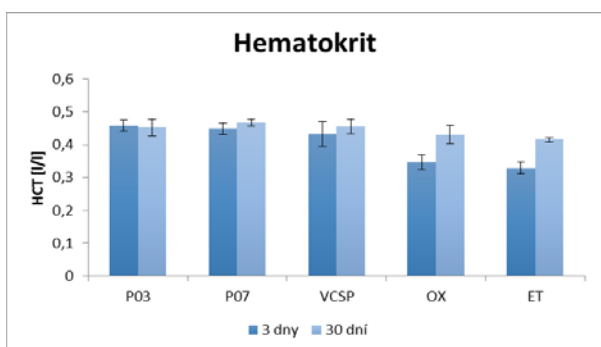
Graf 5 Počet trombocytů u daných skupin



Graf 6 Počet erytrocytů u daných skupin



Graf 7 Množství hemoglobinu u daných skupin



Graf 8 Hodnota hematokritu u daných skupin

Do hodnocení experimentu budou dále zahrnuty výsledky z histologického a molekulárně biologického vyšetření, které nyní probíhá.

Závěr

Dosažené výsledky poukazují na příznivý efekt látky s obsahem viskózy a materiálu převrstveném aktivní hemostatickou substancí etamsylátem. Obě látky projevily velice dobrou účinnost z hlediska rychlosti zástavy krvácení a spotřeba materiálu byla ve srovnání se zbylými skupinami také nižší. Druhá ze jmenovaných látek též vykazovala potenciální biodegradabilitu. S ohledem na hematologické parametry nebyly zaznamenány signifikantní rozdíly mezi testovanými skupinami. Celkové zhodnocení experimentu proběhne po doplnění výsledků získaných z probíhajícího histologického a molekulárně biologického vyšetření odebraných tkání.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 322/2016/FaF.

Seznam literatury:

1. Tan SR, Tope WD. Effectiveness of microporous polysaccharide hemospheres for achieving hemostasis in mohs micrographic surgery. *Dermatol Surg* 2004; 30: 908-914
2. Recinos G, Inaba K, Dubose J, Demetriades D, Rhee P. Local and systemic hemostatics in trauma: a review. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2008; 14: 175-181
3. Chalupová M, Suchý P, Pražanová G, Bartošová L, Sopuch T, Havelka P. Local tissue reaction after the application of topical hemostatic agents in a rat partial nephrectomy model. *J Biomed Mater Res Part A* 2012; 100A: 1582-1590

Stereoselektivní syntéza derivátů arylkarbonyloxyaminopropanolu a stanovení jejich fyzikálně-chemických vlastností

Pavlna Marvanová, Ondřej Hošík, Tereza Padrtová

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Antagonisté β -adrenergních receptorů, „ β -blokátory“, jsou esenciální léčiva široce používána v terapii kardiovaskulárních i dalších indikací více než 50 let. U novějších sloučenin se β -adrenolytický efekt s výhodou kombinuje s α_1 -adrenolytickým vazodilatačním účinkem, zprostředkovaným např. fenylpiperazinovým skeletem v bazické části molekuly. Tyto „duální β -blokátory“ (např. karvedilol, labetalol, vanylidilol) vykazují zlepšení hemodynamického profilu, např. snížením periferního cévního odporu, zlepšením funkce levé komory a srdečního výdeje, což přináší benefity např. v léčbě arteriální hypertenze [1,2].

Charakteristickou vlastností již používaných β -blokátorů i navrhovaných struktur je přítomnost alespoň jednoho chirálního centra v molekule, přičemž jednotlivé enantiomery se ve svých účincích často podstatně odlišují [3,4]. Příprava čistých enantiomerů, ať už stereoselektivní syntézou či chirální separací, a analýza optické čistoty je tedy velmi významná. K přípravě enantiomerně čistých β -adrenolytik lze použít řadu postupů, ke kterým patří i syntézy s využitím komerčně dostupných enantiomerně čistých reagentů. Výhodou je, že tyto syntézy jsou relativně rychlé a méně nákladné [5].

Acidobazická disociační konstanta (pK_a) patří ke klíčovým parametrům pro odhad biodostupnosti, farmakokinetických vlastností a toxicity léčiva v organismu. Je možné ji vypočítat pomocí komerčně dostupných software a experimentálně stanovit řadou analytických metod (NMR, CZE, RP-HPLC, potenciometrie, UV-VIS spektroskopie) [6,7].

Materiál a metodika

Příprava cílových sloučenin byla provedena vícestupňovou syntézou podle Schématu č.1. Substituované kyseliny byly převedeny na odpovídající oxiran-2-yl-methyl 4-alkoxybenzoáty, jejichž oxiranový kruh byl otevřen reakcí s různě substituovaným fenylpiperazinem. Pro zvýšení rozpustnosti finálních sloučenin byly vzniklé báze převedeny na hydrochloridy pomocí nasyceného roztoku étherického chlorovodíku [8].

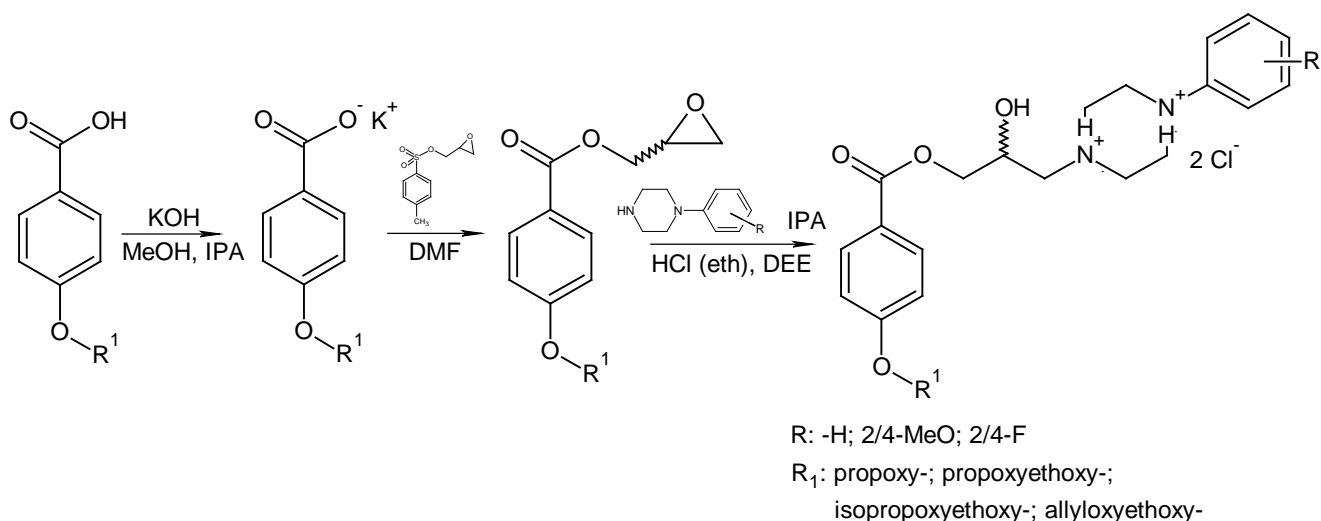


Schéma č.1

Pro převedení kyseliny na příslušný oxiranový meziprodukt nabízí literatura několik možností, které byly postupně vyzkoušeny pro kyselinu 4-propoxybenzoovou (Schéma č.2). Jako nejslibnější byla vybrána **Metoda B** a byla použita pro přípravu dalších racemických derivátů.

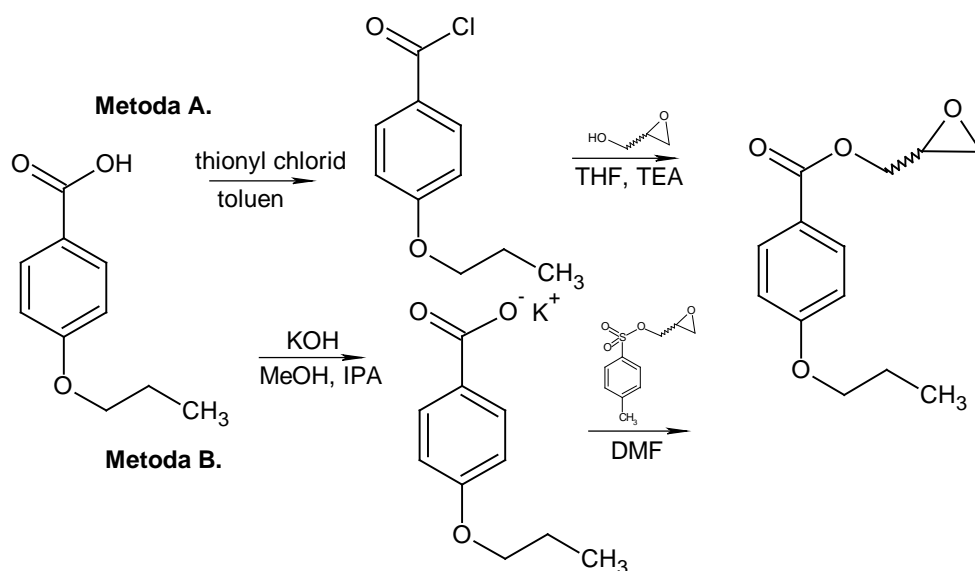


Schéma č.2

Stereoselektivní syntéza jednotlivých enantiomerů byla provedena za využití komerčně dostupných chirálních glycidyl-tosylátů taktéž **metodou B**.

Substituované kyseliny, které nebyly komerčně dostupné, byly připraveny podle Schématu č. 3. Tosylátové reagenty byly připraveny reakcí příslušných alkoholů s *p*-toluensulfonyl chloridem v dichlormethanu. Ty potom reagovaly s ethyl *p*-hydroxybenzoátem a uhlíčanem draselným v acetonu za vzniku příslušných substituovaných esterů, které byly podrobeny hydrolýze a poskytly příslušné kyseliny.

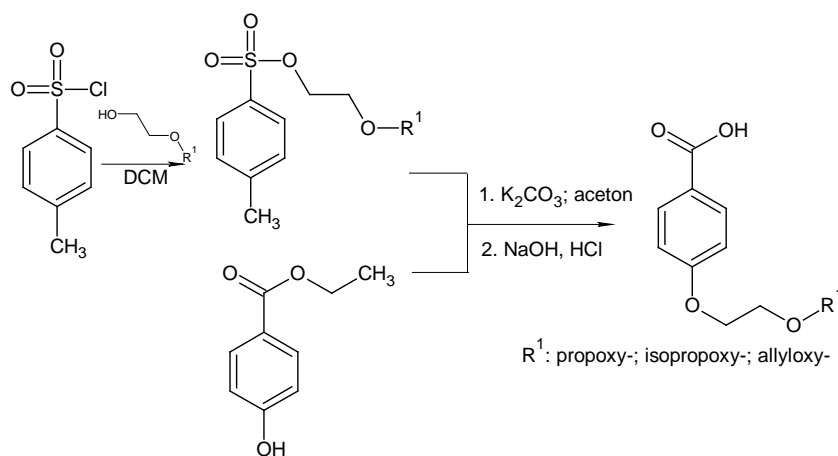


Schéma č.3

Pro stanovení disociační konstanty pK_a byla použita metoda nukleární magnetické rezonance (přístroj JEOL ECZR 400 (JEOL, Japonsko)). Metoda NMR využívá ke stanovení pK_a změnu chemických posunů jader blízkých místu, kde dochází k ionizaci při změně pH. Postupným přidáváním zásady k hydrochloridům měřených látek docházelo ke změně ionizace molekuly analytu. Změna náboje ovlivní elektronové obaly atomů v nejbližším okolí, dojde ke změně stínění jádra elektronovým obalem a tím pádem i chemického posunu skupiny vodíků ve spektru. Vzniklá závislost posunu na pH byla vnesena do grafu a vyhodnocena programem Sigma Plot v. 10.0, přičemž pK_a je hodnotou pH v inflexním bodě získané sigmoidy.

Výsledky

V rámci projektu byla optimalizována příprava derivátů arylkarbonyloxyaminopropanolů podle literatury a celkem bylo připraveno 28 výsledných hydrochloridů, z toho 20 racemických a 8 enantiomerních. Výsledné látky byly charakterizovány teplotou tání, HPLC čistotou a základními spektrálními metodami (1D a 2D-NMR, IR a MS), u chirálních produktů a meziproduktů byla změřena optická otáčivost a spektrum cirkulárního dichroismu. Dále byla stanovena jejich lipofilita a disociační konstanta pomocí NMR spektroskopie.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 323/2016/FaF.

Seznam literatury:

- 1) PEDERSEN, M.E. et al. The vasodilatory Beta-blockers. *Curr. Hypertens. Rep.* 2007, 9, 269-277.
- 2) CHIU, C.C. et al. Anti-Hypertension Effect of Vanylidilol: A Phenylaldehyde α/β -Adrenoceptor Blocker with Endothelium-Dependent and K⁺ Channels Opening-Associated Vasorelaxant Activities. *Pharmacology*, 2004, 70, 140-151.

- 3) MEHVAR, R. et al. Stereospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Beta-Adrenergic Blockers in Humans. *J Pharm Sci.* 2001, 4, 185-200.
- 4) KILIÁNOVÁ, A., et al. Effect of Newly Synthesized Compounds 44Bu and 444 on QRS-Complex Width and Fast Sodium Current: Differences between Isomers. *Acta Vet. (Brno)*, 2010, 79, 41–49.
- 5) AGUSTIAN, J., A. HARUN KAMARUDDINA a S. BHATIAA. Single Enantiomeric β -blockers: the Existing Technologies. *Process Biochem.*, 2010, vol. 45, p. 1587–1604.
- 6) REIJENGA, J. et al. Development of methods for the determination of pK_a Values. *Anal. Chem. Insights*, 2013, 8, 53-71.
- 7) KAPUSTIKOVA, I. et al. Determination of Acid-base Dissociation Constant of Selected β -blockers Using Capillary Zone Electrophoresis, RP-HPLC and $^1\text{H-NMR}$. *Chem. Listy* 2014, 108, 1073-1079.
- 8) MARVANOVÁ, P. et al. Synthesis and Characterization of New 3-(4-Arylpiperazin-1-yl)-2-hydroxypropyl 4-Propoxybenzoates and Their Hydrochloride Salts. *Molecules* 2016, 21, 707.

Syntéza vybraných synthonů Largazolu a totální syntéza jeho analogů

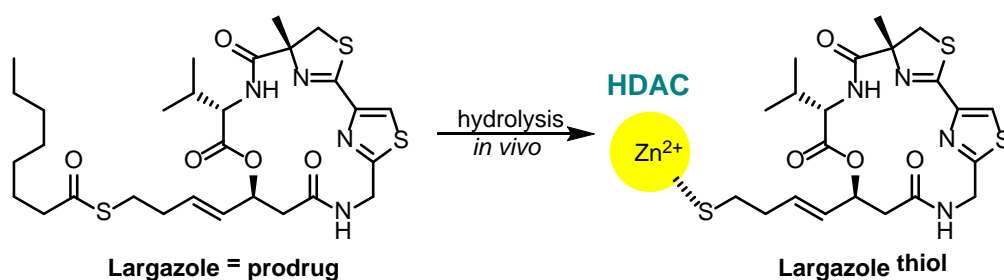
Anna Faustmannová, Michal Fedor, Alexander Jurík, Pavel Bobál

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Largazol je sloučenina přírodního původu, kterou poprvé izoloval Luesch se svými spolupracovníky v roce 2008 z mořské řasy rodu *Symploca* sp. v Key Largo (Florida, USA). Jedná se o cyklický depsipeptid, který je kvůli své zajímavé struktuře předmětem mnoha výzkumů. Kromě cytotoxické aktivity¹ je popsána i osteogenní aktivita². Dále je potenciálním léčivem jaterní fibrózy.³

Mechanismus účinku spočívá v selektivní inhibici třídy I histon deacetylasy (HDAC). Do organismu se largazol dostane jako proléčivo, *in vivo* je hydrolyzován na aktivní metabolit largazol thiol, který chelatuje zinek v aktivním místě, a tím inhibuje samotný enzym.⁴

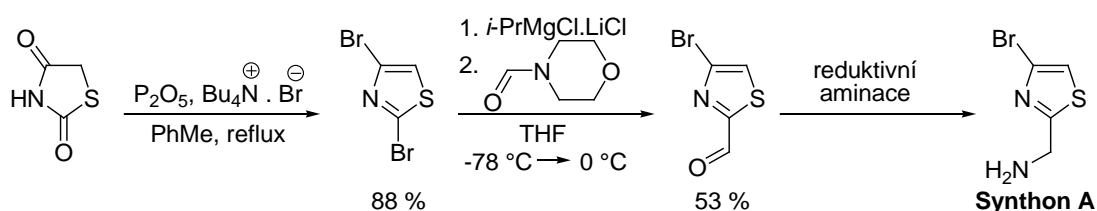


Molekulu largazolu lze rozdělit do pěti synthonů. Cílem naší práce bylo připravit synthony A, B a C. Synthon D a E jsou komerčně dostupné látky.

Výsledky

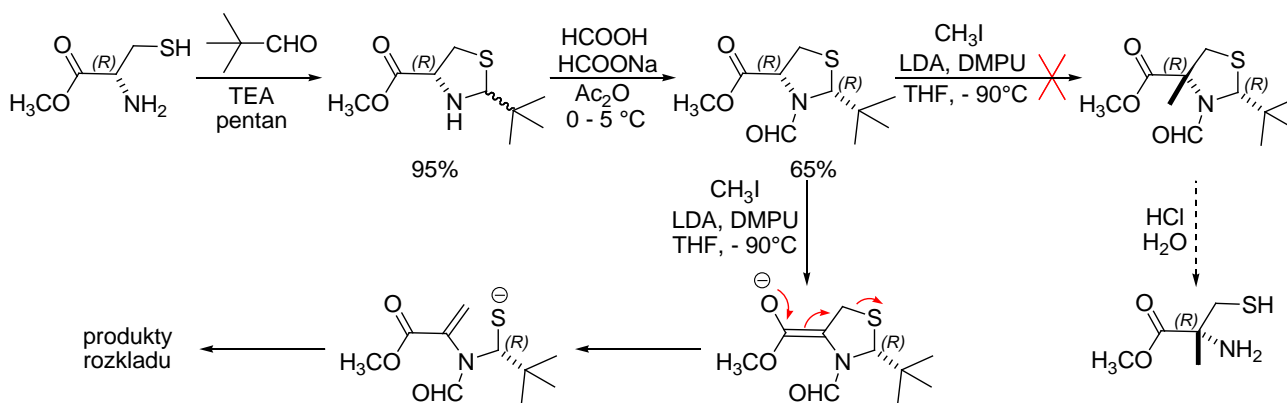
Synthon A

Původně plánovaná šestistupňová syntéza synthonu **A** vycházející z 1,3-thiazolidin-2,4-dionu byla modifikována a synthon **A** byl v závěru úspěšně připraven ve třech krocích. Cílem bylo připravit (4-brom-1,3-thiazol-2-yl)methanamin. V prvním kroku produktem bromace s P_2O_5 a $Bu_4N^+Br^-$ byl 2,4-dibromthiazol ve výtěžku 88 %. V dalším kroku proběhla selektivní transmetalace s Turbo Grignardovým činidlem a *N*-formylmorfolinem při $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a byl izolován 4-bromothiazol-2-karbaldehyd s výtěžkem 53 %. Následovala reduktivní aminace a byl připraven požadovaný synthon **A**.



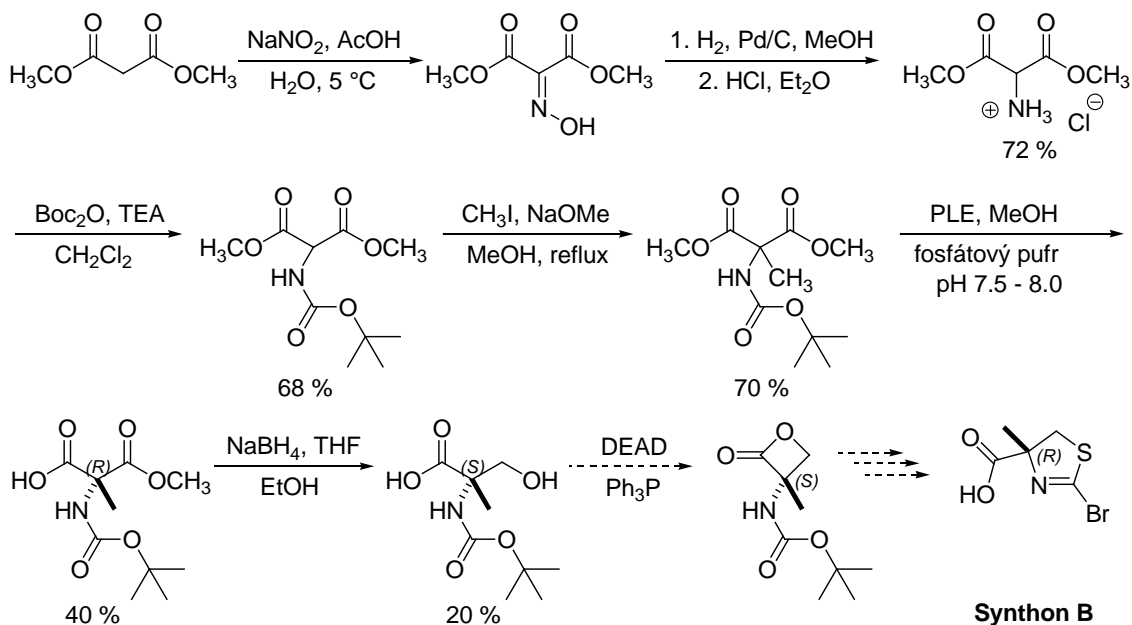
Synthon B

Výchozí látkou pro přípravu synthonu **B** byl (*R*)-cystein. Ve dvou krocích byl přeměněn na derivát *N*-formyl-*tert*-butylthiazolidinu a poté methylován. Při methylaci pravděpodobně došlo k β -eliminaci, tato reakce se nezdařila ani po změně reakčních podmínek.



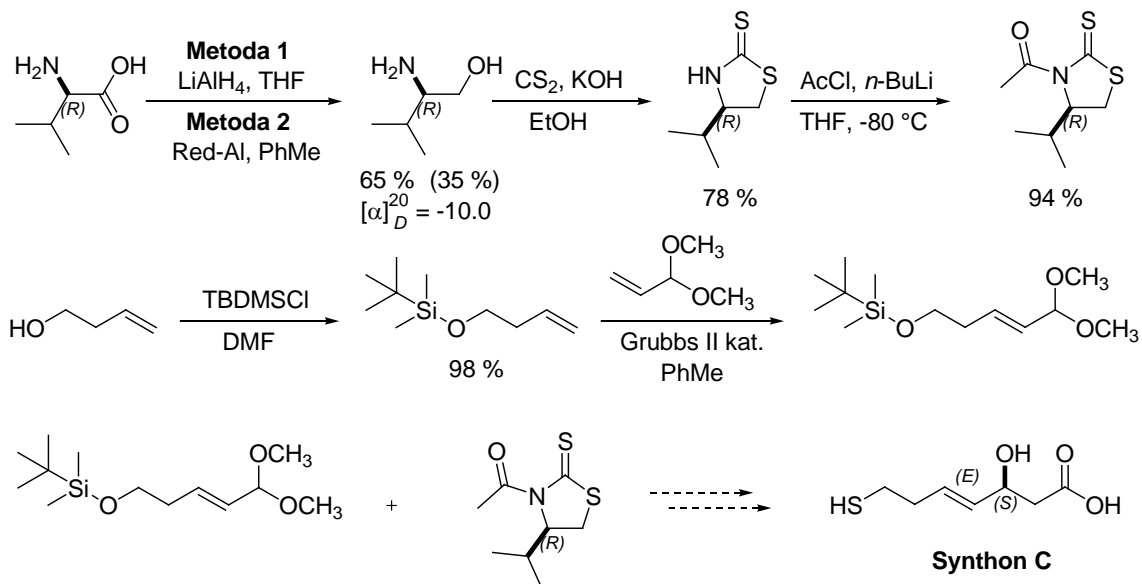
Byla vyzkoušena nová syntéza vycházející z dimethyl malonátu přes *N*-Boc *C*-methylovaný aminomalónát. Následovala enantioselektivní enzymatická desymetrizace katalyzovaná PLE s výtěžkem 40 %. Po redukcí esterové skupiny na alkohol a následné cyklizaci (Mitsunobuova reakce) byl izolován chirální oxetan-2-on. Po reakci se sirovodíkem vzniká opticky čistý

2-methylcystein. Synthon B může být posléze připraven cyklizací na derivát 2-aminodihydrothiazolu s následnou diazotací a nukleofilní substitucí. Poslední kroky syntézy synthonu B, jsou v současné době předmětem výzkumu.



Synthon C

K vytvoření uhlíkatého řetězce synthonu C byla aplikována olefinová metateze a Lewisovou kyselinou katalyzována aldolizace Nagaova chirálního thiazolidinthionu.⁵



Výchozí D-valin byl redukován dvěma metodami na (*R*)-valinol, následovala reakce se sirouhlíkem v přítomnosti hydroxidu draselného. Připravený (*R*)-4-isopropylthiazolidin-2-thion byl acetylován acetylchloridem v přítomnosti *n*-butyllithia. Výtěžek reakce byl 94 %.

But-3-en-1-ol byl ochráněn pomocí *tert*-butyldimethylsilyl chloridu v přítomnosti imidazolu ve výtěžku 98 %. Reakce *tert*-butyl(but-3-enyloxy)dimethylsilanu s akroleindiethylacetalem v přítomnosti Grubbsova katalyzátoru 2. generace poskytla ((*E*)-5,5-dimethoxypent-3-enyloxy)(*tert*-butyl)dimethylsilan. Tímto způsobem připravený lineární aldehyd, resp. jeho dimethylacetal může v přítomnosti vybrané Lewisovy kyseliny reagovat s Nagaovým chirálním thiazolidinthionem za vzniku synthonu C.

Závěr

Cílem práce bylo připravit prekurzory cytotoxického léčiva přírodního původu largazolu. Synthon A je již úspěšně dokončen. Pro synthon B byly vyzkoušeny dva přístupy k syntéze, jeden z nich se nezdařil kvůli β -eliminaci. Poslední kroky syntézy synthonů B a C jsou nadále předmětem výzkumu.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 327/2016/FaF.

1. Taori, K.; Paul, V. J.; Luesch, H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 1806 – 1807.
2. Lee, S.; Kwak, H.; Pi, S.; You, H.; Byeon, S.; Ying, Y.; Luesch, H.; Hong, J.; Kim, S. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *2*, 248 – 251.
3. Liu, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Lam, W.; Kwong, S.; Li, F.; Friedman, S.; Zhou, S.; Ren, Q.; Xu, Z.; Wang, X.; Ji, L.; Tang, S.; Zhang, H.; Lui, E.; Ye, T. *Liver International* **2013**, *33*, 504 – 515.
4. Hong, J.; Luesch, H. *Nat. Prod. Rep.*, **2012**, *29*, 449 – 456.
5. Nagao, Y.; Fujita, E. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2391 – 2393.

Studium antiproliferačních účinků prenylovaných flavonoidů z *Paulownia tomentosa* u lidské nádorové buněčné linie

Lucie Holaňová, Peter Kollár

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Paulownia tomentosa je listnatý strom z čeledi *Paulowniaceae*. Původně pochází z východní Asie, kde je v tradiční čínské medicíně využíván k léčbě zánětů, hypertenze a onemocnění horních dýchacích cest. *Paulownia tomentosa* je bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, zejména fenolických sloučenin, které se vyskytují v květech, plodech, listech, kůře i dřevě. Mezi významné zástupce patří prenylované flavonoidy, které díky enzymatické adici postranního lipofilního uhlíkatého řetězce k hydrofilní struktuře flavonoidů vykazují vysokou afinitu k biomembránám, což umožňuje jejich interakci s cílovými proteiny. Postranní řetězce mohou být různě modifikovány, například hydroxylací, methoxylací nebo cyklizací [1]. Bylo prokázáno, že prenylované flavonoidy vykazují *in vitro* antioxidační aktivitu, působí cytotoxicky, protizánětlivě, antibakteriálně i antivirotický [2]. U prenylovaného flavonoidu tomentodiplakonu B izolovaného z *Paulownia tomentosa* byla *in vitro* prokázána schopnost inhibovat proliferaci buněk lidské monocytární leukemie, a to akumulací buněk v G1 fázi buněčného cyklu a inhibicí jejich přechodu do S-fáze [3].

Na Ústavu přírodních léčiv FaF VFU Brno bylo z plodů *Paulownia tomentosa* izolováno dvacet prenylovaných flavonoidů, jejichž biologické účinky byly v rámci tohoto projektu testovány na Ústavu humánní farmakologie a toxikologie FaF VFU Brno. Cílem bylo porovnání antiproliferačních a cytotoxických účinků vůči buněčné linii THP-1 (lidská monocytární leukemie), vytipování látek s potenciálním cytostatickým účinkem a detekce cílových molekul těchto látek na subcelulární úrovni.

Materiál a metodika

Buněčná linie

Pro hodnocení studovaných účinků testovaných látek byla zvolena lidská nádorová buněčná linie THP-1 (lidská monocytární leukemie). Tato byla kultivována v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% CO₂ ve vzduchu. Kultivace probíhala v médiu RPMI 1640 obohaceném o 10% FBS a 1% antibiotikem. Buňky byly subkultivovány v intervalu jednou za týden.

Testované látky

Testováno bylo dvacet prenylovaných flavonoidů izolovaných z plodů *Paulownia tomentosa*, konkrétně L1 (tomentodiplakon L), L2 (tomentodiplakon M), L3 (3',4'-*O*-dimethyl-5'-hydroxydiplakon), L4 (mimulon F), L5 (mimulon G), L6 (tomentodiplakon N), L7 (tomenton), L8 (3'-*O*-methyldiplakon), L9 (tomentodiplakon G), L10 (tomentodiplakon B), L11 (6-prenyl-3'-*O*-methyleriodictiol), L12 (mimulon), L13 (3'-*O*-methyl-5'-methoxydiplakon), L14 (diplakon), L15 (3'-*O*-methyldiplakol), L16 (5,7-dihydroxy-6-geranylchromon), L17 (paulownion C), L18 (3'-*O*-methyl-5'-hydroxydiplakon), L19 (bonnadiol A), L20 (tomentodiplakon O). Tyto látky byly testovány v konečných koncentracích 0; 5; 10; 15; 20; 30 $\mu\text{mol/l}$. Látky byly rozpouštěny v DMSO, finální koncentrace DMSO ve vzorku nepřesáhla 0.1%. Jako kontrolní vzorek byla vždy použita buněčná suspenze inkubovaná s 0.1% DMSO [4].

Hodnocení buněčné proliferace a viability

Buněčná proliferace a viabilita byla hodnocena hemocytometricky, WST-1 analýzou a LDH analýzou. Hemocytometrické stanovení probíhalo po obarvení buněčné suspenze 0,1 % roztokem erythrosinu B v PBS. Počet a viabilita buněk byly určeny přímým počítáním v Bürkerově komůrce. Antiproliferační účinky testovaných látek byly stanoveny také pomocí WST-1 analýzy (Cell proliferation reagent WST-1, Roche Life Sciences). Cytotoxické působení bylo stanoveno také pomocí LDH analýzy (Cytotoxicity detection kit, Roche Life Sciences).

Analýza vlivu na buněčný cyklus

Procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu bylo měřeno pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter). Buňky byly značeny propidium iodidem. Inkubace buněk s testovanými látkami trvala 24 hodin.

Westernový přenos

Buňky byly po 24-hodinové inkubaci s testovanými látkami lyzovány RIPA pufrem (Cell Signaling Technology) obohaceným o PMSF (Cell Signaling Technology) a inhibitory proteáz a fosfatáz (Roche Life Sciences), sonikovány a stočeny na centrifuze při 12 000 rpm, 20 min, 4°C. V odebraném supernatantu byla stanovena koncentrace proteinů pomocí kitu Roti-Quant Universal (Carl Roth). Vzorky byly denaturovány v β -merkptoethanolu a SDS při 95 °C po dobu 5 min a nanášeny na 12% SDS-polyakrylamidový gel, kde byly podrobeny elektroforéze (140 V, 0.4 A, 90 min) a následnému přenosu proteinů na nitrocelulósovou membránu (100 V, 0.4 A, 60 min). Ta byla 1 h blokována v 5% roztoku odtučněného mléka nebo 5% BSA v 1xTBST a poté inkubována

přes noc při 4 °C s roztokem primární protilátky (1:1000). Po promývání 1x TBST byla membrána inkubována 1 h s roztokem sekundární protilátky (1:1000) při pokojové teplotě. Cílové proteiny byly vizualizovány pomocí Opti-4CN Substrate Kit (Bio-Rad). Intenzita jednotlivých bandů byla vyhodnocena pomocí Image Studio Lite (Li-COR Biotechnology).

Statistická analýza

Výsledky byly hodnoceny neparametrickým one-way ANOVA testem v kombinaci s Dunnettovým testem na všech hladinách statistické významnosti (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Výsledné hodnoty jsou vždy průměrem tří experimentů provedených v triplicátu.

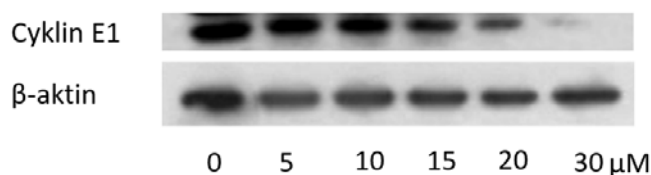
Výsledky

Na buňkách lidské nádorové buněčné linie THP-1 bylo v koncentračním rozmezí 5 -30 µmol/l testováno antiproliferační a cytotoxické působení dvaceti prenylovaných flavonoidů izolovaných z *Paulownia tomentosa*. Na základě těchto experimentů bylo vytipováno několik látek, u nichž byl pozorován potenciální antiproliferační účinek při relativně nízké cytotoxicitě. Nejvyšší potenciál vykazaly L18, L14, L13 a L3 (hodnoty IC₅₀ a LD₅₀ viz Tabulka 1). Hodnoceny byly také účinky vybraných látek v závislosti na čase. Pozorované efekty byly koncentračně i časově dependentní.

Pro analýzu buněčného cyklu byly buňky inkubovány s testovanými látkami po dobu 24 hodin. Zvoleny byly netoxické koncentrace s již signifikantním antiproliferačním účinkem. L18 vykazala již při nejnižší testované koncentraci (5 µM) schopnost kumulovat buňky v G0/G1 fázi buněčného cyklu a to na nejvyšší hladině statistické významnosti (p<0.001), čemuž odpovídal analogický pokles buněčné hmoty v S fázi. U ostatních látek nebyly pozorované efekty natolik výrazné. U L3 byl analogický efekt detekován až při koncentraci 15 µM. Podíl buněk v G2/M fázi zůstal vlivem působení obou látek nezměněn.

Westernový přenos u L18 byl zaměřen na detekci proteinů podílejících se na zástavě buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Vlivem této látky byl pozorován koncentračně dependentní pokles hladiny cyklinu E, který plní funkci aktivátoru cyklin-dependentní kinázy 2 (viz Obrázek 1). Aktivace této signální kaskády je nezbytná pro přesun buňky do S-fáze buněčného cyklu.

Hodnoty IC ₅₀ a LD ₅₀ testovaných látek		
	IC ₅₀ ± SD	LD ₅₀ ± SD
L1	> 30	> 30
L2	> 30	> 30
L3	15,85 ± 0,80	> 30
L4	> 30	> 30
L5	> 30	> 30
L6	> 30	> 30
L7	> 30	> 30
L8	> 30	> 30
L9	> 30	> 30
L10	> 30	> 30
L11	> 30	> 30
L12	24,59 ± 3,11	24,05 ± 4,71
L13	15,32 ± 1,76	29,93 ± 0,80
L14	9,89 ± 0,83	18,97 ± 0,28
L15	18,3 ± 0,57	20,37 ± 2,92
L16	> 30	> 30
L17	> 30	> 30
L18	12,97 ± 0,75	21,67 ± 2,12
L19	26,12 ± 2,20	28,04 ± 0,54
L20	> 30	> 30



Obrázek 1: Koncentračně dependentní pokles hladiny cyklinu E1 vlivem L18.

Tabulka 1: Výsledné hodnoty IC₅₀ a LD₅₀ testovaných látek

Závěr

Z dvaceti testovaných prenylovaných flavonoidů bylo vybráno několik látek s potenciálním cytostatickým působením. U těch byla provedena analýza vlivu na průběh buněčného cyklu a Westernový přenos za účelem detekce cílových molekul v buňce. V současné době dále probíhají experimenty zaměřené na vliv testovaných látek na další regulační proteiny řídící progresi buněčného cyklu za účelem bližšího objasnění mechanismu účinku na molekulární úrovni.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 328/2016/FaF.

Seznam literatury

- Schneiderová, K.; Šmejkal, K. Phytochemical profile of *Paulownia tomentosa* (Thunb). Steud. *Phytochemistry Reviews*. 2015, **14**(5), 799-833.
- Šmejkal, K. Cytotoxic potential of C-prenylated flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. 2014, **13**(1), 245-275.
- Kollár, P.; Bárta, T.; Závalová, V.; Šmejkal, K.; Hampl, A. Geranylated flavanone tomentodiplacone B inhibits proliferation of human monocytic leukaemia (THP-1) cells. *British Journal of Pharmacology*. 2011, **162**(7), 1534-1541.
- Hanáková, Z.; Hošek, J.; Babula, P.; Dall'Acqua, S.; Václavík, J.; Šmejkal, K. C-geranylated flavanones from *Paulownia tomentosa* fruits as potential anti-inflammatory compounds acting via inhibition of TNF- α production. *Journal of Natural Products*. 2015, **78**(4), 850-863.

Syntéza a charakterizace alkylesterů arylaminopropanolů a jejich prekurzorů

Anna Hudcová¹, Aleš Kroutil¹

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Potenciálními léčivy typu antidysrytmik se zabývá řada výzkumných týmů. Při léčbě srdečních arytmií jsou hojně využívány látky typu blokátorů draslíkových kanálů (dle Vaughan-Williamse třída III). V posledních letech široce zkoumanou skupinu představují analoga dofetilidu a ibutilidu a nověji klinicky hodnocené látky typu „kalantů“ např. almokalant. (1, 2) Další látky jsou vyvíjeny a testovány, do terapeutické praxe pro své nežádoucí účinky se doposud nedostaly. (3)

Strukturní motivy arylalkylaminu jsou v molekulách antidysrytmických léčiv časté. Obměny substituentů aminů, především terciárních, a obměny formy a délky alkylového spojovacího řetězce mají velký vliv na aktivitu, selektivitu i výskyt nežádoucích účinků. (4) Z těchto důvodů je příprava a studium vztahu struktury a biologické aktivity v popředí zájmu výzkumných pracovišť. Deriváty vzniklé záměnou methansulfonamidové skupiny za karbamovou kyselinu, případně její alkylester, zatím popsány nebyly. Taktéž deriváty arylaminopropanolu nejsou v oblasti kardiovaskulárních léčiv téměř zmiňovány.

Metodika

Syntéza proběhla v několika na sebe navazujících krocích.

Jako výchozí látky byly reakcí 4-aminoacetofenonu a příslušného chlorformiátu připraveny alkylestery kyseliny 4-acetylfenylkarbamové – methyl (1m), ethyl (1e), propyl (1p) a butyl (1b). (5) Komerčně dostupné sekundární aminy – N-butylmethylamin (BuMe), N-butylethylamin (BuEt), N-methylpropylamin (MePro), N-methylpentylamin (MePe) – byly převedeny do formy solí s kyselinou chlorovodíkovou.

Mannichovou reakcí byly připraveny alkylestery kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-propyl-1-on]-fenylkarbamové: v prostředí tetrahydrofuranu byl suspendován hydrochlorid příslušného sekundárního aminu, příslušný alkylester kyseliny 4-acetylfenylkarbamové a paraformaldehyd (v trojnásobném molárním přebytku), roztok byl okyselen konc. HCl. Reakce probíhala za varu, ukončena byla na základě TLC po 8 hod. Vzniklé krystaly byly přefiltrovány, rozpuštěny ve 2M vodném roztoku HCl, roztok byl zalkalizován 2M vodným roztokem NaOH, lipofilní produkt byl

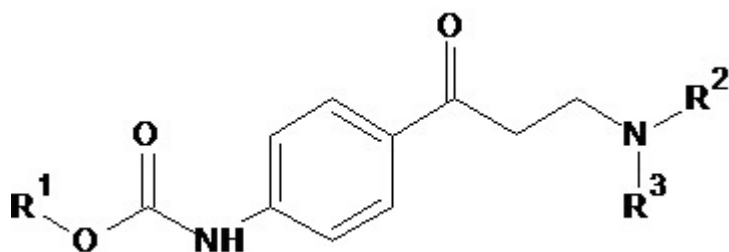
vytřepán do dichlormethanu. Po odpaření rozpouštědla byl odparek (báze příslušné látky) rozpuštěn v diethyletheru, po přidání HCl v etheru z roztoku vypadl příslušný alkylester kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-propyl-1-on]-fenyلكarbamové ve formě soli s HCl. Tyto meziprodukty byly charakterizovány.

Následná redukce na alkylestery kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-1-hydroxy-propyl]-fenyلكarbamové byla provedena dvěma metodami: **Metoda A:** látka byla opět převedena na bázi a rozpuštěna v methanolu, během 30 min. byl postupně přidáván tetrahydridoboritan sodný (v trojnásobném molárním přebytku) jako redukční činidlo. Reakce probíhala za varu, ukončena byla na základě TLC po 3 hod. Methanol byl odpařen, odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu a promyt vodou, rozpouštědlo bylo oddestilováno. **Metoda B:** látka byla ve formě hydrochloridu za varu rozpuštěna v methanolu, během 30 min. byl postupně přidáván tetrahydridoboritan sodný (v trojnásobném molárním přebytku) jako redukční činidlo. Reakce probíhala za varu, ukončena byla na základě TLC po 3 hod. Methanol byl odpařen, odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu a promyt vodou, rozpouštědlo bylo oddestilováno. Tyto báze produktu byly charakterizovány.

Výsledky, diskuze

Proběhla syntéza alkylesterů kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-propyl-1-on]-fenyلكarbamové (tabulka 1), většinou s uspokojivými výtěžky. Nízká výtěžnost byla především u látek 1bBuMe.HCl a 1bBuEt.HCl, pravděpodobně způsobená butylovým řetězcem v pozici R1.

Velká část těchto látek je ve formě soli špatně rozpustná ve většině standardních rozpouštědel, proto bylo obtížné jejich zpětné převedení na báze pro účely přečištění, popř. další krok syntézy.



Obrázek 1 Obecná struktura alkylesterů kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-propyl-1-on]-fenyلكarbamové.

Kód	R1	R2	R3	Výtěžek [%]
1mBuMe . HCl	-CH ₃	-CH ₃	-C ₄ H ₉	74,5
1eBuMe . HCl	-C ₂ H ₅	-CH ₃	-C ₄ H ₉	52,9

1pBuMe . HCl	-C ₃ H ₇	-CH ₃	-C ₄ H ₉	43,2
1bBuMe . HCl	-C ₄ H ₉	-CH ₃	-C ₄ H ₉	6,28
1mBuEt . HCl	-CH ₃	-C ₂ H ₅	-C ₄ H ₉	33,6
1eBuEt . HCl	-C ₂ H ₅	-C ₂ H ₅	-C ₄ H ₉	67,8
1pBuEt . HCl	-C ₃ H ₇	-C ₂ H ₅	-C ₄ H ₉	44,9
1bBuEt . HCl	-C ₄ H ₉	-C ₂ H ₅	-C ₄ H ₉	9,4
1mMePro . HCl	-CH ₃	-CH ₃	-C ₃ H ₇	74,6
1eMePro . HCl	-C ₂ H ₅	-CH ₃	-C ₃ H ₇	57,7
1eMePe . HCl	-C ₂ H ₅	-CH ₃	-C ₅ H ₁₁	47,8

Tabulka 3 Přehled nově syntetizovaných látek.

Špatná rozpustnost meziproductů byla důvodem vytvoření dvou metod pro redukci. Výsledky obou metod byly srovnatelné. Při charakterizaci redukováných látek (bází) bylo ovšem zjištěno, že dochází k jejich rozkladu. Toto znemožnilo následnou přípravu stabilních solí cílových látek.

Závěr

Bylo připraveno 11 látek - alkylesterů kyseliny 4-[3-(N, N-dialkylamino)-propyl-1-on]-fenylylkarbamové ve formě hydrochloridu. Tyto látky byly charakterizovány pomocí ¹H-NMR, ¹³C-NMR, TLC a byla stanovena jejich teplota tání. Na partnerských pracovištích probíhá stanovení jejich inhibiční aktivity vůči enzymu acetylcholinesteráza. U redukováných forem těchto látek probíhá optimalizace jejich syntézy.

Literatura

- (1) HESTER, J.B., GIBSON, J.K., BUCHANAN, L.V., et al. *Progress toward the Development of a Safe and Effective Agent for Treating Reentrant Cardiac Arrhythmias: Synthesis and Evaluation of Ibutilide Analogues with Enhanced Metabolic Stability and Diminished Proarrhythmic Potential*. J. Med. Chem. 2001, Vol. 44, pp. 1099-1115.
- (2) LI, P., SUN, H., ZHOU, P., et al. *Comparison of the effects of DC031050, a class III antiarrhythmic agent, on hERG channel and three neuronal potassium channels*. Acta Pharmacologica Sinica. 2012, Vol. 33, pp. 728-736.

- (3) SAVELIEVA, I., CAMM, J. *Anti-arrhythmic drug therapy for atrial fibrillation: current anti-arrhythmic drugs, investigational agents, and innovative approaches*. *Europace*. 2008, Vol. 10, pp. 647-665.
- (4) CARVALHO, J.F.S., LOUVEL, J., DOORNBOS, M.L.J., et al. *Strategies To Reduce hERG K⁺ Channel Blockade. Exploring Heteroaromaticity and Rigidity in Novel Pyridine Analogues of Dofetilide*. *J. Med. Chem.* 2013, Vol. 56, pp. 2828-2840.
- (5) GONĚC, Tomáš. *Syntéza a studium látek ovlivňujících adrenergní receptory*. Brno, 2010. Disertační práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta. Vedoucí práce Jozef Csöllei.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 330/2016/FaF.

Editovali:	doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D. prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc. doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2016

978-80-7305-783-1