

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

BRNO 2019

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2019

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2019 financovaných z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2019

Editovali:

doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

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

doc. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D.

doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2019

ISBN 978-80-7305-830-2

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

tento sborník Vám přináší příspěvky, které byly prezentovány na závěrečné konferenci Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno konané dne 10. prosince 2019.

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

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

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

OBSAH

Příspěvky FVL

Použití perorální aplikace azaperonu pro sedaci prasat v rámci zlepšení podmínek welfare...	2
Vliv parenterální aplikace vitamínu E a beta-karotenu březím kravám na kvalitu kolostra a imunitní a zdravotní stav jejich telat.....	5
Vliv časování intrafolikulárního transferu oocytů na zisk blastocyst u mléčného skotu.....	10
Role klinické a faremní diagnostiky v přesné diagnóze a cílené terapii mastitid dojnic vyvolaných G+ bakteriemi, včetně hodnocení účinnosti léčby.....	12
Identifikace a genomická charakterizace kmenů kaliciviru koček.....	17
Identifikace kandidátních polymorfních markerů asociovaných s persistencí viru FCoV v trusu koček.....	22
Porovnání výsledků mikrobiologické kultivace a PCR detekce patogenů v tělních tekutinách septických hříbat.....	27
Prevalence equinního sarkoidu v České republice a zavedení nových laboratorních metod pro jeho diagnostiku.....	31
Prevalence výskytu dilatační kardiomyopatie u výmarských ohařů a jejich možné příčiny vzniku.....	37
Zhodnocení vybraných biochemických parametrů v peritoneální efuzi a krvi v souvislosti s postižením gastrointestinálního traktu.....	41
Vliv podávání metamizolu na hematologické a biochemické parametry u psů.....	45
Vliv kontinuálně podávaných analgetik na nitrooční tlak u psů.....	47
Vztah mezi tloušťkou centrální rohovky a nitroočním tlakem u koní.....	51
c-Myb a osteogeneze: nové funkce a interakce.....	55
Nové funkce pro-apoptotických kaspáz ve vztahu k autofagii a chondrogenezi.....	59
Působení vybraných látek, izolovaných z <i>Taraxacum officinale</i> , na fyziologické a nádorové buněčné linie.....	63

Příspěvky FVHE

Diverzita a prevalence zoonotických patogenů v drobných savcích na modelové lokalitě.....	68
Dynamika růstu <i>Bacillus cereus</i> ve vařených těstovinách uchovávaných při 24 °C.....	71
Komplexní zhodnocení negativních účinků vybraných organických UV filtrů na ryby.....	75
Komparativní genomika izolátů a plazmidů aeromonád rezistentních k antimikrobiálním látkám z ryb v České republice.....	80
Seeds-oil dressings heat stability assessment using principal component analysis.....	84
Riziko výskytu potenciálně toxigenních bakterií <i>Bacillus cereus sensu lato</i> v provozovných stravovacích služeb.....	88
Ekotoxicita nanočástic zlata pro organismy vodních ekosystémů	92
Průkaz modifikovaných škrobů v masných výrobcích.....	95
Vliv ethinylestradiolu na celosamčí triploidní populaci dánia pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)...99	
Dopad mikroplastů na organismus pstruha duhového (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	103
Hodnocení produkce stafylokokových enterotoxinů v lahůdkářských a cukrářských výrobcích.....	107
Hodnocení metod pro detekci sójové bílkoviny v potravinách.....	111
Disperze mláďat orla mořského <i>Haliaeetus albicilla</i>	115
Vliv agrotechnických metod na výskyt mykotoxinů v jablkách.....	118
Vliv nízkých teplot na růst netopýří buněčné kultury.....	121
Ultrastruktura <i>Candidatus Neoehrlichia mikurensis</i> ve slinných žlázách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	125
Nutriční hodnocení suchých krmiv pro psy dostupných v tržní síti se zaměřením na obsah organických živin a vybraných minerálních látek.....	128
Sekvenovanie štvrtej generácie u plazmidov kódujúcich klinicky významné beta-laktamázy získaných z ľudí a zvierat.....	132
Vliv křížení plemene meklenburský strakáč s hybridními králicemi na růstové schopnosti, jatečnou hodnotu a kvalitu masa vykrmovaných králíků.....	136

Příspěvky FaF

Vývoj perorálního přípravku s biologickým obsahem k enterickému podání	142
Syntéza a studium derivátů dihydroxynaftalenkarboxamidů s potenciálním antimikrobiálním účinkem.	147
Testování antibakteriální aktivity přírodními látkami, inhibice tvorby bakteriálního biofilmu a ovlivnění quorum sensing.....	150
Výroba a testování "umělých" trombů pro experimentální modely trombembolických mozkových příhod.....	154
Příprava a hodnocení polymerních částic pro plicní aplikaci.....	158
Stanovení vlivu obsahových látek <i>Broussonetia papyrifera</i> na signální kaskádu insulinu a NF- κ B v buněčných kulturách.....	163
Izolace obsahových látek z dřevní části <i>Broussonetia papyrifera</i> (L.) L'Hér. ex Vent.....	168
Izolácia a identifikácia obsahových látok z plodov <i>Paulownia tomentosa</i> a ich cytotoxická aktivita.....	171
Syntéza a biologické hodnocení substituovaných 5-hydroxy- γ -pyronů.....	176
Vývoj organokatalyzované asymetrické Henryho reakce fluorketonů.....	180
Rychlá metoda stanovení isomaltulose vedle glukosy a sacharosy pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) s detektorem ELSD.....	185
Studium vlivu ligandů a pH prostředí na interakci nádorového supresoru p53 s guaninovými kvadruplexy.....	188
Kombinované kolagenové matrice pro terapii ran a účely kosmetické dermatologie.....	191
Testování nepřímého antioxidačního potenciálu rostlinných fenolických látek aktivací systému Nrf2/ARE v buněčných kulturách.....	196
Nové potenciální antibakteriální léčiva a stanovení jejich aktivity vůči gram-pozitivním bakteriím.....	200

Příspěvky

Fakulty veterinárního lékařství

Použití perorální aplikace azaperonu pro sedaci prasat v rámci zlepšení podmínek welfare

Zdeněk Fajt¹, Martin Svoboda¹

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

Úvod

Prasata jsou velmi citlivá ke stresu při manipulaci a během transportu. To může výrazným způsobem snižovat jejich welfare. Tyto negativní účinky může snižovat použití sedativ (Dantzer, 1977). Nejčastěji používaným sedativem u prasat je azaperon (přípravek obsahující 40mg/ml inj.). Jedná se o butyrophenonové neuroleptikum, které se používá u prasat k redukci stresu, ale také ke snižování agresivity a při celkové injekční anestezii (Benson and Thurmon, 1979). Podle současných doporučení výrobce se sedace prasat provádí injekční aplikací azaperonu v dávce 2 mg/kg.ž.hm. Nevýhodou této formy aplikace je, že azaperon zanechává v místě vpichu vysoké a perzistentní koncentrace. Tato skutečnost vylučuje možnost jeho použití při transportu prasat na jatky. Řešením tohoto nedostatku by mohlo být použití perorální aplikace azaperonu. Autoři Mestorino et al. (2013) zjistili, že pokud aplikovali perorálně azaperon v dávce 4 mg/kg.ž.hm. 6 hodin před odporažením, koncentrace azaperonu ve všech analyzovaných tkáních nepřekročila maximální reziduální limit stanovený EU. Někteří autoři zjistili, že samotná injekční aplikace azaperonu může vyvolat určitou stresovou odpověď u ošetřovaných prasat. Tato stresová odpověď se projevila zvýšenou koncentrací např. kortizolu, glukózy a laktátu v krevní plazmě (Das et al. 2016, Schwarz et al. 2018). Tuto skutečnost je třeba brát v úvahu, pokud je azaperon používán např. při fyziologických experimentech, které hodnotí vliv různých faktorů na biochemické ukazatele prasat. Zda se tyto negativní důsledky projevují i po perorální aplikaci azaperonu prasatům není zatím známo. Z uvedených skutečností je zřejmé, že znalost některých aspektů použití azaperonu u prasat je doposud nedostatečná. To nás vedlo k formování cílů studie, tj. porovnat účinnost injekční a perorální aplikace azaperonu za účelem dosažení sedace prasat a zjistit jaký vliv má injekční a perorální aplikace azaperonu na hematologické a biochemické parametry selat a jak se liší koncentrace azaperonu v krvi během jeho působení.

Materiál a metodika

Celkem bylo použito 40 selat po odstavu, rozdělených do 4 skupin po 10 kusech. V rámci samotného pokusu byla selatům odebrána krev před zahájením pokusu a v jeho průběhu, v intervalu 0, 30, 90, 240 minut po aplikaci. Vzorek krve byl odebrán sterilními jehlami a stříkačkami z *vena cava*

cranialis. Krev byla odebírána do zkumavek s EDTA na hematologické vyšetření a do zkumavek s heparinem za účelem získání vzorku plazmy pro biochemické vyšetření. Za účelem komplexního zhodnocení stavu organismu a stavu welfare byly do analýz zahrnuty biochemické parametry, tzn. aktivity ALP, ALT, AST, GMT, CK, LDH koncentrace kreatininu a močoviny, glukózy, celkové bílkoviny a laktátu v plazmě a kompletní hematologické vyšetření. V krevní plazmě se stanovovala metodou ELISA koncentrace azaperonu a jeho farmakodynamické změny.

Skupině A byl aplikován přípravek obsahující azaperon v koncentraci 40mg/ml inj 100 ml *i.m.*, v dávce 2 mg/kg ž.h.,

Skupině B (kontrolní) byl aplikován 1ml fyziologického roztoku *per os*

Skupině C byl aplikován přípravek obsahující azaperon v koncentraci 40mg/ml inj 100 ml *per os*, v dávce 2 mg/kg ž.h.

Skupině D byl aplikován přípravek obsahující azaperon v koncentraci 40mg/ml inj 100 ml *per os*, v dávce 4 mg/kg ž.h.

Dle výrobce přípravku obsahující azaperon se sleduje maximální účinek po injekční aplikaci za 30-60 minut a během 4 hodin vymizí. Výrobce neuvádí žádné údaje o použití preparátu *per os*. Z tohoto důvodu se pokusná zvířata sledovala v intervalu 0, 30, 90, 240 minut po aplikaci. U všech skupin se sledovaly tyto parametry stupně sedace:

pohyb (rozsah 0-1-2), palpabrální reflex (ANO/NE), korneální reflex (ANO/NE), flexorový reflex končetin (ANO/NE), povrchová a hluboká citlivost končetin (ANO/NE), stupeň salivace (v rozsahu 0-1-2), prolaps pyje u samců (0-1-2), úroveň dýchání a dechová frekvence (eupnoe-tachypnoe-bradypnoe; počet dechů/minutu), reakce na hlasitou stimulaci tupým úderem kovu do kovového hrazení, každých (15 min bude tento parametr sledován) (0-1-2), měření tělesné teploty rektálním teploměrem a monitoring srdeční funkce fonendoskopem.

Výsledky

Zjistili jsme, že perorální podání azaperonu v dávce 2 mg/kg indukuje sedaci u selat, ale k získání klinicky srovnatelné sedace s injekční aplikací (2 mg/kg *i. m.*) je nutné použít dávku 4 mg/kg *per os*. Dále jsme zjistili, že se zvýšením dávky perorálně podaného azaperonu lze učinit následující závěry:

nástup sedace je rychlejší, konec sedace je pozdější, doba sedace je delší. V dostupné literatuře nejsou doposud k dispozici údaje o tom, jakým způsobem působí zvýšené dávky azaperonu na organismus selat. Výhodou perorální aplikace azaperonu z hlediska welfare je možnost jeho hromadné aplikace bez nutnosti fixace prasat v napájecí vodě nebo krmivu.

Seznam literatury:

Benson GJ, Thurmon JC (1979) Anesthesia of swine under field conditions. J Am Vet Med Assoc 174: 594-596.

Dantzer R (1977) New aspects of the use of tranquilizers in animal husbandry, with particular reference to pigs. Vet Sci Commun 1: 161-169.

Daş G, Vernunft A, Görs S, Kanitz E, Weitzel JM, Brüssow KP, Metges CC (2016) Effects of general anesthesia with ketamine in combination with the neuroleptic sedatives xylazine or azaperone on plasma metabolites and hormones in pigs. J Anim Sci 94: 3229-3239.

Mestorino N, Marchetti ML, Martinez MA, Anadon A (2013) Tissue depletion of azaperone and its metabolite azaperol after oral administration of azaperone in food-producing pigs. Rev Toxicol 30: 209-213.

Schwarz T, Zięcik A, Murawski M, Nowicki J, Tuz R, Baker B, Bartlewski PM (2018) The influence of azaperone treatment at weaning on reproductive function in sows: ovarian activity and endocrine profiles during the weaning-to-ovulation interval. Animal12(10): 2089-2097.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 105/2019/FVL

Vliv parenterální aplikace vitamínu E a beta-karotenu březím kravám na kvalitu kolostra a imunitní a zdravotní stav jejich telat

Mikulková K., Kadek R., Uríčková E., Odkladalová V.

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

Úvod

Udržení optimálního zdraví telat má významný vliv na jejich produkci v budoucnosti a tedy i na ekonomiku chovu. Nízká koncentrace α -tokoferolu a β -karotenu byla častější v souvislosti s vysokou mortalitou telat ve stádě¹. U telat, kterým byl injekčně aplikován vitaminový přípravek (E, A a D) byla zjištěna vyšší koncentrace IgG1 a též významný vliv na jejich růst a imunitní odpověď². Cílem této studie bylo sledování vlivu aplikace vitaminových preparátů (vitamín E a beta-karoten) březím kravám na biochemické a hematologické parametry a zdravotní stav jejich telat po porodu.

Materiál a metodika

V rámci pokusu bylo vybráno 30 březích krav, které byly následně rozděleny do tří skupin (kontrolní skupina, 1. pokusná skupina - aplikace vitamínu E, 2. pokusná skupina - aplikace beta-karotenu). V období 10-14 dní před porodem byl proveden první odběr krve u krav z v. coccygea media a zároveň byl aplikován vitaminový přípravek dle skupiny (1. pokusná skupina - ADE inj. roztok, 2. pokusná skupina - Carofertin). V den otelení těchto krav byl proveden jejich druhý odběr krve a zároveň první odběr krve u jejich telat z v. jugularis ihned po narození. Kolostrum krav bylo průběžně oddojeno a použito k prvnímu (do 2 hodin po narození), druhému (do 6 hodin po narození) a třetímu (na další den) napojení telat a vzorek kolostra byl analyzován. Druhý a třetí odběr krve u telat byl proveden 2 hodiny a 24 hodin po napojení a pak čtvrtý odběr 5-7 dní po porodu v období přechodu na mléčnou výživu. V době 5-7 dní po porodu byl odebrán zároveň i třetí vzorek krve u krav. Při každém odběru telat byl sledován a zaznamenán jejich klinický stav (životaschopnost, sací reflex, případný výskyt průjmů, flexorových kontraktur). Stanovení daných parametrů v krevním séru a v plné krvi bylo provedeno v Klinické laboratoři pro velká zvířata, VFU Brno. V krvi krav byly stanoveny následující parametry: vitamin E, beta- karoten, CB, albumin, BHB, NEMK, AST, bilirubin, glukóza, UREA, Ca, P, Zn, Cu, Mg. V krvi telat byly stanoveny následující parametry: vitamin E, beta- karoten, CB, albumin, glukóza, IgG, AST, GMT, bilirubin, kreatinin, UREA, Ca, P, Mg, Na, K. Vitamíny byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalínové chromatografie (HPLC). Stanovení biochemických parametrů bylo provedeno na automatickém biochemickém analyzátoru KONELAB 20XT.

Minerální profil byl stanoven pomocí atomové absorpční spektrometrie (AAS). U krav i telat bylo provedeno základní hematologické vyšetření pomocí automatického hematologického analyzátoru BC-2800 VET. V kolostru byl stanoven také vitamín E a beta- karoten. Stanovení kvality kolostra bylo provedeno pomocí refraktometru v jednotkách BRIX.

Výsledky

Výsledné koncentrace vitamínů v séru krav jsou uvedeny v Tab 1. V rámci odběrů v den otelení a 5-7 dní po porodu nebyly prokázány žádné statisticky signifikantní rozdíly v koncentraci vitamínu E v séru krav mezi 1. pokusnou skupinou (vitamín E) a ostatními skupinami (beta-karoten a kontrolní skupina). Statisticky signifikantně zvýšená ($P < 0,01$) koncentrace beta-karotenu byla zaznamenána u 2. pokusné skupiny (6,05 $\mu\text{mol/l}$) v porovnání s kontrolní skupinou (3,61 $\mu\text{mol/l}$) při odběru v den otelení. Statisticky velmi signifikantní rozdíl ($P < 0,001$) v koncentraci beta-karotenu byl dále pozorován mezi 2. pokusnou skupinou (5,35 $\mu\text{mol/l}$) a kontrolní skupinou (3,41 $\mu\text{mol/l}$) 5-7 dní po porodu.

Tab 1: Koncentrace vitamínů v séru krav 10-14 dní *ante partum*, v den otelení a 5-7 dní po porodu

Parametry		10-14 dní a.p.			den otelení			5-7 dní p.p.		
		KO	Vit E	BETA	KO	Vit E	BETA	KO	Vit E	BETA
Vit E	X	5,91 ^{αA}	6,55 ^A	4,97 ^{α}	4,69	4,67	4,13	4,27	3,85	3,79
$\mu\text{mol/l}$	SD	1,26	1,43	0,63	0,73	1,34	1,07	0,58	1,03	0,64
bKar	X	5,19 ^{αA}	7,98 ^A	7,34 ^{α}	3,61 ^A	4,80	6,05 ^A	3,41 ^{A,a}	4,66 ^A	5,35 ^a
$\mu\text{mol/l}$	SD	1,34	2,73	1,56	0,94	1,54	2,06	0,51	1,21	1,07

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v rámci daného odběru jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α , β – $P < 0,05$; A – $P < 0,01$; a, b – $P < 0,001$; KO – kontrolní skupina; Vit E – 1. pokusná skupina (vitamín E); BETA – 2. pokusná skupina (beta-karoten); Vit E – vitamín E; bKar – beta-karoten

Výsledné hodnoty celkové bílkoviny, imunoglobulinů, vitamínu E, beta-karotenu a hematologických parametrů u telat jsou uvedeny v Tab 2. Koncentrace celkové bílkoviny byla statisticky významně zvýšená u kontrolní skupiny ve všech odběrech po napojení v porovnání se skupinami pokusnými. Statisticky nejvýznamnější rozdíl byl pozorován v případě odběru 2 hodiny po napojení mezi kontrolní skupinou (59,0 g/l) a 1. pokusnou (49,6 g/l; $P < 0,001$) a 2. pokusnou (49,1 g/l; $P < 0,001$) skupinou. Statisticky významný rozdíl v koncentraci vitamínu E u telat mezi jednotlivými skupinami byl pozorován 5-7 dní po porodu. Koncentrace vitamínu E v séru telat 1. pokusné skupiny byla v tomto období nejvyšší (9,64 $\mu\text{mol/l}$) v porovnání s kontrolní ($P < 0,05$) a 2. pokusnou skupinou ($P < 0,01$). Statisticky významně ($P < 0,01$) zvýšené koncentrace beta-karotenu byly pozorovány mezi 1. pokusnou skupinou a 2. pokusnou skupinou v odběrech 2 hodiny a 24 hodin po napojení. Nebyly

zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami telat v rámci jednotlivých odběrů v počtu WBC. Na druhé straně byly zaznamenány statisticky významně zvýšené koncentrace hemoglobinu u 1. pokusné (107 g/l; $P < 0,01$) a 2. pokusné skupiny (104 g/l; $P < 0,05$;) v porovnání se skupinou kontrolní 2 hodiny po napojení a také v rámci odběru 24 hodin po napojení (98 g/l a 96 g/l vs. 30,3 %; $P < 0,01$). Signifikantně zvýšená koncentrace hematokritu byla také pozorována u 1. pokusné (39,9 %; $P < 0,05$) a 2. pokusné skupiny (40,1 %; $P < 0,05$) v porovnání se skupinou kontrolní 2 hodiny po napojení a také v rámci odběru 24 hodin po napojení (35,0 % u obou pokusných skupin vs. 82 g/l; $P < 0,01$). Rovněž byl 2 hodiny po napojení statisticky významně zvýšený ($P < 0,05$) počet RBC u telat 2. pokusné skupiny ($8,96 \cdot 10^{12}/l$) v porovnání s kontrolní skupinou ($8,14 \cdot 10^{12}/l$). Signifikantní pozitivní korelace byla zaznamenána mezi koncentrací vitamínu E v kolostru a koncentrací vitamínu E v séru telat 24 hodin po napojení ($r = 0,3716$; $P < 0,05$). Hodnoty BRIX v kolostru signifikantně pozitivně korelovaly s koncentrací celkové bílkoviny a imunoglobulinů v séru telat v odběrech 24 hodin po napojení (CB: $r = 0,6578$; $P < 0,001$; IgG: $r = 0,6286$; $P < 0,001$) a 5-7 dní po porodu (CB: $r = 0,6640$; $P < 0,001$; IgG: $r = 0,5546$; $P < 0,01$).

Tab 2: Hodnoty biochemických a hematologických parametrů v krvi telat bezprostředně po porodu před prvním napojením kolostrum, 2 hodiny po napojení, 24 hodin po napojení a 5-7 dní po porodu

Parametry		před napojením			2 h po napojení			24 h po napojení			5-7 dní p.p.		
		KO	Vit E	BETA	KO	Vit E	BETA	KO	Vit E	BETA	KO	Vit E	BETA
CB	X	56,5 ^{ab}	47,3 ^a	49,4 ^b	59,0 ^{ab}	49,6 ^a	49,1 ^b	84,7 ^a	75,0	73,3 ^a	81,1 ^{aA}	71,3 ^a	69,6 ^A
g/l	SD	3,6	3,1	2,0	5,1	4,0	2,4	10,9	11,5	13,8	8,6	7,1	10,5
IgG	X	0,11 ^a	0,19 ^b	0,76 ^{ab}	2,90	2,20	2,22	17,11	16,81	12,97	16,92	17,22	12,40
g/l	SD	0,15	0,15	0,31	2,95	2,56	1,95	5,18	5,13	6,06	4,41	5,33	7,77
Vit E	X	0,39	0,48	0,46	0,56	0,63	0,60	1,46	1,51	1,26	7,46 ^a	9,64 ^{aA}	6,83 ^A
μmol/l	SD	0,11	0,19	0,20	0,16	0,25	0,16	0,84	0,69	0,56	1,44	2,86	1,47
bKar	X	0,71 ^a	0,61 ^A	1,21 ^{aA}	1,23	0,87 ^A	1,58 ^A	1,76	1,35 ^A	2,29 ^A	3,00	2,76	3,47
μmol/l	SD	0,43	0,27	0,56	0,58	0,32	0,68	0,71	0,50	0,96	0,64	1,07	0,90
WBC	X	12,3	10,7	11,4	14,5	12,2	12,1	11,2	12,1	11,3	8,7	8,0	9,8
*10⁹/l	SD	3,6	3,2	2,2	3,6	4,0	2,9	3,1	4,5	5,6	3,3	3,0	3,6
RBC	X	8,86	9,26	9,05	8,14 ^a	8,56	8,96 ^a	7,49	8,37	8,11	7,45	7,88	7,83
*10¹²/l	SD	0,75	1,29	1,05	0,73	1,14	0,63	0,73	1,15	0,64	0,63	1,35	1,10
HGB	X	100	112	106	92 ^{aA}	107 ^A	104 ^a	82 ^{A,B}	98 ^A	96 ^B	83	94	90
g/l	SD	8	16	16	7	14	10	7	16	10	9	11	14
HCT	X	38,5	43,3	40,9	34,9 ^{aβ}	39,9 ^a	40,1 ^β	30,3 ^{A,B}	35,0 ^A	35,0 ^B	29,7	34,0	32,6

%	SD	3,5	6,3	6,0	2,7	6,1	3,8	2,8	6,0	4,3	3,4	4,9	5,1
---	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v rámci daného odběru jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α , β – $P < 0,05$; A, B – $P < 0,01$; a, b – $P < 0,001$; KO – kontrolní skupina; Vit E – 1. pokusná skupina (vitamín E); BETA – 2. pokusná skupina (beta-karoten); CB – celková bílkovina; IgG - imunoglobuliny; Vit E – vitamín E; bKar – beta-karoten; WBC - leukocyty; RBC erytrocyty; HGB - hemoglobin; HCT – hematokrit

Závěr

Koncentrace vitamínu E se v séru krav významně nezvýšila po podání vitamínového přípravku. Vzhledem k tomu, že kolostrum se v mléčné žláze vytváří už pár týdnů před porodem, je možné, že množství vitamínu E obsaženého v přípravku bylo spotřebováno v kolostru. Na druhé straně, koncentrace vitamínu E u telat v odběru 24 hodin po napojení významně korelovaly s koncentrací vitamínu E v kolostru. Koncentrace vitamínu E v séru telat 1. pokusné skupiny byla signifikantně zvýšená v porovnání s kontrolní a 2. pokusnou skupinou 5-7 dní po porodu. Koncentrace beta-karotenu v krvi krav 2. pokusné skupiny byla významně zvýšená v porovnání s kontrolní skupinou krav v den otelení a 5-7 dní po porodu. Avšak, korelace mezi hladinou beta-karotenu v krvi telat a množstvím beta-karotenu obsaženého v kolostru nebyla významná. Nebyly také pozorovány statisticky významné rozdíly v koncentraci beta-karotenu mezi 2. pokusnou a kontrolní skupinou v odběrech po napojení kolostrem. Statisticky významně zvýšené koncentrace beta-karotenu byly zaznamenány mezi 1. pokusnou skupinou a 2. pokusnou skupinou v odběrech 2 hodiny a 24 hodin po napojení. Nebyl prokázán vliv aplikace vitamínových přípravků na koncentraci WBC v krvi telat. Toto zjištění nekorresponduje s výsledky studií jiných autorů, které uvádí pozitivní vliv podávání vitamínových přípravků na imunitu telat. Naopak počet RBC a koncentrace HGB a HMT byly významně zvýšené u telat 1. a 2. pokusné skupiny 2 hodiny a 24 hodin po napojení. To by mohl vysvětlovat fakt, že vitamín E a beta-karoten jsou součástí antioxidačního obranného systému a chrání fosfolipidovou membránu erytrocytů před lipoperoxidací. Obecně bylo prokázáno, že kolostrum kontrolní skupiny bylo kvalitnější v porovnání se skupinami pokusnými, jelikož koncentrace celkové bílkoviny u telat kontrolní skupiny byly významně zvýšené v rámci všech odběrových skupin. Na kvalitu kolostra má vliv velké množství faktorů. Závěrem lze říci, že jednorázové injekční podání vitamínu E nebo beta-karotenu březím krávám před porodem nemělo vliv na zvýšení koncentrace celkové bílkoviny a imunoglobulinů u telat.

Seznam literatury:

1. Torsein M., Lindberg A., Svensson C., Jensen S.K., Berg CH., Person Waller K. α -Tocopherol and β -carotene concentrations in feed, colostrum, cow and calf serum in Swedish dairy herds with high or low calf mortality. *Acta Veterinaria Scandinavica*, Volume 60, December 2018; article 7

2. Krueger L. A., Beitz D. C., Onda K., Osman M., O'Neil M. R., Lei S., Wattoo F.H., Stuart R.L., Tyler H.D., Nonnecke B. Effects of D- α tocopherol and dietary energy on growth and health of preruminant dairy calves. Journal of Dairy Sciences, Volume 97, June 2014, pages 3715-3727

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 106/2019/FVL

Vliv časování intrafolikulárního transferu oocytů na zisk blastocyst u mléčného skotu

Vojtěch Kos, Aneta Koudelová, Tomáš Páleník

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

Úvod

Využití transvaginální ultrasonografické punkce vaječníků u skotu se stále rozšiřuje. V současnosti je používána k odběru materiálu z vaječníků nebo k aplikaci biologicky účinných látek přímo do vaječníků. Jednoznačně nejrozšířenější je metoda transvaginální aspirace folikulů, která slouží rutinně v praxi k získávání oocytů pro *in vitro* produkci embryí (IVP) (1). Jiné aplikace jsou již podstatně řidší (odběr folikulární tekutiny k endokrinologickým a metabolickým analýzám, transvaginální injekce do folikulů) (2, 3, 4). V současnosti se metoda transvaginální ultrasonografické punkce vaječníků začíná používat k injekci oocytů do preovulačního folikulu (intrafollicular oocyte transfer - IFOT). Je to technika využívaná jen několika světovými pracovišti (5, 6), která představuje jak rozšíření možností *in vivo* studia finální fáze maturace oocytů ve folikulu, tak i perspektivní alternativu pro klasickou produkci embryí *in vitro*. Podstatou IFOT je injekce oocytů získaných od dárce do preovulačního folikulu příjemce a následná inseminace příjemce. Injektované oocyty podstupují *in vivo* maturaci ve folikulu a po ovulaci jsou ve vejcovodu oplozeny a pokračují ve vývoji. Osm dnů po IFOT jsou výplachem dělohy příjemce získána sedmidenní embrya, se kterými lze dále manipulovat. Tento postup obejde proces maturace, fertilizace a kultivace v prostředí *in vitro* a embrya takto získaná mají na rozdíl od IVP embryí vlastnosti shodné s *ex vivo* produkovanými embryi (5). Naše pracoviště disponuje vybavením vlastní konstrukce umožňujícím provádět IFOT relativně jednoduše a snadno. Nicméně metoda IFOT však zatím neposkytuje výsledky kvantitativně srovnatelné s IVP, není metodicky dokonale zvládnuta a poskytuje nevyrovnané výsledky. Cílem studie je proto modifikace původní metodiky IFOT se zaměřením na posun časování zákroku během synchronizace příjemců a hodnocení vlivu maturace oocytů *in vitro* na výsledky IFOT.

Materiál a metodika

Pro experimenty měly být využity oocyty odebrané z jatečných vaječníků podle standardní metodiky. Pokus je rozdělen do 4 experimentů: Experiment 1: Aplikace média PBS do říjového folikulu jeden den před ovulací (D -1), Experiment 2: Intrafolikulární transfer čestvě odebraných jatečných oocytů do říjového folikulu jeden den před ovulací (D -1), Experiment 3: Kontrolní

intrafolikulární transfer *in vitro* maturovaných jatečných oocytů do říjového folikulu v den ovulace (D 0), Experiment 4: Kontrolní produkce embryí *in vitro*. Bylo plánováno provést 40 akcí IFOT a přenést celkem 800 oocytů. Měl být hodnocen bude počet znovu získaných oocytů/embryí a jejich kvalita, vliv punkce dominantního folikulu v D-1 před očekávanou ovulací na průběh ovulace, a provedeno srovnání získaných struktur mezi pokusnými skupinami.

Výsledky

Harmonogram projektu byl posunut z důvodu reakreditace zvířetníků FVL. VFU neměla oprávnění k držení pokusných zvířat a proto aktivity na živých zvířatech mohou být realizovány až nyní po schválení projektu pokusů. Doposud byla realizována část projektu v podmínkách *in vitro* (testování vhodných inseminačních dávek, produkce embryí *in vitro* z jatečných vaječnicků). Pokus dále pokračuje z vlastních zdrojů a bude dokončen v plném rozsahu.

Seznam literatury:

1. Pieterse, M.C. – Kappen, K.A. – Kruip, Th.A.M. – Taverne, M.A.M. (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30, 751 – 762.
2. Indrova, E. – Dolezel, R. – Novakova-Mala, J. – Pechova, A. – Zavadilova, M. – Cech, S. (2017): Impact of acute metabolic acidosis on the acid-base balance in follicular fluid and blood in dairy cattle. *Theriogenology*, 89, 41 – 46.
3. Kot, K. – Gibbons, J. R. – Ginther, O. J. (1995): A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. *Theriogenology*, 44, 41 – 50.
4. Mala, J. – Beckers, J. F. – de Sousa, N. M. – 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. Kassens, A. – Held, E. – Salilew-Wondim, D. – Sieme, H – Wrenzycki, C. – Tesfaye, D. – Schjellander, K., Hoelker, M. (2015): Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and *in vitro*-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. *Biol. Reprod.*, 92, 150, 1 – 14.
6. Spricigo, J.F.W. – Sena Netto S.B. – Vieira Muterlle, C. – Dias Rodriguez S.A. – Oliveira Leme, L. – Guimaraes A. L. – Costa Caixeta, F. M. – Machain Franco, M. – Pivato, I. – Nunes Dode, M.A. (2016): Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*, 86, 2054 – 2062.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 125/2019/FVL

Role klinické a faremní diagnostiky v přesné diagnóze a cílené terapii mastitid dojnic vyvolaných G+ bakteriemi, včetně hodnocení účinnosti léčby

Josef Prášek, Martin Pleško, Kristýna Geboliszová

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

Úvod

Mastitida je nejčastější indikací pro použití antimikrobik v intenzivních chovech mléčného skotu. V poslední dekádě dochází k výraznému posunu ve výskytu jednotlivých patogenů mléčné žlázy, přičemž přibývá případů, které jsou již bakteriologicky bez nálezu. Je popsáno, že až v polovině případů klinických mastitid použití antimikrobik nepřináší žádný efekt (Ruegg, 2018). V praxi je ovšem značně rozšířeno používání širokospektrých antibiotik např. cefalosporinů 3. a 4. generace. Vzhledem k rostoucímu počtu záchytů izolátů se získanou rezistencí není nadále možné použití antimikrobik bez odpovídající diagnostiky a je třeba každé rozhodnutí o léčbě podložit průkazem původce a to se zaměřením na použití úzko spektrálních látek. To také předpokládá návrh nové legislativy EU v oblasti použití antimikrobik ve veterinární medicíně. Zásadní inovaci přinesl koncept faremní kultivace vzorků přímo na farmě, který umožňuje rychlé rozpoznání původce a nasazení odpovídající léčby. Cílem práce bylo využít rychlé stájové diagnostiky s kultivací na farmě ke zvýšení přesnosti stanovení diagnózy klinických a subklinických mastitid se zaměřením na Gram+ původce: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* (včetně CAMP pozitivních kmenů), *Streptococcus dysgalactiae*, *Trueperella pyogenes* a vybrané koaguláza negativní stafylokoky. Z gram negativních patogenů byly sledovány *E. coli* a *Klebsiella spp.* V návaznosti na to navrhnout postup racionální stájové diagnostiky, včetně optimální volby antimikrobik pro léčbu bez použití cefalosporinů 3. a 4. generace. Dalším cílem bylo vyhodnotit účinnost použitých postupů antimikrobiální terapie včetně případů, kdy nebyla použita, a dosáhnout tak zásadního omezení spotřeby antibiotik pro léčbu nezávažných klinických mastitid.

Materiál a metody

Studie byla provedena ve dvou vybraných chovech, kde již byla stájová diagnostika zavedena. Nové případy klinických mastitid byly klinicky vyšetřeny a vyhodnoceny podle závažnosti na 3 stupně:

1. Změněné mléko
2. Změněné mléko a lokální příznaky zánětu na postižené čtvrti
3. Systemická mastitida – s narušením celkového zdravotního stavu

Izoláty získané kultivací na farmě byly vyšetřeny rychlými testy (katalázový, koagulázový, eskulinový, CAMP) pro předběžnou identifikaci druhu v podmínkách farmy. Tyto výsledky byly podkladem pro stanovení individuálního léčebného protokolu pro Gram+ původce. Pro léčbu byl na základě dřívější znalosti citlivosti k antibiotikům použit penicilin a v některých případech amoxicilin. A to v intramamárním i systemickém podání po dobu 3 dnů v případě penicilinu a 4 dnů v případě amoxicilinu. Případy s Gram- nálezy a vzorky bez kultivačního nálezu nebyly léčeny antibiotiky. Vybrané kultury pak byly pro confirmaci vyšetřeny v laboratoři Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie, FVL, VFU Brno metodou MALDI TOFF za účelem přesné identifikace druhu původce. Mastitidy léčené antibiotiky byly 7. den po ukončení terapie klinicky vyšetřeny a znovu odebrány k mikrobiologickému vyšetření za účelem ověření klinické a bakteriologické účinnosti léčby. Případy mastitid bez léčby antibiotik byly 7. den po první kultivaci opakovaně vyšetřeny klinicky a kultivačně. Bylo stanoveno procento klinicky vyléčených případů a procento bakteriologicky vyléčených případů.

Na základě počtu somatických buněk stanoveného ze vzorku mléka pro kontrolu užitkovosti byly vytipovány krávy se subklinickou mastitidou. Čtvrtě dojnic byly vyšetřeny stájovým NK testem a na základě jeho výsledku byly odebrány čtvrt'ové vzorky mléka ke kultivaci. Identifikace izolátů na úroveň druhu byla provedena obdobně jako u klinických případů. Na základě výsledku byl navržen individuální léčebný protokol.

Výsledky

Výsledky klinického vyšetření jsou shrnuty v tabulce č. 1. Klinické mastitidy pouze se změněným mlékem (stupeň 1) se vyskytovaly v 89 % na farmě A a v 93 % na farmě B, což dokazuje, že na obou farmách je zacvičený personál schopen včasného rozpoznání nových klinických případů.

Tabulka č. 1. Výsledky klinických vyšetření krav s mastitidou

	Klinické vyšetření				Teplota \geq 39,0°C	
	St.1	St.2	St.3	Celkem		
Farma A	41	4	1	46	6	
%	89	9	2	100	13	
Farma B	56	3	1	60	3	
%	93	5	2	100	5	
	Klinické vyšetření 7.den po léčbě ATB nebo 7. den po				Celkem	Teplota \geq 39,0°C
	St.0	St.1	St.2	St.3		
Farma A	39	6	1	0	46	1
%	85	13	2	0	100	2
Farma B	56	3	1	0	60	2
%	93	5	2	0	100	3

Zvýšená teplota byla zjištěna pouze v 13 % případů na farmě A a v 5 % případů na farmě B.

Na obou farmách převažovaly Gram pozitivní nálezy, jak ukazuje tab. č. 2. Na farmě A dominovaly streptokoky (47 %) a (31 %) koaguláza negativní stafylokoky (CNS). Bez nálezu bylo 16 % případů a *E. coli* byla původcem v 6 % případů. Na farmě B byla situace podobná s převahou CNS (44 %) oproti streptokokům (34 %). CAMP pozitivní *Streptococcus uberis* nebyl zachycen. Bez nálezu bylo 10 % vzorků a ostatních Gram negativních izolátů společně s *E. coli* a *Klebsiella spp.* bylo 12 % případů.

Tabulka č. 2: Bakteriologické nálezy z faremní kultivace

Bakteriologické nálezy									
	<i>Streptoc. spp.</i>	Eskulin pozitivní	CAMP test	CNS	Bez nálezu	E.c.	<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	Celkem
Farma A	24	14	Negativní	16	8	3	0	0	51
%	47	58		31	16	6	0	0	100
Farma B	21	5	Negativní	27	6	1	2	5	62
%	34	24		44	10	1,5	2,5	8	100

Na farmě A bylo léčeno antimikrobiky pouze 55 % všech klinických případů. U 45 % případů byla zvolena symptomatická léčba. Na farmě B obdobně 53 % případů bylo léčeno a 47 % nebylo léčeno antibiotiky, jak je uvedeno v tab. č. 3. Na obou farmách jsme dosáhli shodně 88% úspěšnosti léčby při použití úzko spektrálních antimikrobik.

U subklinických mastitid je situace ještě příznivější, přičemž na farmě A bylo léčeno pouze 28 % případů a na farmě B 30 % případů. Nejčastějším nálezem jsou shodně CNS (63 % farma A a 47 % farma B). Streptokoky se vyskytovaly v 13 % případů na farmě A a v 20 % případů na farmě B. Výsledky získané z vyšetření subklinických mastitid shrnuje tab. č.4

Tabulka č. 3: Efektivita antimikrobiální a symptomatické léčby

Efektivita léčby antimikrobiky									
		Původce							
		<i>Strep. spp.</i>	CNS	Bez nálezu	E.c.	<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	Celkem	%
Farma A	Léčeno ATB	24	2	0	1	0	0	27	55
	Neléčeno ATB	0	12	3	7	0	0	22	45
								49	100
	Nález 7. den po léčbě nebo 7. den	<i>Strep. spp.</i>	CNS	Bez nálezu	EC	<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	celkem	%
	Negativní	21	11	3	8			43	88
	Snížení počtu kolonií	3						3	6
	Shodný nález opakovaně	0	3					3	6
Efektivita léčby antimikrobiky									
Farma B		<i>Strep. spp.</i>	CNS	bez nálezu	E.c.	<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	Celkem	%
	Léčeno ATB	18	12	0	0	0	0	30	53
	Neléčeno ATB	2	12	4	2	1	6	27	47
								57	100
	Nález 7. den po léčbě, nebo 7. den	<i>Strep. spp.</i>	CNS	Bez nálezu	E.c.	<i>Klebsiella spp.</i>	Gram -	Celkem	%
	Negativní	15	22	4	2	1	6	50	88
	Snížení počtu kolonií	3						3	5
	Shodný nález opakovaně	2	2					4	7
								57	100
Jiná infekce	3	2							

Tabulka č. 4. Bakteriologické nálezy a léčba antimikrobiky u subklinických mastitid.

Subklinické mastitidy										
	<i>Strep. spp.</i>	CNS	SA	Bez nálezu	E.c.	<i>Corynebacterium spp.</i>	Kvasinky	<i>Bacillus spp.</i>	Celkem	%
Farma A	13	66	1	6	8	7	2	1	104	100
Léčeno ATB	11	17	1	0	0	0	0	0	29	28
Zaprahnuto ATB	2								2	2
Kontaminace								1	1	

	<i>Strep. Spp</i>	<i>S. agal.</i>	CNS	SA	Bez nálezu	E.c.	<i>Corynebacterium spp.</i>	Kvasinky	Celkem	%
Farma B	29	13	69	0	16	9	11	1	148	100
Léčeno ATB	18	12	10	0	0	0	3	0	43	30
Zaprahnuto ATB	11	1							12	8
Kontaminace								21	15	

Použité zkratky: SA: *S. aureus*; E.c. : *E. coli*; CNS: koaguláza negativní stafylokoky; G-: ostatní gram negativní (mimo *E. coli* a *Klebsiella* spp.); ATB: antibiotika (antimikrobika);

Závěr

Výsledky získané faremní kultivací potvrzují trend změny výskytu jednotlivých původců mastitid. Ve studii nebyly zachyceny CAMP pozitivní kmeny *Streptococcus uberis*. Využitím faremní kultivace došlo k významnému snížení spotřeby antimikrobik při léčbě klinických i subklinických mastitid. Cílená léčba přináší vysokou míru efektivity jak na klinické, tak na bakteriologické úrovni.

Seznam literatury:

Ruegg P. (2018): Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis. *Vet. Clin. Food Anim.*: 34, 413 – 425.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 117/2019/FVL

Identifikace a genomická charakterizace kmenů kaliciviru koček

Dana Lobová¹, Jana Mariánková¹

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

Úvod

Felinní kalicivirus (FCV) je jedním z významných virových původců onemocnění horních dýchacích cest koček. Hlavní symptomy onemocnění zahrnují ulceraci sliznice dutiny ústní a zánět v orofaryngeální oblasti. Onemocnění je často provázeno rinitidou a konjunktivitidou.¹ Kalicivirus koček je malý, neobalený sférický virus patřící do čeledi *Caliciviridae*, rod *Vesivirus*. Jeho malý genom obsahující ssRNA zajišťuje viru vysokou adaptabilitu a variabilitu pod selektivním tlakem imunitního systému hostitele, čímž vznikají nové antigenní varianty viru². Vakcinační kmeny, které jsou součástí komerčně dostupných vakcín, poskytují zvířatům pouze částečnou ochranu a bohužel se některé patogenní kmeny liší od vakcinačních. Sekvenování genomu viru a evidence kmenů cirkulujících v populaci koček v určité oblasti (Morava) by mohlo být výrazným benefitem pro přípravu vakcíny obsahující více aktuálních vakcinačních kmenů. Tím by se výrazně zvýšila její účinnost v chovech koček³.

Naším cílem je identifikovat pozitivní izoláty kaliciviru molekulárními metodami i kultivací viru na buněčné kultuře a definovat kmeny kaliciviru na úrovni genomu za použití sekvenování jak kapsidového proteinu, tak celého genomu. Mapovat rozdílnost individuálních izolátů FCV v populaci koček a výsledky studie porovnat s evropskými kmeny.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky: Odběry suchých stěrů horních dýchacích cest, nejlépe stěry orofaryngeální a stěry z bukální sliznice a dásní, byly získávány od koček pacientů KCHMZ Brno, pacientů soukromé veterinární ambulance v Brně a z několika moravských domácích chovů. Vzorky pocházely od zvířat s klinickými příznaky. V období trvání projektu se vyšetřil soubor 292 zvířat. Vzorky byly transportovány do klinické mikrobiologické laboratoře dle standardních teplotních podmínek (4°C) a uchovávány při teplotě -20°C.

Identifikace felinního kaliciviru (FCV): Z těchto vzorků byla izolována RNA pomocí extračního kitu NucleoSpin RNA. Základní screening směřující k průkazu FCV v těchto vzorcích byl proveden metodou nested RT-PCR a RT-qPCR.

Izolace viru: Stěry resuspendované ve fyziologickém roztoku od PCR pozitivních koček byly dále využity pro izolaci viru na buněčné linii kočičích ledvin CRFK a po 24h a 48h analyzovány.

Sekvenování: Namnožené pozitivní izoláty viru byly následně znovu podrobeny RT-qPCR a RNA byla transkribována do cDNA podoby kitem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Dále byla provedena analýza kapsidového proteinu (4048 bp) metodou PCR, výsledné pozitivní úseky byly sekvenovány v Macrogen, Amsterdam a similarita kmenů porovnána s izoláty ve světě (GenBank databáze). Z těchto pozitivních nálezů bylo vybráno 5 kandidátů (pozitivních izolátů) vhodných pro analýzu NGS.

Výsledky

V naší studii byla vytvořena kolekce 292 vzorků suchých tamponových stěrů z orofaryngu nebo postižené dásně. Metodami RT nested PCR a qPCR byla identifikována RNA u 37 (12.7%) koček. U 33 vyšetřovaných koček byla popsána klinická anamnéza typická pro kalicivirus, jako jsou stomatitida, eroze na bukalní sliznici, zduření a zarudnutí dásní, inapetence a respirační syndrom. Čtyři pozitivní kočky byly bez klinických příznaků, avšak u dvou koček byl diagnostikován pouze slabě pozitivní výsledek vyšetření. Při porovnání výskytu mezi pohlavím ($p = 0,836$) i mezi věkovými kategoriemi zvířat (mladší než 1 rok, 1-3 roky, starší 3 let) ($p = 0.5207$) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0.05$). Při porovnání výskytu FCV u koček různých chovů (indoor, outdoor, útulek) byl detekován vysoce významný statistický rozdíl mezi indoor kočkami a kočkami z útulku ($p = 0.001$).

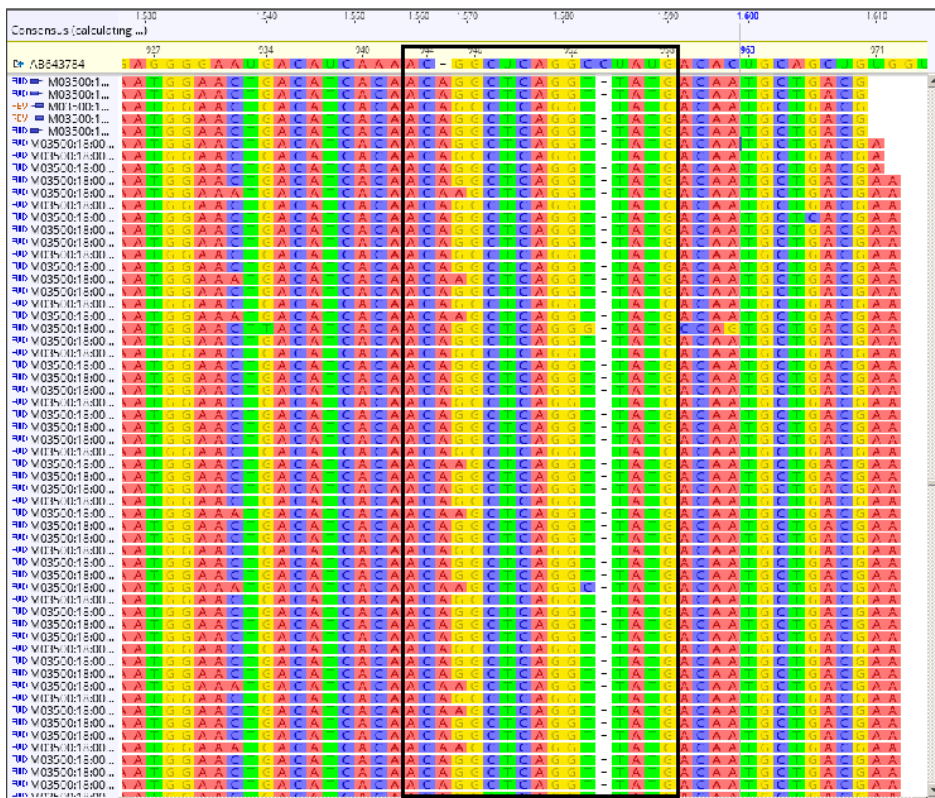
Celkem patnácti pozitivními izoláty ve formě suspenzí byly infikovány buněčné monolayerové linie Crandell-Rees feline kidney a byl detekován výrazný cytopatický efekt za 24 nebo 48 hodin po inokulaci virem. Konfirmaci vzorků sekvenováním a porovnáním s databází Gen Bank byla potvrzena přítomnost felinního kaliciviru. Bylo provedeno NGS sekvenování pěti vybraných kandidátů. Sekvence jednoho terénního izolátu z Jižní Moravy (Holubice) byly analyzovány a porovnány s vakcinačním kmenem F9 programem Geneious. Zjistili jsme minimálně jeden lokus, ve kterém se tyto dva kmény od sebe liší. Vakcinační kmen F9 se liší v sekvenci aminokyselin v pozici 944-958, jedná se o pozici v sekvenci AB643784 F9 dle databáze GenBank.

Celkový počet vyšetřených koček		
Celkový počet vyšetřených koček	292	
Počet pozitivních z celkového počtu	37 (12,7%)	
Porovnání výskytu FCV mezi pohlavími	Pozitivní	Negativní
Samice/celkový počet vyšetřených= 157	21 (13%)	136
Samci/celkový počet vyšetřených=135	16 (12%)	119
Porovnání výskytu FCV mezi jednotlivými věkovými kategoriemi	Pozitivní	Negativní
Mladší než 1 rok/Vyšetř.73	12 (16,4%)	61
1-3 roky/vyšetř.100	12 (12%)	88
Starší než 3 roky/vyšetř. 119	13 (11 %)	106
Porovnání výskytu FCV podle způsobu chovu	Pozitivní	Negativní
Indoor/vyšetř. 167	16 (9.5%)	151
Outdoor/ vyšetř. 100	12 (12 %)	88
Útulek/vyšetř. 25	9 (36 %)	16

Tabulka 1: Výsledky vyšetření



Obrázek 1: Terénní kmen Holubice, parciální PCR



Obrázek 2: Porovnání nukleotidových sekvencí vakcinačního kmene F9 s terénním kmenem Holubice. NGS sekvenování

Závěr

Naším cílem bylo zavést metody komplexní laboratorní diagnostiky FCV a zařadit je do běžné laboratorní praxe. Byly testovány stěry koček různých kategorií a sledována incidence výše zmíněných patogenů v ČR. Z obrázku č. 2 jsou patrné rozdíly v nukleotidových sekvencích terénního kmenu Holubice v porovnání s vakcinačním kmenem F9, ostatní čtyři terénní kmény analyzované v oblasti kapsidového genu NGS sekvenováním jsou nyní ve fázi analytického zpracování.

Seznam literatury:

1. GASKELL R.M., RADFORD A.D., DAWSON S. 2004: Feline infectious respiratory disease. In: Chandler E.A., Gaskell C.J., Gaskell R.M. *Feline Medicine and Therapeutics* third ed. Blackwell Publishing, Oxford, s. 577-595.
2. RADFORD A.D., COYNE K.P., DAWSON S., PORTER C.J., GASKELL R.M. 2007: Feline calicivirus, *Vet. Res.* 38, s. 319-335.
3. OSSIBOFF R.J, SHEH A., SHOTTON J., PESAVENTO P.A, PARKER J.S. 2007: Feline caliciviruses (FCVs) isolated from cats with virulent systemic disease possess in vitro phenotypes distinct from those of other FCV isolates. *J. Gen. Virol.*, 88, s. 506–517.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 121/2019/FVL

Identifikace kandidátních polymorfních markerů asociovaných s persistencí viru FCoV

v trusu koček

Jana Bubeníková¹, Jana Vrábelová², Petra Černá³, Dana Lobová², Martin Plášil¹, Karla Stejskalová¹

Ján Futas¹, Petr Hořín¹

Ústav genetiky¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie², Klinika chorob psů a koček³

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

FCoV je virus z čeledi *Coronaviridae* napadající kočkovité šelmy. Forma FCoV označovaná FECV se nachází ve střevě a způsobuje pouze mírně probíhající onemocnění trávicího traktu. FECV se v chovech s vysokou koncentrací koček vyskytuje až u 90% z nich. V organismu infikovaných koček může v důsledku mutací vzniknout forma FIPV, která je původcem fatálního onemocnění felinní infekční peritonitidy (FIP)¹. Ve vztahu k účinkům FECV na organismus je pozorována značná individuální variabilita. Malá část koček je odolných k FECV a infekce se u nich nerozvine. Nejvyšší procento jedinců jsou transientní nosiči bez klinických příznaků infekce. Ti jsou vnímaví k nakažení virem FECV, avšak efektivními obrannými mechanismy ho ze svého organismu eliminují. Poslední skupina koček pak zůstává dlouhodobě infikovaných, virus FECV vylučují trusem a šíří ho do prostředí. Tito persistentní vylučovatelé viru představují nejrizikovější skupinu pro vznik mutací generujících FIPV, protože riziko vzniku mutace roste s dobou persistence v organismu. Prvním cílem projektu proto bylo pomocí virologických metod vypracovat postup identifikace rizikových jedinců dlouhodobě vylučujících virus.

Persistenci FECV v organismu ovlivňují faktory prostředí, hostitele i původce. U hostitele jsou důležitými faktory výkonnost imunitního systému, stáří, plemeno a genetické založení. V tomto kontextu bylo identifikováno několik kandidátních genů pro vnímavost k FIP^{2,3}, avšak o genetické predispozici k nosičství viru nejsou žádné informace. Druhým cílem projektu tedy bylo navrhnout soubor polymorfních molekulárních markerů využitelných pomocí asociačních analýz k určení jedinců geneticky predisponovaných k persistentnímu vylučování FCoV v trusu.

Materiál a metodika

Odběry trusu a krve

Vzorky trusu byly sbírány ve spolupráci se soukromými chovateli koček z různých krajů v ČR. Každý chovatel podepsal informovaný souhlas s účastí v projektu a provedl dle připravené Metodologie pro chovatele odběr trusu do předem rozeslaných zkumavek. Pro delší uchování vzorků byl použit 1 ml stabilizátoru RNA- RNA later (Sigma) ve sterilní zkumavce. Vzorky byly uchovány v lednici do doby transportu do virologické laboratoře. Byly provedeny tři odběry vzorků ve dvouměsíční periodě. 1. odběr probíhal postupně duben - červen, 2. odběr červen -září, 3. odběr září- listopad. Vzorky krve o objemu 1-3 ml byly odebrány do sterilních zkumavek s EDTA na Klinice chorob psů a koček na VFU nebo soukromými veterinárními lékaři chovatelů.

Virologické vyšetření. Byla provedena izolace RNA z trusu komerčním kitem NucleoSpin® RNA Stool (Macherey Nagel), přepis RNA do cDNA kitem Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) a průkaz virové RNA metodou nested RT -PCR a qPCR. V prvním kole byly souběžně využity obě analýzy, ve druhém a třetím odběru byla použita qPCR. Navržení a optimalizace qPCR bylo rovněž součástí tohoto projektu. Výsledky byly zaznamenány elektronicky a dále statisticky vyhodnoceny.

Genetické vyšetření. Ze vzorků periferní krve byla pomocí kitu NucleoSpin® Blood (Macherey Nagel) izolována genomická DNA. Jako kandidátní geny byly zvoleny geny s předpokládaným vztahem k dlouhodobému nosičství koronavirů. Byly navrženy primery pro PCR, jednotlivé geny byly amplifikovány a amplikony sekvenovány na NGS sekvenátoru Illumina Miseq. Získaná NGS data byla zpracována standardními bioinformatickými metodami a využita k detekci polymorfismů v kandidátních genech.

Výsledky

Virologické vyšetření. Projektu se účastnilo 24 chovatelů vlastních ve většině případů čistokrevné kočky 14 plemen. Všichni jedinci pocházeli z domácností s více kočkami, případně byly dříve prokazatelně v kontaktu s jinými jedinci. Celkový počet koček vstupujících do studie byl 77, přičemž jedna kočka byla vyřazena po prvním odběru z důvodu úhynu na následky brániční kýly, druhá uhynula po druhém odběru trusu po komplikacích spojených s odběrem krve. Další čtyři kočky přestaly být sledovány po druhém odběru z důvodu ukončení spolupráce majitelů. Virologicky bylo vyšetřeno celkem 227 vzorků trusu, výsledky **jsou shrnuty v následujících tabulkách.**

Tab. 1. Vylučování FCoV v jednotlivých odběrech

Virologický status	Den 0	2 měsíce	4 měsíce
FCoV pozitivní	40	52	54
FCoV negativní	35	23	15
Prevalence vylučování FCoV (%)	53,3	69,3	78,3

Tab. 2. Dynamika vylučování FCoV v průběhu studie

Negativní ve všech odběrech	20
Negativní -> pozitivní	8
Pozitivní -> negativní	15
Pozitivní ve všech odběrech	29
Negativní -> pozitivní -> negativní	3

Genetické vyšetření. Pro účely genetického vyšetření byl sestaven základní panel 61 koček různého původu, určený k identifikaci polymorfních markerů ve vybraných genech a sloužící jako podklad pro rozhodnutí o využitelnosti k navazujícím asociačním studiím. Spolu se skupinou koček podrobených virologickému sledování taky byla extrahována a vyšetřena DNA z celkem 132 vzorků periferní krve. Na základě *in silico* analýzy bylo vybráno 9 kandidátních genů, konkrétně MHC třídy I (FLAI-K), MHC třídy II (DRA a DRB), geny receptorů NK buněk (NCR1, NCR2, NCR3) a další geny související s mechanismy přirozené obrany proti virové infekci (IFNB, IFNL, IFNLR). Dosažené výsledky genetických analýz vyjadřují níže uvedené tabulky.

Tab. 3. Kandidátní geny a zjištěné polymorfismy

GEN			DÉLKA	POČET SNP
název	symbol	funkce		
INTERFERON LAMBDA 1	<i>IFNL1</i>	cytokin, přirozená imunita proti virům	14 092 bp	145
INTERFERON LAMBDA RECEPTOR 1	<i>IFNLR1</i>	receptor pro IFNL	9 664 bp	88
INTERFERON BETA 1	<i>IFNB1</i>	cytokin, přirozená imunita proti virům	2095 bp	20
NATURAL CYTOTOXICITY TRIGGERING RECEPTOR 1	<i>NCR1</i>	receptor NK buněk	3839 bp	28
NATURAL CYTOTOXICITY TRIGGERING RECEPTOR 2	<i>NCR2</i>	receptor NK buněk	9640 bp	122
NATURAL CYTOTOXICITY TRIGGERING RECEPTOR 3	<i>NCR3</i>	receptor NK buněk	5606 bp	20
MHC CLASS II ANTIGEN DRA	<i>DRA</i>	prezentace antigenů	5100 bp	8 v CDS (0 v exonu 2)
MHC CLASS II ANTIGEN DRB	<i>DRB</i>	prezentace antigenů	1505 bp	V procesu bioinformatické analýzy
MHC CLASS I ANTIGEN ALPHA CHAIN	<i>FLAI-K</i>	Prezentace antigenů	1504 bp	V procesu bioinformatické analýzy
Použité zkratky:				
NK - natural killer bp - base pairs SNP - single nucleotide polymorphism CDS - coding sequence				

Pro tyto kandidátní geny byla provedena amplifikace a sekvenování také u souboru koček již podrobených virologickému vyšetření s charakterizovanými fenotypy nositelství koronavirů. Nyní probíhá bioinformatická analýza dat.

Závěr

Výsledky virologických vyšetření poskytly důležité informace o dynamice vylučování FCoV. Byly zjištěny značné odlišnosti od údajů uváděných literaturou vylučování FECV se zdá v podmínkách naší studie mnohem delší. S cílem plně postihnout variabilitu potřebnou pro následné asociační analýzy byl proto další odběr odložen o tři měsíce, což umožní spolehlivě identifikovat dlouhodobé vylučovatele.

Ve studovaných genech byl prokázán dostatečný polymorfismus v podobě desítek jednonukleotidových polymorfismů SNP. Nalezené markery jsou využitelné jako nástroje k hledání asociací mezi nosičstvím a genetickým založením koček.

Výsledky budou využity k asociačním analýzám s cílem přispět k pochopení patogeneze infekce FIP, k definici preventivních opatření v chovech, k vyhledávání chovatelsky rizikových zvířat a potenciálně i k designu diagnostického testu určujícího vnímavost jedinců k infekci FCoV.

Seznam literatury:

1. TEKES, G., THIEL, H.- J. Feline Coronaviruses: Pathogenesis of Feline Infectious Peritonitis. *Advances in virus research*. 2016, **96**, 193-218. DOI: 10.1016/bs.aivir.2016.08.002.
2. WANG et al.: Polymorphisms in the feline TNFA and CD209 genes are associated with the outcome of feline coronavirus infection. *Veterinary Research*. 2014, **45**(1), 123. DOI: 10.1186/s13567-014-0123-6.
3. GOLOVKO et al.: Genetic susceptibility to feline infectious peritonitis in Birman cats. *Virus Res*. 2013;**175**(1):58-63. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.04.006.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 150/2019/FVL

Porovnání výsledků mikrobiologické kultivace a PCR detekce patogenů v tělních tekutinách septických hřibat

MVDr. Katarína Tóthová, MVDr. Olga Dobešová, MVC Tereza Poláková

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Neonatální seps je jednou z hlavních příčin morbidity a mortality novorozených hřibat. Rychlé a přesné stanovení původce onemocnění a možnost cílené antibiotické terapie výrazně zvyšuje pravděpodobnost rychlého a úspěšného zvládnutí septického stavu. Mikrobiologická kultivace patogenů z krve hřiběte je dodnes považována za zlatý standard pro stanovení definitivní diagnózy neonatální seps. Podstatnou nevýhodou této metody je však její časové prodlení, neboť výsledky hemokultivace bývají dostupné minimálně za 5 dní od doručení vzorku do laboratoře a antibiotická terapie je proto u kritických pacientů pouze empirická, nikoliv kauzální. PCR detekce patogenů je rychlá a vysoce senzitivní metoda a výsledky jsou dostupné od 6 do 24 hodin po doručení vzorků do laboratoře.

Septická artritida vzniká u septických hřibat hematogenním rozsevem z primárního místa infekce. Z důvodu rychlé destrukce struktur postiženého kloubu (kloubní chrupavky, kostní podklad) je pro záchranu kloubu kriticky důležitý výplach kloubu se současnou agresivní antibiotickou terapií ideálně založenou na detekci kauzálního agens. Kromě časové náročnosti je však u mikrobiologické kultivace patogenů ze synoviální tekutiny známá její nízká senzitivita. Falešně negativní výsledek je získán u 20 až 70 % vzorků. Vyšší záchyt patogenů je popisován při odběru synoviální membrány/ fibrinu z postiženého kloubu. Vlastní získání vzorků je ale u neonatálních hřibat obtížné, neboť fibrin se prostou punkcí kloubu jehlou nemusí získat a k odběru synoviální membrány je nutno podrobit pacienta artroskopické revizi kloubu, k čemuž není majitel hřiběte vždy svolný. Naproti tomu je PCR detekce patogenů v synoviální tekutině diagnosticky citlivější metodou, která je prováděna s úspěchem u lidí a u psů.

Cílem projektu bylo porovnat spektrum patogenů zachycených metodou mikrobiologické kultivace a kvantitativní PCR detekce v synoviální tekutině a krvi u hřibat trpících neonatální sepsí a/nebo jejich následků. Projekt se skládal ze dvou dílčích cílů:

1. Vyhodnotit rozdíly hemokultivace a PCR detekce patogenů v krvi hřibat s neonatální sepsí.

2. Vyhodnotit rozdíly výsledků kultivace a PCR detekce v synoviální tekutině u hřibat trpících septickou artritidou.

Materiál a metodika

Řešitelský tým vyšetřil 46 hřibat mladších třiceti dní, přijatých na Kliniku chorob koní Brno, nebo Veterinární kliniku Heřmanův Městec. U všech hřibat byla odebrána detailní anamnéza. Hřibata s podezřením na neonatální sepsi byla dále klinicky, paraklinicky a laboratorně vyšetřena (hematologie, biochemie, hladina imunoglobulinů G). Na základě výsledků vyšetření byla hřiběti přidělena hodnota septického skóre dle modifikovaného systému hodnocení dle Wonga et al. (2018). Do studie byla zahrnuta hřibata s výsledkem septického skóre nad 10 bodů a dále hřibata kulhající, nebo s otokem končetinových kloubů netraumatického původu. U těchto hřibat bylo z *v. jugularis* nebo *v. cephalica* sterilně odebráno 20 ml krve pro hemokultivaci a PCR pandetekci patogenů. 10 ml krve na hemokultivaci bylo umístěno do kultivačního média pro aeroby a anaeroby a posléze bylo vyšetřeno ve veterinární laboratoři Laboklin GMBH Co.&KG, kde dle standartních laboratorních metod probíhala izolace bakterií, jejich identifikace a kvantifikace. Vzorek plné krve pro detekci PCR byl vyšetřen v Tilia Laboratories s.r.o. Odebraný biologický materiál zde byl převeden do objemu 1 ml, ze kterého byla následně izolována celková nukleová kyselina. Byla provedena PCR amplifikace 16S rDNA s následným přímým sekvenováním PCR produktů na kapilárním sekvenátoru ABI3500. Technologie neměla žádný detekční limit – stanovení bylo pouze kvalitativní.

U hřibat s otokem kloubu / kloubů byl sterilně perkutánní aseptickou punkcí odebrán vzorek synoviální tekutiny (2-10 ml, dle velikosti kloubu). Vzorek synovie pro mikrobiologickou kultivaci i PCR detekci byl uchován ve sterilní zkumavce. Kultivace byla provedena v laboratoři Laboklin, PCR detekce poté v laboratoři Tilia Laboratories s.r.o.

V případě záchytu bakterií metodou hemokultivace / kultivace synovie byl stanoven antibiogram.

Výsledky:

Na Klinice chorob koní a Veterinární klinice Heřmanův Městec bylo celkem vyšetřeno 16 hřibat s klinickými příznaky akutně probíhající sepse, z toho 9 (56,5 %) hřibat vykazující příznaky artritidy /synovitidy následkem hematologického rozsevu infekce. U těchto hřibat bylo odebráno celkem 16 vzorků krve na hemokultivaci a dále stanovení kauzálního patogena pomocí kvalitativní PCR pandetekce. U devíti hřibat s podezřením na septickou artritidu/ synovitidu byla provedena kultivace a PCR pandetekce synovie získané aseptickou synoviocentézou postiženého kloubu/kloubů..

Pozitivní výsledky hemokultivace byly získány u 5/15 hříbat (33%) Pozitivní výsledek PCR pandetekce byl zjištěn u třech pacientů. Shodně negativní výsledky hemokultivace a PCR pandetekce byl zjištěn u devíti pacientů (Tab 1).

Metodou mikrobiologické kultivace byly detekované bakterie pouze ve 3/8 vzorcích synoviální tekutiny. PCR pandetekce odhalila původce onemocnění u 6/8 suspektně infikovaných kloubů (Tab 2).

Tab. 1: Pozitivní výsledky hemokultivace / PCR pandetekce krve vyšetřených septických hříbat

pacient	hemokultivace	PCR pandetekce	Poznámky
2019/392	<i>Strept. equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>Strept. equi subsp. zooepidemicus</i>	
2019/365	<i>Enterococcus mundti</i>	negativní	
2019/242	negativní	<i>E.coli</i> , EHV 1	Kultivace:hluboký nosní výtěr: <i>E.coli</i>
190451	<i>E. coli</i>	negativní	
190378	<i>Staphylococcus vitulinus</i> , <i>Actinobacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium glutamicum</i>	<i>E.coli</i>	
190374	<i>E.coli</i>	negativní	

Tab. 2: Pozitivní výsledky kultivace / PCR pandetekce vzorků synovie hříbat se septickou artritidou

pacient	kultivace synovie	PCR pandetekce
190378	<i>Actinobacillus sp.</i>	<i>Actinobacillus equuli</i>
2019/392	<i>Strept. equi subsp. zooepidemicus</i>	<i>Strept. equi subsp. zooepidemicus</i>
2019/470	beta-hemolytické streptokoky	<i>Actinobacillus equuli</i>
2019/396	negativní	EVA (equinní virová arteritida)
190451	negativní	<i>Actinobacillus equuli</i>
2019/452	negativní	<i>Cutibacterium acnes</i>

Závěr:

Použití molekulárně-biologických metod pro diagnostiku původce sepsí je v posledních letech věnována velká pozornost především kvůli předpokladu vysoké citlivosti, specificity a možnosti určit konkrétní patogen v relativně krátkém čase. PCR detekce patogenů z krve septických pacientů není prozatím ani v humánní medicíně zcela standardizována a existuje značné množství detekčních metodik. Z výsledků naší studie vyplývá, že PCR amplifikace 16S rDNA je schopná detekovat bakterie přímo z krve nebo synovie bez předchozího pomnožení v kultivačním médiu. Citlivost záchytu bakterií v synoviální tekutině se jeví výrazně vyšší než u mikrobiologické kultivace. Pro

zhodnocení skutečné relevantnosti výsledků této metodiky bude potřeba vyšetřit větší soubor pacientů.

Seznam literatury:

1. *Morgenstern, C., Renz, N., Cabric, S., Perka, C., & Trampuz, A. (2018). Multiplex polymerase chain reaction and microcalorimetry in synovial fluid: can pathogen-based detection assays improve the diagnosis of septic arthritis?. The Journal of rheumatology, 45(11), 1588-1593.*
2. *Scharf, V. F., Lewis, D. D., Wellehan, J. F., Wamsley, H. L., & Richardson, R. (2015). Comparison of synovial fluid culture and 16S rRNA PCR in dogs with suspected septic arthritis. Australian veterinary journal, 93(6), 204-207.*
3. *Fenollar, F., Roux, V., Stein, A., Drancourt, M. and Raoult, D., 2006. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. Journal of clinical microbiology, 44(3), 1018-1028.*
4. *Wong, D.M., Ruby, R.E., Dembek, K.A., Barr, B.S., Reuss, S.M., Magdesian, K.G., Olsen, E., Burns, T., Slovis, N.M. and Wilkins, P.A., 2018. Evaluation of updated sepsis scoring systems and systemic inflammatory response syndrome criteria and their association with sepsis in equine neonates. Journal of Veterinary Internal Medicine, 32(3), pp.1185-1193.*
5. *Hytychová, T. and Bezděková, B., 2015. Retrospective evaluation of blood culture isolates and sepsis survival rate in foals in the Czech Republic: 50 cases (2011–2013). Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 25(5), pp.660-666.*
6. *Ginn, A.N., Halliday, C.L., Douglas, A.P. and Chen, S.C., 2017. PCR-based tests for the early diagnosis of sepsis. Where do we stand?. Current opinion in infectious diseases, 30(6), pp.565-572.*

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 109/2019/FVL

Prevalence equinního sarkoidu v České republice a zavedení nových laboratorních metod pro jeho diagnostiku

Petr Jahn, Andrea Kopecká

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

Úvod

Equinní sarkoid je lokálně agresivní fibroblastický kožní tumor a nejčastější tumor koní s celosvětovým výskytem (Regland et al. 1966, Marti et al. 1993), který může nepříznivě ovlivňovat hodnotu koně, často znemožňuje jeho využití a v krajním případě může být důvodem eutanázie. Z těchto důvodů je equinnímu sarkoidu celosvětově věnována pozornost (Scott et al. 2011, Torrontegui a Reid, 1994, Knottenbelt et al. 2015). Diagnostika equinního sarkoidu je dnes založena na klinickém posouzení kožních změn (Haspesslagh et al. 2018), případně kožní biopsii. Klinická diagnostika je často nespolehlivá a kožní biopsie je spojena s rizikem nekontrolované proliferace nádoru (Knottenbelt et al. 2015). Z tohoto důvodu jsou hledány spolehlivé a neinvazivní metody, které by mohly doplnit stávající diagnostické možnosti.

V předchozích dvou letech byla v rámci projektu IGA provedena studie, při níž bylo klinicky vyšetřeno 1107 koní pro orientační posouzení výskytu equinního sarkoidu v ČR. U klinicky pozitivních nebo suspektních případů bylo provedeno real-time PCR vyšetření pro stanovení bovinního papilomaviru (BPV) a jeho typizaci (Taylor et al. 2013, Knottenbelt et al. 2015).

Pro průkaz protilátek proti nádorovému onkoproteinu E5 byl vytvořen ELISA test. Teno onkoprotein je typem transmembránového proteinu II, který je exprimován v hlubších epiteliálních vrstvách infikované tkáně (Burnett et al. 1992, Venuti a Campo 2002) a převážně lokalizován v membránách endoplazmatického retikula a Golgiho komplexu (Burkhardt et al. 1989, Pennie et al. 1993). BPV E5 je exprimován v cytoplazmě transformovaných bazálních a suprabazálních epiteliálních buněk (Bohl et al. 2001, Araibi et al. 2004). Expresí tohoto onkoproteinu spolu s expresí vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, která vede k neovaskularizaci pro nutriční zajištění tumoru nás vedly k úvaze, že v organismu mohou být přítomny protilátky proti E5 onkoproteinu, které by bylo možno využít pro diagnostiku (Borzacchiello et al. 2008, Martano et al. 2018).

V návaznosti na předchozí projekty byly stanoveny cíle práce:

1. Rozšířit databázi koní pro studium prevalence equinního sarkoidu v České republice,

2. zhodnotit rizikové faktory jeho vývoje na základě porovnání laboratorních výsledků přítomnosti bovinního papilomaviru (BPV) s dalšími činiteli ovlivňujícími vnímavost k onemocnění,
3. získat materiál pro laboratorní průkaz BPV jako původce equinního sarkoidu,
4. u koní s klinickou diagnózou equinní sarkoid ověřit tvorbu specifických protilátek proti onkoproteinu E5 metodou ELISA.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Do studie byli zařazeni koně náhodně vybraní v různých stájích a dále pacienti Kliniky chorob koní VFU Brno. U majitelů jednotlivých koní byl získán souhlas s klinickým vyšetřením a případným odběrem materiálu od suspektních případů. U každého koně byly zaznamenány nacionále (jméno, plemenná příslušnost, pohlaví, věk, barva). Majitel koně, případně manažer stáje byl dotazován na přítomnost podezřelých kožních eflorescencí. Poté bylo provedeno klinické dermatologické vyšetření celého povrchu těla a hlavně predilekčních míst (hlava, krk, ventrální strana hrudníku a břicha, okolí genitálií, případně oblast se starším poraněním). U koní s klinickou diagnózou sarkoid nebo suspektní sarkoid byla zaznamenána lokalizace, typ a počet lézí. Byla pořízena fotodokumentace lézí a byly odebrány vzorky (suché kožní stěry z míst lézí, dvě zkumavky srážlivé krve pro získání séra a jedna zkumavka s obsahem EDTA). U vybraných koní byly odebrány i vzorky z intaktní kůže.

Kromě klinicky pozitivních koní byla vytvořena kontrolní skupina koní bez klinického nálezu equinního sarkoidu nebo suspektního equinního sarkoidu. U koní této skupiny byly odebrány vzorky plné krve (zkumavka s obsahem EDTA) a u části z nich kožní stěry z predilekčních míst pro equinní sarkoid.

Naplněná zkumavka s obsahem EDTA a kožní stěr byly nejpozději do 10 hodin zmrazeny a uchovány při teplotě -80°C . Srážlivá krev byla ponechána ve zkumavce přes noc v laboratorní teplotě. Druhý den byla krev centrifugována a separované sérum zmrazeno na -80°C .

PCR test

Z odebraných stěrů byly izolovány nukleové kyseliny DNA a RNA. Z nich byla provedena real-time PCR (v oblasti onkogenů) na průkaz DNA viru za pomoci interkalační barvy SYBR Green, která umožňuje po analýze křivky tání odlišit eventuální variabilitu kmenů viru. Zároveň byl každý vzorek podroben real-time PCR na přítomnost buněčné DNA (gen SDHA) pro kontrolu dostatečného množství setřeného buněčného materiálu. Výsledky vyšetření real-time PCR na BPV DNA u skupiny koní s klinickým nálezem equinní sarkoid a klinicky negativních koní byly staticky vyhodnoceny X^2 testem.

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

ELISA

Ke zjištění imunologického markeru byla využita reakce případných protilátek v krevním séru s funkčním onkoproteinem E5, který se objevuje během raných stádií proliferace tumoru jako potenciální antigen. Vzorky séra pozitivního koně (koně s klinickou diagnózou equinní sarkoid) a negativní kontroly (čtyřletý kůň bez klinických příznaků equinního sarkoidu, který nebyl v kontaktu s koňmi s equinním sarkoidem) byly testovány metodou ELISA na přítomnost protilátek proti dvěma hypoteticky imunogenním částem komerčně dodaného onkoproteinu E5 (N-terminální a C-terminální oligopeptid). Pro oba peptidy byla využita metoda boxové titrace, přičemž séra pozitivního a negativního koně byla ředěna 1:50 a 1:100 a reagovala s antigenem v množství 1 nebo 2 μg v jamce. Celá reakce byla blokována 0,5% nebo 2% roztokem mléka v PBS za použití standardních teplot a časů v inkubaci.

Genetické vyšetření

Společně s ústavem genetiky byl navržen model sestávající se ze 145 koní tří plemenných skupin - Anglický plnokrevník, Český teplokrevník + Hannoverský kůň (dále Teplokrevníci), Arabský plnokrevník + Shagya arab. Do každé ze skupin bylo zařazeno 15 koní s klinickou diagnózou equinní sarkoid a 30 kontrolních koní.

U všech koní s klinickou diagnózou equinní sarkoid bylo provedeno real-time PCR vyšetření na přítomnost BPV a podmínkou pro zařazení do skupiny byl pozitivní výsledek. Podmínkou pro

zařazení do skupiny kontrolních koní byla nepřítomnost equinního sarkoidu a zároveň ustájení v kontaktu s koňmi, u kterých byla vyslovena diagnóza equinní sarkoid.

U 16 ze 30 kontrolních koní ve skupině teplokrevníci a u 19 kontrolních koní ve skupině angličtí plnokrevníci byl taktéž proveden stěr suchým tamponem z predilekčních míst pro equinní sarkoid a tyto vzorky byly vyšetřeny v laboratoři na přítomnost BPV metodou real-time PCR.

Ze vzorků periferní krve od koní se sarkoidem a od kontrolních negativních koní byla extrahována DNA, která bude využita ke genotypizaci polymorfních markerů genů MHC a NKR. Získané genotypy budou využity k asociačním analýzám.

Výsledky

Databáze koní klinicky vyšetřených na přítomnost equinního sarkoidu, která byla vytvořena v rámci projektu IGA 2018, byla rozšířena o 241 zvířat na celkový počet 1348. U 112 koní z tohoto souboru byla stanovena klinická diagnóza equinní sarkoid, u 19 klinická diagnóza suspektní equinní sarkoid. Z 241 koní nově zařazených do studie byla stanovena klinická diagnóza equinní sarkoid u 31 koní.

Počty koní a vzorků s výsledky průkazu BPV DNA uvádí Tab. 1. Shoda výsledku klinického a laboratorního průkazu BPV DNA byla statisticky vysoce významná ($p < 0,0001$). Výsledky stanovení BPV mRNA jsou uvedeny v Tab. 2.

Metodou ELISA byla zjištěna přítomnost protilátek proti C-terminálnímu peptidu onkoproteinu E5 u koně s chronickým equinním sarkoidem a prokázanou infekcí BPV. Protilátky proti tomuto antigenu nebyly zjištěny u negativní kontroly. U obou koní nebyla zjištěna rozdílná reaktivita proti N-terminálnímu peptidu onkoproteinu E5. Stanovení protilátek proti C-terminálnímu peptidu onkoproteinu E5 bude následně provedeno u ostatních koní s klinickou diagnózou sarkoid nebo suspektní sarkoid z vyšetřovaného souboru.

Výsledky genetického vyšetření pro stanovení predispozice v současné době ještě nejsou k dispozici, protože analýzy probíhají.

Získané výsledky považujeme za předběžné.

Tab. 1: Počty koní jednotlivých skupin a výsledky stanovení BPV DNA.

Klinická diagnóza	Počet koní	Výsledek BPV DNA real-time PCR	Počet vzorků
Equinní sarkoid	112	BPV DNA pozitivní	117
		BPV DNA negativní	2
Suspektní equinní sarkoid	19	BPV DNA pozitivní	8
		BPV DNA negativní	15
Equinní sarkoid, intaktní kůže		BPV DNA pozitivní	4
		BPV DNA negativní	3
Negativní kontrola	35	BPV DNA pozitivní	5
		BPV DNA negativní	30

Tab. 2: Výsledky stanovení BPV mRNA u koní s pozitivním a negativním nálezem BPV DNA.

Výsledek BPV DNA real-time PCR	Výsledek BPV mRNA real-time PCR	Počet vzorků
BPV DNA pozitivní	BPV mRNA pozitivní	66
	BPV mRNA negativní	62
BPV DNA negativní	BPV mRNA pozitivní	1
	BPV mRNA negativní	55

Seznam literatury:

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

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

Borzacchiello G., Russo V., Della Salda L., Roperto S and Roperto F., 2008. Expression of the platelet derived growth factor β receptor and bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in equine sarcoids. *J. Comp. Path.* 139: 231 - 237

- Burkhardt A., Willingham M., Gay C., Jeang K.T. and Schlegel R., 1989. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology*. 170: 334 – 339
- Burnett S., Jareborg N. and DiMaio D., 1992. Localization of bovine papillomavirus type I E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proceedings of the national academy of science of the USA*, 89: 5665 – 5669
- Haspeslagh, M., Gerber, V., Knottenbelt, D.C., Schüpbach, G., Martens, A. and Koch, C., 2018. The clinical diagnosis of equine sarcoids—Part 2: Assessment of case features typical of equine sarcoids and validation of a diagnostic protocol to guide equine clinicians in the diagnosis of equine sarcoids. *The Veterinary Journal*, 240, pp.14-18.
- Knottenbelt D. C., Patterson –Kate J. C., Snalune K. L. 2015. Sarcoids. In *Clinical Equine Oncology*. Elsevier. Pp 203 – 219.
- Martano M., Poer K., Redtucci B., Pagano I., Altamura G., Borzacchiello G. and Maiolino P., 2018. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in equine sarcoid. *BMC Vet. Research*, 14: 266
- Marti E., Lazary S., Antczak D.F. and Gerber H., 1993. Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine vet. J.* 25: 397 – 407.
- Pennie W.D., Grindlay G. J., Cairney M. and Campo M.S., 1993. Analysis of the transforming functions of bovine papillomavirus type 4. *Virology*, 193: 614 – 620.
- Regland W. L., Keown G.H. and Gorham J. R., 1966. An epizootic of equine sarcoid. *Nature* 210: 1399.
- Scott D.W. and Miller W. H. J., 2011. Neoplasms, Cysts, Hamartomas and Keratoses. In *Equine Dermatology*. Elsevier. Pp 479 – 488.
- Taylor S. and Haldorson G., 2013. A review of equine sarcoid. *Equine vet. Edu.* 25: 210 – 216.
- Torrontegui B. O. and Reid S.W.J., 1994. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet. Edu.* 6: 85 – 88.
- Venuti A. and Campo M.S., 2002. The E5 protein of papillomavirus. *Human Papillomavirus – perspectives in medical virology*, D. McCance Ed., Esevier Science B.V., Amsterdam, pp 143 - 164

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 107/2019/FVL

Prevalence výskytu dilatační kardiomyopatie u výmarských ohařů a jejich možné příčiny vzniku

Zita Filipejová¹, Dominik Procházka², Benicie Kosková¹

Oddělení vnitřních chorob, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Magisterský studijní program - 5. ročník (student), Fakulta veterinární hygieny, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Dilatační kardiomyopatie (DCM) je jedno z nejčastějších srdečních onemocnění psů, které je specifické zejména pro velká až obří plemena psů, jako jsou např. boxer, doberman, německá doga a další. Jedná se o onemocnění srdečního svalu charakterizované dilatací srdečních komor a systolickou a diastolickou dysfunkcí myokardu. Etiologie DCM je neznámá. Uvádí se široké spektrum možných příčin hypokineze srdečního svalu, jedná se zejména o genetické faktory, nutriční deficiencie, metabolické onemocnění, imunologické abnormality, infekční choroby, léky indukovaný vznik. Popisuje se také vliv hypotyreózy jako další z etiologických faktorů vzniku dilatační kardiomyopatie.⁵ Součástí kardiologického vyšetření je echokardiografické vyšetření, které nám dokáže odhalit výskyt případné DCM a okultní formu DCM.^{3,6} Neexistuje žádná studie o prevalenci DCM u výmarských ohařů (VO) a zjištění genetické příčiny. V dnešní době je znám gen pro rozvoj DCM pouze u dobermanů.²

Materiál a metodika

Do prospektivní studie byli zařazeni psi plemene výmarský ohař, kteří byli vyšetřeni na našem pracovišti. Všechna vyšetření a odběr krve byly provedeny u zvířat s písemným informovaným souhlasem majitelů. Všichni pacienti byli klinicky vyšetřeni a bylo provedeno elektrokardiografické vyšetření pomocí programu SEIVA EKG Praktik Veterinary a echokardiografické vyšetření na přístroji ALOKA 7 mikrokonvexní sondou 2,5 - 5 MHz. U pacientů s výskytem arytmií během EKG vyšetření se pokračovalo v Holterovském vyšetření. U všech pacientů byla odebrána krev z *v. jugularis externa*. Vzorek krve byl odeslán do laboratoře Genrex pro vývoj genetického testu DCM pro výmarské ohaře. RNDr. Jiří Černý, Ph.D, který spolupracuje s doc. Adam Boyka, Ph.D z Cornell University a prof. Laurie

Connell, Ph.D z University of Maine. *U všech nemocných a vybraných zdravých pacientů bylo provedeno kompletní hematologické a biochemické vyšetření krve (CB, albumin, urea, kreatinin, ALT, AST, ALP, GGT, bilirubin, glukóza, Na, K, P, Cl, Ca, Mg) v klinické laboratoři pro malá zvířata VFU Brno. Dále byly stanoveny hormony srdečního poškození a funkčnosti (Troponin I a NTproBNP), hormony štítné žlázy (T4, TSH) v laboratoři IDEXX.*

Výsledky

Do klinické studie bylo zařazeno celkově 130 psů a z toho 124 psů plemene výmarský ohař krátkosrstý (VOK) a 6 psů plemene výmarský ohař dlouhosrstý (VOD). Zastoupeno bylo 70 nekastrovaných samic, 53 nekastrovaných samců a 1 kastrovaný samec plemene VOK. Z plemene VOD byly zastoupeny 4 nekastrované samice a 2 nekastrovaní samci.

Průměrný věk pacientů byl 5,32 let (SD 2,50). Průměrná váha psů byla 34,24 kg (SD 4,26).

V souboru plemene VOK byla zjištěna prevalence: klinická DCM u 5 psů (4,03%), z toho byli zastoupeni 3 nekastrovaní psi, 1 kastrovaný pes a 1 nekastrovaná fena; preklinická forma DCM byla zjištěna u 11 psů (8,87%), z toho bylo zastoupeno 6 nekastrovaných psů a 5 nekastrovaných fen; arytmogenní forma DCM byla prokázána u 1 psa (nekastrovaný samec).

Během vyšetření byla nalezena i jiná srdeční onemocnění: dysplazie trikuspidální chlopně u 2 nekastrovaných fen (1,61%); degenerativní onemocnění mitrální chlopně u 1 nekastrovaného psa a 1 nekastrované feny (1,61%); PDA u 1 nekastrované feny (0,80%); dysplazie mitrální chlopně u 1 nekastrovaného psa (0,80%). U jedné nekastrované feny (0,80 %) byl zjištěn srdeční tumor.

Z celkového počtu 124 VOK bylo 100 zdravých jedinců (80,64%), z toho 59 nekastrovaných fen (47,58%) a 41 nekastrovaných psů (33,06%).

Ve skupině klinické DCM byla potvrzena hypotyreóza pouze u jednoho z nich (pes kastrovaný).

Celkový počet vyšetřených jedinců z plemene VOD bylo 6. V této skupině pacientů byla diagnostikována pouze jedna preklinická DCM u nekastrované feny (16,66%) a jedna arytmogenní forma DCM u nekastrované feny (16,66%). Ostatní jedinci, 2 nekastrované feny (33,33%) a 2 nekastrovaní psi (33,33%) byli zdraví. V této skupině pacientů nebyla zjištěna hypotyreóza u žádného jedince.

Závěr

Prevalence klinické DCM u výmarských ohařů vyšetřovaných na naší klinice byla zjištěna u 3,8% pacientů. U Dobrmanů je prevalence potvrzená u 58%.⁸ Věk, v kterém jsou pacienti vyšetřováni, je faktor ovlivňující výskyt DCM u Dobrmanů.⁹ Průměrný věk u našich pacientů byl 5,32 let (SD 2,50).

Dalším pokračováním je zjištění možného genu zodpovědného za DCM u tohoto plemene. V tento okamžik není gen zjištěn. Naším vyšetřením jsme zjistili 11 psů s preklinickou DCM. 7 psů s preklinickou DCM byli potomci 2 psů s klinickou DCM.

Potvrzením faktu, že plemeno výmarský ohař patří mezi predisponovaná plemena pro rozvoj DCM, bude nadále doporučeno preventivně vyšetřovat výmarské ohaře a snížit tak rizika náhlých úmrtí jedinců.¹ Dle dosažených výsledků je doporučováno vyšetřovat chovné jedince každý rok.

V naší studii jsme potvrdili, že srdeční markery mají důležitý prognostický význam. Pacienti s klinickou DCM, u nichž byla zjištěna elevace biomarkerů, měly výrazně horší prognózu a během třech měsíců došlo k jejich úhynu. Všichni pacienti s DCM měli zvýšené oba parametry (Troponin I a NTproBNP), hodnoty zdravých pacientů byly v normě. U pacientů s preklinickou DCM nebyl potvrzen diagnostický význam těchto biomarkerů. Z tohoto důvodu je důležité pokračování ve sledování těchto pacientů do budoucna a určení „cutt off value“ hodnot pro preklinickou DCM. U dobrmanů srdečný marker NTproBNP byl vyšší u pacientů s DCM, nebo u pacientů u kterých se v průběhu 1,5 roku vyvinula DCM. Senzitivita byla 90% a specificita 75%. Při echokardiografických změnách měl tento marker specificitu 90,4%.⁷ Troponin I má u dobrmanů senzitivitu 81,2 % a specificitu 73,2% pro diagnostiku okultní DCM.⁴ Opakovaným vyšetřením pacientů plemene výmarský ohař bychom mohli stanovit referenční echokardiografické hodnoty pro toto plemeno, které nebyly doposud publikovány.

Seznam literatury:

1. CALVERT, C. A., BROWN, J. Influence of antiarrhythmia therapy on survival times of 19 clinically healthy Doberman pinschers with dilated cardiomyopathy that experienced syncope, ventricular tachycardia, and sudden death. *J Am Anim Hosp Assoc* 2004, 40 (1):24-8
2. DOMANJKO, A.P., STABEJ, P., ZEMVA, A. Dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers: Survival, causes of death and a pedigree review in a related line. *J Vet Cardiology* 2002, 5: 17-24

3. DUKES-McEwan J., Proposed Guidelines for Diagnosis of Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. J Vet Cardiology 2003, 5(2):7
4. KLUSER L., MAIER ET., WESS G. Evaluation of a high-sensitivity cardiac troponin I assay compared to a first-generation cardiac troponin I assay in Doberman Pinschers with and without dilated cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2019, 33(1):54-63
5. TIDHOLM, A., HÄGGSTRÖM, J., BORGARELLI M., TARDUCCI, A. Canine Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. Part I: Aetiology, Clinical Characteristics, Epidemiology and Pathology. The Veterinary Journal 2001, 162:92-107
6. WESS, G., MAURER R., SIMAK J., HARTMANN K. Use of Simpson's method of disc to detect early echocardiographic changes in Doberman Pinchers with dilated cardiomyopathy. J Vet Intern Med 2010, 24(5):1069-76
7. WESS G., BUTZ V., MAHLING M., HARTMANN K. Evaluation of N-terminal pro B-type natriuretic peptide as a diagnostic marker of various stages of cardiomyopathy in Doberman Pinchers. J Am Vet Reseach 2011, 72(5):642-649
8. WESS G., DOMENCH, O., DUKES- MCEWAN, J., HÄGGSTRÖM, J., GORDON, S. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinchers. J Vet Cardiol 2017, 19 (5):405-415
9. WESS G., SCHULZE A., BUZT V., SIMAK J., KILLICH M., KELLER LJM., MAUERER J., HARTMANN K. Prevalence of Dilated Cardiomyopathy in Doberman Pinchers in Various Age Groups. J Vet Intern Med 2010, 24: 533-538

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 126/2019/FVL

Zhodnocení vybraných biochemických parametrů v peritoneální efuzi a krvi v souvislosti s postžením gastrointestinálního traktu

Lucie Urbanová¹, Ondrej Mišo¹, Andrea Nečasová¹

Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Existuje mnoho příčin vzniku peritoneální efuze. Porovnání hodnot biochemických parametrů v periferní krvi a peritoneální efuzi pomáhá určit důvod jejího vzniku. Příkladem je srovnání hodnot glukózy a laktátu při podezření na septickou peritonitidu, lipázy při podezření na pankreatitidu, nebo draslíku a kreatininu při podezření na rupturu močového měchýře či jiný důvod pro uroabdomen. V tomto případě se předpokládá vysoký rozdíl mezi hodnotami v efuzi oproti krvi, protože v moči je o mnoho vyšší hladina draslíku než v krvi.

V obsahu žaludku a střev člověka je hodnota draslíku vyšší než v krvi. Kazuistika psa se zvýšeným poměrem hladin draslíku v krvi a efuzi popisuje tento stav jako následek perforace žaludku. U psů a koček se zvýšeným obsahem draslíku v peritoneální efuzi je hlavní diferenciální diagnózou uroabdomen, avšak v případě, že není doprovázena zvýšenou hladinou kreatininu v efuzi, je třeba do diferenciálních diagnóz přidat i perforaci gastrointestinálního traktu.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

Celkem jsme vyšetřili 29 vzorků krve a 29 vzorků efuze od pacientů ošetřených na Klinice chorob psů a koček Veterinární a farmaceutické Univerzity Brno. Vzorky plné krve byly odebrány z v. Jugularis, v. Cephalica antibrachii, nebo z v. saphena. Vzorky efuze byly odebrány buď během diagnostiky, v rámci sonografického vyšetření, nebo při laparotomii ihned po chirurgickém otevření dutiny břišní. Vzorky byly předány do laboratoře KCHPK k následnému biochemickému vyšetření. Vyšetřovanými parametry bylo: draslík, celková bílkovina, laktát, laktátdehydrogenáza, glukóza, kreatinin. Vzhledem ke kazuistice, která byla inspirací k provedení této studie, jsme se v první fázi zaměřili na srovnání hodnot glukózy, draslíku a kreatininu a to jejich poměrů v krvi vůči efuzi (efuzi vůči krvi) u pacientů s poškozením žaludku nebo střev, které potenciálně vedlo k průniku obsahu GIT do peritoneální dutiny a u pacientů bez poškození těchto struktur.

Výsledky

Výsledky vyšetření vybraných parametrů pacientů (n=11) s patrným poškozením gastrointestinálního traktu jsou znázorněny v tabulce 1. Výsledky vyšetření vybraných parametrů pacientů bez poškození žaludku nebo střev (n=18) jsou znázorněny v tabulce 2. Statistické zpracování získaných výsledků stále probíhá.

	Vzorek	Draslík mmol/l	Poměr efuze/krev	Glukóza mmol/l	Poměr krev/efuze	Kreatinin mmol/l	Poměr efuze/krev
1	krev	3,5	1,11	5,6	0,9	84,8	0,90
	efuze	3,9		6,2		72,9	
2	krev	3,9	1,23	5,5	1,53	76,5	1,25
	efuze	4,8		3,6		95,9	
3	krev	3,7	1,30	7,96	1,11	20	1,69
	efuze	4,8		7,2		33,7	
4	krev	3,8	1,26	5,4	18,62	69,6	0,93
	efuze	4,8		<0,3		64,4	
5	krev	3,2	1,66	5,9	1,0	59,3	1,04
	efuze	5,3		5,9		61,4	
6	krev	3,1	1,19	8,2	1,16	51,5	0,77
	efuze	3,7		7,1		39,5	
7	krev	3,7	1,43	7,7	0,54	109,4	0,87
	efuze	5,3		14,3		95,5	
8	krev	3,4	1,71	4,1	0,61	38,2	1,04
	efuze	5,8		6,7		39,7	
9	krev	3	1,33	2,1	7,24	145,3	0,78
	efuze	4		0,29		113,6	
10	krev	3,9	1,05	5,8	1,23	32	0,85
	efuze	4,1		4,7		27,3	
11	krev	4	0,53	6	20,69	54	0,81
	efuze	2,1		0,29		43,9	

Tabulka 1: hodnoty a poměry hodnot vybraných parametrů u pacientů s poškozením GIT

	Vzorek	Draslík mmol/l	Poměr efuze/krev	Glukóza mmol/l	Poměr krev/efuze	Kreatinin mmol/l	Poměr efuze/krev
1	krev	3,8	1,24	7	0,84	105,5	0,79
	efuze	4,7		8,3		83	
2	krev	5,2	0,87	6,3	0,96	71,2	0,99
	efuze	4,5		6,6		70,3	
3	krev	3,5	1,0	7,2	0,49	44,9	1,57
	efuze	3,5		14,8		70,5	
4	krev	3,4	1,03	5,9	3,28	108,4	0,81
	efuze	3,5		1,8		88,3	
5	krev	3,5	0,54	4,2	14,48	65,2	0,90
	efuze	1,9		0,29		58,7	
6	krev	3,7	1,51	5	0,81	67,5	0,81
	efuze	5,6		6,2		54,5	
7	krev	4,1	0,73	3,3	0,34	59,2	0,96
	efuze	3		9,6		57	
8	krev	3,5	1,09	5	0,93	73,6	0,88
	efuze	3,8		5,4		64,7	
9	krev	3,4	1,71	5,6	0,93	70,7	1,06
	efuze	5,8		6		75,2	
10	krev	4	0,90	6	20,69	46	0,95
	efuze	3,6		0,29		43,7	
11	krev	4,3	0,98	5,7	1,00	48,5	0,86
	efuze	4,2		5,7		41,9	
12	krev	4,7	0,83	5,3	1,02	36,7	0,82
	efuze	3,9		5,5		30,1	
13	krev	3,9	1,03	6,3	1,50	52,9	0,76
	efuze	4		4,2		40,4	
14	krev	3,6	0,94	4,4	1,76	67,1	0,79
	efuze	3,4		2,5		53,2	
15	krev	4,5	0,91	6,5	1,28	49,4	0,84
	efuze	4,1		5,1		41,6	
16	krev	4,8	1,13	5,9	0,96	152,3	0,81
	efuze	5,4		6,1		123,2	
17	krev	4,3	1,19	6,1	1,05	102,1	0,84
	efuze	5,1		5,8		84,6	
18	krev	4,3	1,07	4,5	0,9	28,5	0,73
	efuze	4,6		5		21	

Tabulka 2: hodnoty a poměry hodnot vybraných parametrů u pacientů bez poškození GIT

Závěr

Celkem bylo po dobu trvání projektu vyšetřeno 29 vzorků krve a 29 vzorků efuze z dutiny břišní. Posouzení a statistické zhodnocení vybraných parametrů bude dále využíváno v diagnostice pacientů Kliniky chorob psů a koček, dále poslouží jako podklad pro tvorbu diplomové práce.

Seznam literatury:

Ben OJ, Aroch I, Segev G. Increased ratio of peritoneal effusion-to-serum potassium concentration in a dog with gastric perforation. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio). 2016 Nov;26(6):793-797.

Bohn AA. Analysis of Canine Peritoneal Fluid Analysis Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2017 Jan;47(1):123-133.

Tyler RD, Cowell RL. Evaluation of Pleural and Peritoneal Effusions. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice-Vol. 19, No. 4, July 1989

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 128/2019/FVL

Vliv podávání metamizolu na hematologické a biochemické parametry u psů

Bložoňová Aneta, Cigánková Eliška, Raušerová Leona, Vitásek Roman, Radó Michal, Pompová

Alena

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

Brno

Úvod

Metamizol (dipyrone) je u nás hojně používaným analgetikem v humánní i veterinární medicíně. Jedná se o jedno z nejsilnějších neopioidních analgetik.

Stále se můžeme setkat s jeho chybným řazením k nesteroidním antiflogistikům. A to i přesto, že je známo, že jeho mechanismus účinku je zaměřen na inhibici centrální cyklooxygenazy-3, aktivaci opioidního a kanabinoidního systému [1].

Metamizol vyniká nejen svým dobrým analgetickým účinkem, ale i antipyretickým a spasmolytickým efektem. Má však slabé antiinflatorní působení, které vychází z jeho slabé inhibice cyklooxygenázy-1 a 2, což je hlavní mechanismus účinku nesteroidních antiflogistik, proto jsou jeho potenciální vedlejší účinky odlišné od nesteroidních antiflogistik. Ve srovnání s NSAIDs je jeho negativní vliv na zažívací aparát zanedbatelný, a proto je možné metamizol aplikovat i u pacientů s gastroduodenální ulcerací [4].

Mezi nejčastěji diskutované nežádoucí účinky metamizolu patří hepatotoxický a myelotoxický vliv. Studií u psů je poměrně málo, ale zdá se, že výskyt metamizolem indukované agranulocytózy a hepatotoxicity je vácný [2,3]. Přesto metamizol zůstává stále v mnoha západních zemích málo používaným nebo neregistrovaným veterinárním analgetikem podezřelým ze závažných vedlejších účinků.

Materiál a metodika

Do projektu jsme zařadili feny ošetřené na KCHPK Brno – Oddělení reprodukce a Oddělení chirurgie a ortopedie, Kliniky chorob psů a koček. Jednalo se o feny podstupující ovariektomii nebo ovariohysterektomii z důvodu terapeutického a preventivního. U těchto pacientek byl v rámci pooperační analgezie použit metamizol nebo meloxicam. Metamizol byl podán v dávce 50mg/kg po osmi hodinách v rozmezí tří dnů ve formě injekční a následně ve formě tablet. Meloxicam byl aplikován v dávce 0,2 mg/kg ve formě jednorázového injekčního podání. Feny byly rozděleny do tří následujících skupin. Skupina 1. feny po terapeutické ovariohysterektomii z důvodu výskytu patologických procesů na děloze ošetřené metamizolem, skupina 2. feny po preventivní ovariektomii nebo ovariohysterektomii ošetřené metamizolem, skupina 3. feny po preventivní

ovariektomii nebo ovariohysterektomii ošetřené meloxicamem. U všech skupin jsme odebrali krev k hematologickému a biochemickému vyšetření, a to předoperačně (tedy před podáním analgetik) a následně 10. den po chirurgickém zákroku. V rámci hematologického vyšetření byly stanoveny parametry: červený a bílý krevní obraz, diferenciální rozpočet, retikulocyty. V rámci biochemického vyšetření: celková bílkovina, albumin, celkový bilirubin, jaterní enzymy (ALP, ALT, AST, GGT), glukóza, kreatinin, močovina, laktát, Na, K, Cl, Mg, Ca, P. Zjištěné odchylky hematologických a biochemických parametrů byly zaznamenány a statisticky zpracovány. Vyšetření krve jsme provedli v Klinické laboratoři pro malá zvířata VFU Brno.

Výsledky

V získaných výsledcích nebyl zachycen výskyt zmíněných nežádoucích účinků u fen ošetřených metamizolem (agranulocytóza, elevace jaterních enzymů). Avšak u této skupiny fen byl zjištěn statisticky významný pokles Ht, Hb, erytrocytů, celkové bílkoviny a albuminu a zvýšení počtu retikulocytů ve 2. a 3. odběru, které bylo pravděpodobně způsobeno větší ztrátou krve během a po chirurgickém zákroku. Tyto změny hladin zmíněných parametrů mohly být způsobeny narušenou agregací trombocytů, což je další nežádoucí efekt metamizolu prokázáný v humání medicíně. Snížená agregace trombocytů po podávání metamizolu již byla u psů popsána, ale neprokázala se její souvislost se zvýšeným rizikem krvácení. Limitujícím faktorem této studie je relativně malý počet pacientů.

Jednorázové podání meloxicamu a opakované podávání metamizolu nebylo u zdravých fen spojeno s klinicky významnou alterací vybraných hematologických a biochemických parametrů krve, protože navzdory statisticky signifikantním změnám se ani jeden z těchto krevních parametrů nevychýlil z referenčního rozmezí.

Seznam literatury:

- [1] JASIECKA A., MASLANKA T., JAROSZEWSKI J.J., Pharmacological characteristics of metamizole, Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014, 17(1), 207-214, ISSN: 0025-8628
- [2] IMAGAWA V.H., FANTONI D.T. ET AL, The use of different doses of metamizol for post-operative analgesia in dogs, Veterinary Anaesthesia and Analgesia, 2011, 38, 385-393, ISSN: 1467-2987
- [3] ZANNUZO F.S. ET AL, Effects of dipyron, meloxicam, or the combination on hemostasis in conscious dogs, Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 2015, 25(4), 512-520, ISSN: 1479-3261
- [4] BATU O.S., EROL.K., The effects of some nonsteroidal anti-inflammatory drugs on experimental induced gastric ulcers in rats, Inflammopharmacology, 2007, 15 (6), 260-265, ISSN: 0925-4692

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 104/2019/FVL

Vliv kontinuálně podávaných analgetik na nitrooční tlak u psů

Petr Raušer, Hana Němečková, Markéta Mrázová, Jana Burová, Lukáš Novák

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

Úvod

Analgezie je nezbytnou součástí léčby celé řady patologických procesů. Pro tlumení akutní bolesti se zpravidla využívají intravenózně podávaná analgetika – opioidy, disociační nebo lokální anestetika. Fentanyl je silným opioidem, ketamin disociačním anestetikem a lidokain lokálním anestetikem (1). Všechny tyto látky mají krátkou dobu působení, proto se pro zajištění déletrvajících analgezie musí podávat kontinuálně intravenózně (2). Stabilní nitrooční tlak (NOT) je nezbytnou součástí udržení oční homeostázy a normální funkce oka (3). Kolísání NOT tuto homeostázu narušuje (4). Adekvátní tlumení bolesti je často nezbytné i u pacientů s abnormalitami NOT bez jeho výraznějšího ovlivnění. Blaze a kol. (5) zaznamenali po podání opioidu morfinu vzestup NOT. Informace o účincích kontinuálně podávaného fentanylu na NOT však k dispozici nejsou. Ketamin v anestetických dávkách zvyšuje NOT (6). Pro analgezii jsou však dostačující mnohem nižší dávky ketaminu. Vliv na NOT při použití analgetických dávek ketaminu v literatuře zmiňován není. Intravenózně aplikovaný lidokain NOT také zvyšuje (7). Informace o působení lidokainu podaného v analgetické dávce rovněž dostupné nejsou.

Cílem této studie bylo analyzovat změny nitroočního tlaku při kontinuálním intravenózním podávání výše uvedených látek. Předpokládali jsme menší míru ovlivnění NOT oproti změnám výše popsaným.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 55 zdravých psů – klinických pacientů o tělesné hmotnosti 5–20 kg podstupující stomatologické ošetření. Psi byli rozděleni do 4 skupin – skupina FEN (n = 15), skupina KET (n = 15), skupina LID (n = 15) a skupina KON (n = 10). Projekt byl proveden formou randomizované "dvojitě slepé" studie. Svým rozsahem nepřekračoval běžně prováděné výkony a měření, proto nebyl vyžadován projekt pokusu. U všech psů byl změřen nitrooční tlak, velikost zornice, dechová a tepová frekvence a systolický a diastolický krevní tlak. Psům skupiny FEN byl aplikován bolus fentanylu (0,005 mg/kg) následovaný kontinuálním podáním fentanylu (0,005 mg/kg/h). Psům skupiny KET byl aplikován bolus ketaminu (0,6 mg/kg) následovaný kontinuálním podáním ketaminu (0,6 mg/kg/h). Psům skupiny LID byl aplikován bolus lidokainu (1 mg/kg) následovaný kontinuálním podáním lidokainu (1 mg/kg/h). Všechny látky byly ředěny pro bolusovou

aplikaci do objemu 0,3 ml/kg a pro kontinuální podání do objemu 2 ml/kg/h. Psům kontrolní skupiny KON byl aplikován bolus 0,9% NaCl (0,3 mg/kg) následovaný jeho kontinuálním podání (2 ml/kg/h). Za 2, 5, 10, 20 a 30 minut po aplikaci bolusu při kontinuálním podávání byl na levém oku měřen nitrooční tlak a velikosti zornice, dechová a tepová frekvence a systolický a diastolický krevní tlak. Pacienti byli při měření při plném vědomí vsedě nebo ve sternální poloze. Jednotlivá analgetika byla podávána formou preemptivní analgezie, která po skončení měření pokračovala i v průběhu celkové anestezie a vlastního stomatologického ošetření.

Výsledky

Nitrooční tlak se u žádné ze sledovaných skupin v průběhu našeho sledování signifikantně nezměnil oproti stavu před aplikací ani při vzájemném porovnání jednotlivých skupin mezi sebou.

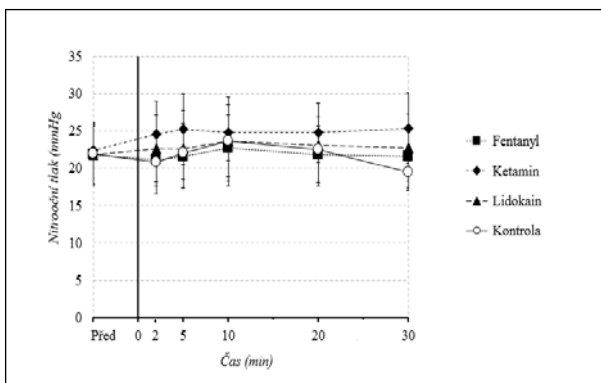
Ve všech sledovaných časech (2, 5, 10, 20 a 30 min) se oproti stavu před aplikací signifikantně zmenšila pupila u psů, kterým byl podáván fentanyl. Psům, kterým byl aplikován ketamin, se oproti stavu před medikací naopak pupila signifikantně rozšířila 2, 5 a 10 minut od začátku aplikace. Při vzájemném srovnání mezi skupinami byla pupila signifikantně menší u psů při aplikaci fentanylu oproti psům s aplikací ketaminu 2, 5, 10 a 20 minut a oproti kontrolní skupině 5, 10, 20 a 30 minut od začátku aplikace.

Dechová frekvence se signifikantně zvýšila 5, 10, 20 a 30 minut u psů, kterým byl aplikován fentanyl. U psů po aplikaci fentanylu byla také ve 30. minutě zaznamenána signifikantně nižší tepová frekvence oproti psům po aplikaci ketaminu, ve 2., 10., 20. a 30. minutě oproti psům po aplikaci lidokainu a ve 20. minutě oproti psům kontrolní skupiny.

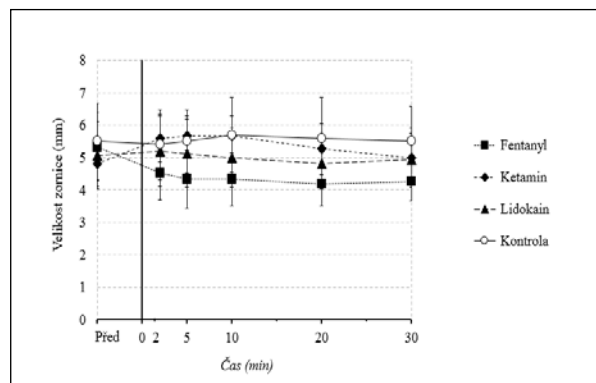
Žádné jiné signifikantní odchylky jsme v rámci jedné skupiny ani při porovnání skupin mezi sebou nezaznamenali.

Závěr

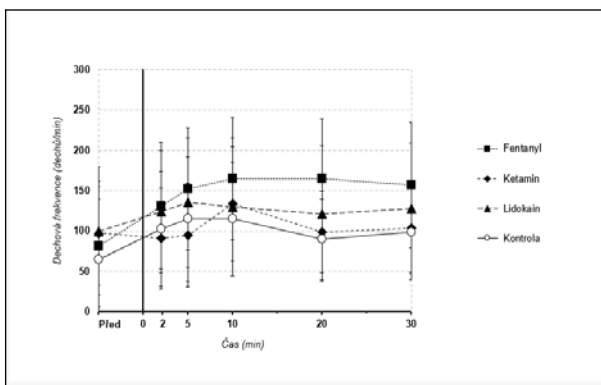
Fentanyl, ketamin ani lidokain podávaný kontinuálně v běžně doporučených dávkách signifikantně neovlivňují během 30 minutové aplikace nitrooční tlak. Fentanyl však vyvolává signifikantní zúžení zornice, není proto vhodný u pacientů, kde není žádoucí mióza. Ketamin naopak vyvolává krátkodobé přechodné rozšíření zornice, není proto vhodný u pacientů, kde je mydriáza nežádoucí.



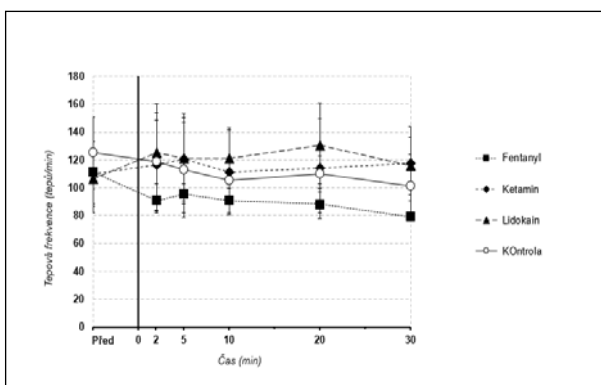
Obrázek 1. Kolísání nitroočního tlaku po aplikaci fentanylu, ketaminu a lidokainu (průměr ± směrodatná odchylka)



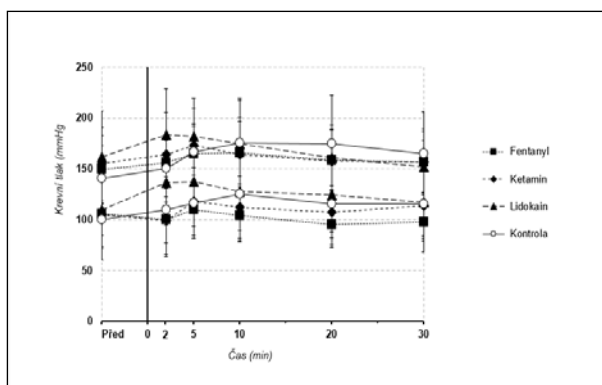
Obrázek 2. Kolísání velikosti zornice po aplikaci fentanylu, ketaminu a lidokainu (průměr ± směrodatná odchylka)



Obrázek 3. Kolísání dechové frekvence po aplikaci fentanylu, ketaminu a lidokainu (průměr ± směrodatná odchylka)



Obrázek 4. Kolísání tepové frekvence po aplikaci fentanylu, ketaminu a lidokainu (průměr ± směrodatná odchylka)



Obrázek 3. Kolísání systolického (horní hodnoty) a diastolického (dolní hodnoty) krevního tlaku po aplikaci fentanylu, ketaminu a lidokainu (průměr \pm směrodatná odchylka)

Seznam literatury:

- (1) Mathews KA, Sinclair M, Steele AM, Grubb T 2018: Analgesia and anesthesia for the ill or injured dog and cat. 1st ed., Wiley Blackwell, Hoboken, 480 p.
- (2) Guedes AGP 2012: Pain management: constant-rate infusion. Clinician's Brief March, 32, 29–33.
- (3) Jantzen JP 1988: Anaesthesia and intraocular pressure. Anaesthesia, 37, 458–469.
- (4) Gelatt KN, MacKay EO 1998: Distribution of intraocular pressure in dogs. Veterinary Ophthalmology 1, 109–114.
- (5) Blaze C, Pine CG, Casey E, Pizzirani S 2009: The effect of intravenous hydromorphone, butorphanol, morphine, and buprenorphine on pupil size and intraocular pressure in normal dogs. Proceedings of 10th WCVA, AVA, Glasgow, p. 134.
- (6) Hofmeister EH, Mosunic CB, Torres BT, Ralph AG, Moore PA, Read MR 2006: Effects of ketamine, diazepam, and their combination on intraocular pressures in clinically normal dogs. American Journal of Veterinary Research 67: 1136–1139.
- (7) Hofmeister EH, Williams CO, Braun C, Moore PA 2006a: Influence of lidocaine and diazepam on peri-induction intraocular pressures in dogs anesthetized with propofol-atracurium. Canadian Journal of Veterinary Research 70: 251–256.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 101/2019/FVL

Vztah mezi tloušťkou centrální rohovky a nitroočním tlakem u koní

Filip Kološ¹, Aikaterini Maria Zisopoulou¹, Natália Vyhnalová²

*Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita
Brno¹, Ústav veterinárního lékařství²*

Úvod

Spektrum oftalmologických pacientů Kliniky chorob koní poukazoval na to, že onemocnění rohovky je nejčastějším oftalmologickým problémem, pak následuje ERU (equine recurrent uveitis) a glaukom. Jednotlivá oční onemocnění je někdy neskutečně těžké identifikovat, neboť postižené oční struktury jsou často pouhou adspekcí neidentifikovatelné a je nutné využít speciálního instrumentária, které rovněž vyžaduje zkušeného vyšetřujícího. Diagnostické metody jako tonometrie pro měření nitroočního tlaku a pachymetrie pro měření korneální tloušťky během posledních let pomáhají ke konečné diagnóze a jsou často esenciální částí diagnostického procesu. Hlavním cílem projektu bylo posoudit, zda existuje vztah mezi tloušťkou centrální rohovky a nitroočním tlakem koňského oka u různých věkových kategorií koní. Rovněž určit vztah mezi tloušťkou centrální části rohovky a věkem měřených koní. A nakonec se pokusit o vytvoření referenčních hodnot zkoumaných parametrů pro konkrétní plemena koní, která jsou nejčastěji používána jako sportovní nebo pracovní v České republice.

Materiál a metodika

Do projektu byli zařazeni koně od soukromých majitelů. Projekt probíhal na Klinice chorob koní, kde koně byli ustájeni, nebo byli dovezeni během dne na různé neinvazivní zákroky. K měření byli vybráni jedinci, kteří tolerovali měření bez použití sedativ a byli umístěni do klidného a tmavého vyšetřovacího boxu.

Oftalmologické vyšetření na koních bylo provedeno po jejich příjezdu na kliniku a adaptaci v boxe. Celkové zkrácené klinické vyšetření předcházelo specializovanému vyšetření předního a zadního očního segmentu s pomocí přímého světelného zdroje (Finoffuv transiluminator, PenLight, Slit Lamp) a přímého oftalmoskopu. V případě, že nebyly zpozorovány žádné oční abnormality, byl lokálně aplikován oxybuprokain, několik kapek v intervalech 1 min do obou očí. IOP byl měřen na každém oku. První oko bylo vybráno náhodně a poté bylo vyhodnoceno i oko druhé.

Centrální tloušťka rohovky se měřila podle stejného principu. Jednu minutu po aplikaci oxybuprokainu se IOP změřil pomocí TonoPen XL. Po 5 minutách byl CCT měřen ultrazvukovým pachymetrem. První zkoušející provedl všechna měření a student si zapsal hodnoty. Po vypláchnutí lokálního anestetika z očí sterilním fyziologickým roztokem byl nakonec pro zvýšení komfortu rohovky po měření aplikován do obou očí Vidisic Oční gel.

Výsledky

Hlavním cílem projektu bylo určit vztah mezi tloušťkou centrální rohovky a nitroočním tlakem. Zjistili jsme hodnoty nitroočního tlaku u koní během dne a hodnoty nitroočních tlaků koní různého věku a pohlaví, a konečně hodnoty těchto dvou parametrů u nejčastěji se vyskytujících plemen koní v České republice. Naše výsledky zatím nemají statistický význam, protože jsme nemohli provést měření u všech pacientů. Většina koní, která byla dovezena na kliniku, byla už medikována od strany terénního veterinárního lékaře, anebo nechtěla spolupracovat bez použití sedativ. V příštím roce plánujeme pokračovat v měření. Korelace mezi nitroočním tlakem a tloušťkou centrální rohovky byla již prokázána u 50 pacientů. Ke statisticky přijatelným výsledkům je však nutné větší množství pacientů.

Plemeno	Rozmezí hodnot		
	Počet pacientů	Tlak	Tloušťka rohovky
Anglický plnokrevník	5	23±4	820±60
Český teplokrevník	12	24±8	803±85
Starokladrubský kůň	4	28±6	741±64
Quarter - am. hon.	4	30±6	794±14

Tabulka 1: Fyziologické rozmezí pro nejběžnější přijatá plemena na Klinice chorob koní

Průměr očního tlaku		Průměr tloušťky rohovky	
Levé oko	Pravé oko	Levé oko	Pravé oko
27,3	25,66	776	772,75
22,67	27	845,6	854
22	24	781,4	800
32,67	27	819	832,2
25	24	888,67	855,4
27,33	25,33	792,33	805,6
26,67	26	829,17	824,17
42,33	35	698,2	698,4
31	30,33	835,5	859
32	27	860	826
25	20,33	816,6	815,8
25	24,67	871	870
22,67	22	860,5	879,17
25	24	816,25	823,5
20,67	20,33	887	892
28	21,33	733,33	746
23	24,33	796,67	805,5
28,67	26,33	853,17	852,17
35,67	36	801,5	809,4
28,67	21,33	867	863
31,33	26,33	850,17	834,3
31,33	30	811,33	827,17
30	30,31	887,33	884
36,67	32,33	808	813
33,3	25,67	801	816,8
31	26,33	777,5	768
22	20,67	831,6	820,2
28,33	30	825	824
26	31	817,7	828
24,67	25,67	835,2	807,6
25,67	34,33	721,2	716,8
23,33	24,67	847	827,5
25,33	23,33	762,6	767,2
35,67	34,67	815,17	820
28,67	25,67	781,33	795,83
29,33	32	800,5	794
18,33	22,67	864,8	881
22	27	846	850,8
23,33	25,67	887	884
16,33	18,33	871,75	803,75
24,33	26,33	845,25	862,25
17	16,33	750,5	718
21,33	24,66	755,28	763,57
24,67	22,3	724,87	738,13
28,66	28	844,75	825,875
24,67	30,67	775,5	784,75
28,33	34	789,4	785
27,33	22	810,7	810,14
17,67	19	825,17	838,33
20	22	840	835,2
Korelácia			
Levé oko	-0,243216777		
Pravé oko	-0,146914975		

Tabuľka 3: Korelácie IOP a CCT s vekom

Vek	Průměr očního tlaku		Průměr tloušťky rohovky	
	Levé oko	Pravé oko	Levé oko	Pravé oko
1.1.2015/ 4 roky	27,3	25,66	776	772,75
13.5.2008/11 rokov	22,67	27	845,6	854
16.4.2013/6 rokov	22	24	781,4	800
4.4.2009/10 rokov	32,67	27	819	832,2
3.3.2006/13 rokov	25	24	888,67	855,4
20.3.2017/2 roky	27,33	25,33	792,33	805,6
7.4.2017/ 2 roky	26,67	26	829,17	824,17
1.1.2012/7 rokov	42,33	35	698,2	698,4
1.1.2002/17 rokov	31	30,33	835,5	859
7.5.2010/9 rokov	32	27	860	826
24.5.2011/8 rokov	25	20,33	816,6	815,8
1.1.2012/7 rokov	25	24,67	871	870
6.3.2013/6 rokov	22,67	22	860,5	879,17
7.5.2011/8 rokov	25	24	816,25	823,5
7.3.2012/7 rokov	20,67	20,33	887	892
27.3.2015/4 roky	28	21,33	733,33	746
1.1.2012/7 rokov	23	24,33	796,67	805,5
19.4.1998/21 rokov	28,67	26,33	853,17	852,17
19.6.2010/9 rokov	35,67	36	801,5	809,4
17.6.2004/15 rokov	28,67	21,33	867	863
13.7.2004/15 rokov	31,33	26,33	850,17	834,3
23.3.1998/21 rokov	31,33	30	811,33	827,17
13.5.2008/11 rokov	30	30,31	887,33	884
12.3.2012/7 rokov	36,67	32,33	808	813
15.4.2017/2 roky	33,3	25,67	801	816,8
8.8.2008/ 11 rokov	31	26,33	777,5	768
8.4.2015/4 roky	22	20,67	831,6	820,2
1.1.2009/10 rokov	28,33	30	825	824
18.3.2002/17 rokov	26	31	817,7	828
7.6.2012/7 rokov	24,67	25,67	835,2	807,6
1.7.2018/ 1 rok	25,67	34,33	721,2	716,8
16.7.2016/3 roky	23,33	24,67	847	827,5
1.1.2016/3 roky	25,33	23,33	762,6	767,2
1.1.2015/4 roky	35,67	34,67	815,17	820
22.3.2008/11 rokov	28,67	25,67	781,33	795,83
3.4.1999/20 rokov	29,33	32	800,5	794
26.3.2010/9 rokov	18,33	22,67	864,8	881
1.1.2013/6 rokov	22	27	846	850,8
1.1.2004/15 rokov	23,33	25,67	887	884
21.1.2008/11 rokov	16,33	18,33	871,75	803,75
20.3.2012/7 rokov	24,33	26,33	845,25	862,25
1.1.1995/24 rokov	17	16,33	750,5	718
1.1.1994/25 rokov	21,33	24,66	755,28	763,57
4.6.2010/9 rokov	24,67	22,3	724,87	738,13
12.5.2008/11 rokov	28,66	28	844,75	825,875
31.3.2013/6 rokov	24,67	30,67	775,5	784,75
9 rokov	28,33	34	789,4	785
13.4.2016/3 roky	27,33	22	810,7	810,14
1.1.2014/5 rokov	17,67	19	825,17	838,33
1.3.2017/2 roky	20	22	840	835,2
Korelácia s vekom				
Oční tlak	Pravé oko	0,043047871		
	Levé oko	-0,008790306		
Hrúbka rohovky	Pravé oko	0,049435082		
	Levé oko	0,095805721		

Tabuľka 2: Korelácie IOP s CCT

Závěr

Existuje vztah mezi tloušťkou centrální rohovky a nitroočním tlakem koňského oka podobný jako u jiných druhů zvířat a u lidí (Park et al. 2011, Andrade et al. 2011). Vzhledem k nedostatečnému počtu pacientů náš výsledek zatím nemá statistický význam, ale myslíme si, že se to změní, jakmile vypočítaný počet pacientů bude změřen. Existuje jakákoli závislost mezi hodnotami IOP a CCT u různých plemen koní, pak máme větší šanci ji objevit, vyšetříme-li vyšší počet pacientů. Byly publikovány výsledky pozitivní korelace mezi hodnotami CCT a zvyšujícím se věkem koní, avšak v našem souboru pacientů se objevily případy, kdy naopak mladší koně měli vyšší hodnoty CCT (Herbig a Eule 2015, Monk et al. 2017). Měření proběhlo u 50 koní, ale abychom dosáhli přesných vědeckých výsledků, chtěli bychom během příštího roku provést měření u dalších 50.

Seznam literatury:

Andrade SF, Kupper DS, Pinho LF, Franco EC, Prativiera MV, Duarte RR, Junqueira JR. 2011: Evaluation of the Perkins handheld applanation tonometer in horses and cattle. J Vet Sci. 12(2):171-6.

Herbig LE and Eule JC. 2015: Central corneal thickness measurements and ultrasonographic study of the growing equine eye. Vet Ophthalmol. 18(6):462-71.

Monk CS, Brooks DE, Granone T, Garcia-Pereira FL, Melesko A, Plummer CE. 2017: Measurement of intraocular pressure in healthy anesthetized horses during hoisting. Vet Anaesth Analg. 44(3):502-8.

Park YW, Jeong MB, Kim TH, Ahn JS, Ahn JT, Park SA, Kim SE, Seo K. 2011: Effect of central corneal thickness on intraocular pressure with the rebound tonometer and the applanation tonometer in normal dogs. Vet Ophthalmol. 14(3):169-73.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 111/2019/FVL

c-Myb a osteogeneze: nové funkce a interakce

Sabina Štouračová, Veronika Oralová, Eva Matalová

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

Úvod

Transkripční faktor c-Myb/Myb je regulační protein známý především u nediferencovaných buněk kostní dřeně (Mitra 2018), v poslední době je však poukazováno na jeho význam také v diferenciaci buněk (Ess et al. 1999, Wang et al. 2018). U celkové deficience Myb dochází z důvodu selhání hematopoézy k intrauterinní letalitě, u myši se jedná o prenatalní den 15 (Mucenski et al. 1991).

V tomto období se vytváří alveolární/mandibulární kost v oblasti prvního moláru, dochází k transformaci mezenchymové kondenzace do diferencované kostní tkáně obsahující všechny tři základní typy buněk - osteoblasty, osteocyty a osteoklasty (Veselá et al. 2019). Alveolární kost, která je součástí parodontu, je nezbytná pro dynamické ukotvení zubu a správnou funkčnost dentice (Yeh et al. 2011).

Myb byl nedávno charakterizován právě ve vztahu k vývoji tvrdých tkání zubů a kostí (Matalová et al. 2011), což bylo následně experimentálně potvrzeno (Bhattarai et al. 2013) a bylo poukázáno na jeho osteogenní potenciál (Oralová et al. 2016). Mechanismus uplatnění Myb v osteogenezi dosud není znám.

Hlavním cílem výzkumu byla detekce expresních změn u vyvíjející se mandibuly v případě deficience genu pro transkripční faktor Myb (knock-out vs. wild-type) se zaměřením na analýzu osteogenních a proliferačních drah v oblasti prvního moláru u myšího modelu.

Materiál a metodika

Vzorky: Hlavové části fetů (prenatální den 15,5) Myb deficientních a kontrolních myši byly získány od prof. J. Framptona (Sumner et al. 2000) po fixaci v RNAlateru. Mikrodisekcí byly odděleny mandibuly a poté separovány jejich molárové části. Vzorky byly odebrány do RLT pufry (Qiagen) s β -merkaptóethanolem (Sigma-Aldrich).

Izolace RNA a přepis do cDNA: RNA byla vyzolována pomocí RNeasy Plus mini-kitu (Qiagen). Čistota a koncentrace RNA byly stanoveny na přístroji NANO-drop (Thermo Fischer Scientific). Pro PCR Array byla RNA přepsána do komplementární DNA s využitím

SuperScript™ VILO™ cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific), pro qPCR byla RNA přepsána pomocí gb Elite Reverse Transcription Kit (Generi Biotech).

qPCR/PCR Array: PCR Array byla provedena s využitím RT² Profiler™ PCR Mouse Arrays (Quiagen) Výsledky byly vyhodnoceny programem Qiagen Data Analysis Center (<https://geneglobe.qiagen.com/jp/analyze/>). qPCR byla provedena s využitím gb Ideal PCR Master Mix (Generi Biotech) a příslušných primerů (ThermoFisher). Změna exprese byla statisticky vyhodnocena proti hodnotě aktinu.

Výsledky a závěr

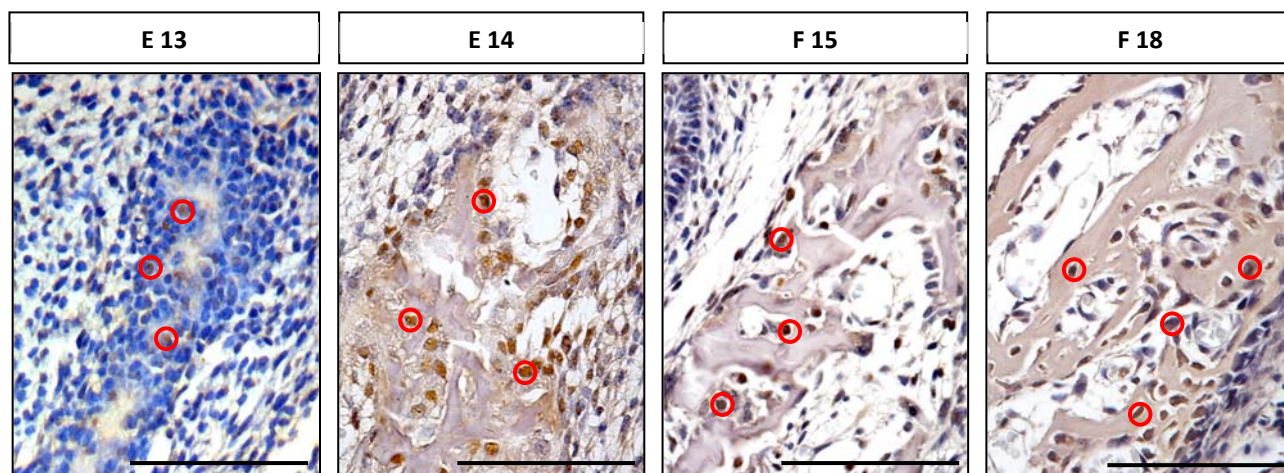
Myb protein je přítomen již ve formující se alveolární/mandibulární kosti jak bylo zdokumentováno s využitím imunohistochemie u frontálních histologických řezů myši mandibuly (Obr. 1). Embryonální den 13 je první den *in utero* vývoje s morfologicky identifikovatelnou strukturou budoucí alveolární/mandibulární kosti. Myb je zde přítomen v jádře mesenchymových buněk (Obr. 1, E13). Během následujících dní multipotentní mesenchymové buňky diferencují v osteoblasty (Obr. 1, E14) a později ve zralé osteocyty (Obr. 1, F15, F18), pozitivní na transkripční faktor Myb.

Pro PCR Array analýzu byl vybrán nejzazší den přežívání Myb knock-out myši, a to prenatální den 15/15,5, kdy jsou v alveolární/mandibulární kosti v okolí prvního moláru již přítomny osteoblasty, ale také první osteocyty a mnohojaderné osteoklasty. Screening byl proveden pro osteogenní molekuly a markery buněčného cyklu. Nejvýraznější trend expresní změny se týkal *Slfn1*, a to ve smyslu snížené exprese u k/o vzorků (Tabulka 1). *Slfn* představují rodinu proteinů s řadou důležitých funkcí, např. v buněčné proliferaci (Liu et al. 2018), kde hraje roli také Myb.

Osteogenní screening poukázal na expresní změny u systému Rank-Rankl-Opg, který je klíčový pro diferenciaci osteoklastů a udržování dynamické rovnováhy mezi osteoblasty a osteoklasty (Walsh et al. 2014). Rank je přítomen na prekurzorech osteoklastů, které po vazbě osteoblastového Rankl maturují. Opg je decoy receptorem pro RANKL. U Myb k/o vzorků mandibuly byla detekována snížená exprese Rank, u Rankl byl rozdíl ještě výraznější (Graf 1, Rank, Rankl). U exprese Opg byla v případě Myb deficientních vzorků zaznamenána zvýšená exprese (Graf 1, Opg).

Prezentované výsledky screeningu u mandibul Myb deficientních vs. kontrolních myši indikují participaci Myb v jednom z nejdůležitějších osteogenních systémů, jehož modulace má široký aplikační potenciál.

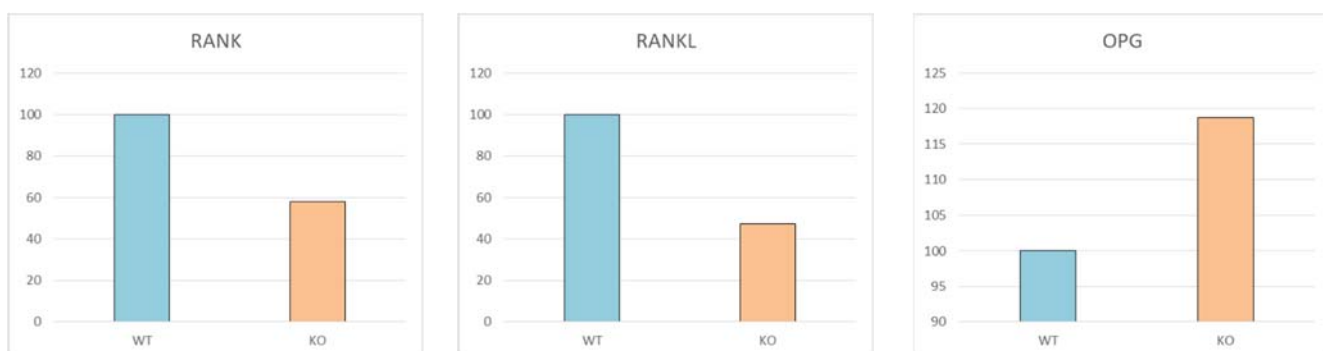
Obrázek 1: Imunohistochemická detekce proteinu Myb během prenatalního vývoje (E – embryonální den 13, 14, F - fetální den 15, 18) alveolární/mandibulární kosti. Myb pozitivní buňky jsou obarveny hnědě, negativní modře. Červené kroužky ukazují pozitivní buňky. Měřítka = 100 μ m.



Tabulka 1: Trend expresních změn u Myb knock-out a wild-type vzorků, mandibula, prenatalní den 15, PCR Array analýza, Cell Cycle PCR Array Pannel (Qiagen).

Array kód	Zkratka genu	Název genu	Změna exprese
A11	Ccna1	Cyclin A1	vyšší u k/o
B07	Ccne1	Cyclin E1	nižší u k/o
C09	Cdkn2a	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	nižší u k/o
D06	E2f2	E2F Transcription factor 2	nižší u k/o
D10	Gpr132	G Protein-Coupled Receptor 132	nižší u k/o
G03	Slfn1	Schlafen 1	nižší u k/o

Graf 1: Analýza exprese komponent systému Rank-Rankl-Opg u Myb knock-out vzorků vs. kontrol, mandibula, molárová oblast, prenatalní den 15, qPCR.



Seznam literatury:

- Bhattarai G, Lee YH, Yi HK, *Gene delivery of c-myb increases bone formation surrounding oral implants*, J Dent Res 2013, doi:10.1177/0022034513497753
- Ess CK, Witte PD, Bascomb PCH, Aronow JB. *Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation*, Oncogene 1999, 18, 1103-1111
- Liu F, Zhou P, Wang Q, Zhang M, Li D, *The schlafen family: complex roles in different cell types and virus replication*, Cell Biol Int 2018, doi: 10.1002/cbin.10778
- Matalova E, Buchtova M, Tucker AS, Bender Timothy P, Janeckova E, Lungova V, Balkova S, Smarda J: *Expression and characterization of c-Myb in prenatal odontogenesis*, Develop Growth Differ 2011, doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01287.x
- Mitra P., *Transcription regulation of MYB: a potential and novel therapeutic target in cancer*, Ann Transl Med 2018, doi: 10.21037/atm.2018.09.62
- Mucenski ML, McLain K, Kier AB, Swerdlow SH, Schreiner CM, Miller TA, Pletryga DW, Scott J Jr, Potter SS, *A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis*, Cell 1991, Vol.65, 677-689
- Oralova V, Matalova E, Killinger M, Knopfova L, Smarda J, Buchtova M, *Osteogenic potential of the transcription factor c-MYB*. Calcif Tissue Int 2016, doi: 10.1007/s00223-016-0219-2
- Sumner R, Crawford A, Mucenski M, Frampton J, *Initiation of adult myelopoiesis can occur in the absence of c-Myb whereas subsequent development is strictly dependent on the transcription factor*, Oncogene 2000, 19, 3335-3342
- Vesela B, Svandova E, Bobek J, Lesot H, Matalova E, *Osteogenic and angiogenic profiles of mandibular bone-forming cells*, Front Physiol 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00124
- Yeh KD, Popowics T, *Molecular and structural assessment of alveolar bone during tooth eruption and function in the miniature pig, Sus Scrofa*, Anat Histol Embryol 2011, doi: 10.1111/j.1439-0264.2011.01067.x
- Walsh MC, Choi Y, *Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone and beyond*, Front Immunol 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00511
- Wang X, Angelis N, Thein S L. *MYB – A regulatory factor in hematopoiesis*, Elsevier 2018, doi: 10.1016/j.gene.2018.04.065

Poděkování: Za poskytnutí Myb deficientních a kontrolních vzorků prof. J. Framptonovi (Birmingham, UK).

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 115/2019/FVL

Nové funkce pro-apoptotických kaspáz ve vztahu k autofagii a chondrogenezi

Alice Ramešová, Barbora Veselá, Eva Matalová

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

Úvod

Autofagie je proces lyzozomální degradace cytoplazmatických komponent, který hraje důležitou úlohu při přežívání/smrti buněk, degradaci intracelulárních proteinů a organel, ale také při prezentaci antigenu, raném vývoji organismu a při diferenciaci řady buněčných linií (1). Autofagie se uplatňuje i při vývoji kostí a v jejich homeostázi (2). Chondrogeneze je součástí vývoje dlouhých kostí, chondrocyty jsou zachovány v růstové ploténce, která je nezbytná pro elongaci kosti (3).

Kaspázy, cysteinové proteázy, jsou tradičně spojovány s apoptózou a zánětem. V poslední době se však objevují nové poznatky, které prokazují funkce kaspáz i mimo tyto procesy. Nové studie se týkají uplatnění proapoptotických kaspáz u autofagických drah (4).

Řešitelské pracoviště aktuálně prokázalo zapojení kaspáz do autofagických procesů probíhajících během degradace Meckelovy chrupavky (5). Dále byly studovány chondrocyty odvozené z končetinových základů, protože k neapoptotické aktivaci kaspáz dochází také v růstové ploténce dlouhých kostí (6). Farmakologická inhibice kaspáz a PCR Array analýza umožnila detekci řady autofagických molekul, jejichž exprese se lišila u kontrolních a inhibovaných kultur chondrocytů (Veselá et al., nepublikované výsledky). Primárně se jednalo o expresní změny u Pik3cg (phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide), Tnfsf10 (tumor necrosis factor/ligand superfamily member 10), Irgm1 (immunity-related GTPase family M member 1) a Ctss (cathepsin S).

Prezentovaný výzkum měl za cíl specifikovat, které konkrétní proapoptotické kaspázy se na těchto efektech podílejí.

Materiál a metodika

Chondrocytové mikromasové kultury odvozené z prenatálních (den 12) základů myších hrudních končetin, mechanické (v PSA pufru) a chemické (dispázou II) rozvolnění buněk, promytí, filtrace, nasazení na kultivační misky ve formě spotů (objem 10 μ l), kultivace (DMEM, F12 nutrient, FBS, P/S, L-glu, β -GP, kyselina askorbová).

Inhibice jednotlivých kaspáz přidáním FMK inhibitoru (100 μ M v DMSO) do kultivačního média, výměna po 48 h, kultivace (5 % CO₂, 37 °C), odběr po 7 dnech do RLT pufru s β -

merkaptoetanolem. Separátní inhibice kaspázy-3/7 (společný inhibitor vzhledem ke sdíleným substrátům) a -6, -8, -9, vždy 3 biologické replikace, kontroly s DMSO bez inhibitoru.

Izolace RNA a přepis do cDNA s využitím RNeasy Mini Kit a SuperScript VILO. Poté provedena qPCR analýza úrovně exprese genů *Pik3cg*, *Tnfsf10*, *Irgm1* a *Ctss* (Generi Biotech Ideal PCR Master Mix, ThermoFisher primery). Výsledky vyhodnoceny jako rozdíl v C_t hodnotách, referenční gen aktin, statistické zpracování, hladina signifikance $p < 0,01$ (**) a $p < 0,05$ (*).

Výsledky

Výsledkem výzkumu byla kvantifikace expresních změn *Pik3cg*, *Tnfsf10*, *Irgm1* a *Ctss* po inhibici jednotlivých proapoptotických kaspáz (Tabulka 1). Exprese genu *Pik3cg* byla signifikantně snížena po inhibici kaspázy-3/7, -6, -8, -9, exprese *Tnfsf10* byla signifikantně zvýšena po inhibici kaspázy-3/7, -8, -9, exprese *Irgm1* byla signifikantně zvýšena po inhibici kaspázy-3/7, -8 a signifikantně snížena inhibicí kaspázy-9, exprese *Ctss* byla signifikantně snížena po inhibici kaspázy-6 a -8.

*Tabulka 1: Vliv inhibice jednotlivých pro-apoptotických kaspáz na expresi autofagických markerů v mikromasových kulturách chondrocytů. Tabulka ukazuje změnu genové exprese jako procento u experimentální skupiny vs. kontrolní (100 %), $p < 0,01$ (**) a $p < 0,05$ (*).*

	Kaspáza-3/7	Kaspáza-6	Kaspáza-8	Kaspáza-9
Pik3cg	54 %, **	49 %, *	30 %, **	29 %, *
Tnfsf10	263 %, **	Nesignifikantní	349 %, *	377 %, **
Irgm1	206 %, **	Nesignifikantní	190 %, **	81 %, **
Ctss	Nesignifikantní	51 %, *	32 %, **	Nesignifikantní

Diskuze

Mezi proapoptotické kaspázy patří zejména kaspáza-8, -9 (iniciační kaspázy) a kaspáza-3, -6, -7 (exekuční kaspázy). Prezentovaný výzkum identifikoval ty, jejichž inhibice měla dopad na expresi molekul spojovaných s autofagií, vytipovaných předchozím screeningem. Všechny studované kaspázy se podílely na modulaci exprese genu *Pik3cg*, který negativně reguluje autofagii prostřednictvím Akt signalizace (7). Stejně kaspázy ovlivňují i štěpení Beclin-1, jednoho z hlavních markerů autofagie (7), který však interferuje také s apoptotickými drahami (4).

Inhibice kaspázy-3/7, -8, -9 způsobila změnu exprese genu *Tnfsf10*. Exprimovaný protein *Tnfsf10/Trail* pozitivně ovlivňuje autofagii a jeho signalizační dráha může aktivovat kaspázu-8 a ta poté kaspázu-3 (8). Kaspáza-8 i -9 mohou regulovat autofagii cestou *Atg7-Beclin-1*. (7, 9).

Změna exprese u genu *Irgm1* byla detekována také v případě inhibice kaspázy-3/7, -8, -9. Funkce proteinu *Irgm1* v autofagických drahách není zcela objasněna, některé studie poukazují na jeho schopnost interakce s *Beclin-1* (10). Inhibice exekučního tria kaspáz měla rozdílný vliv na expresi *Irgm1* i *Tnfsf10*. Přestože ani v tomto případě není mechanismus ještě objasněn, je známo, že kaspázy-3/7 a kaspáza-6 mají odlišné substráty, a to i v případě autofagických drah (11).

Inhibice kaspázy-6 a -8 snižovala expresi *Ctss*. Protein *Ctss* je, stejně jako např. *Pik3cg*, schopen modulovat autofagii prostřednictvím *Akt* signální dráhy (12). Kaspáza-6 může přímo aktivovat kaspázu-8 v případě mitochondriální cytochromem-c indukované cesty apoptózy. Tento způsob aktivace kaspázy-8 má zřejmě funkci zpětné vazby (13). Jelikož změnu exprese *Ctss* způsobily pouze tyto dvě proapoptotické kaspázy, je možné, že obdobné cesty aktivace se mohou uplatňovat i v autofagii.

Závěr

Individuální inhibice proapoptotických kaspáz v chondrocytových kulturách umožnila specifikovat konkrétní kaspázy a jejich modulační efekt na expresi genů *Pik3cg*, *Tnfsf10*, *Irgm1* a *Ctss*. Jedná se o zcela nové interakce v souvislosti s autofagií. Některé z uvedených molekul jsou aktuálně studovány v souvislosti s diagnostikou a terapií, zejména v oblasti nádorových onemocnění.

Seznam literatury:

- (1) MIZUSHIMA N, LEVINE B. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol.* 2010; **12**:823-830.
- (2) NOLLET M. et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. *Autophagy.* 2014; **10**:1965-1977.
- (3) MACKIE EJ. et al. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; **40**(1):46-62.
- (4) TSAPRAS P, NEZIS IP. Caspase involvement in autophagy. *Cell Death Differ.* 2017; **24**:1369-1379.

- (5) BÍLIKOVÁ P. et al. Coupling activation of pro-apoptotic caspases with autophagy in the Meckel's cartilage. *Physiol Res.* 2018; **68**(1):135-140.
- (6) JANEČKOVÁ E. et al. Osteogenic Potential of Caspases Related to Endochondral Ossification. *J Histochem Cytochem.* 2018. **66**:47-58.
- (7) YU X. et al. Differential regulatory functions of three classes of phosphatidylinositol and phosphoinositide 3-kinases in autophagy. *Autophagy.* 2015; **11**:1711-1728.
- (8) ORAL O. et al. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis.* 2012; **17**:810-820.
- (9) HAN J. et al. A Complex between Atg7 and Caspase-9: A NOVEL MECHANISM OF CROSS-REGULATION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS. *J Biol Chem.* 2014; **289**(10):6485-97.
- (10) CHAUHAN S. et al. IRGM governs the core autophagy machinery to conduct antimicrobial defense. *Mol Cell.* 2015; **58**(3):507-21.
- (11) LIU WJ. et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett.* 2016; 21:29.
- (12) ZHANG L. et al. Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways. *Toxicol Lett.* 2014; **228**(3):248-59.
- (13) COWLING W. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. 2002; **9**(10):1046-56.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 119/2019/FVL

Působení vybraných látek, izolovaných z *Taraxacum officinale*, na fyziologické a nádorové buněčné linie

Markéta Korbášová¹, Erika Rajtová¹, Karolína Koryntová¹, Kristýna Koryntová¹, Jan Chloupek¹

Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Konvenční terapie nádorových onemocnění jde stále dopředu, ale přírodní látky (NHP – natural health products), a léčiva z nich vyráběná mají na poli medicíny stále své místo. Velkou nevýhodou NHP je ovšem jejich variabilita a nestabilní množství látek. Jedním z řešení tohoto problému je izolace bioaktivních sloučenin a terapie samotnými látkami, či jejich kombinacemi ve známých koncentracích. *Taraxacum officinale* (TO), česky smetanka lékařská, též známá jako pampeliška, je vytrvalá bylina z čeledi hvězdnicovitých (Asteraceae). Je jednou z rostlin, využívaných v lidovém léčitelství už po celá staletí. Stala se proto nejen předmětem našeho zájmu, ale také tématem mnoha výzkumů, ať už v podobě extraktu z celé rostliny, nebo pouze její části, či odizolovaných obsahových látek, zejména ze skupiny flavonoidů, fenolových kyselin, triterpenů a fytosterolů (1,2,3,4). Cílem naší práce bylo porovnat účinek celého extraktu z kořene TO, a jednotlivých izolovaných látek, případně jejich kombinací na viabilitu myších nádorových linií.

Materiál a metodika

Buněčné kultury: Pro experimenty byly použity komerčně dostupné buněčné kultury, a to nenádorové a nádorové myší linie jater, plic a pojivové tkáně. Buňky plic byly zakoupeny u firmy ATCC® (Manassas, Virginie, USA), buňky pojivové tkáně a jater byly použity ze sbírky Ústavu fyziologie. Jedná se o adherentní buněčné linie, které se kultivují na kultivačním plastiku v živném médiu s 10% FBS, antibiotiky (penicilin, streptomycin) a jsou umístěny v inkubátoru v atmosféře s 5 % CO₂.

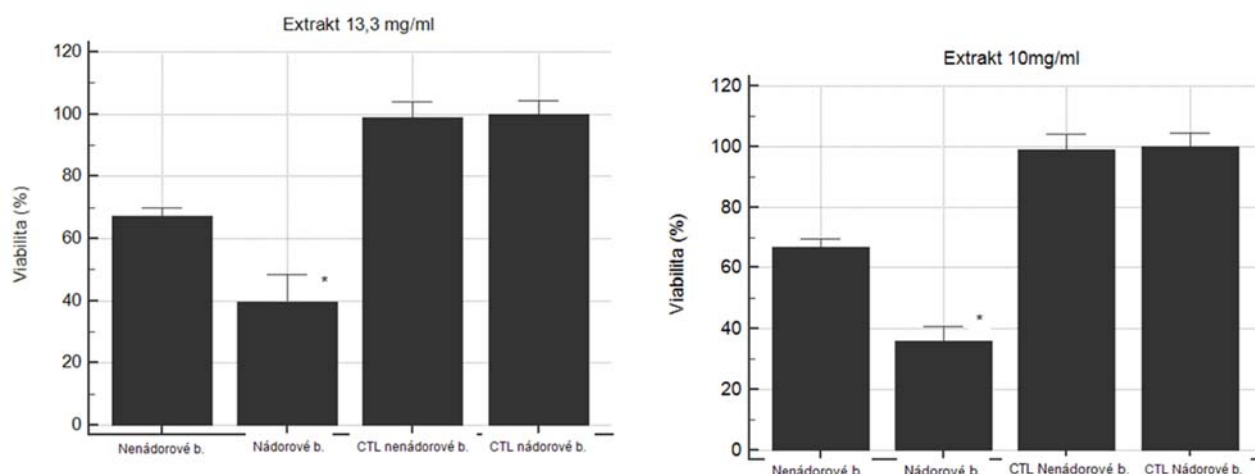
Přírodní látky: Extrakt se připravoval ve spolupráci s Ústavem přírodních léčiv FaF. Zkoušené látky, původně izolované z extraktu na ÚPL FaF, byly pro zajištění dostatečného množství zakoupeny ze Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Experimentální design: V první fázi se připravil extrakt z *Taraxacum officinale* (sběr, zpracování kořene, dvoustupňová extrakce methanolem a chloroformem, odpaření extraktu a naředění v příslušném kultivačním médiu), nebo testované látky – k. kávová, k. chlorogenová, k. ursolová (navážení a rozředění v příslušném kultivačním médiu). V druhé fázi se testovalo jejich působení na viabilitu buněčných linií. Experimenty na fyziologických a nádorových buňkách probíhaly současně, v průběhu celého roku. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny a srovnána účinnost jak jednotlivých látek, tak jejich kombinací, a také účinnost celého extraktu.

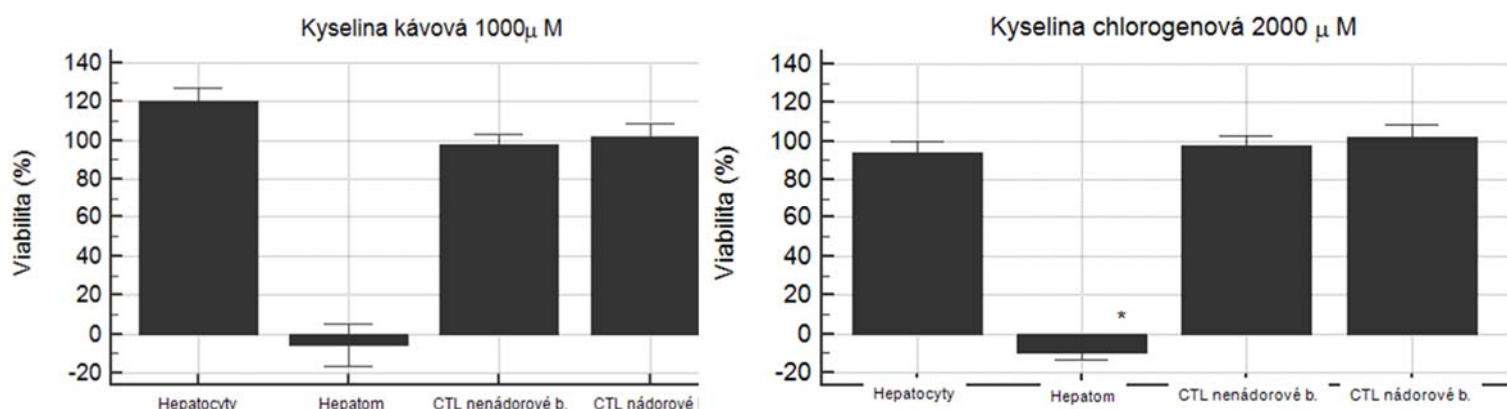
Analýza vzorků: Viabilita nádorových a nenádorových buněk bude hodnocena pomocí testu TACS MTT Cell Proliferation Assays (Trevigen, USA). Výsledky byly vyhodnocovány na přístroji M200 Infinite PRO (Tecan, CHE) na Oddělení virologie, Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie. Všechny analýzy probíhaly v multiplikátech (3-5) a byly 2-3krát opakovány. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí statistického software MedCalc. Hladina významnosti byla stanovena na $p < 0,05$.

Výsledky

Graf 1,2: Viabilita buněk pojivové tkáně při působení extraktu v koncentraci 13,3 mg/ml a 10 mg/ml.



Graf 1,2: Viabilita nádorových a nenádorových buněk jater při působení jednotlivých kyselin



Graf 3: Viabilita nádorových a nenádorových buněk jater při působení kyseliny ursolové

Graf 4: Viabilita nádorových a nenádorových buněk pojivové tkáně při působení kombinace kyselin kávové a chlorogenové

1) Nenádorové buňky a kyselina kávová (250 uM) a chlorogenová (1000 uM);

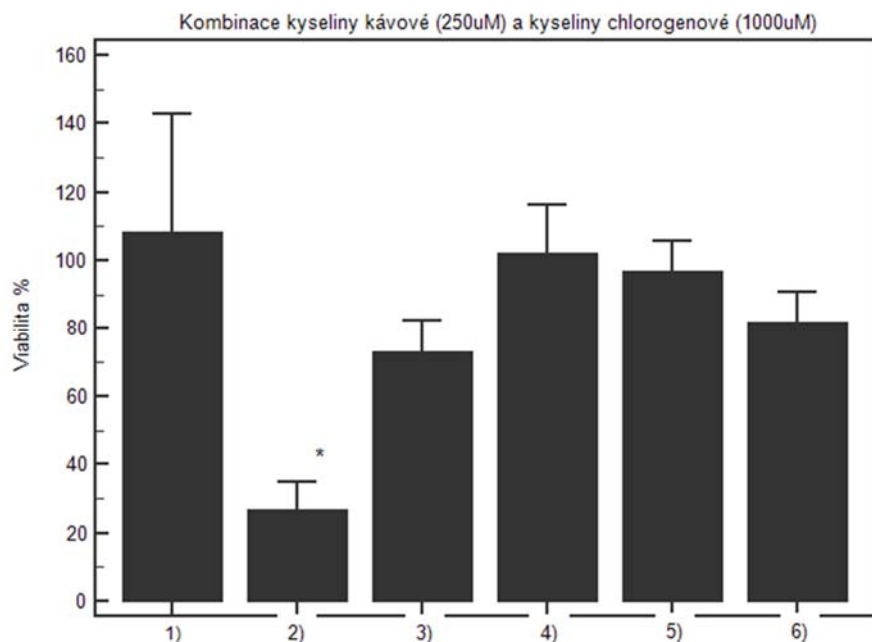
2) Nádorové buňky a kyselina kávová (250 uM) a chlorogenová (1000 uM);

3) Nenádorové buňky a kyselina kávová (250 uM);

4) Nádorové buňky a kyselina kávová (250 uM);

5) Nenádorové buňky a kyselina chlorogenová (1000 uM);

6) Nádorové buňky a kyselina chlorogenová (1000 uM)



Diskuse a závěr

Extrakt z *Taraxacum officinale* statisticky významně snižuje viabilitu nádorových buněk fibrosarkomu, konkrétně v dávkách 13,3 mg/ml a 10 mg/ml (viz Graf 1 a 2). Jeho cytotoxické

působení bylo rovněž u buněk plic signifikantně vyšší při dávkách větších než 6,7 mg/ml. Mezi nádorovými a nenádorovými buňkami však statisticky významný rozdíl nebyl. Dle předchozích studií vykazuje extrakt z pampelišky hepatoprotektivní efekt. Naše výsledky tuto teorii nevyvracejí. Viabilita nenádorových hepatocytů je dokonce vyšší, než viabilita negativní kontroly (tzn. hepatocyty inkubované v médiu). U buněk jater není statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a treatovanými buňkami.

Dalším krokem projektu bylo otestovat působení izolovaných kyselin, kávové, chlorogenové a ursolové na zmíněné buněčné linie. Byla prokázána selektivní cytotoxicita u všech tří kyselin na nádorové buňky jater v závislosti na dávce (viz Grafy 1,2,3). Dále kyseliny snižují viabilitu i u buněk pojivové tkáně a plic, kyselina chlorogenová v koncentraci 1000 μM selektivně snižuje viabilitu u nádorových buněk pojivové tkáně.

Posledním krokem bylo porovnání působení jednotlivých kyselin a jejich kombinací. Zde se projevil interakce mezi látkami. Zajímavý výsledek vykazuje kombinace kyseliny kávové (250 μM) a kyseliny chlorogenové (1000 μM) u buněk pojivové tkáně, kde došlo k výraznému prohloubení selektivity působení na buněčnou viabilitu. Dalším zajímavým výsledkem bylo snížení cytotoxicity kyseliny ursolové, která sama o sobě byla velmi agresivní, ale v kombinaci s kyselinou chlorogenovou byla viabilita nenádorových fibroblastů vyšší o 20%, než při použití samotné k. ursolové. Podobné výsledky byly prokázány i u nádorové linie jater, nikoliv však u buněk plic, kde, přestože viabilita byla ovlivňována v závislosti na dávce, mezi nádorovou a fyziologickou linií však nebyl rozdíl.

Prokázali jsme cytotoxický účinek celého extraktu z kořene *Taraxacum officinale*, který nekoreloval s výsledky jednotlivých kyselin. Potvrdil se tím fakt, že látky v extraktu mohou vykazovat jiný účinek, než jako izolované samostatně, neboť v extraktu se mohou uplatňovat vzájemné interakce.

Seznam literatury:

1. OVADJE, P., CHATTERJEE, S., GRIFFIN, C., TRAN, C., HAMM, C., & PANDEY, S. (2011). Selective induction of apoptosis through activation of caspase-8 in human leukemia cells (Jurkat) by dandelion root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(1), 86–91.
2. OVADJE, P., HAMM, C., & PANDEY, S. (2012). Efficient induction of extrinsic cell death by dandelion root extract in human chronic Myelomonocytic Leukemia (CMML) cells. *PLoS ONE*, 7(2).
3. OVADJE, P., SALEEM, A., GUERRERO, J., & THOR, A. J. (2016). Dandelion root extract affects colorectal cancer proliferation and survival through the activation of multiple death signalling pathways. *Oncotarget*.
4. PANDEY, S., CHATTERJEE, S. J., OVADJE, P., MOUSA, M., & HAMM, C. (2011). The efficacy of dandelion root extract in inducing apoptosis in drug-resistant human melanoma cells. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 110/2019/FVL

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Diverzita a prevalence zoonotických patogenů v drobných savcích na modelové lokalitě

Alena Balážová¹, Eva Jiroušová², Vojtech Baláž²

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Hlodavci jsou společně s letouny globálně nejvýznamnějšími rezervoárovými hostiteli zoonóz (Han et al., 2015). Případy výskytu některých zoonóz u člověka nebo domácích zvířat jsou monitorovány a hlášeny v rámci mezinárodních úmluv o zdraví lidí a zvířat (např. ECDC, OIE). Ve střední Evropě je známo přes 20 zoonóz, u kterých jsou významnými rezervoárovými hostiteli hlodavci, např. Lymská borelióza, ehrlichioza, leptospiróza (Han et al., 2015). Většina těchto nemocí má mírný průběh, ale u části postižených dochází k vážným komplikacím (např. Papa et al. 2010, Silva-Pinto et al., 2014). Pro svou relativní vzácnost jsou mnohé z těchto nemocí přehlíženy a nesprávně diagnostikovány.

Česká republika má velmi dobře zdokumentovanou faunu hlodavců a drobných savců, s podrobným přehledem o rozšíření jednotlivých druhů a jejich biotopových preferencí. Společenstva hlodavců se na konkrétní lokalitě mění v čase, jak vlivem vnitrodruhových populačních cyklů, změnami podmínek prostředí tak šířením nebo ubýváním druhů. Vymezení modelových lokalit a jejich dlouhodobý výzkum má potenciál zachytit změny v populacích a jejich promořenosti patogeny (Davis et al., 2005). Prostor venkova a rekreačních oblastí je z pohledu šíření hlodavci zprostředkovaných zoonóz obzvláště rizikové, protože zde snadno dochází ke kombinaci patogenů z volně žijících, synantropních a domácích zvířat, a také k těsnému kontaktu lidí s potenciálními přenašeči (Sharareh et al., 2017).

Naše místo odběru vzorků (obec Salaš) funguje již 6 let jako modelová lokalita pro výuku studentů veterinárních oborů. Díky tomu jsou z této lokality k dispozici záznamy o počtu odchycených jedinců a druhů, a odebrané vzorky tkání. Nasbíraný materiál umožnil podrobný průzkum spektra přítomných zoonotických patogenů, jejich hostitelského spektra, prevalence a variability v čase.

Materiál a metodika

Studovanou lokalitou je obec Salaš v pohoří Chřiby. Od roku 2014 zde každoročně probíhají odchvy hlodavců pomocí sklapovacích pastí s návnadou. Trapping effort, tj. počet položených pastí se mezi roky lišil, průměrně se každý rok provedlo přibližně 1200 past/nocí. V letech s nízkou úspěšností se počty položených pastí navyšovaly, tak aby se povedlo pro každý rok získat reprezentativní soubor vzorků. Na materiálu ze všech odchycených jedinců byly provedeny pitvy, makroskopická vyšetření, odběry vnitřních a vnějších makroparazitů a vzorků tkání. Soubor vzorků obsahuje tkáně v etanolu (játra, srdce, ledvina, slezina, sval) a sběry z r. 2019 byly také konzervovány v RNA pufru. Vzorky z předchozích let byly doplněny v sezóně 2019 do celkového počtu 504 zpracovaných jedinců náležejících k 7 druhům hlodavců (*Apodemus agrarius*, *A. flavicolis*, *A. sylvaticus*, *Microtus arvalis*, *Mus musculus*, *Myodes glareolus*, *Rattus norvegicus*) a 5 druhů hmyzožravců (*Sorex araneus*, *Sorex minutus*, *Crocidura suaveolens*, *Crocidura leucodon*, *Neomys fodiens*). V terénu obtížně odlišitelné druhy *Apodemus flavicolis* a *A. sylvaticus* nebyly druhově determinovány a nadále je označujeme jako *Apodemus* sp.

DNA z každého odchyceného jedince se izolovala ze směsi orgánových vzorků (játra, srdce, ledvina, slezina, sval), tak aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu patogenů s různými predilekčními orgány. Samotná izolace DNA byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel).

Přítomnost *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. a *Babesia* sp. jsme zjišťovali nově vyvinutými metodami (Balážová et al. *in prep.*). Pro *Anaplasma phagocytophilum* a *Rickettsia* sp. jsme použili duplex qPCR se specifickými hydrolyzačními sondami. *Babesia* sp. jsme detekovali pomocí qPCR s pomocí námi vyvinutých primerů určených k detekci *Babesia* s. stricto s mastermixem obsahujícím interkalační barvivo SYBR Green. Identita pozitivních výsledků byla následně testována pomocí analýzy teploty tání amplifikovaných fragmentů. *Borrelia burgdorferi* a *B. miyamotoi* byly detekovány pomocí individuálních qPCR. Pro *B. burgdorferi* jsme vycházeli z Leutenegger et al. (1999), v případě *B. miyamotoi* jsme použili primery a sondu dle Sato et al. (2014). Přítomnost *Leptospira interrogans* byla detekována pomocí duplex PCR (Ahmed et al. 2012) s následnou vizualizací produktů 1,5% agarózovém gelu. K průkazu *Bartonella* sp. jsme použili standardní PCR (Schorn et al, 2011). Vybrané pozitivní vzorky pro jednotlivé patogeny byly sekvenovány pro prokázání identity a identifikaci zaznamenaných linií.

Výsledky

V rámci odchycených hlodavců dominovaly myšice (*Apodemus flavicolis*, *A. sylvaticus*), norníci (*Myodes glareolus*) a relativně běžné byly také bělozubky (*Crocidura suaveolens*). U těchto taxonů jsme zaznamenali největší počet patogenů. Vzhledem k povaze biotopů (převážně okraje lesů) bylo odchyceno pouze 8 jedinců hraboše polního (*Microtus arvalis*), ale i tak v nich byly zaznamenány 3 cílové patogeny.

Tab. 1 Sumarizace záchytu cílových patogenů u jednotlivých druhů drobných savců

	<i>Apodemus</i> sp.	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Microtus arvalis</i>	<i>Sorex araneus</i>	<i>Sorex minutus</i>	<i>Crocidura suaveolens</i>	<i>Crocidura leucodon</i>
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	X	X	X			X		
<i>Rickettsia</i> sp.	X	X	X				X	X
<i>Babesia venatorum</i>	X	X	X				X	
<i>Leptospira interrogans</i>	X	X	X	X				
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.	X	X	X	X				X
<i>Borrelia miyamotoi</i>	?		?					
<i>Bartonella</i> sp.	X	X	X	X	X		X	

Tab. 1 Sumarizace zaznamenaných prevalencí patogenů u vybraných druhů drobných savců

	<i>Apodemus sp.</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Crocidura suaveolens</i>
<i>Borrelia burgdorferi</i> s.l.(%)	9.06 (27/297)	25.00 (8/32)	2.40 (3/125)	-
<i>Leptospira</i> (%)	5.72 (17/297)	3.13 (1/32)	12.00 (15/125)	-
<i>Anaplasma</i> (%)	8.75 (26/297)	6.25 (2/62)	4.80 (6/125)	-
<i>Rickettsia</i> (%)	7.07 (21/297)	6.25 (2/62)	1.60 (2/125)	24.00 (6/25)
<i>Babesia</i> (%)	5.05 (15/297)	3.13 (1/32)	1.60 (2/125)	4.00 (1/25)

Zaznamenalí jsme rozdíly v incidenci infekce různými patogeny u rezervoárových druhů (viz tab. 2) a mnohačetné případy multiinfekcí u rodu *Apodemus* a *Myodes*. *Leptospira* byla nalézána relativně nejčastěji u norníka rudého (*Myodes glareolus*), *Anaplasma phagocytophilum* u rodu *Apodemus* (*sylvaticus* + *flavicolis*). Přes omezený počet vzorků se zdá, že na lokalitě jsou hlavními rezervoáry *Borrelia burgdorferi* s.l. hraboše polní (*Microtus arvalis*) a myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*).

Seznam literatury:

- Ahmed SA, Sandai DA, Musa S, Hoe CH, Riadzi M, Lau KL, Tang TH. 2012. Rapid diagnosis of leptospirosis by multiplex PCR. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 19(3):9-16.
- Davis S., Calvet E., Leirs H. 2005: Fluctuating Rodent Populations and Risk to Humans from Rodent-Borne Zoonoses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5(4), 305-314.
- Han B. A., Schmidt J. P., Bowden S. E., Drake J. M. 2015: Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 7039-7044.
- Papa A., Zelená H., Barnetová D., Petroušová L. 2010: Genetic detection of Dobrava/Belgrade virus in a Czech patient with haemorrhagic fever with renal syndrome. *Clinical Microbiology and Infection*, 16:1187–1190.
- Sato, K., Takano, A., Konnai, S., Nakao, M., Ito, T., Koyama, K., ... Kawabata, H. (2014). Human infections with *Borrelia miyamotoi*, Japan. *Emerging infectious diseases*, 20(8), 1391–1393. doi:10.3201/eid2008.131761
- Schorn, S., Pfister, K., Reulen, H. *et al.* Occurrence of *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* in Bavarian public parks, Germany. *Parasites Vectors* 4, 135 (2011) doi:10.1186/1756-3305-4-135
- Sharareh N., Sabounchi N. S., Roome A., Spathis R., Garruto R. M. 2017: Model-based risk assessment and public health analysis to prevent Lyme disease. *Royal Society Open Science*, 4(11).
- Silva-Pinto A., de Lurdes Santos M., Sarmiento A. 2014: Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(6), 656-659.

Tato práce byla financovaná grantem IGA 220/2019/FVHE VFU Brno

Dynamika růstu *Bacillus cereus* ve vařených těstovinách uchovávaných při 24 °C

Šárka Bursová¹, Danka Haruštiaková², Lenka Necidová¹, Eliška Krobotová¹, Zuzana Mlejnková¹,
Matej Tkáč¹

*Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹; Masarykova univerzita, Brno²*

Úvod

Bacillus cereus je schopen vyvolat alimentární onemocnění dvou různých forem – emetický a diarhogenní syndrom (Bhunia, 2008). Emetický syndrom je typicky spojován se škrobnatými potravinami, jako jsou rýže a těstoviny (Tewari a Abdullah, 2015). Tepelné ošetření pokrmů vařením není z pohledu devitalizace spor *B. cereus* dostatečné. Vařené pokrmy by proto měly být konzumovány co nejdříve po přípravě, uchovávány při teplotách nad 60 °C nebo rychle zchlazeny pod 4 °C. Při těchto teplotách nemohou přítomné spory vyklíčit (Bhunia, 2008). Cílem práce bylo hodnocení růstu *B. cereus* ve vařených těstovinách uchovávaných 48 hodin při teplotě 24 °C. Sledován byl vliv typu inokula a složení těstovin. Vytvořené matematické modely byly použity k odhadu doby potřebné k namnožení bakterie na množství představující potenciální zdravotní riziko pro konzumenty.

Materiál a metodika

Testovacím médiem byly vařené těstoviny typu torti tří různých receptur – bezvaječné, vaječné a vyrobené ze semolinové mouky. Těstoviny byly připraveny vždy bezprostředně před zahájením pokusu dle pokynů výrobce. Po ukončení varu byly rychle zchlazeny propláchnutím sterilní destilovanou vodou o teplotě 5–6 °C. K inokulaci byla použita směs 6 sbírkových kmenů *B. cereus*. Těstoviny byly inokulovány suspenzí vegetativních buněk nebo spor.

Vařené těstoviny (bezvaječné/vaječné/semolinové) byly asepticky naváženy po 10 g do sterilních homogenizačních sáčků s filtrem. Byly připraveny 4 sady po 9 vzorcích. Vždy 3 sady vzorků byly inokulovány směsnou suspenzí (buňky/spory) tak, aby bylo dosaženo výchozí koncentrace řádově 2–3 log KTJ.g⁻¹. Čtvrtá sada bez přídavku *B. cereus* byla použita jako kontrola. Vzorky byly následně uchovávány při teplotě 24 °C po dobu 48 h. Počet *B. cereus* byl stanoven plotnovou metodou za použití Mannitol Yolk Polymyxine B agaru (Oxoid). Inokulované Petriho misky byly inkubovány aerobně při 30 °C po dobu 24 h. Individuální vzorky vařených těstovin byly vyšetřeny ihned po inokulaci (0 h) a poté v následujících časových intervalech: 3, 6, 8, 10, 12, 24, 31 a 48 h.

Získaná analytická data (KTJ.g⁻¹) byla nejprve logaritmičsky transformována za použití dekadického logaritmu. Z takto upravených dat byly spočítány průměrné hodnoty a směrodatné odchylky (IBM

SPSS Statistics, verze 22; IBM Corp., Armonk, NY, USA). K hodnocení dynamiky růstu sledovaných mikroorganismů byly použity 3 primární matematické modely sledující změnu počtu bakterií v čase – Baranyi-Robertsův model (Baranyi a Roberts, 1994), Gompertzův model (Gibson et al., 1988; Zwietering et al., 1990) a třífázový Buchananův model (Buchanan et al., 1997) (software R, verze 3.4.3 a knihovna nlsMicrobio).

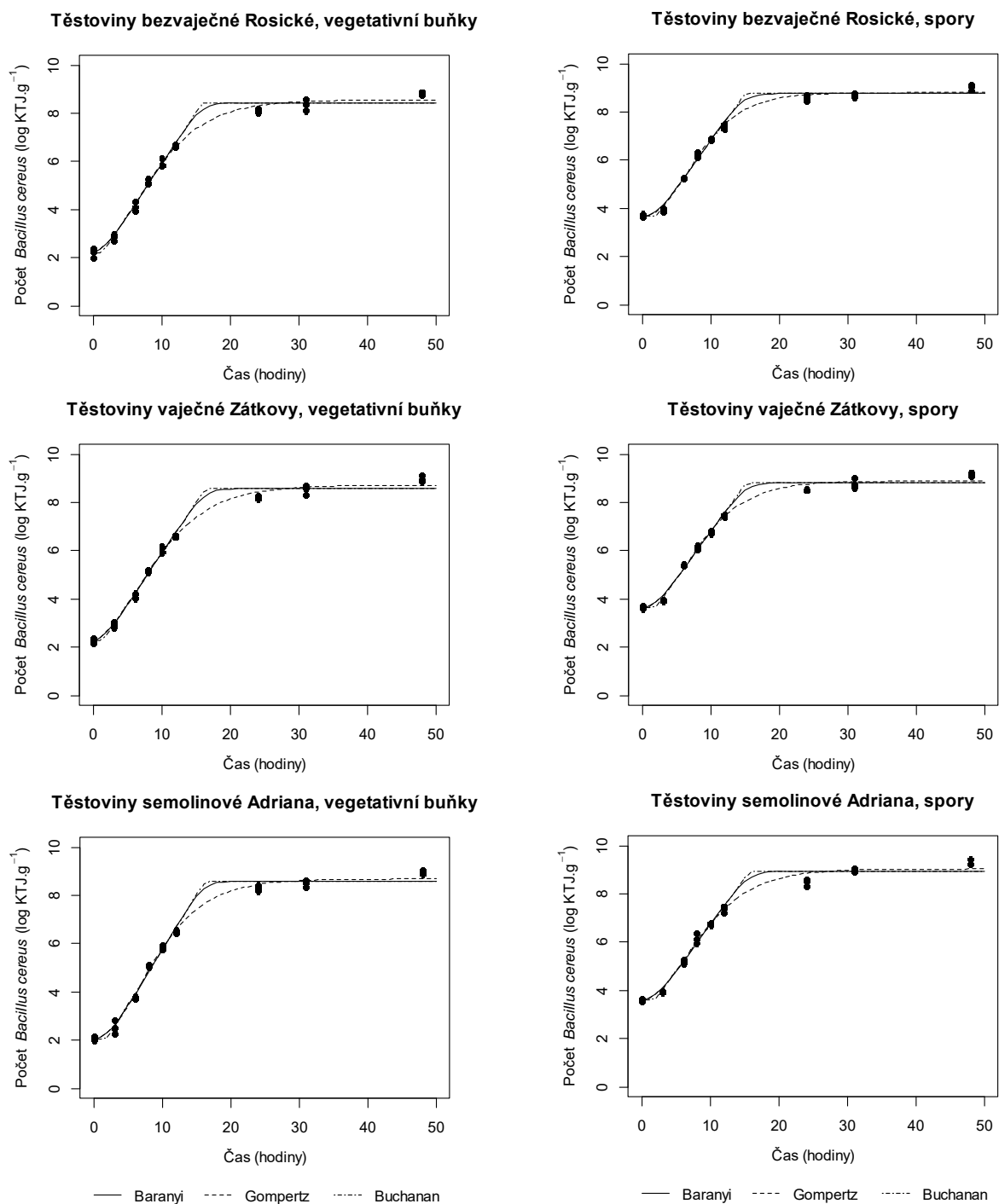
Výsledky

Po 48 hodinách skladování při 24 °C dosáhly maximální počty *B. cereus* ve vařených těstovinách hodnoty průměrně 9 log KTJ.g⁻¹, přičemž rozdíly mezi jednotlivými typy těstovin a použitými inokuly byly minimální. Ve všech kontrolních vzorcích (těstoviny bez přídavku *B. cereus*) byl stanoven počet *B. cereus* < 1,70 log KTJ.g⁻¹, tj. pod mezí detekce použité plotnové metody.

Na obrázku 1 jsou uvedeny vytvořené růstové křivky *B. cereus* v jednotlivých typech vařených těstovin uchovávaných při 24 °C. Ve všech případech byly vytvořené růstové křivky kompletní. Na základě nejnižší hodnoty RSE (reziduální standardní chyba) a nejvyšší hodnoty R² (druhá mocnina korelace pozorovaných hodnot a hodnot predikovaných modelem) byl jako nejpřesnější vyhodnocen model Gompertzův (data neuvedena).

K zhodnocení dynamiky růstu byly použity základní kinetické parametry vytvořených modelů – doba trvání lag fáze a rychlost růstu bakteriální populace. Průměrná predikovaná délka lag fáze se pohybovala přibližně v rozmezí 1–2 hodiny. Významné rozdíly mezi typem těstovin (bezvaječné/vaječné/semolinové) zjištěny nebyly. Stejně tak délku lag fáze významně neovlivnil typ použitého inokula (vegetativní buňky/spory). Podobně tomu bylo i v případě rychlosti růstu, opět nebyl prokázán významný vliv typu těstovin či použitého inokula. Průměrná predikovaná rychlost růstu byla 0,9–1,0 ln KTJ.g⁻¹.h⁻¹.

Hodnota pH vařených těstovin během 48 hodin skladování mírně kolísala (6,35–5,86), rozdíly mezi jednotlivými typy těstovin byly minimální. Aktivita vody byla prakticky konstantní, a_w = 0,985. Vzhledem k tomu, že *B. cereus* roste a množí se při pH 4,3–9,3 a minimální aktivitě vody 0,92 (Kramer a Gilbert, 1989), lze konstatovat, že hodnota pH ani aktivita vody neměly na růst *B. cereus* ve vařených těstovinách významný vliv.



Obrázek 1. Pozorované (symbol) a predikované (linie) hodnoty počtu *Bacillus cereus* ve vařených těstovinách uchovávaných při teplotě 24 °C (●) po dobu 48 h. Těstoviny inokulované suspenzí vegetativních buněk a spor na výchozí koncentraci 2–3 log KTJ.g⁻¹. Gompertzův model byl použit k odhadu doby potřebné k namnožení *B. cereus* na rizikové množství 3, 5 a 8 log KTJ.g⁻¹ (tabulka 1). Při uchovávání vařených těstovin při teplotě 24 °C dojde k namnožení bakterie na kritické množství 5 log KTJ.g⁻¹ během méně než 8,5 hodin. Podobně 14,4 až 19,4 h je potřeba k namnožení na 8 log KTJ.g⁻¹.

Tabulka 1. Doba skladování potřebná k namnožení *B. cereus* ve vařených těstovinách při 24 °C na kritické množství. Čas skladování (hodiny) predikovaný Gompertzovým modelem.

Druh těstovin, inokulum	Doba (hodiny) potřebná k dosažení kritické koncentrace <i>Bacillus cereus</i>		
	3 log KTJ.g ⁻¹	5 log KTJ.g ⁻¹	8 log KTJ.g ⁻¹
bezvaječné, vegetativní buňky	3,2	7,8	19,4
bezvaječné, spory	0 ^a	5,5	14,4
vaječné, vegetativní buňky	3,1	7,8	18,8
vaječné, spory	0 ^a	5,4	14,7
semolinové, vegetativní buňky	4,0	8,3	18,3
semolinové, spory	0 ^a	5,5	14,8

^a koncentrace 3 log KTJ.g⁻¹ bylo dosaženo ihned po inokulaci vzorků

Závěr

Vařené těstoviny jsou vhodným médiem pro růst a množení *B. cereus*. Spory mohou přežít přípravu, záhřevem dochází k jejich aktivaci. Při dlouhém a nedostatečném zchlazení, velkém množství uvařených těstovin a jejich uchovávání při pokojové teplotě může již během několika hodin dojít k namnožení bakterie na hodnoty představující zdravotní riziko pro konzumenty.

Seznam literatury:

- 1) BARANYI, J., ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, vol. 23, no. 3–4, p. 277–294.
- 2) BHUNIA, A. K. *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In: BHUNIA, A. K. (Ed.): *Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis*. 1st ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008a. p. 135–148. ISBN: 978-0-387-74536-7.
- 3) BUCHANAN, R. L., WHITING, R. C., DAMERT, W. C. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology*, 1997, vol. 14, no. 4, p. 313–326.
- 4) GIBSON, A. M., BRATCHELL, N., ROBERTS, T. A. Predicting microbial growth – growth responses of Salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 1988, vol. 6, no. 2, p. 155–178.
- 5) TEWARI, A., ABDULLAH, S. *Bacillus cereus* food poisoning: international and Indian perspective. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, vol. 52, no. 5, p. 2500–2511.
- 6) ZWIETERING, M. H., JONGENBURGER, I., ROMBOUITS, F., VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, vol. 56, no. 6, p. 1875–1881.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno projekt 211/2019/FVHE

Komplexní zhodnocení negativních účinků vybraných organických UV filtrů na ryby

Jana Cahová, Jana Blahová, Viola Zentrichová, Nela Maňáková, Adéla Vítovcová

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

Úvod

UV filtry se běžně přidávají do širokého spektra kosmetických výrobků za účelem ochrany organismu před škodlivými účinky UV záření. Mimo jiné tyto sloučeniny můžeme také nacházet v různých textilních výrobcích, plastech či barvách, kde plní funkci ochrany daného materiálu před fotodegradací vlivem UV záření. V důsledku častého používání uvedených produktů může následně docházet k jejich vstupu do vodního ekosystému a ovlivnění necílových organismů. Do vody se dostávají nejen přímo v letním období v průběhu různých rekreačních aktivit, ale také nepřímo při jejich nedokonalém odstranění ze splaškových vod v průběhu čistírenských procesů (Miletín, 2011). Ve vodním prostředí je následně můžeme detekovat jak v abiotických (voda, sediment), tak i biotických matricích (vodní organismy). Jejich koncentrace je v jednotlivých matricích variabilní a významně závisí na lokalitě a ročním období (Gago-Ferrero et al. 2015).

Organické UV filtry představují významnou skupinu kontaminantů, jejichž spotřeba a následná přítomnost ve vodním ekosystému se během posledních let významně zvýšila. Společně s léčivy a dalšími zástupci produktů využívaných pro osobní péči se UV filtry řadí mezi tzv. moderní „pseudoperzistentní“ mikropolutanty. Mezi nejvýznamnější zástupce řadíme několik strukturních typů látek, jako jsou *p*-aminobenzoáty, benzofenony, deriváty kafru a kyseliny skořicové (cinnamáty), dibenzoylmethany, salicyláty, triaziny, benzimidazoly a další (Miletín, 2011).

Z hlediska akutní toxicity jsou organické UV filtry většinou netoxické. Výjimkou jsou ovšem někteří zástupci jako je např. ethylhexyl methoxycinnamát (EHMC) nebo 4-methylbenzyliden camphor (4-MBC), u kterých byla prokázána i akutní toxicita, a to především u řas či bezobratlých (Paredes et al. 2014). Významnější riziko tyto látky představují především z pohledu chronického působení, kdy negativní vlivy byly zaznamenány již při expozici environmentálně relevantním koncentracím. Toxikologické studie prokázaly u vybraných zástupců schopnost narušit antioxidační ochranu, způsobit vývojovou toxicitu nebo genotoxicitu (Fong et al. 2016; Quintaneiro et al. 2019). Autoři Quintaneiro et al. (2016) uvádějí negativní působení látky 4-MBC na vývoj embrya, neboť po aplikaci 4-MBC došlo u embryí ke vzniku perikardiálního edému a ke snížení tepové frekvence. Nejzávažnějším účinkem organických UV filtrů je ovšem schopnost narušovat fyziologické funkce endokrinního systému, kdy studie na rybách potvrdily u některých

zástupců zvýšenou syntézu vitellogeninu u samců a histopatologické nálezy na samčích gonádách (Christen et al. 2011). Lee et al. (2019) také uvádějí, že EHMC může ovlivňovat fyziologické funkce štítné žlázy. Ačkoliv je problematice toxicity UV filtrů v posledních letech věnována intenzivní pozornost, stále nejsou k dispozici kompletní údaje o jednotlivých zástupcích a jejich účincích na vodní organizmy, a to především na ryby.

Materiál a metodika

Hodnocení potenciálních negativních účinků organických UV filtrů bylo realizováno zpracováním vzorků získaných v rámci dvou testů toxicity. V prvním, subchronickém testu na juvenilním stádiu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*), byla látka EHMC aplikována v krmných peletách. Druhá část experimentu se zaměřila na stanovení embryotoxicity vybraných zástupců organických UV filtrů.

V první fázi byly zpracovány vzorky získané v rámci subchronického testu toxicity, který probíhal po dobu 6-ti týdnů v semistatickém systému na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství (Mendelova univerzita v Brně). Testovány byly celkem 3 koncentrace EHMC (10, 100 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), kontrolní skupina byla krmena komerčním krmivem bez přídavku EHMC. Krmné pelety s přídavkem testované látky byly připraveny smícháním krmiva s rozpuštěným standardem a speciálním kopolymerem Eudragit E, který umožní ukotvit a stabilizovat povrch pelet s adherovanou látkou. Ryby byly krmeny 3x denně v celkové dávce 1,5 % celkové hmotnosti ryb. V průběhu experimentu byly dvakrát denně kontrolovány chemické parametry vody (teplota, koncentrace, koncentrace amoniakálního dusíku, dusitanového dusíku a chloridů). Po ukončení experimentu byly odebrány vzorky krve pro hematologické (počet leukocytů a erytrocytů, hemoglobin, hematokrit, leukogram) a biochemické (albumin, celkový protein, glukóza, alkalická fosfatáza, alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, cholesterol, triacylglyceroly, vápník, fosfor, amoniak, laktát, laktátdehydrogenáza a kreatinin) vyšetření. Zbylé vzorky plazmy byly zamrazeny pro následnou analýzu vybraných ukazatelů oxidativního stresu (ceruloplasmin, redukční potenciál plazmy) a markerů endokrinní disrupce (vitellogenin, hormony štítné žlázy). Po odběru krve byly u každého jedince stanoveny základní morfologické ukazatele (hmotnost, délka těla, výška a šířka těla, hmotnost jater). Pro komplexní hodnocení vlivu EHMC na ryby byly dále odebrány vybrané tkáně pro analýzu oxidativního stresu (kataláza, glutathionperoxidáza, glutathionreduktáza, glutathion-S-transferáza, lipidní peroxidace). Vybrané tkáně (žábra, játra, přední a zadní ledvina, kůže, slezina) byly také odebrány pro histologické vyšetření.

Dále byly realizovány embryonální testy na dáníu pruhovaném (*Danio rerio*), kde byla hodnocena akutní toxicita vybraných UV filtrů na raná vývojová stádia. Čerstvě oplozené jikry byly

exponovány v mikrotitračních destičkách po dobu 96 hodin látkám EHMC a PBSA (fenylobenzimidazol sulfonová kyselina) v koncentracích 0,1, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 a 2 000 $\mu\text{g/l}$ a látky 4-MBC v koncentracích 0,1, 1, 10, 50, 100 a 250 $\mu\text{g/l}$. Po 24 hodinových intervalech byla hodnocena mortalita s využitím vybraných indikátorů (koagulace, absence somitů, neoddělení ocasu, absence srdečního tepu) a dále byly také sledovány subletální malformace (např. deformace, edémy).

Statistické zpracování získaných výsledků bylo provedeno pomocí statistického programu Unistat for Excel 5.6. Data ze subchronického testu toxicity, ve kterém byl posuzován negativní účinek EHMC podávaný v krmivu, byla v první fázi testování podrobena hodnocení normality (Shapiro-Wilkův test). Pokud data splňovala podmínku normálního rozdělení, bylo pro další testování použito parametrického testu – Tukey-HSD. Pokud nebyla splněna podmínka normality, bylo pro zjištění rozdílu mezi hodnocenými parametry využito neparametrického vícevýběrového mediánového testu. K posouzení rozdílů četností jednotlivých ukazatelů sledovaných v embryonálních testech toxicity (mortalita, líhnutí, výskyt morfologických změn) byly využity kontingenční tabulky 2x2. Statistická významnost byla hodnocena na hladině $p < 0,05$.

Výsledky a závěr

Subchronický test toxicity na pstruhu duhovém – hodnocení EHMC v krmivu. Při sledování morfologických ukazatelů po ukončení experimentu byly zjištěny statisticky významné změny pouze v šířce těla. U skupiny vystavené nejvyšší testované koncentraci (1000 $\mu\text{g/kg}$) došlo ke statisticky významnému zvýšení uvedeného ukazatele. U ostatních parametrů bylo patrné zvýšení sledovaných ukazatelů, ale nebylo testováno jako statisticky významné. V rámci experimentu nebyly pozorovány žádné změny v chování. Z výsledků hematologického vyšetření bylo zjištěno, že vlivem EHMC v koncentraci 1000 $\mu\text{g/kg}$ došlo ke statisticky významnému snížení počtu leukocytů. U ostatních hematologických parametrů nebyly potvrzeny žádné statisticky významné změny. Výsledky biochemického vyšetření jsou uvedeny v tabulce č. 1. Statisticky významné změny byly zaznamenány především v experimentálních skupinách vystavených EHMC v koncentraci 100 a 1000 $\mu\text{g/kg}$. Při sledování ukazatelů oxidativního stresu v krvi bylo zaznamenáno snížení redukčního potenciálu plazmy, který byl testován jako statisticky významný u všech testovaných skupin. Nebyly zjištěny statisticky významné změny v koncentraci ceruloplasminu.

Tabulka 1: Výsledky biochemického vyšetření krevní plazmy po 6-týdenní expozici EHMC v krmivu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru (a, b, c – rozdílná písmena indikují statistickou významnost $p < 0,05$) (ALP – alkalická fosfatáza, ALT –

alaninaminotransferáza, AST – aspartátaminotransferáza. LDH – laktátdehydrogenáza, TAG - triacylglyceroly, FRAP – redukční potenciál plazmy)

Parametr	kontrola	10 µg/kg	100 µg/kg	1000 µg/kg
albumin (g/l)	12,8 ± 0,4^a	10,6 ± 0,5^{a,b}	10,3 ± 0,7^b	9,8 ± 0,7^b
ALP (µkat/l)	1,8± 0,1	1,9± 0,2	1,4± 0,1	1,4± 0,1
ALT (µkat/l)	0,3±0,03	0,3±0,02	0,3±0,02	0,3±0,03
AST (µkat/l)	5,7±0,5	6,7±0,4	5,7±0,4	7,3±0,6
amoniak (µmol/l)	513,3±21,6^a	418,0±26,2^b	371±16,6^b	376,8±13,3^b
bílkovina (g/l)	37,5±0,7^a	34,7±0,9^{a,b}	33,3±1,1^b	31,6±1,1^b
cholesterol (mmol/l)	8,7±0,2^a	7,3±0,4^b	7,1±0,3^b	6,7±0,4^b
fosfor (mmol/l)	3,5±0,1	3,7±0,2	3,4±0,2	3,7±0,2
glukóza (mmol/l)	4,3±0,2^a	4,8±0,2^{a,c}	5,2±0,2^{b,c}	5,8±0,3^b
kreatinin (µmol/l)	25,8±1,7	28,0±1,2	25,2±1,8	23,0±1,9
LDH (µkat/l)	3,4±7,0	32,3±3,3	34,6±3,6	45,3±5,1
laktát (mmol/l)	3,1±0,4^a	4,1±0,5^a	4,0±0,4^a	5,0±0,5^b
TAG (mmol/l)	2,9±0,2^a	2,1±0,2^b	2,0±0,2^b	2,0±0,2^b
vápník (mmol/l)	2,8±0,1	3,0±0,1	2,8±0,1	2,9±0,1
FRAP (µmol/l)	896,0±21,6^a	736,2±21,3^b	726,3±31,0^b	727,0±31,5^b
ceruloplazmin (ΔA/min x 10000)	138,5±8,2	132,3±8,0	135,6±9,1	128,6±8,0

Embryonální test na dániu pruhovaném. Při sledování mortality nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou, a to ani u jednoho z testovaných UV filtrů. Nebyl také potvrzen výskyt morfologických změn. Při hodnocení líhnutí, bylo při pozorování po 72 h zaznamenáno u experimentální skupiny vystavené 50 a 2000 µg/l EHMC dřívější líhnutí. Dřívější líhnutí bylo také zaznamenáno v některých experimentálních skupinách exponovaných PBSA, rozdíly ovšem nebyly hodnoceny jako statisticky významné. Při sledování embryotoxicity 4-MBC byla naopak zaznamenáno snížené líhnutí po 72 h, které ovšem nebylo hodnoceno jako statisticky významné. Ačkoli se vyskytovaly v rámci testovaných koncentrací 4-MBC malformace a deformity (edém perikardu, totální deformace embrya, nevyvinuté oči), nebyla četnost těchto změn testována jako statisticky významná. Z uvedených výsledků je zřejmé, že v námi testovaných podmínkách se nepodařilo prokázat vývojovou toxicitu látky 4-MBC, jak uvádějí autoři Quintaneiro et al. (2019).

Seznam literatury:

- Fong, H.C., Ho, J.C., Cheung, A.H., Lai, K.P., Tse, W.K. Developmental toxicity of common UV filter, benzophenone-2, in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 2016, **164**, 413–420. ISSN: 0045-6535.
- Gago-Ferrero, P, Díaz-Cruz, M.S., Barceló, D. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of the Total Environment*. 2015, **518–519**, 518–525. ISSN: 0048-9697.
- Christen, V., Zucchi, S., Fent, K. Effects of the UV-filter 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquatic Toxicology*. 2011, **102**, 167–176. ISSN: 0166-445X.
- Lee, I., Lee, J., Jung, D., Kim, S., Choi, K. Two generation exposure to 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (EHMC) in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and its reproduction and endocrine related effects. *Chemosphere*. 2019, **228**, 478-484. ISSN: 0045-6535.
- Miletín, M. Prostředky na ochranu pokožky proti škodlivým vlivům UV záření. *Praktické lékařství*. 2011, **7**, 34–38. ISSN: 1801-2434.
- Paredes, E., Perez, S., Rodil, R., Quintan, J.B., Beiras, R.. Ecotoxicological evaluation of four UV filters from different trophic levels *Isochrysis galbana*, *Mytilus galloprovincialis*, *Paracentrotus lividus* and *Siriella armata*. *Chemosphere*. 2014, **104**, 44-50. ISSN: 0045-6535.
- Quintaneiro, C., Teixeira, B., Benedé, J.L., Cisvert, A., Soares, A.M.V.M., Monteneiro, M.S. Toxicity effects of the organic UV-filter 4-methoxybenzylidene camphor in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 2019, **218**, 273-281. ISSN: 0045-6535.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 226/2019/FVHE

Komparativní genomika izolátů a plazmidů aeromonád rezistentních k antimikrobiálním látkám z ryb v České republice

Monika Dolejská¹, Hassan Tarabai¹, Jana Palkovičová¹, Matej Medvecký², Jiří Kolář¹, Alois Čížek³
¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²CEITEC, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ³Ústav mikrobiologie a imunologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Intenzivní chov ryb je spojen s vysokým rizikem bakteriálních infekcí, které vyžaduje profylaktické a terapeutické použití antimikrobiálních látek. Aeromonády jsou gramnegativní bakterie úzce spojené s prostředím sladkých i slaných vod. U ryb vyvolávají různá infekční onemocnění, například hemoragické septikémie nebo vředovitá onemocnění. Aeromonády jsou rovněž vhodnými indikátorovými bakteriemi pro studium incidence a vývoje antibiotické rezistence převážně ve vodním prostředí (1). Komparativní genomika s využitím celogenomového sekvenování představuje důležitý nástroj pro identifikaci vysoce patogenních kmenů aeromonád a k popisu jejich vlastností. Informace o epidemiologii aeromonád, šíření patogenních typů v chovech ryb, jejich sdružení s faktory virulence a rezistencí k antibiotikům však v České republice chybí nebo jsou tato data velmi omezená. Cílem této studie byl detailní popis a komparace souboru izolátů aeromonád rezistentních k antibiotikům z českých ryb s využitím celogenomového sekvenování a poskytnutí nových informací o jejich patogenitě a epidemiologii.

Materiál a metodika

V rámci studie bylo provedeno celogenomové sekvenování 4 izolátů *Aeromonas salmonicida* ze pstruhů duhových a 10 izolátů *Aeromonas veronii* z kaprů obecných dle níže uvedené metodiky. Izoláty byly získány z případů infekcí ryb chovaných v ČR. U všech izolátů byl zároveň testován horizontální přenos plazmidů a byla stanovena kompletní sekvence 12 vybraných plazmidů.

Horizontální přenos rezistence a typizace plazmidů

Přenos plazmidů nesoucích geny rezistence k antibiotikům se zaměřením na fluorochinolony byl testován pomocí konjugačních experimentů do laboratorních kmenů *A. veronii* Ae9, *A. hydrophila* ATCC 7966 a *A. salmonicida* Ae25. Přítomnost zájmových genů rezistence u získaných transkonjugantů, kteří přijaly rezistentní plazmid, byl potvrzen metodou PCR. V případě neúspěšné

konjugace byla izolována plazmidová DNA fenol-chloroformovou extrakcí přenesena do laboratorního kmene transformací. Následně byla u takto získaných transkonjugantů/transformantů zhodnocena přítomnost a velikost plazmidů pomocí PFGE s využitím enzymu S1 (1).

Příprava DNA knihoven a sekvenování

Genomová DNA izolátů aeromonád byla izolována kitem NucleoSpin® Tissue, zatímco plazmidová DNA transformantů kitem GenoPure Midi, Invitrogen. Po kontrole kvality a kvantity byla tato DNA následně použita pro přípravu knihoven pomocí kitu Nextera XT. Vlastní sekvenování bylo provedeno na přístroji MiSeq Illumina.

Bioinformatická analýza dat

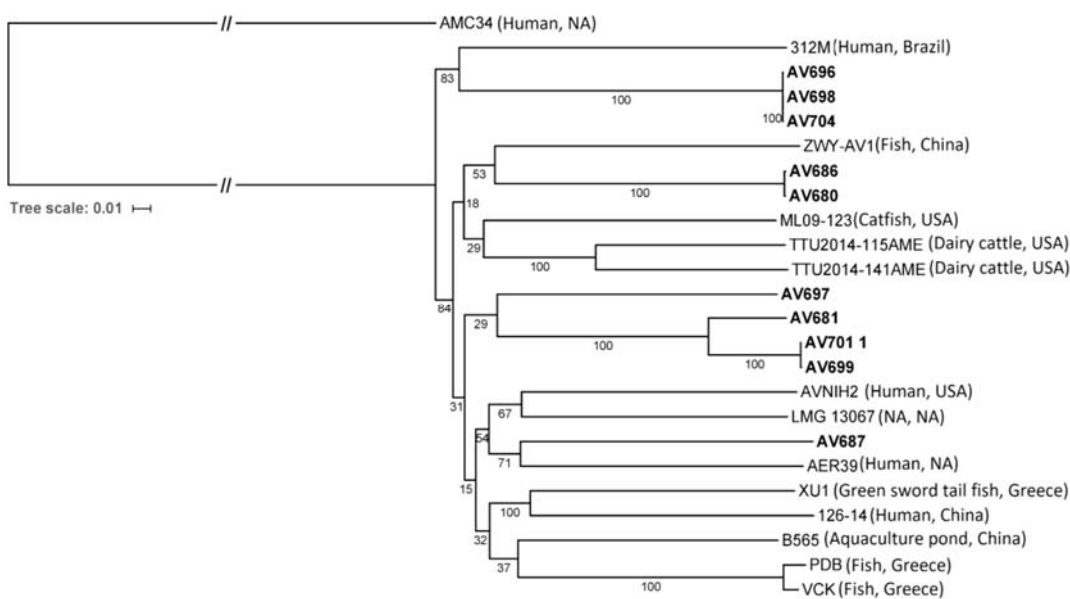
Získané výsledky byly podrobeny kontrole kvality a surová data byla následně assemblována s využitím programu SPAdes. Výsledné contigy byly použity ke stanovení sekvenčních typů izolátů a typizaci plazmidů za využití online CGE programů (2). Byla provedena fylogenetická analýza izolátů včetně referenčních genomů a vizualizace výsledků v podobě fylogenetického stromu. Sekvence plazmidů nesoucích geny rezistence k fluorochinolonům byly anotovány a analyzovány pomocí bioinformatických nástrojů (algoritmus BLAST, Geneious, RAST, Prokka, IS Finder). V sekvencích plazmidů byly hledány geny pro přenos konjugací či mobilizací, geny pro rezistenci k antibiotikům a dezinfekčním látkám a faktory virulence (3).

Výsledky

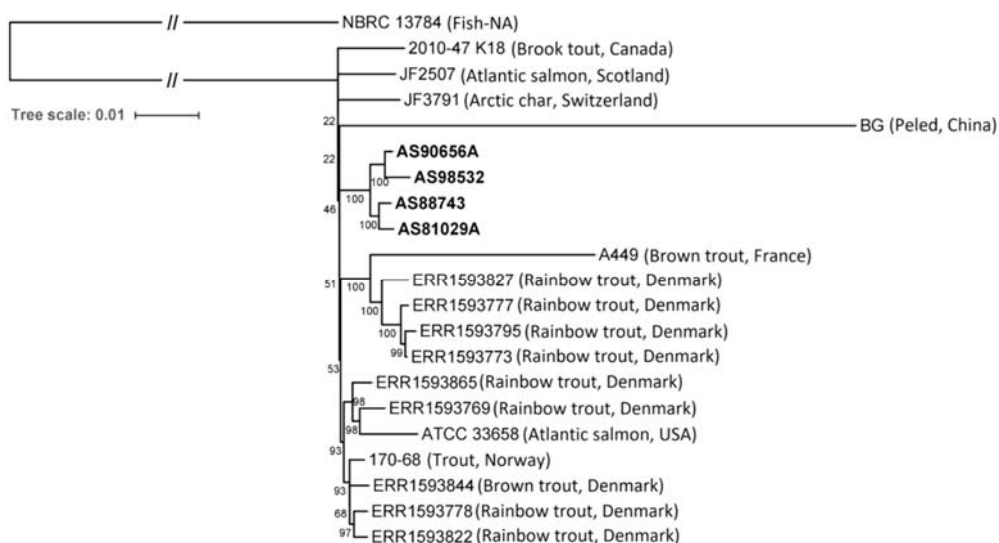
Celogenomové sekvenování vyšetřeného souboru izolátů ukázalo na vysokou genetickou variabilitu izolátů *A. veronii* (Obrázek 1A). Metoda multi-locus sequence typing zařadila izoláty k různým sekvenčním typům neboli ST (ST42 a single-locus variant, ST67) a více než polovina izolátů vykazovala doposud nepopsanou kombinaci alel a náleželo tak k novým ST (Tabulka 1). Rezistence k fluorochinolonům byla spojena s genem *qnrS2*. Všechny izoláty *A. veronii* byly rezistentní k tetracyklinu a rezistence byla kódována genem *tet(E)*. U většiny izolátů byly nalezeny geny rezistence k beta-laktamovým antibiotikům *bla*_{CEPH-A3-like} (60%) a *bla*_{OXA-12-like} (50%).

Genetická variabilita *A. salmonicida* byla nízká a fylogenetická analýza *rpoB* sekvence je zařadila do jednoho klastru (Obrázek 1B) a všechny izoláty náležely do epidemické linie ST2 (Tabulka 1). Dva izoláty vykazovaly rezistenci k tetracyklinu kódovanou genem *tet(A)*, dále nesly geny *strA* a *aph(6)-Id* pro rezistenci k aminoglykosidům, gen *sul3* pro rezistenci k sulfonamidům a integron

třídy 1 s genovou kazetou *dfrA14* pro rezistenci k trimetoprimu. Rezistence k fluorochinolonům byla u všech izolátů spojena s genem *qnrS2*. Izoláty *A. salmonicida* nesly 6 různých genů virulence. Konjugativní přenos plazmidů nesoucích gen *qnrS2* nebyl úspěšný u žádného z analyzovaných izolátů. Naproti tomu přenos plazmidů transformací laboratorních kmenů byl úspěšný v případě všech izolátů. Následná sekvenční analýza plazmidů ukázala, že gen *qnrS2* se nachází uvnitř mobilní inzerční kazety ohraničené přímými a obrácenými repeticemi nesené různými skupinami plazmidů. Plazmidy nesoucí gen *qnrS2* zahrnovaly velké multirezistentní plazmidy IncU o velikosti 34 kb (2 izoláty *A. salmonicida*) a malé mobilizovatelné plazmidy s různou velikostí (4-10 kb). Studované plazmidy nenesly žádné známé geny virulence.



A



B

Obrázek 1: Fylogenetická analýza založená na sekvenci genu *rpoB* izolátů *A. veronii* (A) a *A. salmonicida* (B). Izoláty z českých ryb vyšetřených v rámci studie jsou uvedeny tučně. U referenčních sekvencí je uveden původ a stát v závorce za názvem sekvence; pokud není tato informace dostupná, je uvedeno “NA”.

Izolát č.	Identifikace	ST	Geny rezistence											Geny virulence					Plazmid s <i>qnrS2</i>				
			<i>tet</i>	<i>bla</i> _{CEPH-A3}	<i>bla</i> _{OXA-12}	<i>ampS</i>	<i>dfrA14</i>	<i>strA</i>	<i>aph(6)-Ia</i>	<i>sul3</i>	<i>ahh1</i>	<i>asa1</i>	<i>act</i>	<i>ast</i>	<i>asvC</i>	<i>eno</i>	<i>aex1</i>	typ	velikost (bp)				
AV699	<i>A. veronii</i>	42	E																				
AV701/1	<i>A. veronii</i>	42	E																				10454
AV681	<i>A. veronii</i>	42-like	E																		repB	4043	
AV697	<i>A. veronii</i>	42-like	E																		repB	4043	
AV687	<i>A. veronii</i>	67	E																		repB	4041	
AV680	<i>A. veronii</i>	n	E																		repB	4043	
AV686	<i>A. veronii</i>	n	E																		repB	4043	
AV696	<i>A. veronii</i>	n	E																		repB	4043	
AV698	<i>A. veronii</i>	n	E																				
AV704	<i>A. veronii</i>	n	E																		repB	4043	
AS90656A	<i>A. salmonicida</i>	2																					
AS95832	<i>A. salmonicida</i>	2																					
AS81029A	<i>A. salmonicida</i>	2	A																		IncU	34541	
AS88743	<i>A. salmonicida</i>	2	A																		IncU	34541	

n, nový ST.

Tabulka 1: Výsledky celogenomového sekvenování aeromonád

Seznam literatury:

1. DOBIASOVA, Hana, KUTILOVA Iva, PIACKOVA, Veronika, VESELY, Tomas, CIZEK, Alois, DOLEJSKA, Monika. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology*, 2014, **171**(3-4): 413-421.
2. MANGA, Ivan, HASMAN Henrik, SMIDKOVA Jana, MEDVECKY Matej, DOLEJSKA Monika, CIZEK Alois. Fecal Carriage and Whole-Genome Sequencing-Assisted Characterization of CMY-2 Beta-Lactamase-Producing Escherichia coli in Calves at Czech Dairy Cow Farm. *Foodborne Pathogen Diseases*, 2019, **16**(1): 42-53.
3. DOBIASOVA Hana, VIDENSKA Petra, DOLEJSKA Monika. Complete Sequences of IncU Plasmids Harboring Quinolone Resistance Genes *qnrS2* and *aac(6)-Ib-cr* in *Aeromonas* spp. from Ornamental Fish. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2015, **60**(1): 653-657.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 205/2019/FVHE

Seeds-oil dressings heat stability assessment using principal component analysis

Dani Dordevic¹, Simona Jancikova¹, Alejna Krilic²

¹Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic,

²Faculty of Agricultural and Food Sciences, University of Sarajevo

Introduction

The cold pressed edible plant oils are more popular among consumers mainly because they are starting to be more informed about health benefits of these oils. The technological process that is included in the extraction of this type of edible oil makes them nutritionally more acceptable same as sensory properties (Febrianto et al., 2011; Parker et al., 2003). In the Europe, cold pressed rapeseed and sunflower oil are starting to be more popular among consumers (Brühl et al., 2008). These types of oil are made from *Brassica napus L.* and *Helianthus annuus* are one of the most important crops in the world. For an example can serve the fact that 60 million tons of rapeseed is produced every year (Yang et al., 2013; Natorina et al., 2017). These oils are valuable sources of polyphenolic compounds, that can affect positively people health (Song et al., 2019).

The fortification of food commodities has been very popular among producers and consumers. Seeds and teas are used for the fortification since many of them contain higher amounts of phenols, omega 3 fatty acids and dietary fibers (Romankiewicz et al., 2017).

These types of oils and mixtures are mainly used as salad dressings, but they are also very often included to culinary conditions with high temperature applications. This type of processing can influence awkwardly the product nutritional profile, same as stability (Rudzinska et al., 2005; Kmiecik et al., 2009).

The aim of the study was to monitor nutritional profile and oxidation stability of cold pressed oils under influence of repeated heating.

Material and methods

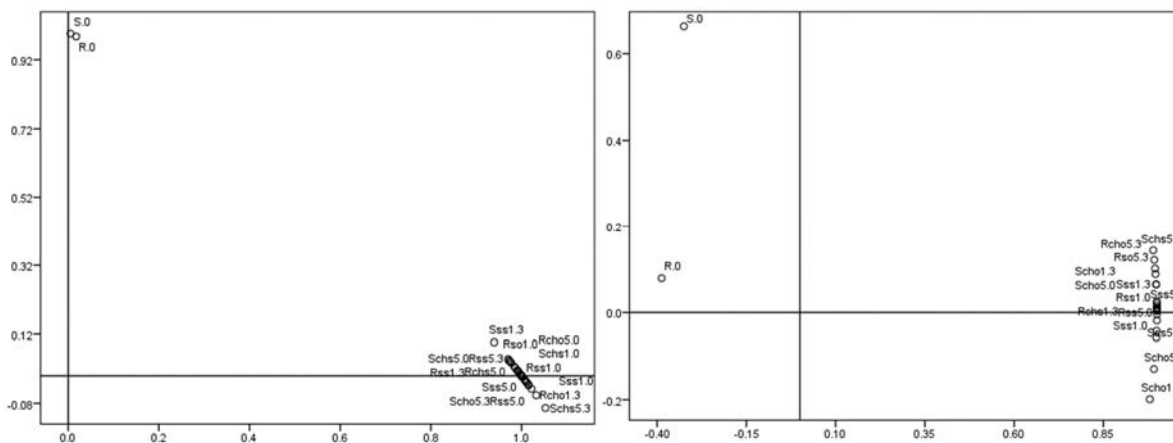
Following cultivars of sunflower and rapeseed were used in the study: Velox and Sidney, respectively. The oil was prepared using screw press and then filtrated through nonwoven, the yield was 30 %. Chia and sesame, seeds and oils, were added to cold pressed sunflower and rapeseed oils in 5 % concentrations. The mixtures of oils and seeds are shown in Table 1. The formed samples (control samples and mixture samples) undergone 3 cycles of heating that included 10 minutes heating at 220 °C, cooling for 20 minutes, for 3 times.

Prepared samples were analyzed by following chemical analysis: peroxide value (ISO 3960:2017), free fatty acids (ISO 660:2009), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Sivarrooban et al., 2008), Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Szydłowska-Czerniak et al., 2008), total polyphenol (Li et al., 2012), chlorophyll and carotenoid (Kraljic et al., 2013) contents.

Table 1. Analyzed samples of oil mixtures

Samples	mixture
S	Sunflower oil (Velox)
R	Rapeseed oil (Sidney)
Sss5	Sunflower oil + 5 % sesame seeds
Rss5	Rapeseed seed oil + 5 % sesame seeds
Schs5	Sunflower oil + 5 % chia seeds
Rchs5	Rapeseed oil + 5 % chia seeds
Sso5	Sunflower oil + 5 % sesame oil
Rso5	Rapeseed oil + 5 % sesame oil
Scho5	Sunflower oil + 5 % chia oil
Rcho5	Rapeseed oil + 5 % chia oil

Results



A) Figure 1. A) Oxidative-hydrolysis stability of oil samples evaluated by principal component analysis. B) Antioxidant capacity of oil samples evaluated by principal component analysis

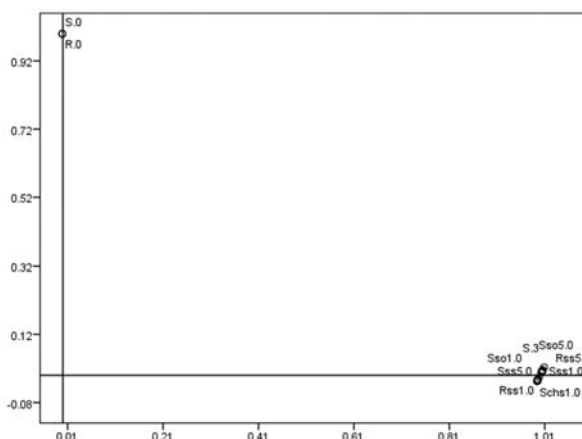


Figure 3. Chlorophyll, carotenoid and polyphenol contents of oil samples evaluated by principal component analysis.

Table 2. Hydrolytic-oxidative changes in the samples of oils after repeated cycles of heating

Samples	Peroxide value		Free fatty acids		FRAP	
	Not heated [mekv.O ₂ /kg]	3 cycles of heating [mekv.O ₂ /kg]	Not heated [mg KOH/g]	3 cycles of heating [mg KOH/g]	Not heated [μmol Trolox/g]	3 cycles of heating [μmol Trolox/g]
S	1.30 ± 0.20 ^a	37.78 ± 0.35 ^c	0.43 ± 0.03	0.53 ± 0.04	116.38 ± 1.68 ^a	665.62 ± 0.18 ^d
R	2.76 ± 0.20 ^a	14.77 ± 0.03 ^c	1.42 ± 0.06	1.87 ± 0.12	298.74 ± 30.12 ^a	389.27 ± 0.10 ^d
Sss1	9.78 ± 0.12	25.77 ± 1.96	0.67 ± 0.00	0.67 ± 0.00	186.59 ± 0.36 ^a	345.64 ± 15.54 ^b
Sss5	10.90 ± 0.03 ^a	23.54 ± 0.28 ^d	0.84 ± 0.08	0.78 ± 0.00	269.34 ± 0.60	274.22 ± 3.53
Rss1	5.90 ± 0.01 ^a	13.49 ± 0.14 ^b	1.93 ± 0.04	1.98 ± 0.05	460.56 ± 0.15 ^a	843.51 ± 44.80 ^c
Rss5	5.25 ± 0.06 ^a	11.38 ± 0.30 ^b	2.19 ± 0.08	2.16 ± 0.08	263.45 ± 0.25 ^a	365.09 ± 7.01 ^c
Schs1	11.00 ± 0.14 ^a	33.07 ± 0.03 ^c	0.36 ± 0.04	0.47 ± 0.04	166.90 ± 0.27 ^a	268.70 ± 2.70 ^d
Schs5	11.17 ± 0.42	32.96 ± 2.44	0.50 ± 0.08	0.45 ± 0.08	190.80 ± 0.70 ^a	378.36 ± 39.60 ^c
Rchs1	5.59 ± 0.00 ^a	14.88 ± 0.20 ^c	1.68 ± 0.16	1.68 ± 0.01	250.36 ± 0.23 ^a	342.54 ± 2.38 ^c
Rchs5	5.79 ± 0.15 ^a	15.24 ± 0.42 ^c	1.68 ± 0.16	1.72 ± 0.08	275.50 ± 0.24 ^a	446.47 ± 1.34 ^d
Sso1	4.09 ± 0.00 ^a	33.12 ± 0.11 ^c	0.36 ± 0.04	0.50 ± 0.08	144.63 ± 0.17	141.19 ± 4.08
Sso5	27.79 ± 0.01	29.52 ± 0.24	0.42 ± 0.04	1.65 ± 0.12	171.69 ± 0.19 ^a	224.77 ± 0.22 ^d
Rso1	3.45 ± 0.15 ^a	13.04 ± 0.02 ^c	1.29 ± 0.08	1.68 ± 0.00	288.34 ± 0.15 ^a	371.21 ± 0.90 ^c
Rso5	6.29 ± 0.14 ^a	13.45 ± 0.10 ^c	1.68 ± 0.00	0.42 ± 0.04	273.30 ± 0.25	303.48 ± 21.65
Scho1	24.77 ± 0.12	25.74 ± 0.07	0.50 ± 0.00 ^a	0.39 ± 0.00 ^b	179.73 ± 24.02 ^a	216.44 ± 12.18 ^b
Scho5	21.14 ± 0.43	22.04 ± 0.40	0.50 ± 0.08	0.56 ± 0.15	189.52 ± 7.08 ^a	412.41 ± 45.29 ^b
Rcho1	6.05 ± 0.09	13.52 ± 0.53	1.71 ± 0.04	1.89 ± 0.22	230.68 ± 0.25 ^a	348.22 ± 4.69 ^c
Rcho5	12.81 ± 0.13 ^a	9.86 ± 0.18 ^c	1.71 ± 0.04	1.79 ± 0.01	258.39 ± 0.57 ^a	391.41 ± 34.80

*different letters (a, b, c, d) indicate statistical significant (p<0.05) differences between not heated and heated samples

Conclusion

The research showed significant difference among not heated samples of experimentally produced oil dressings/mixing with and without addition of sesame and chia oil and seeds. Principal component analysis distinguished especially not heated samples of sunflower and rapeseed oil without addition of oil and seeds from other heated and not heated samples. The research confirmed that hydrolytic-oxidative stability same as antioxidant and nutritional profile of oil mixtures and oil dressings that can be found on the market could vary significantly due to the addition of different seeds or oil. On the other hand, the mixing is usually done only to make the product more attractive for consumers.

References:

- Brühl, L., Matthäus, B. (2008). Sensory assessment of virgin rapeseed oils. *European journal of lipid science and technology*, 110(7), 608-610.
- Febrianto, N. A., Yang, T. A. (2011). Producing High Quality Edible Oil by using Eco-Friendly Technology: A Review. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4), 317-326.
- Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzińska, M., Michałowska, A.G., Heś, M. (2009). Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. *European journal of lipid science and technology*, 111(11), pp.1124-1132.
- Kraljić, K., Škevin, D., Pospišil, M., Obranović, M., Nederal, S., Bosolt, T. (2013). Quality of rapeseed oil produced by conditioning seeds at modest temperatures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(4), 589-599.

- Li, H., Deng, Z., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R. (2012). Ultra-performance liquid chromatographic separation of geometric isomers of carotenoids and antioxidant activities of 20 tomato cultivars and breeding lines. *Food Chemistry*, vol. 132, 2012, p. 508–517.
- Natorina, A. (2017). Congruent marketing product strategies of the enterprises. *Економічний часопис-XXI*, 163(1-2 (1)), 75-78.
- Parker, T. D., Adams, D. A., Zhou, K., Harris, M., Yu, L. (2003). Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. *Journal of food science*, 68(4), 1240-1243.
- Romankiewicz, D., Hassoon, W. H., Cacak-Pietrzak, G., Sobczyk, M., Wirkowska-Wojdyla, M., Ceglinska, A., Dziki, D. (2017). The Effect of Chia Seeds (*Salvia hispanica* L.) Addition on Quality and Nutritional Value of Wheat Bread. *Journal of Food Quality*. 2017, 2017, 1-7.
- Rudzińska, M., Korczak, J., Wasowicz, E., 2005. Changes in phytosterols and their oxidation products during frying of French fries in rapeseed oil. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 14(4), 381.
- Sivarooban, T., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Song, J. G., Cao, C., Li, J., Xu, Y. J., Liu, Y. (2019). Development and validation of a QuEChERS-LC-MS/MS method for the analysis of phenolic compounds in rapeseed oil. *Journal of agricultural and food chemistry*. 67(14), 4105-4112.
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.
- Yang, M., Zheng, C., Zhou, Q., Huang, F., Liu, C., Wang, H. (2013). Minor components and oxidative stability of cold-pressed oil from rapeseed cultivars in China. *Journal of food composition and analysis*, 29(1), 1-9.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 215/2019/FVHE

Riziko výskytu potenciálně toxigenních bakterií *Bacillus cereus sensu lato* v provozovnách stravovacích služeb

Dorotíková Kateřina, Slovácová Lenka, Bogdanovičová Kateřina, Bursová Šárka, Vaňková Iveta
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Dle zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin mají dominující roli ve vzniku a šíření hromadných onemocnění z potravin provozovny stravovacích služeb (EFSA, 2017). Hned druhý největší podíl na vypuknutí ohnisek alimentárních nákaz má skupina bakteriálních toxinů, jež zahrnuje také toxiny produkované *Bacillus cereus* (EFSA, 2017). *Bacillus cereus sensu stricto* může vyvolat 2 odlišné formy alimentárního onemocnění – diarhogenní a emetický syndrom. Tyto obvykle neprovází výraznější komplikace. Nicméně, v poslední době roste počet těžkých otrav, které vedou k hospitalizaci, v některých případech až ke smrti jedince (Messelhäußer a Ehling-Schulz, 2018). To může souviset s aktuálními vědeckými poznatky odhalujícími toxigenitu dalších druhů skupiny *Bacillus cereus sensu lato*, stejně jako se zvyšující se mikrobiální kontaminací provozoven těmito bakteriemi. Zvyšování míry rizika z přítomnosti bakterií skupiny *Bacillus cereus* v gastronomických zařízeních si proto vynucuje důkladné zhodnocení potenciální toxigenity kmenů pocházejících ze zdrojů, které jsou z pohledu ohrožení obyvatel aktuálně nejzávažnější.

Materiál a metodika

V průběhu roku 2019 byly prováděny analýzy izolátů *B. cereus s. l.* získaných z prostředí gastronomických provozoven, ze stěrů z rukou pracovníku provozoven stravovacích služeb a z pokrmů s cílem detekce genů pro produkci toxinů, jež mohou u spotřebitele vyvolat alimentární onemocnění. Pro zhodnocení výskytu bakterií *B. cereus s. l.* v provozovnách stravovacích služeb bylo odebráno 143 vzorků, které pocházely z 6 různých stravovacích zařízení (5 kantýn, 1 školní jídelna).

Vzorky z provozoven byly vyšetřeny kvalitativně na přítomnost bakterie *B. cereus* dle ČSN EN ISO 7932. Pro sledování rozdílností v druhovém zastoupení a toxigenním potenciálu 66 fenotypově pozitivních kmenů *B. cereus s. l.* byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) založená na detekci genu *gyrB* kódujícího podjednotku B DNA-gyrasy (Yamada et al., 1999) a technika využívající hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

Příprava vzorků na MALDI-TOF probíhala 3 způsoby, z nichž byl jako finální vždy zvolen výsledek metody s nejvyšší hodnotou skóre (tzv. score value). Při metodě přímé aplikace byla mikrobiální kultura z jedné izolované kolonie přenesena na spoty kovové desky přímo. V případě

extrakční metody docházelo k extrakci proteinů s použitím ethanolu a 70 % kyseliny mravenčí. Mikrobiální kultura o jedné kolonii nebo 1 plné inokulační kličce byla resuspendována ve 300 µl PCR vody a smíchána s 900 µl 96 % ethanolu. Dalším krokem bylo odstředění při 13000 rpm/2 min. Po vysušení na vzduchu byla peleta vortexováním resuspendována s 10 – 50 µl (dle velikosti pelety) 70 % kyseliny mravenčí, důkladně promíchána s 10 – 50 µl acetonitrilu a odstředěna (13 000 rpm/2min). Třetí způsob byl specifický pro sporotvorné bakterie. S použitím extrakce vzorku s kyselinou trifluoroctovou (TFA) a acetonitrilem dochází k jejich inaktivaci. Bakteriální kultura byla resuspendována ve 300 µl PCR vody, po centrifugaci při 13 000 rpm/2 min byl supernatant slit a k peletě bylo přidáno 10 – 50 µl TFA, dále trojnásobek vody a ekvivalentní množství acetonitrilu (200 µl). Následným společným krokem všech 3 způsobů bylo přenesení 1 kolonie/1 µl supernatantu na vzorový terčik MALDI Biotarget 96. Zaschlé vzorky byly překryty 1 µl HCCA matrice (kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová) a po zaschnutí analyzovány. Výstupem srovnávacího algoritmu byla druhová identifikace mikroorganismu s přiřazenou hodnotou skóre vyjadřujícího shodu hmotnostního spektra vyšetřovaného vzorku s referenčním molekulárním identifikátorem v databázi

MALDI Biotyper (Freiwald a Sauer, 2009).

Pro potřeby detekce všech komponent toxinů *B. cereus s. l.* vyvolávajících onemocnění z potravin (hemolyzin BL, nehemolytický enterotoxin, cytotoxin K, cereulid) byly navrženy nové standardní operační postupy. Izolace DNA byla provedena lýzou varem (100 °C, 20 min) s následným odstředěním při 12 000 rpm/6 min. Celkem byly k detekci genů pro produkci toxinů, jež stojí za vypuknutím diarhogenní a emetické formy onemocnění, použity 4 multiplex PCR (mPCR). Přehled použitých primerů a jejich sekvencí je uveden v Tabulce č.1.

Tabulka č. 1: Přehled použitých primerů a jejich sekvencí

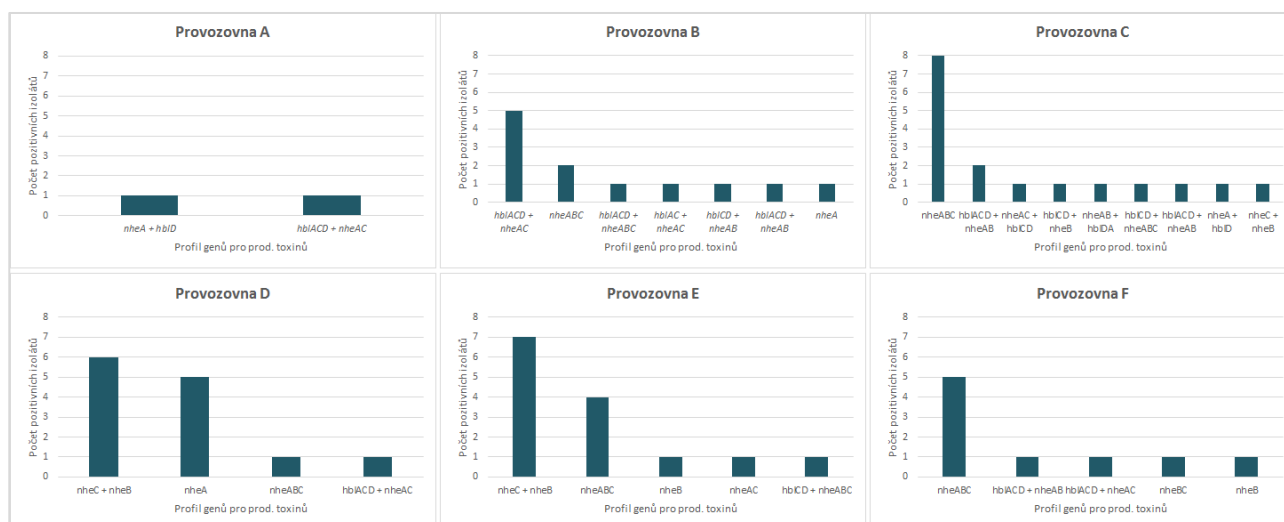
Target gene	Primer	Primer sequence (5'–3')	Amplicon size (bp)	Reference	Annealing
<i>gyrB</i>	BC1	ATT GGT GAC ACC GAT CAA ACA	365	Yamada et al. (1999)	54 °C
	BC2	TCA TAC GTA TGG ATG TTA TTC			
NRPS*	CER1	ATC ATA AAG GTG CGA ACA AGA	188	Horwood et al. (2004)	54 °C
	CER2	AAG ATC AAC CGA ATG CAA CTG			
16Sr RNA	InKo1	GGA GGA AGG TGG GGA TGA CG	241	Martineau et al. (1996)	54 °C
	InKo2	ATG GTG TGA CGG GCG GTG TG			
<i>hblA</i>	HBLA1	GCT AAT GTA GTT TCA CCT GTA GCA AC	873	Rowan et al. (2003)	62.5 °C
	HBLA2	AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA			
<i>hblC</i>	HBLC-N	AAT AGG TAC AGA TGG AAC AGG	399	Rowan et al. (2003)	62.5 °C
	HBLC-C	GGC TTT CAT CAG GTC ATA CTC			
<i>hblD</i>	HBLD-N	AAT CAA GAG CTG TCA CGA AT	439	Rowan et al. (2003)	54 °C
	HBLD-C	CAC CAA TTG ACC ATG CTA AT			
<i>nheA</i>	nheA344S	TAC GCT AAG GAG GGG CA	499	Ghelardi et al. (2002)	54 °C

	nheA843A	GTT TTT ATT GCT TCA TCG GCT			
<i>nheB</i>	NBF	TTT AGT AGT GGA TCT GTA CGC	743	Guinebretière et al. (2002)	54 °C
	NBR	TTA ATG TTC GTT AAT CCT GC			
<i>nheC</i>	NCF	TGG ATT CCA AGA TGT AAC G	683	Guinebretière et al. (2002)	54 °C
	NCR	ATT ACG ACT TCT GCT TGT GC			

Výsledky a diskuze

V rámci této studie byla pomocí PCR a metody MALDI-TOF potvrzena přítomnost bakterií *B. cereus s. l.* v 65 ze 143 vzorků (45,5 %). Pouze 1 z 67 (1,5 %) fenotypově pozitivních izolátů (presumptivní *B. cereus s. l.*) nebyl s použitím uvedených metod zařazen mezi druhy skupiny *B. cereus*, jednalo se o druh *Lysinibacillus boronitolerans*.

Z celkových 66 pozitivních izolátů spadajících mezi *B. cereus s. l.* jich bylo pomocí PCR identifikováno 59 jako *B. cereus sensu stricto* (89,4 %). 3 izoláty (4,5 %) byly označeny jako druh *Bacillus thuringiensis*, 1 (1,5 %) izolát byl druhově určen jako *Bacillus mycoides*. V případě zbylých 3/66 (4,5 %) izolátů nebyla zaznamenána shoda mezi výsledky analýzy PCR a MALDI-TOF, nicméně u všech těchto izolátů byl zjištěn výskyt genů pro produkci toxinů a s pomocí MALDI-TOF byly tyto určeny jako *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus s. s.*). Geny kódující produkci alespoň jednoho typu sledovaných toxinů byly detekovány u 66/66 (100 %) izolátů. Všechny izoláty nesly geny pro produkci nehemolytického enterotoxinu (*nheABC*). U třetiny získaných izolátů (22/66; 33,3 %) byla potvrzena přítomnost jednotlivých komponent hemolysinu BL (*hblACD*). Gen kódující produkci toxinu vyvolávající emetickou formu alimentárního onemocnění (*ces*) se vyskytoval u 3/66 izolátů (4,5 %). Na základě detekce konkrétních genů pro produkci toxinů a jejich komponent byly pro konkrétní PSS získány tzv. profily genů kódující produkci enterotoxinů (Graf č. 1). Tato skutečnost naznačuje, že cesty šíření *B. cereus s. l.* jsou úzce spjaty s křížovou kontaminací.



Graf č. 1: Profily genů pro produkci enterotoxinů typické pro konkrétní provozovny

S ohledem na výskyt bakterií *B. cereus s. l.* v téměř polovině odebraných vzorků a zjištěný vysoký toxigenní potenciál můžeme konstatovat, že v případě dalšího nedodržení principů správné výrobní a hygienické praxe může konzumace pokrmu kontaminovaného těmito bakteriemi vyústit u spotřebitelů v otravu z potravin.

Závěr

Získání údajů o kontaminaci provozoven potenciálně toxigenními bakteriemi *B. cereus s. l.* a o úrovni dodržování zásadních požadavků správné výrobní a hygienické praxe ve stravovacích zařízeních nacházejících se na území ČR je velkým přínosem nejen pro spotřebitele, ale také pro provozovatele potravinářských podniků. Nedodržení požadavků správné výrobní a hygienické praxe může mít v kombinaci s vysokým toxigenním potenciálem bakterií *B. cereus s. l.* zásadní vliv na bezpečnost pokrmů. Díky výsledkům projektu dochází k praktickému zlepšování situace v provozovnách, a tak snižování velikosti rizika pro spotřebitele.

Seznam literatury:

1. ČSN EN ISO 7932, 2005. Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu presumptivních *Bacillus cereus* - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha: ČNI, 2005.
2. EFSA, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*. 15 (12): 5077.
3. Freiwald, A. a S. Sauer, 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*. 4 (5), 732-742. DOI: 10.1038/nprot.2009.37. ISSN 1754-2189.
4. Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S., 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.*, 208 (1), 129–134. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11072.x.
5. Guinebretiere, M.-H., Broussolle, V., Nguyen-The, C., 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 40 (8), 3053–3056. DOI: 10.1128/JCM.40.8.3053-3056.2002.
6. Horwood, P. F., Burgess, G. W., Oakey, H. J., 2004. Evidence for non-ribosomal peptide synthetase production of cereulide (the emetic toxin) in *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 236 (2), 319–324. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.06.004.
7. Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M., Bergeron, M. G., 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.*, 34 (12), 2888–2893.
8. Messelhauser, U. a M. Ehling-Schulz, 2018. *Bacillus cereus*—a Multifaceted Opportunistic Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*. 5 (2), 120-125.
9. Rowan, N. J., Anderson, J. G., 1998. Diarrhoeal enterotoxin production by psychrotrophic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae (MIF). *Lett Appl. Microbiol.*, 26 (2), 161–165.
10. Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N., Venkateswaran, K., 1999. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. In *App. Environ. Microbiol.*, 65 (4), 1483–1490.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 214/2019/FVHE

Ekotoxicita nanočástic zlata pro organismy vodních ekosystémů

¹Daniela Hlávková, ¹Pavla Palíková, ²Hana Čaloudová, ¹Miroslava Beklová

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

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

Úvod

Zlaté nanočástice se dnes používají v široké škále produktů. Používají se při výrobě elektroniky, lékařských zařízení, jsou součástí terapeutických látek či kosmetiky a zároveň se využívají u osob postižených nádorovým onemocněním (1, 2). Je zřejmé, že se zvyšující se produkcí a spotřebou zlatých nanočástic se zvýší i jejich environmentální koncentrace. Výzkumy potvrzují jejich přítomnost ve všech složkách životního prostředí. Nanočástice se do prostředí dostávají skrze odpad a odpadní vody z domácností, ale i průmyslu, či ve formě emisí (3). Aktuální predikce environmentální koncentrace zlata v odpadních vodách ve Velké Británii je 470 pg/l (4).

Je k dispozici několik studií, které zkoumaly ekotoxikologický efekt zlatých nanočástic na vodní organismy, avšak informace na toto téma ve vědeckých publikacích v současné době nepřinášejí jednotné závěry. Výsledky získané tímto výzkumem je vhodně doplní a rozšíří.

Materiál a metodika

Ekotoxikologické testy byly provedeny se zástupci trofické úrovně producentů (okřehek), konzumentů (perloočka a ryba) a destruentů (bakterie).

Pro provádění testů byly syntetizovány nanočástice zlata s průměrnou velikostí částic (d. nm) 1,1 nm, 11,5 nm a 15,2 nm. Pro objasnění toxických účinků zlata byly provedeny testy i s iontovou formou zlata chloridem zlatitým (AgCl_3). Koncentrační řada nanočástic zlata se stanovila na základě předběžných testů.

Pro posouzení vlivu nanočástic zlata na vodní organismy byly zvoleny testy akutní toxicity na okřehku menším *Lemna minor*, na sladkovodních korýších *Daphnia magna* a na mořských bakteriích *Vibrio fischeri*. Metodicky se postupovalo dle příslušných norem (ČSN EN ISO 20079, ČSN EN ISO 6341 a ČSN EN ISO 11348).

Rostliny okřehku menšího se nechaly růst po dobu 7 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS. Současně se nasadily testovací

rostliny do živného roztoku bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin se kontroloval počet lístků a jejich stav a po 7 dnech se stanovila inhibice růstu na základě růstových rychlostí a hmotnosti konečné biomasy. Pomocí komerčně dostupného softwaru TOXICITA 3.1 (VÚV Ostrava, Česká republika) jsme na základě získaných inhibičních hodnot vyhodnotili 168hEC50.

Akutní test na perloočkách *Daphnia magna* spočíval ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované látky. Následně byla ve 24hodinovém intervalu sledována inhibice pohybu perlooček a zaznamenání jak uhynulí, tak imobilizovaní jedinci. Ze získaných hodnot byla stanovena 48hEC50 probitovou analýzou pomocí počítačového programu (PROBITY VÚRH Vodňany).

Principem bakteriálního bioluminiscenčního testu toxicity je změna intenzity luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* vyvolaná negativním působením toxického vzorku.

Dále byly provedeny embryonální testy akutní toxicity podle modifikované metodiky OECD 236 – Fish Embryo Acute Toxicity Test. Do testů byly nasazeny oplozené jikry dáňka pruhozaného. Test trvající 96 hodin byl prováděn v triplikátu, semistatickou metodou s výměnou lázně každých 24h. Byla pozorována mortalita a stanovena 96hLC50 probitovou analýzou pomocí počítačového programu Ekotox 5.2. Dále byly zaznamenávány subletální změny, jako například retardace vývoje, vývojové deformity, edémy a další změny.

Na základě výsledných hodnot EC/LC byla porovnána citlivost všech testovacích organismů a posouzeno případné environmentální riziko vzhledem k reálným koncentracím nanočástic zlata v životním prostředí.

Výsledky

Výsledky akutních testů toxicity jsou uvedeny v následující tabulce č. 1.

Tab. č. 1: Hodnoty EC50 pro dáňku; ErC50 pro okřehek, EC50 pro bakterie, LC50 pro embrya

Testovací organismus	AuCl ₃	PVP10 (11,5 d.nm)	PVP40 (15,2 d.nm)	Cit (1,1 d.nm)
<i>Daphnia magna</i> (48 hod)	0,59 mg/l	169,64 mg/l	195,55 mg/l	78,92 mg/l
<i>Lemna minor</i> (biomasa)	19,55 mg/l	21,96 mg/l	32,43 mg/l	132,11 mg/l
<i>Lemna minor</i> (růstová rychlost)	9,52 mg/l	56,90 mg/l	64,54 mg/l	155,64 mg/l
<i>Vibrio fischeri</i> (30')	0,89 mg/l	41,98 mg/l	26,08 mg/l	-
<i>Danio rerio</i> (96 hod)	52,2 mg/l	140,6 mg/l	93,9 mg/l	165,3 mg/l

Výsledky ekotoxikologických testů se liší v závislosti na druhu organismu a podmínkách testu. Testy akutní toxicity nanočástic zlata u okřešku menšího prokázaly biomasu jako lepší biomarker v porovnání s růstovou rychlostí. Nejvyšší toxicita u zkoumaných vzorků byla zaznamenána u bakterií *Vibrio fischeri*. Naměřené hodnoty EC, které způsobily 50% (EC50) inhibici emise světla ve srovnání s kontrolou byly v rozmezí 0,89–41,98 mg/l. Naopak nejméně toxické byly nanočástice pro perloočky *Daphnia magna*. Rozdílná toxicita nanočástic zlata pro perloočky byla zaznamenána i na základě hodnot střední efektivní koncentrace stanovených dle velikosti částic. V případě dafnií nanočástice s průměrnou velikostí částic 1,1 nm byly více toxické (48hEC50 = 78,92 mg/l) než nanočástice s průměrnou velikostí částic 15,2 nm (48hEC50 = 195,55 mg/l). V případě embryí dávia pruhovaného byla pozorována nižší toxicita zlatých nanočástic v porovnání s AuCl₃, nejnižší hodnota LC50 byla stanovena pro nanočástice s průměrnou velikostí částic 15,2 nm. Expozice embryí všem druhům nanočástic v nejvyšší koncentraci (100 mg/l) způsobila zvýšený výskyt edémů a v případě nanočástic stabilizovaných PVP (polyvinylpyrrolidon) také snížení srdeční frekvence, což svědčí o negativním působení zlatých nanočástic na vývoj oběhového systému embryí dávia pruhovaného.

Závěr

Naše zjištěné hodnoty EC50 (LC50) potvrzují nízké toxické účinky nanočástic zlata na vodní organismy při krátkodobé expozici. Získané hodnoty efektivních koncentrací nanočástic zlata umožňují predikovat ekotoxické riziko pro zástupce vodní biocenózy, a i když tyto hodnoty jsou vyšší než v současnosti známé environmentální koncentrace, nelze v souvislosti s jejich rostoucím průmyslovým využíváním vyloučit potenciální riziko jejich negativního působení.

Seznam literatury:

1. ASHARANI PV., LIANWU Y, GONG Z., VALIYAVEETIL, S. Comparison of the toxicity of Gold, Silver and Platinum Nanoparticles in Developing Zebrafish Embryos. *Nanotoxicology*. 2011 (5) 43–54.
2. KNOBLOCHOVÁ, L. Gold nanoparticles as a tool of targeted therapy of cancer. Prague: Charles University. 2013.
3. LAPRESTA - FERNANDÉZ, A., FERNANDÉZ, A., BLASCO, J. Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. *Trends in Analytical chemistry*. 2012 (32) 40–59.
4. MAHAPATRA I, SUN TY, CLARK JRA, *et al.* Probabilistic modelling of prospective environmental concentrations of gold nanoparticles from medical applications as a basis for risk assessment. *Journal of Nanobiotechnology*. 2015 (13:93).

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 217/2019/FVHE

Průkaz modifikovaných škrobů v masných výrobcích

Zdeňka Javůrková, Matej Pospiech, Marie Bartlová

*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinárního hygieny
a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Škrob je jednou z potravinářských přídatných látek (PPL) povolených a běžně používaných pro výrobu potravin včetně masných výrobků. Škrob se může používat v nativní nebo modifikované formě. Použití nativních škrobů je omezené, neboť nejsou příliš stabilní a ve výrobcích může docházet k oddělování vody [1]. Pro výrobu masných výrobků jsou preferovány zejména škroby modifikované z důvodu lepší rozpustnosti ve studené vodě a schopnosti formovat stabilní gely. Modifikované škroby se vyrábí zejména chemickou (derivací), fyzikální (záhřev a vysoký tlak), kyselou nebo zásaditou hydrolyzou [2].

Dle již neplatné ČSN normy 570157 se škrob prokazuje jodometrickou titrací. Tato metoda ale stanovuje jednotlivé monosacharidy, proto touto metodou nelze prokázat použití modifikovaných škrobů. Karkalas [3] popsal enzymatickou metodu schopnou prokázat nativní a také voskový škrob. Dle platné legislativy jsou chemicky modifikované škroby považovány za PPL, a proto musí být na spotřebitelském balení uvedeny jako PPL, ve srovnání s nativním nebo fyzikálně modifikovaným škrobem, který je považován za surovinu. Tato skutečnost může negativně ovlivnit jejich výběr, a snížit tak ekonomické zisky výrobců potravin. S ohledem na obavy spotřebitelů a zájmy výrobců potravin se označování PPL otevírá prostor pro falšování potravin, kdy místo modifikovaného škrobu bude uvedena pouze přítomnost škrobu jako suroviny.

Jednou z možností průkazu modifikace použitého škrobu ve výrobku je použití skenovací elektronové mikroskopie [4]. Pospiech [5] popsal možnost histologického průkazu nativních škrobů. U modifikovaných škrobů dochází ke změně barvitelnosti v návaznosti na použitou modifikaci a také ke změně morfologické charakteristiky škrobových zrn [6].

Morfologickou identifikaci a rozdíly v barvitelnosti škrobů lze využít právě pro odlišení použité modifikace, a tedy k určení použití modifikovaného škrobu v masném výrobku. Pro identifikaci použité modifikace škrobu bude sestaven diskriminační model. Využití diskriminačních modelů pro klasifikaci potravin pomocí obrazové analýzy potvrdili například Riguelme [7].

Materiál a metodika

V první části projektu byl proveden výběr nejvhodnějšího histochemického barvení na skupině 32 vzorků škrobů, jak nativních, tak chemicky (E1412, E1414, E1420, E1422, E1442, E1450)

i fyzikálně modifikovaných. Vzorky byly zpracovány technikou parafínových bloků. Bloky byly krájeny na mikrotomu Leica RM2255 (Leica, GER). Pro každý vzorek bylo nakrájeno 5 skl po 2 řezech, pro každé barvení 1 sklo. Ověřena byla barvení jodovým roztokem, modifikované barvení Lugol-Calleja, PAS - Calleja, barvení Azur A a barvení jodovými párami (JP). Vzorky byly po obarvení montovány pomocí montovacího média. Po zaschnutí byly řezy nasnímány kamerou DFK 23U274 (Imaging Source, GER) s využitím mikroskopu Eclipse Ci-L (Nikon, JPN) s motorizovaným stolcem Proasca III (Prior, USA). Následně bylo programem pro analýzu obrazu NIS-Elements BR 4.50.00 (Laboratory Imaging, CZ) provedeno snímání a měření. Kromě měření základních morfometrických parametrů škrobových zrn (v případě jejich přítomnosti) bylo provedeno spektrofotometrické měření za použití spektrální kamery (DFK23U274, Imagine Source, GER).

V dalším kroku byly připraveny modelové masné výrobky v koncentrační řadě (0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 5,0 a 10,0 %) pro nativní bramborový škrob a hydroxypropylether zesíťovaného fosfátu bramborového škrobu – E1442. Vzorky byly zpracovány stejným způsobem jako vzorky škrobů a na základě výsledků předchozí analýzy obarveny jodovými párami.

Dále byly testovány vzorky zakoupené v tržní síti s deklarovaným složením. Veškerá vyšetření probíhala anonymně na vzorcích obsahujících škrob a také na vzorcích bez přítomnosti škrobu.

Výsledky

Na začátku experimentu byly připraveny a obarveny vzorky různých druhů škrobů. U těchto vzorků byly měřeny různé parametry. Jednalo se o RGB, spektrální charakteristiku v rozsahu 400 – 750 nm a analýzu v barevném prostoru CIELAB. Z uvedených metod byly k vytvoření diskriminačního modelu vybrány parametry CIELAB (tabulka 1). Jako nejvhodnější barvení pro diskriminaci bylo vyhodnoceno barvení JP. První dva faktory dosáhly u tohoto typu barvení 93,88 % ($R=93,15$). Pro další barvení korelační faktory dosáhly u PAS Calleja 91,31 % ($R=0,82$), Lugol 86,76 % ($R=0,80$), Lugol Calleja 80,86 % ($R=0,62$) a pro barevní Azurem 86,38 % ($R=0,68$). Navržený model byl použitý pro průkaz typů škrobů (kukuřičný a bramborový) a pro identifikaci použité modifikace. Zvolený model klasifikuje typ škrobu se správností 71,94 % u kukuřičného škrobu a 87,50 % u škrobu bramborového. Specifita metody byla 0,87. Pro klasifikaci jednotlivých modifikovaných škrobů bylo dosaženo různorodých výsledků. Metoda je vhodná pro určení kukuřičného škrobu E1450 (80,00 %), bramborového škrobu E1442 (93,33 %), nativního škrobu voskové kukuřice (82,5 %) a škrobu voskové kukuřice E1450 (60 %). Pro modifikovaný kukuřičný škrob E1421 (30,77 %), kukuřičný nativní (36,59 %) a modifikovaný bramborový E1450 (35,00 %) tato metoda nedosahovala dostatečné správnosti zařídění. Pro škroby kukuřičný E1421, bramborový E1420,

E1422 a nativní (0,00 %), kukuřičný E1422 (17,50 %), kukuřičný E1442 (5,00 %), kukuřičný fyzikálně modifikovaný (7,50 %) je tato metoda nevhodná.

Tabulka 1: Parametry CIELAB u potravinářských škrobů

Vzorky		CIELAB		
Druh škrobu	Modifikace	L*	a*	b*
Kukuřiční	E1412	29,12±6,8	7,87±4,54	-10,08±5,32
Kukuřiční	E1421	18,03±10	12,82±9,39	-3,81±2,85
Kukuřiční	E1422	42,44±25,48	11,04±8,97	6,74±12,68
Kukuřiční	E1442	65,97±6,04	4,7±2,36	17,67±2,54
Kukuřiční	E1450	25,98±7,65	22,83±4,05	7,41±1,53
Kukuřiční	Nativní	52,97±10,42	-2,48±4,69	9,31±6,06
Kukuřiční	Fyzikální	28,44±8,57	10,15±5,62	-8,81±5,12
Bramborový	E1414	36,09±17,08	6,58±9,99	-5,35±9,34
Bramborový	E1420	40,26±6,55	-1,22±1,54	0,9±2,14
Bramborový	E1422	35,87±3,35	0,9±1,28	-0,23±1,35
Bramborový	E1442	47,01±8,17	-2,65±1,59	3,39±2,57
Bramborový	E1450	48,41±11,01	4,78±6,88	0,1±3,52
Bramborový	Nativní	38,56±10,54	6,69±8,62	-3,46±5,45
Vosková kukuřice	Nativní	69,89±5,53	3,88±2,28	17,67±3,38
Vosková kukuřice	E1450	29,22±8,13	22,41±4,53	-6,12±3,36

Navržená metoda JP měřená v systému CIELAB byla ověřena také u masných výrobků (Tabulka 2). Hlavní dva faktory dosáhly 100 % (R=0,82). Diskriminační model pro masné výrobky obsahoval dva zástupce modifikovaných škrobů, běžně používané u masných výrobků (E1422, E1442) a nativní bramborový škrob. Celková úspěšnost zatřídění byla 87,14 %. Přičemž pro škrob E1442 (95,00 %), E1422 (85,00 %), pro nativní škrob (80,00 %).

Tabulka 2: Parametry CIELAB u masných výrobků.

Vzorky	CIELAB		
Modifikace	L*	a*	b*
E1422	32,95±4,99	2,82±1,64	13,02±4,86
E1442	66,85±8,36	7,05±3,43	11,57±3,28
Nativní	39,10±13,20	7,92±3,80	6,68±3,17

Závěr

Navržené modely diskriminační analýzy vytvořené ze získaných výsledků měření vzorků různých druhů škrobů lze použít pro určení modifikovaného škrobu kukuřičného (E1450), modifikovaného bramborového (E1442), nativní škrob z voskové kukuřice a modifikovaný škrob z voskové kukuřice (E1450). Užší model zvolený pro masné výrobky lze rovněž použít pro určení škrobů modifikovaných (E1422, E1442) a nativních. Při použití těchto diskriminačních modelů je úspěšnost zatřídění vysoká. Přestože metoda zatím nedosahuje validačních kritérií vhodných pro kontrolu potravin, představuje jedinou možnost, přímého průkazu modifikovaných škrobů v potravinách. Pro zlepšení výsledků plánujeme do diskriminační analýzy zapojit další měřitelné vlastnosti, které mohou zpřesnit zatřídění analyzovaných vzorků a případně i její využití pro kontrolní účely.

Seznam literatury:

1. Santana, Á. L., & Meireles, M. A. A. (2014). New starches are the trend for industry applications: a review. *Food and Public Health*, 4(5), 229-241.
2. Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F. *Encyclopedia of Food and Health*, Elsevier Science Publishing Co Inc, 2016, 4096 p. ISBN 978-0-12-384947-2
3. Karkalas, J. An improved enzymic method for the determination of native and modified starch. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1985, vol. 36, no. 10, p. 1019 - 1027.
4. Běhalová, H., Javůrková, Z., Rosíková, K.. Určení druhu škrobu pomocí skenovací elektronové mikroskopie. In: XIX. Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí Sborník příspěvků, Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2017, p. 33-35.
5. Pospiech, M., Talandová, M., Tremlová, B., Randulová, Z. Detection of native starches in meat products using histochemical lugol calleja method. Průkaz nativních škrobů histochemickou metodu Lugol Calleja v masných výrobcích. *Potravinářstvo*, 2014, vol. 8, no. 1, p. 77-81.
6. Manion, B., Ye, M., Holbein, B.E., Seetharaman, K. Quantification of total iodine in intact granular starches of different botanical origin exposed to iodine vapor at various water activities. *Carbohydrate Research*. 2011, vol. 15, p. 2482 - 2490.
7. Riquelme, M. T., Barreiro, P., Ruiz-Altisent, M., Valero, C. Olive classification according to external damage using image analysis. *Journal of Food Engineering*, 2008, vol. 87, no. 3, p. 371 - 379.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 209/2019/FVHE

Vliv ethinylestradiolu na celosamčí triploidní populaci dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Zuzana Koutková, Zdeňka Svobodová, Viola Zentrichová, Josef Václavík

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

Úvod

Látky estrogenního charakteru se vyskytují v povrchových vodách, v sedimentech dna a byly zaznamenány nálezy ve tkáních krevet, měkkýšů a ryb (Liu et al., 2015). Jedním ze zdrojů těchto látek je hormonální antikoncepce. V hormonální antikoncepci se jako jedna z účinných látek využívá ethinylestradiol, což je syntetický derivát estradiolu. Existuje široká škála diagnostických metod pro zjištění přítomnosti těchto látek ve vodě, sedimentu i tělech vodních živočichů. Pro hodnocení jejich účinků na necílové organismy je ale potřeba provádět testy toxicity. Dánie pruhované (*Danio rerio*) je využíváno jako nejrozšířenější modelový organismus v akvatické toxikologii.

Dánie pruhované se začíná pohlavně diferenciovat kolem 21. dne a kompletní pohlavní diferenciaci je dokončena 42. den života. Brion et al. (2004) sledovali vliv 17 β -estradiolu rozpuštěného ve vodě na dánie s přirozeným poměrem pohlaví ve třech rozdílných věkových kategoriích. U mladších jedinců bylo pro indukci vitellogeninu potřeba vyšších dávek 17 β -estradiolu (100 ng/l) ve srovnání se staršími jedinci (5 - 25 ng/l). Ačkoliv byla tato studie obsáhlá, nepopsala vliv estrogenních látek po celé období pohlavního dospívání jedinců. Tyto látky působí na necílové organismy po celou dobu jejich dospívání a následného života z důvodu jejich přítomnosti ve vodním prostředí.

Při rozdělování oplozených jiker v rámci pokusu, jako byl tento, nelze zajistit vyrovnaný poměr samců a samic. Obtížně odhadnutelnému poměru pohlaví lze zabránit využitím celosamčích triploidních populací pokusných ryb. Tato ojedinělá charakteristika, kdy se uměle indukovaní triploidi vyvíjí pouze v samce, byla zjištěna právě u dánie pruhovaného (Kavumpurath et Pandian, 1990). Vliv ethinylestradiolu na ryby je možno experimentálně hodnotit na základě množství vitellogeninu v tělních tkáních. Vitellogenin je prekurzorem vaječného žloutku a u samic je běžně tvořen jako odpověď na estrogen produkovaný vaječníky. Samci mají velmi malé množství estrogenu v těle, proto je u nich produkce vitellogeninu minimální (Sumpter, 1995). V převážné části dosavadních studií převládá forma vystavení pokusných ryb účinné látce rozpuštěné ve vodním roztoku. Jedním z experimentů, kdy byla pokusným rybám podávána účinná látka

v krmivu, byl pokus zaměřený na sledování účinků drospirenonu, jakožto rozšířené účinné látky v hormonální antikoncepci (Blanco et al., 2016). Poznatky o vlivu estrogenních látek působících po celou dobu dospívání nejsou dostačující, stejně jako možnosti využití celosamčí populace triploidů pro testování účinků těchto látek ve vodním prostředí.

Materiál a metodika

V rámci uvedeného experimentu byl proveden 8-týdenní test toxicity, jehož praktická část probíhala na Ústavu zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství Mendelovy univerzity Brno. Nejprve byla ve spolupráci s Fakultou rybářství a ochrany vod Vodňany JU České Budějovice řešena produkce triploidních samců dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Produkce triploidních samců byla realizována pomocí teplotního šoku o teplotě 41.3°C aplikovaného 2 minuty po oplození jiker, který trval 2 minuty. V důsledku teplotního šoku dojde po splynutí jádra oocyty a spermie a rozestoupení pólových tělísek k opačným pólům zygoty k zadržení jednoho pólového tělíška, chromozomy se proto nemohou rozestoupit rovnoměrně do nově vzniklých buněk a vzniká triploidní zygota. Pro ověření úspěšnosti indukce triploidie byl před začátkem pokusu vzorek embryí změřen průtokovou cytometrií. Toto vyšetření triploidii potvrdilo.

Rybám byla v rámci pokusu v období larválního, juvenilního a adultního vývoje podávána v krmivu zabudovaná testovaná látka ethinylestradiol ve třech různých koncentracích a testovaná látka 17 β -estradiol v jedné koncentraci. K nanesení testovaných látek na krmivo byla ve spolupráci s Ústavem technologie léčiv Farmaceutické fakulty VFU vyvinuta nová metodika. Kontrolní skupiny byly krmeny krmivem bez navázané testované látky. Před samotným zahájením pokusu byly ryby rozděleny do 12 nádrží. Dvě kontrolní skupiny triploidních jedinců byly krmeny krmivem bez testovaných látek, dvě skupiny sloužící jako pozitivní kontrola byly krmeny krmivem s navázanou látkou 17 β -estradiol. Ve zbylých 6 akváriích byly ryby krmeny krmivem se třemi rozdílnými koncentracemi ethinylestradiolu, v jednom duplikátu. Poslední dvě akvária obsahovala ryby, u kterých nebyla teplotním šokem vyvolána triploidie, jednalo se tedy o diploidní formy dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Tyto ryby byly krmeny krmivem bez obsahu testovaných látek.

Nejnižší testovaná koncentrace testované látky byla stanovena na základě environmentální kontaminace a dostupné odborné a vědecké literatury. Další testované koncentrace byly stanoveny jako 10 a 100násobek této koncentrace. Jednalo se o koncentrace 0,1 mg/100g, 0,01 mg/100g a 0,001 mg/100g krmiva (Peck et al. 2004). Ryby byly krmeny vždy 3x denně, ráno, v poledne a večer. Výměna vodní lázně probíhala vždy 1x denně. Zároveň s výměnou vody proběhl odběr vody před výměnou a po výměně a její laboratorní vyšetření. Po 8 týdnech byl experiment ukončen a vyhodnocen.

Krmivo s obsahem	Kontrola (<i>diploidi</i>)	Kontrola (<i>triploidi</i>)	Pozitivní kontrola	Pokusná skupina 1	Pokusná skupina 2	Pokusná skupina 3
Bez testované látky	0	0	x	x	x	x
17 β -estradiol (mg/100g)	x	x	0,01	x	x	x
Ethinylestradiol (mg/100g)	x	x	x	0,001	0,01	0,1

Výsledky a závěr

V rámci vyhodnocení osmi-týdenního experimentu budou na triploidních formách dánia pruhovaného (*Danio rerio*) provedena jednotlivá vyšetření - stanovení hmotnosti jednotlivých ryb, stanovení vitellogeninu v celotělovém homogenátu ryb pomocí ELISA metody, stanovení hodnot aromatázy, histologické vyšetření gonád a stanovení vybraných ukazatelů oxidativního stresu (aktivita antioxidantních a detoxikačních enzymů, hodnocení úrovně poškození lipidů a proteinů).

Vzhledem k náročnosti technického a časového provedení pokusu nejsou momentálně ještě získaná data vyhodnocena. Vyhodnocení odebraných vzorků je naplánováno na průběh měsíce prosince a na první polovinu ledna. Následně proběhne analýza dat a jejich statistické zpracování. Kromě vyšetření odebraných vzorků tkání je v plánu také vyšetření vody pro zjištění, zda jsou testované látky navázané na krmivu schopny uvolnění se do vodního prostředí a zpětné stanovení koncentrace testovaných látek v krmivu.

Seznam literatury:

Blanco, M., Fernandes, D., Medina, P., Blázquez, M., Porte, C. 2016. Drospirenone intake alters plasmatic steroid levels and cyp17a1 expression in gonads of juvenile sea bass. *Environmental Pollution* 213: 541-548.

Brion, F., Tylet, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P. 2004. Impact of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68: 193-217.

Kavumpurath, S., Pandian, T.J. 1990. Induction of triploidy in the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton). *Aquaculture Research* 21: 229-306.

Liu, S., Chen, H., Xu, X. R., Liu, S. S., Sun, K. F., Zhao, J. L., Ying G. G. 2015. Steroids in marine aquaculture farms surrounding Hailing Island South China: Occurrence, bioconcentration, and human dietary exposure. *Science of the Total Environment* 502: 400-407.

Peck, M., Gibson, R. W., Kortenkamp, A., Hill, E. M. 2004. Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two united kingdom rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, No. 4: 945-952.

Sumpter, J. P. 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters* 82/83: 737-742.

Tato práce vznikla za finanční podpory IGA 224/2019/FVHE

Dopad mikroplastů na organismus pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Nikola Hodkovicová^{1,2}, Hana Minářová^{2,3}, Hana Čaloudová¹, Petr Maršálek¹

Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství², Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Znečištění vodního prostředí plasty je aktuálně diskutovaným problémem vědecké sféry, jejich dopad na necílové vodní organismy však stále není dostatečně prostudován. Rozšíření plastů je celosvětové a jejich hlavním zdrojem je humánní činnost (Botterell et al., 2019). Plasty se nejčastěji dělí podle složení (polyethylen, polypropylen, polystyren, polyvinylchlorid aj.), tvaru (kulovité, vlákna aj.) nebo podle velikosti (makro-, meso-, mikro- a nanoplasty). Jako mikroplasty jsou nejčastěji definovány plasty v rozmezí velikosti od 20 µm do 5 mm (Eerkes-Medrano et al., 2015; EFSA 2016). Pro náš experiment jsme vybrali mikroplasty o velikostním rozmezí 40–48 µm z materiálu polyethylen (Sigma-Aldrich, USA), který je jedním z celosvětově nejvíce používaných plastů. Byl testován jejich dopad na organismus pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v průběhu šesti-týdenní orální aplikace. Mikroplasty byly inkorporovány do krmiva ve třech testovacích koncentracích – 0,5%, 2% a 5%, a jejich účinky byly porovnávány s kontrolní skupinou. Cílem tohoto experimentu bylo zjištění potenciálního vlivu polyethylenových mikročástic na biometrické, hematologické, biochemické a histopatologické parametry pstruha duhového a dále jejich vliv na vybrané pro a protizánětlivé cytokiny a parametry oxidativního stresu.

Materiál a metodika

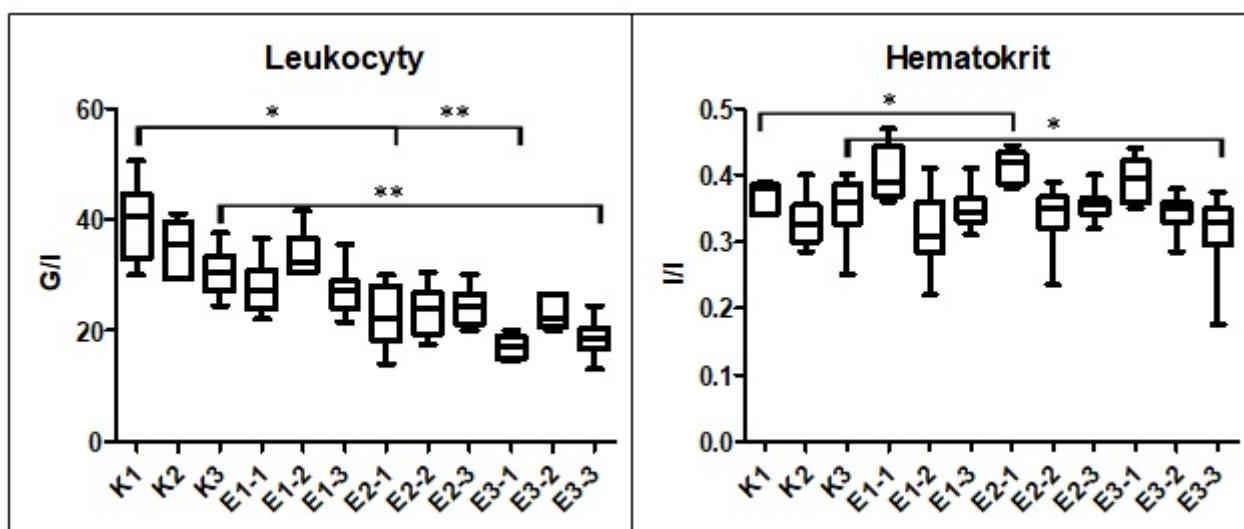
Experiment byl proveden na 160 juvenilních jedincích pstruha duhového. Ryby byly nejprve aklimatizovány po dobu dvou týdnů pro jejich navyknutí na laboratorní podmínky. Následně byl celkový počet ryb rozdělen do 8 akvárií po 20 ks. Test byl proveden v duplikátu – dvě akvária byla vystavena 0,5 % koncentraci polyethylenu v krmivu (E1), další dvě 2% koncentraci (E2) a poslední dvě 5% koncentraci (E3). Dvě akvária sloužila jako kontrolní (K) a byla vystavena nulové koncentraci mikroplastů. Ryby byly krmeny 3× denně v celkové dávce 1,5% tělesné hmotnosti/den, tato dávka byla upravována každé 2 týdny vzhledem k aktuální hmotnosti ryb. Experimentální fáze trvala šest týdnů a v jejím průběhu byly provedeny celkem tři odběry – v 2. a 4. týdnu a celý pokus

byl zakončen v 6. týdnu závěrečným odběrem. V rámci experimentu byla utracena jedna ryba, a sice v nejvyšší testované koncentraci.

V rámci všech odběrů byl každé rybě odebrán vzorek krve do heparinizované injekční stříkačky pro stanovení základních hematologických a biochemických parametrů, zjištění fagocytární aktivity lymfocytů a provedení krevních nátěrů pro stanovení diferenciálního rozpočtu leukocytů. Následně byla ryba omráčena tupým úderem do hlavy, usmrcena přetětím žaberních oblouků a každý kus individuálně změřen pro zjištění základních biometrických parametrů (hmotnost těla, hmotnost jater, celková délka, šířka, výška). Všechny ryby byly předloženy k pitevnímu vyšetření, v rámci kterého byly odebrány vzorky pro zjištění vlivu na genovou expresi (žábra, játra, přední ledvina a přední střevo), stanovení základních parametrů oxidativního stresu (žábra, játra, zadní ledvina) a pro provedení patoanatomického vyšetření (žábra, játra, kůže, slezina, přední a zadní úsek střeva). Získaná data byla následně předložena k statistické analýze (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$), ve které byla porovnána vždy kontrolní skupina s experimentálními skupinami z daného odběru. Data jsou prezentována jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD).

Výsledky

Nebyl zjištěn vliv aplikace mikroplastových částic v krmivu na stanovované biometrické parametry. Hematologické vyšetření neprokázalo statisticky významné rozdíly v počtu erytrocytů a hodnotách hemoglobinu mezi jednotlivými odběry a kontrolou. Významné rozdíly byly zjištěny v počtu leukocytů, kde byl sledován pokles hodnot vzhledem k narůstající koncentraci mikroplastů v krmivu i vzhledem k délce trvání experimentu. Hodnoty hematokritu poukázaly statisticky významný nárůst hodnot v E1, E2 i E3 oproti kontrole v prvním odběru, v čase třetího odběru však došlo k vyrovnání hodnot mezi kontrolou a experimentálními skupinami.



Obrázek 1. Grafické znázornění hodnot leukocytů a hematokritu. K1-3 – kontrolní skupina (první až třetí odběr), E1 1-3 (experimentální skupina E1, první až třetí odběr), E2 1-3 (experimentální skupina E2, první až třetí odběr), E3 1-3 (experimentální skupina E3, první až třetí odběr).

V rámci biochemického vyšetření byly zjištěny statisticky významné rozdíly v hodnotách alanin aminotrasferázy, kdy v rámci druhého odběru došlo k poklesu hodnot v E3 skupině. Hodnoty amoniaku poklesly při druhém odběru téměř na polovinu v E3 skupině oproti kontrolní skupině. K poklesu hodnot laktátu došlo také v E3 skupině, avšak během prvního odběru. Ostatní hodnoty stanovované v rámci biochemické analýzy neprokázaly statistickou významnost při srovnání s kontrolou ve stejném čase odběru. Výsledná data jsou prezentována v Tabulce 1.

	První odběr				Druhý odběr				Třetí odběr			
	K1	E1-1	E2-1	E3-1	K2	E1-2	E2-2	E3-2	K3	E1-3	E2-3	E3-3
ALB	15,8 ±3,2	15,9 ±2,7	15,9 ±1,7	15,8 ±2,2	15,4 ±3,7	15,7 ±2,6	15,3 ±2,7	13,9 ±3,2	15,5 ±2,8	16,0 ±1,8	17,5 ±2,3	15,6 ±3,5
ALP	2,0± 0,6	2,2± 1,0	2,1± 0,7	2,6± 0,7	2,4± 0,8	2,4± 0,9	2,0± 0,5	1,9± 0,6	1,8± 0,6	2,1± 0,8	2,2± 0,7	2,0± 0,7
ALT	0,4 ±0,1	0,5 ±0,1	0,5 ±0,3	0,4 ±0,1	0,4 ±0,1 *	0,4 ±0,1	0,3 ±0,1	0,2 ±0,1 *	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1	0,3 ±0,1
AST	6,8 ±1,5	8,4 ±1,9	6,7 ±1,4	7,9 ±2,0	7,5 ±2,8	8,0 ±1,2	8,2 ±2,4	7,0 ±1,8	6,6 ±1,7	5,8 ±1,3	6,3 ±1,6	6,5 ±1,9
AMO N	1024, 0 ±93,9	928, 6 ±75, 2	755, 9 ±71, 2	665,0 ±57,8	837, 5 ±89, 6 **	694, 6 ±64, 6	612, 9 ±83, 1	485, 5 ±77, 1 **	539, 8 ±83, 4	467, 9 ±73, 5	470,6 ±114, 3	404, 8 ±65, 7
TP	39,1 ±5,2	38,4 ±2,7	38,5 ±1,6	39,7 ±2,7	40,9 ±5,0	41,4 ±4,3	37,6 ±3,5	35,1 ±3,4	38,2 ±4,5	38,2 ±3,4	40,8 ±3,6	40,1 ±5,1
CHO L	10,1 ±1,4	10,1 ±1,2	9,6 ±1,2	10,3 ±1,7	10,2 ±1,4	11,0 ±0,9	10,5 ±1,7	10,2 ±1,5	9,6 ±2,1	10,1 ±1,9	10,4 ±1,8	9,7 ±1,6
FOS	7,0 ±0,7	6,8 ±0,7	5,5 ±0,7	4,3 ±0,5	6,4 ±0,8	5,8 ±0,8	4,7 ±0,7	3,9 ±0,5	3,3 ±0,6	3,1 ±0,5	3,4 ±0,6	3,3 ±0,3
GLC	2,6 ±0,5	3,2 ±0,4	3,8 ±0,7	4,4 ±0,5	4,3 ±1,1	4,0 ±0,4	4,6 ±1,1	4,4 ±0,4	4,7 ±0,7	4,8 ±0,7	5,1 ±0,6	4,7 ±0,7
KRE A	28,6 ±4,2	34,2 ±6,9	29,5 ±5,4	31,4 ±4,7	35,7 ±6,7	35,9 ±8,2	26,7 ±5,7	25,7 ±4,9	32,0 ±7,1	32,6 ±5,3	33,3 ±9,0	33,8 ±7,6
LDH	28,7 ±10,1	44,4 ±5,2	40,2 ±9,8	47,6 ±10,4	42,0 ±10, 4	35,9 ±11, 9	39,8 ±11, 9	26,3 ±5,7	31,6 ±14, 1	28,1 ±10, 4	29,6 ±11,4	27,6 ±6,1
LACT	5,6 ±1,3*	3,4 ±1,0	4,1 ±1,6	2,3 ±0,8*	4,3 ±1,0	3,4 ±1,0	4,0 ±1,4	3,1 ±1,2	3,7 ±1,4	3,9 ±1,1	4,3 ±1,4	3,9 ±1,4

	*			*								
TAG	2,5 ±0,6	2,9 ±0,9	2,6 ±0,7	2,7 ±0,8	2,2 ±0,9	2,9 ±0,6	2,5 ±0,8	2,9 ±0,9	1,9 ±0,6	2,3 ±0,9	2,7 ±1,4	2,0 ±0,9
CA	3,0 ±0,2	3,0 ±0,2	3,1 ±0,2	2,9 ±0,2	3,0 ±0,5	3,0 ±0,2	3,0 ±0,2	2,9 ±0,2	2,7 ±0,4	2,7 ±0,2	2,9 ±0,2	2,7 ±0,3

Tabulka 1. Výsledky biochemické analýzy. ALB – albumin, ALP – alkalická fosfatáza, ALT – alanin aminotrasferáza, AST – aspartát aminotrasferáza, AMON – amoniak, TP – celkový protein, CHOL – cholesterol, FOS – fosfor, GLC – glukóza, KREA – kreatinin, LDH – laktát-dehydrogenáza, LACT – laktát, TAG – triglyceridy, CA – vápník). Průměr ± SD.

Vzhledem k náročnosti proběhlého experimentu, množství odebraných vzorků a časového průběhu, budou analýzy vzorků odebraných pro stanovení vlivu orální aplikace mikroplastů na parametry oxidativního stresu a změn exprese genů pro zánětlivé a proti-zánětlivé cytokiny, vyhodnoceny později, stejně jako vyhodnocení případných patoanatomických změn tkání.

Seznam literatury:

Botterell, Z.L.R., Beaumont, N., Dorrington, T., Steinke, M., Thompson, R.C., Lindeque, P.K., 2019. Bioavailability and effects of microplastics on marine zooplakton: A review. *Environmental Pollution* 245:98–110.

Eerkes-Medrano, D., Thompson, R. C., Aldridge, D. C., 2015. Microplastics in freshwater systems: A review of the emerging threats, identification of knowledge gaps and prioritisation of research needs. *Water Research* 75:63–82.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2016. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal* 14(6):4501, 30 pp. doi: 10.2903/j.efsa.2016.4501.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 212/2019/FVHE

Hodnocení produkce stafylokokových enterotoxinů v lahůdkářských a cukrářských výrobcích

Lenka Necidová¹, Haruštiaková Danka², Šárka Bursová¹, Kateřina Bogdanovičová³,
Iveta Vaňková¹, Michaela Vinklářová¹, Matej Tkáč¹

Ústav hygieny a technologie mléka¹ a Ústav gastronomie³, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; Masarykova univerzita, Brno²

Úvod

Staphylococcus aureus je významným patogenem člověka i zvířat. Je schopný 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). V současnosti je známo více než 20 typů SEs označovaných písmeny A–V (Argudín et al., 2010). Mezi rizikové výrobky se z pohledu možného výskytu *S. aureus* řadí kromě mléka a mléčných výrobků (Rabello et al., 2007) také potraviny s vysokým podílem ruční práce – lahůdkářské a cukrářské výrobky. Jak uvádí výsledky studie Bogdanovičová et al. (2019) prováděné v provozech společného stravování, zdrojem kontaminace lahůdkářských a cukrářských výrobků může být prostředí provozoven a ruce zaměstnanců. Ze 17,9 % stěrů prostředí nebo rukou byly izolovány bakterie *S. aureus*, z nichž u 58,5 % (70,0 % z rukou, 52,0 % z prostředí) byly prokázány geny kódující produkci SEs. Sundararaj et al. (2019) získali 34 izolátů ze 100 vzorků potravin určených k přímé spotřebě, u 14 z těchto izolátů byl prokázán gen kódující tvorbu SEB. Za rizikové množství koagulázopozitivních stafylokoků, mezi jejichž hlavní zástupce se *S. aureus* řadí, je považován počet více než 10^5 KTJ v ml nebo g potravin (Necidová et al., 2012; Nařízení komise (ES) č. 2073/2005).

Cílem práce bylo hodnocení růstu a množení toxigenních kmenů *S. aureus* v lahůdkářských a cukrářských výrobcích. Pozornost byla věnována především hodnocení podmínek skladování umožňujících produkci stafylokokových enterotoxinů.

Materiál a metodika

Pro studii byly z lahůdkářských výrobků vybrány chlebičky obsahující veku, máslo, sýr eidam a šunku (pH = 5,64–5,96; a_w = 0,946–0,964). Dále byla studie rozšířena o modelový pokus s cukrářskými výrobky – věnečky s máslovým krémem (pH = 6,85–7,21; a_w = 0,952–0,965). Vzorky potravin byly zaočkovány směsí toxigenních kmenů *S. aureus* (CCM 5757, CCM 5971 a 1

izolát z potravin), produkujících tři z klasických typů SEs (SEA, SEB a SEC) v množství $5,0 \times 10^1 - 4,8 \times 10^3$ KTJ.g⁻¹. Zaočkované vzorky byly uchovávány při teplotách simulujících porušení chladicího řetězce – 15, 25 a 30 °C po dobu 72 hodin. Během doby skladování byly asepticky ve stanovených intervalech odebírány dílčí vzorky potravin. Ve vzorcích byla sledována dynamika růstu bakterií *S. aureus* referenční metodou ČSN EN ISO 6888-1 (1999) s Baird-Parker agarem. Produkce bakteriálních toxinů byla prokazována imunofluorescenční metodou (ELFA) s využitím automatizovaného systému miniVIDAS®. Současně byly v průběhu skladování lahůdkářských výrobků monitorovány počty mezofilních bakterií mléčného kvašení metodou ČSN ISO 15214 (2000) s agarem De Man, Rogosa a Sharpe.

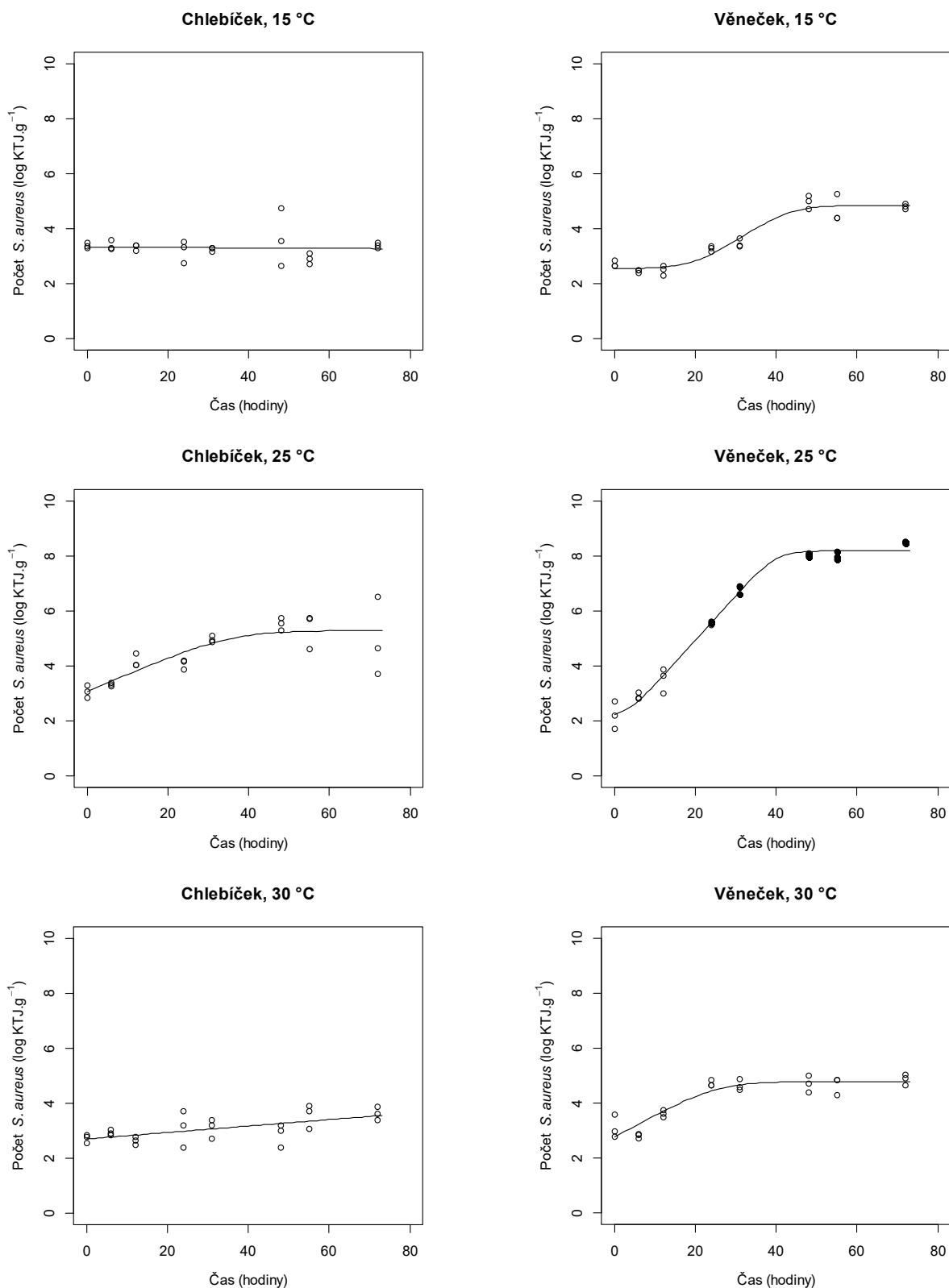
Získaná experimentální data (hodnoty KTJ.g⁻¹) byla pomocí logaritmické transformace s použitím dekadického logaritmu převedena na hodnoty log KTJ.g⁻¹. Růst bakterií *S. aureus* v chlebičkách při teplotě 15 a 30 °C byl odhadnut lineárním modelem, při teplotě 25 °C a ve věnečkách skladovaných při všech teplotách byl vyhodnocen Baranyiho-Robertsovým modelem (Baranyi a Roberts, 1994) pomocí knihovny „nlsMicrobio“ v software R.

Výsledky

Schopnost růstu a množení *Staphylococcus aureus* v chlebičkách a cukrářských výrobcích s máslovým krémem při teplotách 15 °C, 25 °C a 30 °C ukazují růstové křivky vytvořené pomocí Baranyiho-Robertsova modelu pro jednotlivé teploty skladování a jsou uvedeny v obrázku 1.

Množení *S. aureus* ovlivňují hodnoty vnitřních a vnějších faktorů potravin. Teploty umožňující tvorbu SEs nejsou identické jako limity pro množení *S. aureus*. Obecně jsou SEs v potravině produkovány při teplotách 10–46 °C, pH 4,5–9,6 a minimální vodní aktivitě 0,87 (Bhunja, 2008). Baran et al. (2017) hodnotili vliv teploty na produkci SEs u sýrů zrajících při 4 a 12 °C. Za celou dobu skladování 90 dnů nebyla tvorba SE typu B u sýrů prokázána, a to nejen z důvodu uvedených teplot skladování, ale také především díky aktivitě použité startovací kultury.

Produkce SEs byla v naší studii zaznamenána pouze v jednom případě, a to u věnečků s máslovým krémem, kdy byly SEs detekovány po 24 h skladování při teplotě 25 °C. V ostatních případech počty *S. aureus* výrazně nepřekročily rizikovou hranici 10^5 KTJ.g⁻¹ potravin, přestože hodnoty pH, a_w a teplota skladování růst *S. aureus* umožňovaly. Důvodem pro potlačení růstu bude vysoký počet konkurenční mikroflóry – především bakterií mléčného kvašení, které byly v chlebičkách stanoveny během skladování v množství $10^8 - 10^9$ KTJ.g⁻¹. Fakt, že některé kmeny *Lactobacillus lactis* produkují bakteriocin nisin, který je znám jako inhibitor *S. aureus*, uvádí např. Klaenhammer et al. (1993).



Obrázek 1. Růstové křivky *S. aureus* ve chlebičcích a věnečcích s máslovým krémem a doba detekce stafylokokových enterotoxinů. Pozorovaná data (○ symboly), predikované Baraniyho modely (— křivky) nebo lineární modely (— přímky) a doba detekce enterotoxinu (● plné symboly).

Závěr

Na základě uvedených výsledků lze konstatovat, že v případě kontaminace lahůdkářských nebo cukrářských výrobků toxigenními bakteriemi *S. aureus* má na tvorbu enterotoxinů vliv nejen vyšší teplota skladování, ale i přítomnost konkurenční mikroflóry v podobě bakterií mléčného kvašení, které na rozdíl od vyšších teplot růst *S. aureus* a tvorbu SEs potlačují.

Seznam literatury:

- ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, vol. 2, p. 1751–1773.
- BARAN, A., ERDOGAN, A., ATASEVER, M. Effects of storage temperatures on survival and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in Turkish white pickled cheese. *Malaysian Journal of Microbiology*, 2017, vol. 13, issue 4. DOI: 10.21161/mjm.104817
- BARANYI, J., ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 1994, vol. 23, no. 3-4, p. 277–294.
- BHUNIA, A.K. *Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis*. 1st ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, 2008, p. 227–235.
- BOGDANOVIČOVÁ, K., KAMENÍK, J., DOROTÍKOVÁ, K., STREJČEK, J., KŘEPELOVÁ, S., DUŠKOVÁ, M., HARUŠTIAKOVÁ, D. 2019. Occurrence of Foodborne Agents at Food Service Facilities in the Czech Republic. *Journal of Food Protection*. 82, 7, p. 1096-1103.
- 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.
- ČSN ISO 15214 – Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 2000.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 1993, pp. 39-85.
- LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, vol. 2, p. 63–76.
- 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.
- 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 cows with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, vol. 56, p. 1505-1511.
- SUNDARARAJ, N., KALAGATUR, N. K., MUDILI, V., KRISHNA, K., ANTONYSAMY, M. Isolation and identification of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates from Indian food samples: evaluation of in-house developed aptamer linked sandwich ELISA (ALISA) method. *J Food Sci Technol*, 2019, 56 (2), p. 1016-1026.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno projekt 223/2019/FVHE

Hodnocení metod pro detekci sójové bílkoviny v potravinách

Kamila Novotná, Zuzana Tšponová, Tereza Popelková, Petra Doleželová, Veronika Doubková
*Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinárního hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Sója a výrobky z nich se podle nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1169/2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům zařazují mezi látky nebo produkty, které vyvolávají alergie nebo nesnášenlivost. Tyto látky z přílohy II tohoto nařízení musí být pak podle článku 21 zvýrazněny na obalu potravin ve složení tak, aby byly jasně odlišeny od ostatních složek uvedených v seznamu složek a to například typem či stylem písma nebo barvou pozadí. Z informací na obalu by se měl spotřebitel dozvědět, zda látky vyvolávající alergie nebo nesnášenlivost potravinu obsahuje. Je na zodpovědnosti provozovatele potravinářského podniku tyto informace uvádět, ale leckdy tyto informace uvedeny nejsou, což uvádí spotřebitele v omyl a pro alergiky to může být problematické.

Pro zjištění sóji v potravinách je možno použít několik metod, mezi které patří ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (Scharf *et al.* 2013), polymerázová řetězová reakce PCR (Stefanova *et al.*, 2013) s izolací pomocí CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), mikroskopické, histologické a imunohistochemické metody (Pospiech *et al.*, 2011) či chromatografické metody (Leitner *et al.*, 2006).

Tato práce je zaměřena na srovnání dvou metod pro stanovení sóji v potravinách, jedná se o metody ELISA a PCR. Dílčím cílem bylo zavést a optimalizovat metodu end-point PCR pro důkaz genu lektin, což je gen specifický pro sóju a srovnat zjištěné výsledky obou analýz s informací o složení potravin na obalu.

Materiál a metodika

Celkem bylo analyzováno 57 vzorků potravin rostlinného a živočišného původu (45 masných výrobků a 12 výrobků rostlinného původu) nakoupených v tržní síti ČR. Vzorky byly rozděleny do tří skupin podle informace na obalu: výrobky obsahující sóju (O), výrobky neobsahující sóju (N) a výrobky obsahující stopy sóji (S). Charakteristika analyzovaných vzorků a jejich zařazení do skupin jsou uvedeny v tabulce 1.

Izolace DNA

Pro izolaci DNA byla použita metoda CTAB – cetyltrimethylammoniumbromid (Stefanova *et al.*, 2013) a komerčními kity DNeasy Plant Pro (Quiagen) a GENE Spin kit (Eurofins). Po izolaci byla DNA rozpuštěna v PCR vodě, spektrofotometricky kvantifikována pomocí NanoPhotometer N60

(Implen) a skladována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byla u vzorků potravin PCR metodou zjišťována přítomnost nukleotidové sekvence specifické pro lektin (vnitřní gen sóji).

Sekvence primerů pro metodu end-point PCR byla navržena podle již publikovaných sekvencí GMO3 a GMO4. Očekávaná délka produktu amplifikace byla 118pb.

PCR

Reakce probíhala v konečném objemu 25 μl obsahující 1 μl DNA, 0,2 $\mu\text{mol/L}$ každého primeru (GMO3 a GMO4), 0,2 mmol/L každého dNTP, 1x PCR pufr, 2,5 mmol/L MgCl_2 a 1U Taq Polymerázy. Amplifikace měla následující parametry: úvodní denaturace při $95\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$, 35 cyklů spočívajících z denaturace při $95\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$, annealing při $64\text{ }^{\circ}\text{C}/30\text{ s}$ a extenze při $72\text{ }^{\circ}\text{C}/1\text{ min}$. a závěrečné extenze při $72\text{ }^{\circ}\text{C}/3\text{ min}$.

Pro vizualizaci DNA v agarozovém gelu bylo použito značení barvivem SYBR green.

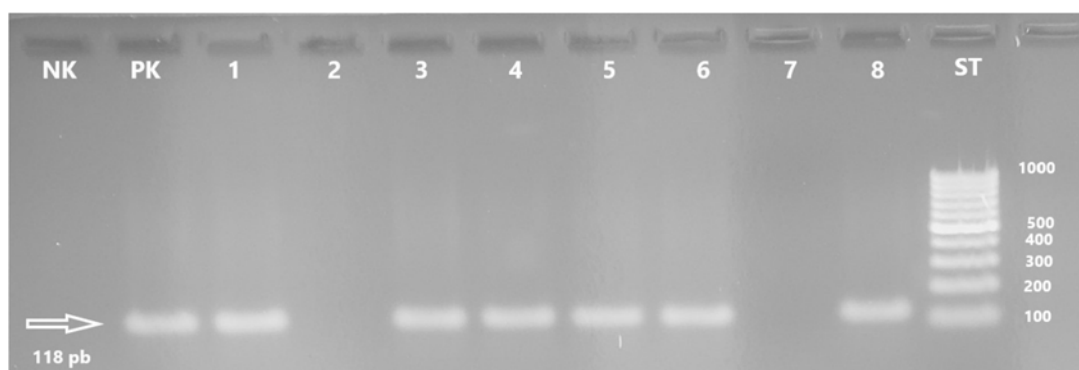
ELISA

K provedení průkazu sóji ve vzorcích potravin byl použit komerční kit Veratox® for soy allergen (Neogen) s rozsahem kvantifikace 2,5–25 ppm. Příprava vzorků, extrakce i postup pro provedení ELISA metody byli provedeny dle instrukcí v přiloženém návodu.

Bylo také provedeno ověření sójového proteinu ve čtyřech vzorcích potravin v akreditované laboratoři.

Výsledky

Výsledky provedených analýz pro jednotlivé vzorky jsou uvedeny v tabulce 1. Příklad vizualizace 1,7 % agarozového gelu po amplifikaci specifického DNA fragmentu lektinu je uveden na obrázku 1. Z obrázku je patrné, že pozitivní signál byl ve formě svítícího proužku DNA o délce 118 bp.



Obrázek 1: 1,7 % agarosový gel po elektroforéze PCR produktů s vizualizací na transiluminátoru po obarvení SYBER Green.

NK=negativní kontrola; *PK*= pozitivní kontrola; *1-8*= vzorky; *ST*= délkový standart GeneRuler 100 bp DNA Ladder

Tabulka 1: Vzorky potravin a jejich zařazení do skupin dle informace na obalu výrobku a výsledky analýz PCR, ELISA a zjištěná koncentrace DNA.

kód vzorku	informace na obalu potraviny	výsledek PCR			ELISA	DNA koncentrace	A	ELISA	
		CTAB	GeneS pin	DNeasy Plant	g/100 g	ng/μl	260/280	SVÚ g/100g	
1	Polohrubá mouka	N	0	0	-	< 0,9	-	-	
2	Polenta kukuřičná mouka	N	0	0	-	3,09	69,12	1,72	
3	Sójová mouka hladká	O	1	1	1	8,8	191,23	1,44	
4	Sójový granulát	O	1	1	1	9,02	248,12	1,67	
5	Sójový nápoj zajíc	O	0	1	1	9,22	44,33	1,12	
6	Sójová omáčka	O	1	1	-	< 0,9	103,8	1,13	
7	Tofu chilli	O	1	1	-	9,1	212,55	1,48	
8	Patíto tofu paštika	O	0	0	0	2,2	72,90	1,51	<0,7
9	Toskánská zeleninová	S	0	0	-	< 0,9	66,97	0,88	
10	Soya frankfurters classic	O	1	1	0	8,07	90,34	1,11	<0,7
11	Vepřový párek uzený	O	1	1	-	7,4	497,93	1,99	
12	Sójový suk	O	1	1	-	8,6	161,02	1,59	
13	Francouzská rostlinná	O	1	1	-	7,7	568,95	1,85	
14	Drůbeží mortadella	N	0	0	0	< 0,9	91,65	1,88	
15	Lyonský salám	N	0	0	-	< 0,9	46,53	2,09	
16	Bivoj gothajský salám	N	0	0	-	< 0,9	153,75	1,81	
17	Gostoso kuřecí prsní šunka	N	0	0	0	< 0,9	111,31	1,69	
18	Šunkový salám jemně	N	0	0	0	< 0,9	88,76	1,64	
19	Vepřová konzerva	N	0	0	0	< 0,9	219,27	1,46	
20	Bruselská paštika	N	0	0	0	< 0,9	565,18	1,70	
21	Šunkové vídeňské párky	N	0	0	-	< 0,9	235,73	1,60	
22	Kuřecí párky klausovky	N	0	0	-	< 0,9	453,65	1,77	
23	Játrová paštika jemná	N	0	0	0	< 0,9	722,67	1,94	
24	Šunková pěna	N	0	0	0	< 0,9	269,17	1,74	
25	Premium lunch Best	S	0	0	0	< 0,9	132,97	1,52	
26	Paštika s paprikou	O	1	1	-	< 0,9	289,65	1,83	
27	Šunková delikatesa krůtí	S	0	0	-	< 0,9	92,02	1,71	
28	Šunkové maso vepřové	S	0	0	0	< 0,9	133,44	1,57	
29	Šunkový salám Pikok	N	0	0	0	1,9	147,54	1,66	
30	Krůtí nářez	S	0	0	0	< 0,9	140,89	1,52	
31	Šunková delikatesa hovězí	S	0	0	0	< 0,9	124,14	1,50	
32	Kuřecí nářez	S	0	0	0	5,4	122,28	1,60	<0,7
33	Vepřový nářez	S	0	0	0	< 0,9	105,08	1,50	
34	Paštika s kachními játry	N	0	0	-	< 0,9	1019,22	1,91	
35	Šunka s vejci	N	0	0	0	< 0,9	62,74	1,50	
36	Májka na svačinu	S	0	0	0	< 0,9	903,18	1,95	
37	Májka lahůdkový krém	S	0	0	-	< 0,9	236,84	1,67	
38	Pekelníkovy toasty se	N	0	0	0	< 0,9	24,7	2,26	
39	Paštika s kuřecími játry	O	1	1	0	< 0,9	256,14	1,54	<0,7
40	Krůtí s vejci	N	0	0	0	< 0,9	71,38	1,51	
41	Drůbeží jemná paštika	S	0	0	0	< 0,9	1052,18	1,99	
42	Paštika zlatá Tesco	S	0	0	0	< 0,9	721,26	2,03	
43	Šunková pěna	S	0	0	0	1,4	219,8	1,60	
44	Matěj	S	0	0	0	< 0,9	4693,72	1,58	
45	Junior jemný salám	N	0	0	0	< 0,9	166,59	1,99	
46	Šunkový salám	N	0	0	-	< 0,9	496,53	2,12	
47	Kuřecí špekáčky	N	0	0	-	< 0,9	125056,06	1,94	
48	Javořické párky	N	0	0	-	< 0,9	216,06	1,95	
49	Kuřecí prsní šunka	N	0	0	-	< 0,9	305,06	1,99	
50	Vídeňské párky	N	0	0	-	< 0,9	324,9	1,89	
51	Játrovka Tesco	N	0	0	0	< 0,9	1126,38	1,96	
52	Játrovka studená	N	0	0	0	< 0,9	1246,02	1,80	
53	Májka	S	0	0	-	< 0,9	607,07	1,92	
54	Kuřecí šunková pěna	N	0	0	0	< 0,9	414,16	1,78	
55	Vepřová konzerva	N	0	0	-	< 0,9	151,03	1,81	
56	Hovězí maso	N	0	0	0	< 0,9	145,27	1,74	
57	Vepřové maso ve vlastní	N	0	0	-	< 0,9	83,64	2,03	

O= obsahuje; N= neobsahuje sóju; S= obsahuje stopy sóji; 0= NEGATIVNÍ; 1= POZITIVNÍ; (-)= neměřilo se

Seznam literatury:

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004 [on-line], [vid 2019-07-02]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/cs/TXT/?uri=CELEX:32011R1169>.

Leitner, A., Castro-Rubio, F., Marina, M.L, Lindner, W. Identification of marker proteins for the adulteration of meat products with soybean proteins bby multidimensional liguid chromatography-tandem mas spectrometry. Journal o f proteopme research 2006, 5, 2424-2430.

Mafra I., Silva S.A., Moreira, E., Ferreira da Silva C., Comparative study of DNA extraction methods for soybean derived food products., Food Control, 2008, 19, 1183-1190.

Pospiech, M. Tremlová, B., Renčová, E., Randulová, Z., Řezáčová Lukášková, Z., Pokorná J. Comparison of the Results of the ELISA, histochemical and immunohistochemicals Detection of Soya Proteins in meat Products. Czech Journal of Food Sciences 2011, vol 29, no. 11, p. 471-479.

Scharf, A., Kase, U., Wichman, G., Besler, M. Performanmce of ELISA and PCR methods for the determination of Allergens in food: An Evaluation of six years of Proficiency testing for soy (*Glycine max.* L.) and wheat gluten (*Triticum aesivum* L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry 2007,. 2013, 61, 10261-10272.

Stefanova, P., Taseva, M., Georgieva, T., Gotcheva, V., Anggelo, A. A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products. Biotechnology and biotechnological Equipment, 2013, vol. 27, no. 3, p. 3803-3810.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 213/2019/FVHE

Disperze mlád'at orla mořského *Haliaeetus albicilla*

Dana Rymešová¹, Veronika Machálková¹, Lenka Rozsypalová¹

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

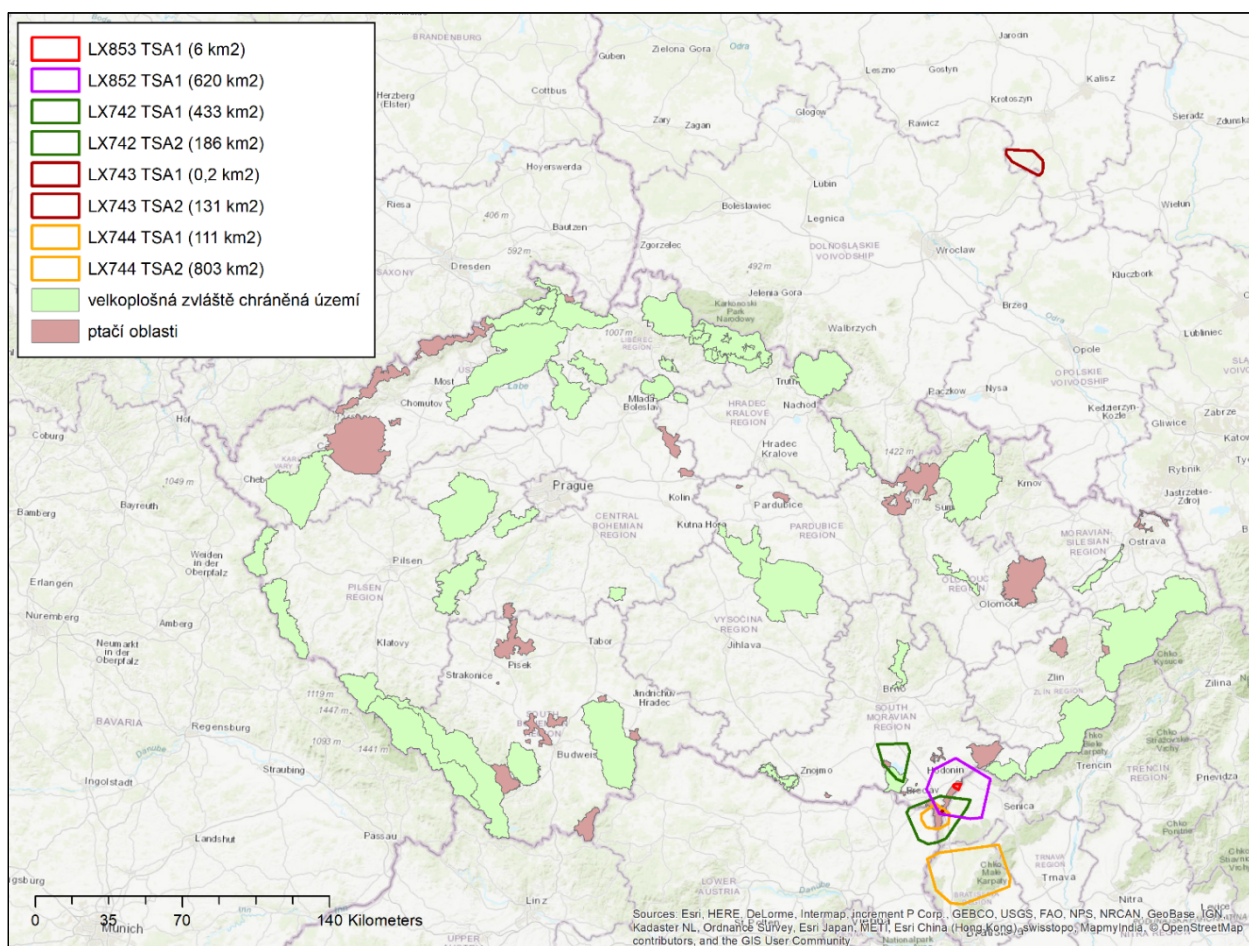
Metody získávání dat o ekologii ptačích druhů se vyvíjely od náhodných pozorování anonymních jedinců, přes cílené odchyty, kroužkování a kontroly až k éře satelitní telemetrie. Díky GPS/GSM vysílačkám je dnes možné získat data nejen o hnízdících jedincích, ale i o těch nespárovaných a potulujících se (“floaters”) či o mlád'atech opouštějících hnízdo. Tato data lze využít pro ochranu ohrožených druhů. Dosud existuje jen málo publikací o časoprostorových aktivitách orlů mořských zkoumaných satelitní či GPS telemetrií [1,2] a žádná taková není z ČR. Cílem tohoto projektu bylo označení až šesti mlád'at orla mořského GPS/GSM vysílačkami za účelem hodnocení pohnízdni disperze mlád'at, identifikace jejich oblastí dočasného usídlení (tzv. TSAs = temporal settlement areas [3]) a navýšení vzorku telemetricky sledovaných jedinců tohoto druhu, pocházejících z území České republiky.

Materiál a metodika

Pět mlád'at orla mořského bylo po okroužkování na hnízdech na jižní Moravě označeno GPS/GSM vysílačkou OT 20 (Ornitela, Litva) 16.5.2019 a 28.5.2019. Vysílačka byla připevněna na záda mláděte pomocí 6 mm široké teflonové pásky na způsob batohu (dvě smyčky obepínající báze křídel a spojené v oblasti sternu). Lokace mlád'at byly automaticky zaznamenávány co hodinu až do 30.9.2019 a analyzovány v programu ArcGIS 10.1 (Esri) a v jeho extenzích HRT a ArcMET, kde byla vytvořena trajektorie pohybu, vymezena nocoviště a TSAs. TSAs byla konstruovaná jako 95% minimální konvexní polygon (MCP) dle metodiky popsané v bakalářské práci V. Machálkové [4], tj. z nocovišť do 10 km od sebe, celkově využitých daným jedincem min. 10x. Den vylétnutí z hnízda byl určen datem, kdy vzdálenost jedince od hnízda poprvé převyšovala 200 m. Jako den začátku rozptylu bylo stanoveno datum, od něhož se sledované mládě nacházelo dál než 5 km od místa vylíhnutí minimálně po 10 dní. Natální oblast byla definována jako okruh 5 km od hnízda. Jako maximum disperze byla označena přímá vzdálenost nejvzdálenější lokace od hnízda. Podkladové mapy VZCHÚ a ptačích oblastí byly v podobě shapefilů staženy na webu AOPK (gis-aopkcr.opendata.arcgis.com). Z těchto podkladů byla vytvořena mapa TSAs sledovaných mlád'at.

Výsledky

Všech pět označených mláďat se dožilo 30.9.2019. Mláďata tak byla sledována 125 či 137 dnů. Pro jedince bylo získáno 2460-2799 lokací (medián 2731). Poprvé vylétávala z hnízda mezi 19.5. a 27.6.2019 (medián 14.6.). Začátek pohnízní disperze mláďat byl pozorován mezi 23.8. a 19.9.2019 (medián 15.9.). Jednotliví jedinci využívali 1-2 oblasti dočasného usídlení. Plochy, počty a umístění jejich TSAs znázorňuje Obr. 1. Medián plochy všech TSAs byl 156 km². TSAs, ležící v ČR, se kryla s CHKO Pálava a třemi ptačími oblastmi (Pálava, Střední nádrž VDNM a Soutok-Tvrdonicko). Druhé TSA dvou jedinců se nacházelo v zahraničí (v Polsku, resp. na Slovensku). Nejvzdálenější lokace označených jedinců za sledované období se nacházely 60-412 km od hnízda (medián 77 km). K 30.9.2019 byl jeden jedinec na jihozápadě Polska, druhý na Slovensku a tři se zdržovali v České republice (v CHKO Bílé Karpaty, v oblasti Soutoku a u Vodního díla Nové Mlýny). Dva jedinci se opakovaně vraceli do natální oblasti.



Obrázek 1 Mapa velkoplošných zvláště chráněných území a ptačích oblastí v ČR a oblasti dočasného usídlení (TSAs) pěti telemetricky sledovaných mláďat orla mořského

Závěr

Pro účinnou ochranu mladých, nehnízdících jedinců orla mořského je zapotřebí efektivní přeshraniční spolupráce. Většina lokací sledovaných jedinců se nacházela v ptačí oblasti

Soutok-Tvrdonicko. Maximální zaznamenaná vzdálenost disperze v rámci hodnoceného období činila 412 km od hnízda. Ačkoli byla mláďata orla mořského sledována pouhé čtyři měsíce od označení na hnízdě, všichni sledovaní jedinci se za toto období vyskytli alespoň 60 km daleko od hnízda a na území 2-3 států. Tento získaný dataset bude pro další publikační účely scelen s dostupnými daty od dalších osmnácti mláďat orla mořského z ČR, sledovaných pomocí GPS/GSM vysílaček po delší časové období. Tím bude získán reprezentativní vzorek mláďat orla mořského z území ČR, značených nejen na hnízdech na jižní Moravě.

Seznam literatury:

- [1] KRONE O., BERGER A., SCHULTE R. Recording movement and activity pattern of a White-tailed Sea Eagle (*Haliaeetus albicilla*) by a GPS datalogger. *Journal of Ornithology* 2009, 150: 273-280.
- [2] KRONE O., NADJAFZADEH M., BERGER A. White-tailed Sea Eagles (*Haliaeetus albicilla*) defend small home ranges in north-east Germany throughout the year. *Journal of Ornithology* 2013, 154(3): 827-835.
- [3] NEMČEK, V., NOGA M., DOBRÝ M. Movements of imperial eagle *Aquila heliaca* juveniles and description of monitored areas in the bordered zone between Austria, Hungary and Slovakia. *Slovak Raptor Journal* 2014, 8(1): 47-52.
- [4] MACHÁLKOVÁ, V. Časoprostorové aktivity orlů mořských. Brno, 2018. Bakalářská práce. VFU Brno, FVHE, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 216/2019/FVHE

Vliv agrotechnických metod na výskyt mykotoxinů v jablkách

Pavla Sehonová¹, Michaela Rozkydalová¹, Jana Čaloudová¹, Jana Blahová²

¹ Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; ² Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

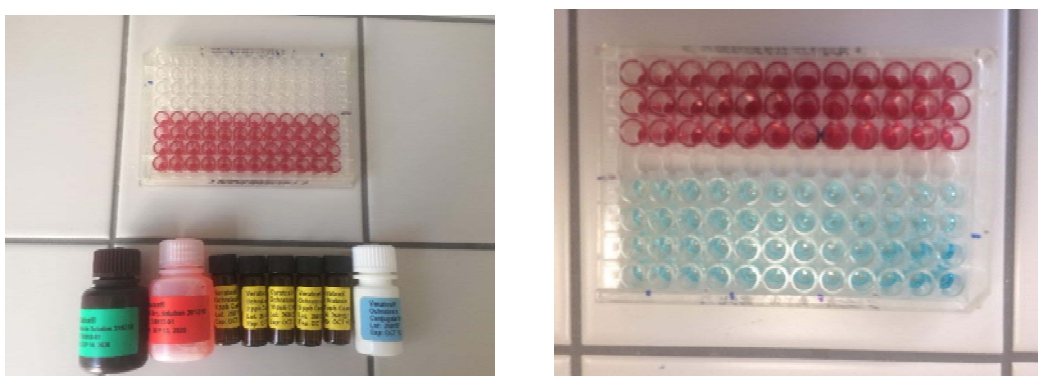
Úvod

Mykotoxiny jsou vysoce toxické sekundární metabolity plísní, zejména rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Mezi nejznámější zástupce mykotoxinů, které se vyskytují v zemědělských produktech a potravinách patří aflatoxiny, ochratoxiny, patulin, fumonisiny a zearalenon (Luo et al., 2018). Maximální limity pro obsah mykotoxinů v potravinách jsou uvedeny v Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, nicméně v tomto nařízení nejsou uvedeny limity pro celé spektrum mykotoxinů, které se v dané potravine mohou vyskytovat – chybí například limit pro obsah ochratoxinu A v ovoci, přestože je známo, že se tento mykotoxin v sušeném ovoci může vyskytovat. Kontaminace potravin a krmiv mykotoxiny je závažný problém s globálním významem. Dle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO, 2002) je zhruba 25 % zemědělských produktů kontaminováno mykotoxiny. Mezi známé toxické efekty mykotoxinů patří teratogenita, mutagenita a karcinogenita (Anfossi et al., 2010). Mykotoxiny vyskytující se v zemědělských plodinách jsou perzistentní a je velmi obtížné je z kontaminovaných surovin odstranit, proto je třeba vzniku mykotoxinů v potravinách předcházet. Zvláště u produktů z ekologického zemědělství se odborná i laická veřejnost domnívá, že by mohly být více náchylné ke kontaminaci plísní a vzniku mykotoxinů, jelikož je v ekologickém zemědělství použití insekticidů a fungicidů omezeno (Blajet-Kosicka et al., 2014). Cílem studie je porovnat rozdíl ve výskytu mykotoxinů v sušených jablkách pocházejících z ekologické a integrované produkce a zjistit tak, zda je úroveň insekticidní a fungicidní ochrany před a po sklizni v ekologické produkci dostatečná.

Materiál a metodika

Při řešení projektu byly nejprve od českého pěstitele získány vzorky sušených jablek. První skupina sušených jablek pocházela z integrované produkce a druhá z ekologické produkce (10 vzorků bio suroviny a 10 vzorků z integrované produkce). Jablka pocházela z úrody sklizené v roce 2018, která byla následně zpracována sušením za účelem využití při výrobě dalších potravin, např. müsli. Před analýzou mykotoxinů byly všechny vzorky nejprve zhomogenizovány a následně byla provedena analýza jednotlivých analytů. Pro stanovení ochratoxinu A byl použit komerční ELISA kit od firmy Veratox. 10 g zhomogenizovaného vzorku bylo extrahováno s využitím 40 ml 50% roztoku

methanolu. Zfiltrovaný extrakt byl následně využit pro vlastní analýzu. Kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky. Obsah patulinu byl stanoven pomocí kapalinové chromatografie s UV detekcí. Po extrakci byl vzorek separován na koloně a kvantifikace byla provedena na základě kalibrační křivky. Stanovení koncentrace aflatoxinu B1 bylo také provedeno chromatograficky s fluorescenční detekcí po předchozí extrakci. Analýza aflatoxinu B1 byla provedena v laboratoři Státního veterinárního ústavu v Jihlavě, protože Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie ani Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství nejsou držiteli povolení pro práci s aflatoxiny.



Obrázek 1. Stanovení koncentrace ochratoxinu A ve vzorcích pomocí komerčního ELISA kitu

Výsledky

Vyšetření vzorků na obsah aflatoxinu B1 prokázalo, že ve všech vzorcích bez ohledu na způsob produkce byl obsah aflatoxinu B1 nižší než 0,16 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Limit pro obsah aflatoxinu B1 v sušeném ovoci uvedený v Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách je 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Obě skupiny vzorků tedy tento limit splňují a neexistuje statisticky významný rozdíl mezi obsahem aflatoxinu B1 v bio jablkách a konvenční surovině.

Obsah ochratoxinu A se v obou skupinách vzorků pohyboval v rozmezí hodnot 4,22–15,99 $\mu\text{g}/\text{kg}$; průměrná hodnota byla 8,05 $\mu\text{g}/\text{kg}$. I když neexistuje statisticky významný rozdíl mezi obsahem ochratoxinu A v bio a konvenčních jablkách, naměřené hodnoty ochratoxinu A jsou překvapivě vysoké. Limit pro obsah ochratoxinu A v sušeném ovoci není v Nařízení Komise č. 1881/2006 stanoven, ale z uvedených výsledků vyplývá, že i ovoce pocházející z našich klimatických podmínek může být tímto mykotoxinem kontaminováno, a to v nezanedbatelných koncentracích.

Naměřená koncentrace patulinu byla u všech vzorků bez ohledu na způsob produkce nižší než 10 µg/kg. Limit pro obsah patulinu přímo v sušených jablkách není v Nařízení Komise č. 1881/2006 stanoven, ale z porovnání obsahu patulinu v námi stanovených vzorcích s nejbližším příbuzným hygienickým limitem pro pevné výrobky z jablek 25 µg/kg vyplývá, že studované šarže sušených jablek nebyly významným zdrojem patulinu, a to bez ohledu na způsob produkce.

Výsledkem projektu je tedy získání poznatků o rozdílu obsahu mykotoxinů ochratoxinu A, aflatoxinu B1 a patulinu ve vzorcích jablek vypěstovaných v rámci integrované a ekologické produkce a též informace o úrovni fungicidní ochrany jablek v České republice. U vzorků dále proběhne analýza na obsah kyseliny kojové. Kromě toho je výsledkem projektu i úspěšné zapojení pregraduálních a postgraduálních studentů do vědeckého týmu, prezentace výsledků na konferenci **XLVIII. Lenfeldovy a Höklovy dny** a publikace připravovaná k uveřejnění ve vědeckém časopise s IF.

Seznam literatury:

Anfossi, L., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G., 2010. Mycotoxins in food and feed: Extraction, analysis and emerging technologies for rapid and on-field detection. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 2, 140–153.

Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M., Kosicki, R., Sibiorowska, E., Grajewski, J., 2014. Co-occurrence and evaluation of mycotoxins in organic and conventional rye grain and products. *Food Control*. 38, 61–66.

FAO, 2002. Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. Rome, Italy: Joint FAO/WHO Food Standards Programme FAO.

Luo, Y., Liu, X., Li, J., 2018. Updating techniques on controlling mycotoxins – a review. *Food Control*. 89, 123–132.

Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006 kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách, 2006. Úřední věstník Evropské unie. L 364, s. 5.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 203/2019/FVHE

Vliv nízkých teplot na růst netopýří buněčné kultury

Seidlová Veronika¹, Němcová Monika¹, Heger Tomáš¹

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Netopýrovití, podobně jako jiní zástupci řádu letounů (Chiroptera), patří mezi jediné savce schopné aktivního letu. Tato schopnost je však spojena s vysokou rychlostí metabolismu. Z tohoto důvodu se v průběhu evoluce u některých druhů vyvinula schopnost měnit intenzitu metabolismu, a to včetně tělesné teploty. Netopýrovití jako praví hibernanti dokážou intenzitu metabolismu výrazně snížit. Tyto změny metabolické rychlosti šetří energii (1). Kromě toho tělesná teplota ovlivňuje imunitní odpověď organismu a také samotné původce onemocnění (2). Nízká tělesná teplota během hibernace redukuje patogenní agens, která jsou typická pro homoiotermní organismy a nejsou psychrofilní či teplotně adaptabilní. Zvýšení tělesné teploty související s aktivním létáním, podobně jako při horečce, pak může inhibovat replikaci patogenů. Tak jako pokles teploty během hibernace, tak i vysoká tělesná teplota (až 41 °C) během aktivity je u netopýra fyziologická. Existuje proto teorie, že netopýří organismus je schopen eliminovat patogeny ještě před propuknutím klinických příznaků (3). Tyto výjimečné adaptace netopýrů se v posledních letech staly předmětem zvýšeného zájmu vědecké obce. Během změn tělesné teploty dochází i ke změnám na buněčné úrovni. A to zejména k rozdílům v energetickém metabolismu, což lze sledovat díky metabolitům vznikajícím v buněčných kulturách (4). Právě moderní *in vitro* modely, buněčné kultury, je vhodné využít k experimentům přijatelným z hlediska etického i legislativního, protože netopýří jsou zákonem přísně chráněni. Cílem tohoto projektu proto bylo sledovat rychlost růstu netopýří buněčné linie makrofágů v závislosti na teplotě a čase kultivace. Pro sledování byly zvoleny tři různé teploty simulující podmínky organismu netopýrů, a to během intenzivního metabolismu (37 °C) a útlumu během hibernace (8 °C) nebo denní strnulosti (17,5 °C) (5). Makrofágy byly zvoleny proto, že jsou důležitou součástí nesespecifických mechanismů imunitního systému. Díky schopnosti eliminovat cizorodé částice pomocí fagocytózy mohou mít zásadní funkci při boji s některými patogeny. Jejich množství tak může hrát významnou roli při zachování zdraví zvířete (6).

Materiál a metodika

Buněčná kultura

Byla použita buněčná linie netopýřích makrofágů získána a immortalizována postupem, který uvádí He *et al.*, 2014 (10). Během experimentu byly buňky kultivovány v médiu DMEM-F12 1:1 s přidavkem 10 % fetálního bovinního séra a penicilinu 100 IU/ml a streptomycinu 100 µg/ml (Biosera, Boussens, France) při 5% obsahu CO₂ v atmosféře a třech různých teplotách (8; 17,5 a 37 °C). Po třech dnech kultivace bylo staré médium vyměněno za nové.

Určení počtu buněk

Během testu byly buňky počítány v počítacích mřížkách vždy ve 4 opakováních (4 jamkách).

Buňky adherované ke kultivačnímu povrchu a buňky volně v suspenzi byly počítány zvlášť. Za živé buňky byly považovány pouze ty, které měly během počítání kulatý tvar.

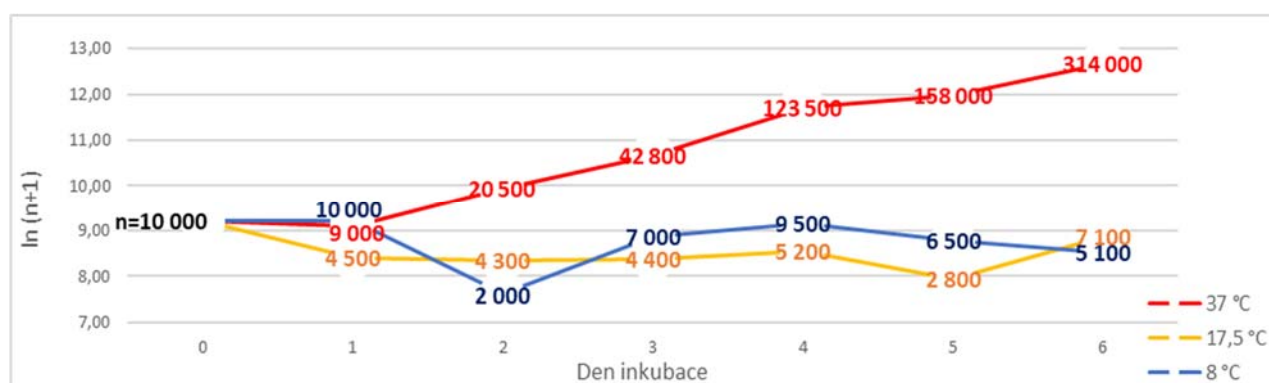
Design experimentu

Test začal s 10 000 buňkami v jedné jamce v 6-jamkových destičkách.

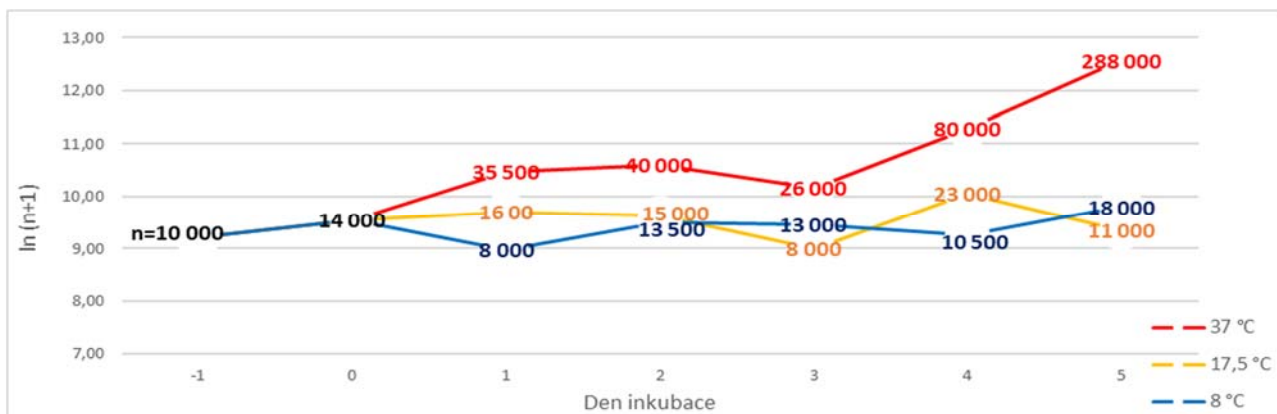
- Buňky byly kultivovány v teplotách 8; 17,5 a 37 °C a počítány každých 24 hodin po dobu 6 dní.
- Buňky byly pre-inkubovány při 37 °C za účelem adheze k povrchu kultivačních jamek. Po 24 hodinách byly buňky spočítány a přesunuty do testovaných teplot a počítány každých 24 hodin po dobu 5 dní.

Výsledky

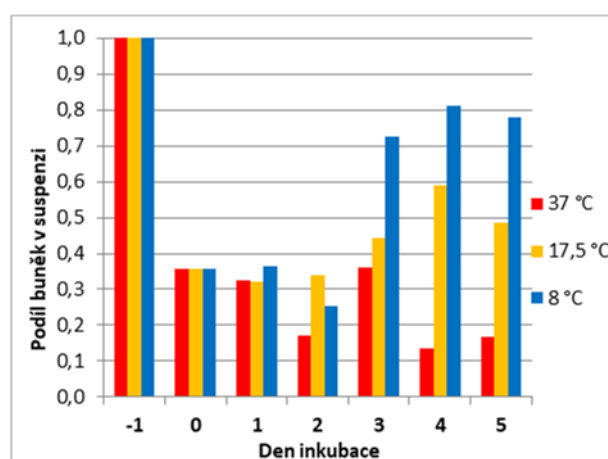
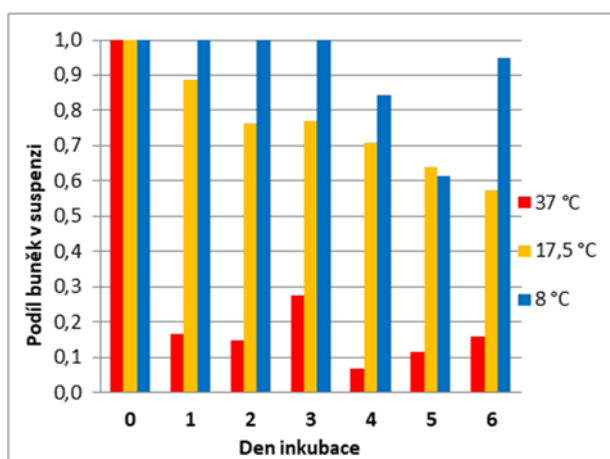
Celkový počet kultivovaných buněk byl statisticky významně ovlivněn inkubační teplotou. Teplota 37 °C vedla k nejvyšší rychlosti růstu kultury (Graf I a, b).



Graf I (a): Vývoj počtu buněk při kultivaci ihned ve sledovaných teplotách.

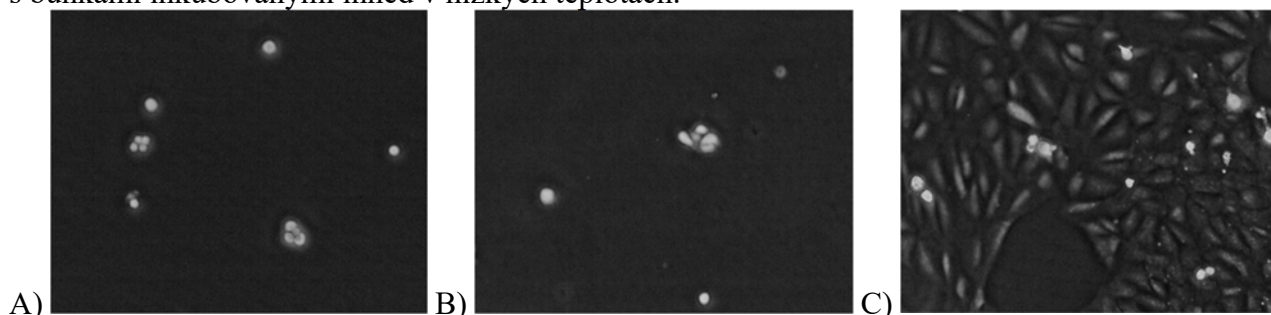


Graf I (b): Vývoj počtu preinkubovaných buněk při kultivaci ve sledovaných teplotách. Buňky (adherované k povrchu vs. volně v suspenzi) se vyvíjely při různých kultivačních teplotách odlišným způsobem (Graf II a, b). Při teplotě 8 °C se buňky vyvíjely téměř pouze v suspenzi a jen malé množství bylo adherované k povrchu kultivační destičky. Při teplotě 17,5 °C počet buněk v suspenzi kontinuálně klesal. V případě preinkubace buněk při 37 °C a následném přemístění desek s buňkami do nízkých teplot byly adherované buňky postupně uvolňovány do suspenze.



Graf II (a): Podíl buněk v suspenzi při kultivaci ihned ve sledovaných teplotách. Graf II (b): Podíl počtu preinkubovaných buněk v suspenzi při kultivaci ve sledovaných teplotách.

Preinkubovaných buněk při kultivaci v 8 a 17,5 °C bylo na konci testu 2 až 3krát více v porovnání s buňkami inkubovanými ihned v nízkých teplotách.



Obrázek I: Immortalizovaná makrofágová buněčná linie během experimentu A po 120 hodinách (5 dnech) kultivace při A) 8 °C; B) 17,5 °C; C) 37 °C.

Závěr

Počet bílých krevních buněk, včetně monocytů jako prekurzorů makrofágů, během hibernace klesá. Proto je počet makrofágů ve srovnání s aktivním metabolismem nižší (2, 7). Makrofágy jsou však schopny přežít nízkou tělesnou teplotu *in vivo* (8) a podle našich výsledků také *in vitro*, a mohou tak být připraveny chránit organismus proti patogenům okamžitě po probuzení ze stavů strnulosti (2, 9).

Seznam literatury:

1. HORÁČEK, Ivan. *Létající savci*. Academia, 1986.
2. BOUMA, Hjalmar R.; CAREY, Hannah V.; KROESE, Frans GM. Hibernation: the immune system at rest?. *Journal of leukocyte biology*, 2010, 88.4: 619-624.
3. O'SHEA, Thomas J., et al. Bat flight and zoonotic viruses. *Emerging infectious diseases*, 2014, 20.5: 741.
4. WAGSTAFF, Jane L., et al. 1H NMR spectroscopy profiling of metabolic reprogramming of Chinese hamster ovary cells upon a temperature shift during culture. *PLoS One*, 2013, 8.10: e77195.
5. GEISER, Fritz; RUF, Thomas. Hibernation versus daily torpor in mammals and birds: physiological variables and classification of torpor patterns. *Physiological Zoology*, 1995, 68.6: 935-966.
6. MANDAL, Ananya (2019) Macrophage Function, News medical life sciences, dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Macrophage-Function.aspx>, [14. 10. 2019].
7. KUZNETSOVA, E. V., et al. Seasonal changes in blood cells and biochemical parameters in the Mongolian hamster (*Allocricetulus curtatus*). *Biology Bulletin*, 2016, 43.4: 344-349.
8. MANIERO, Gregory D. Ground squirrel splenic macrophages bind lipopolysaccharide over a wide range of temperatures at all phases of their annual hibernation cycle. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 2005, 28.4: 297-309.
9. CAREY, Hannah V.; ANDREWS, Matthew T.; MARTIN, Sandra L. Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiological reviews*, 2003, 83.4: 1153-1181.
10. HE, Xiaocui, et al. Establishment of *Myotis myotis* cell lines-model for investigation of host-pathogen interaction in a natural host for emerging viruses. *PloS one*, 2014, 9.10: e109795.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 221/2019/FVHE

Ultrastruktura *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus*

Jaroslav Ondruš^{1,2}, Pavel Kulich³, Oldřich Sychra¹

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, CEITEC, VFU Brno², Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.³

Úvod

Candidatus Neoehrlichia mikurensis (CNM) je klíšťaty přenášená intracelulární bakterie z rodiny Anaplasmataceae, řádu *Rickettsiales*, odpovědná za onemocnění neoehrlichiózu, které ohrožuje zejména jedince s oslabeným, či narušeným imunitním systémem [1]. Rezervoárem CNM jsou dle nynějších poznatků hlodavci a klíšťata, která zároveň plní funkci vektora [2]. Výzkum z roku 2018 uskutečnili členy Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat poprvé odhalil výskyt klíšťat *Ixodes ricinus* infikovaných touto bakterií na téměř celém území České republiky (data nebyla dosud publikována).

Díky nárůstu vědomostí o epidemiologii CNM a zvýšení povědomí o této bakterii vzrůstá počet diagnózy případů neoehrlichiózy [1]. Diagnostika infekce CNM je komplikovaná; dosud nebyl nalezen způsob kultivace této bakterie. Tím pádem nejsou známy povrchové antigenní struktury CNM, a tedy nejsou k dispozici diagnostické serologické testy. Jediným současným způsobem detekce zůstává polymerázová řetězová reakce (PCR).

Znalosti mechanismu napadání buněk hostitele, šíření se v jeho tkáních, a ultrastruktury bakterie CNM jsou do dnešního dne velice omezené. Ačkoliv jsou bakterie z rodiny Anaplasmataceae známy pleomorfními strukturami ve tkáních odlišných hostitelů [3], je v současnosti popsána ultrastruktura CNM pouze ve tkáních savců [4, 5], ale ve tkáních klíšťat zůstává neznámá. Popsání ultrastruktury bakterie *Candidatus N. mikurensis* ve tkáních vektora *Ixodes ricinus* je cílem předloženého projektu.

Materiál a metodika

Sběr a krmení klíšťat

Dospělci klíšťat *I. ricinus* infikovaní CNM byli sbíráni metodou vlajkování v okolí Kvítkova Dvora v západní části Českého Krumlova, lokalitě s nejvyšším výskytem CNM v klíšťatech v České republice (dosud nepublikovaná data). Samice byly následně vykrmeny v laboratorních podmínkách pomocí techniky „*in vitro* feeding“. Při této technice bylo 10 samic a 10 samců umístěno do plexisklových krmítek, zajištěných zátkami z gázy. Krmítka byla vložena do 6-jamkových panelů pro tkáňové kultury, které byly naplněné heparinizovanou krví obohacené o glukózu a ATP, a ošetřené gentamicinem a nystatinem. Z těchto krmítek umístěných na panelech ve vodní lázni nastavené na 37 °C klíšťata sála krev po dobu 10ti dnů.

Příprava slinných žláz

Po samovolném odpojení byly samice zafixovány na parafinové podložce a jejich slinné žlázy byly vypitvány. První pár byl uložen do roztoku T1 s proteinázou K pro okamžitou izolaci DNA za využití kitu NucleoSpin Tissue (MACHERY NAGEL GmbH & Co. KG). Druhý pár byl zafixován v 4% roztoku glutaraldehydu. Koncentrace DNA ve vzorcích byla změřena pomocí spektrofotometru a vzorky byly uskladněny při -20 °C až do PCR detekce.

Detekce pomocí PCR

Pro detekci CNM ve slinných žlázách byl použit protokol vytvořený v rámci předešlého projektu IGA 205/2018/FVHE, spočívající v amplifikaci 654 bp úseku genu groEL (heat-shock protein).

PCR reakce probíhala v objemu 25 µl. Koncentrace látek v PCR reakci byla 75 mM Tris-HCl, pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0.01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, 200 µM dCTP, 200 µM dGTP, 200 µM dTTP, 50 U/ml Taq DNA polymerázy (kit PPP Master Mix, TOP-BIO, s.r.o.) a 500 nM primery.

Sekvenování

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

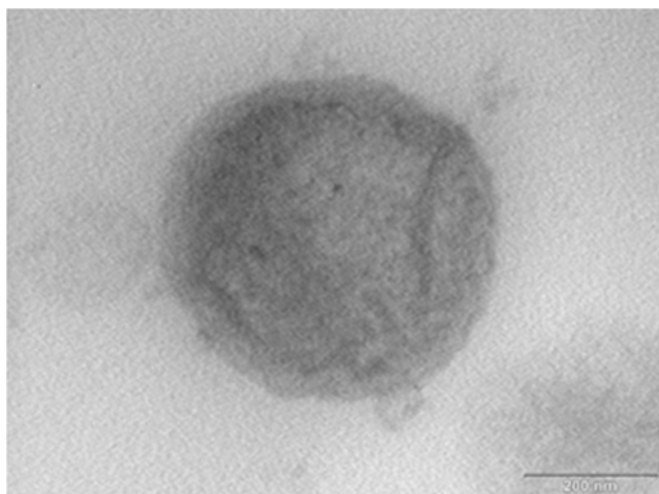
Transmisní elektronová mikroskopie

Slinné žlázy fixované v glutaraldehydu byly odvodněny, post-fixovány v 1% roztoku oxidu osmičelého a zality do epoxidové pryskyřice. V polymeračních kapslích byly ponechány v termostatu při 60 stupních Celsia po dobu pěti dnů pro polymeraci. Bloky zpolymerované pryskyřice s infikovanými slinnými žlázami byly otrimovány na brousícím zařízení Leica EM TRIM2. Ultratenké řezy o tloušťce 60 nm byly nařezány na skleněných nožích na ultramikrotomu Leica UC7 a mikroskopovány na transmisním elektronovém mikroskopu Philips EM208.

Výsledky

Výsledkem projektu je popsání pravděpodobné ultrastruktury klíšťaty přenášené intracelulární bakterie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ve tkáních slinných žláz klíšťat *Ixodes ricinus*. Ultrastruktura (Obr. 1) se do značné míry podobá již publikovaným snímkům pravděpodobné podoby bakterie, které pocházejí z tkání myši a člověka. Stejně jako v tomto případě mají nalezené exempláře kulatý tvar, měří v průměru přibližně 500 nm a jsou obklopeny dvěma membránami, mezi kterými je elektronlucentní periplastický prostor. Zdá se, že se podobně jako v případě savčích tkání vykytují v klíšťecí tkáni *Neoehrlichie* samostatně, a tvoří moruly jako některé příbuzné druhy bakterií z rodiny Anaplasmatacae jako např. *Ehrlichia chaffeensis*.

Obr. 1: Pravděpodobná ultrastruktura bakterie *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* ve tkáních slinných žláz klíštěat *Ixodes ricinus*.



Závěr

V rámci projektu byly mikroskopovány 60 nm ultratenké řezy slinných žláz klíštěat *Ixodes ricinus* infikovaných bakterií *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*. Bylo zjištěno, že se tyto bakterie mají tendenci vyskytovat ve klíštěcí tkáni samostatně, a že tedy pravděpodobně netvoří moruly, jako některé příbuzné druhy z rodiny Anaplasmataceae, e.g. *Ehrlichia chaffeensis*. Pozorované bakterie mají kulatý tvar, měří v průměru přibližně 500 nm a jsou obklopeny dvěma membránami, mezi kterými je elektronlucentní periplastický prostor.

Seznam literatury:

1. GRANKVIST A, ANDERSSON PO, MATTSSON M, SENDER M, VAHT K, HÖPER L, SAKINIENE E, TRYSBERG E, STENSON M, FEHR J, PEKOVÁ S, BOGDAN C, BLOEMBERG G, WENNERÅS C (2014) Infections with the tick-borne bacterium 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' mimic noninfectious conditions in patients with B cell malignancies or autoimmune diseases. Clin. Infect. Dis. 58(12): 1716–22.
2. SVITÁLKOVÁ ZH, HARUŠTIKOVÁ D, MAHRÍKOVÁ L, MOJŠOVÁ M, BERTHOVÁ L, SLOVÁK M, KOCIANOVÁ E, VAYSSIER-TAUSSAT M, KAZIMÍROVÁ M (2016) Candidatus Neoehrlichia mikurensis in ticks and rodents from urban and natural habitats of South-Western Slovakia. Parasit. Vectors 9:2.
3. DEDONDER SE, CHENG C, WILLARD LH, BOYLE DL, GANTA RR (2012) Transmission Electron Microscopy Reveals Distinct Macrophage- and Tick Cell-Specific Morphological Stages of Ehrlichia chaffeensis. PLoS ONE 7(5): e36749.
4. KAWAHARA M, RIKIHISA Y, ISOGAI E, TAKAHASHI M, MISUMI H, SUTO C, SHIBATA S, ZHANG C, TSUJI M (2004) Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in Ixodes ovatus ticks. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1837-43.
5. PEKOVA S, VYDRA J, KABICKOVA H, FRANKOVA S, HAUGVICOVA R, MAZAL O, CMEJLA R, HARDEKOPF DW, JANCUSKOVA T, KOZAK T (2011) Candidatus Neoehrlichia mikurensis infection identified in 2 hematologic patients: benefit of molecular techniques for rare pathogen detection. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 69(3):266-70.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 201/2019/FVHE

Nutriční hodnocení suchých krmiv pro psy dostupných v tržní síti se zaměřením na obsah organických živin a vybraných minerálních látek

Eva Štercová, Michaela Grmelová, Jana Tšponová, Eva Straková, Kateřina Muchová, Karolína Janáčková

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

Úvod

Suchá krmiva pro psy a kočky tvoří přibližně 70 % trhu s krmivy pro zájmová zvířata, dominantní podíl mezi nimi mají krmiva extrudovaná (1). Jedním z významných kritérií při výběru krmiv pro psy je obsah potřebných živin, který můžeme stanovit chemickou analýzou (2). V zahraničí byla provedena řada studií zaměřených na hodnocení obsahu živin v kompletních krmivech pro psy. Byly zde nalezeny významné rozdíly mezi deklarovaným a analyticky stanoveným obsahem živin (3, 4, 5). Při srovnání s nutričními standardy AAFCO většina testovaných vzorků krmiv splňovala nebo překročila doporučené minimální hodnoty v obsahu hrubého proteinu a tuku, zatímco v obsahu některých esenciálních aminokyselin a minerálních látek byly zjištěny určité nedostatky (5, 6). Další práce zjistily, že část hodnocených krmiv nedosahovala nutričního minima u vybraných mikroprvků, zatímco koncentrace vápníku v některých krmivech překročila doporučené limity (7, 8).

Cílem práce bylo srovnat obsah základních živin, energie, minerálních látek a aminokyselin v suchých krmivech pro psy, která byla rozdělena do tří skupin na základě cenové kategorie a obsahu obilovin ve složení, a zjistit, zda mezi skupinami existují statisticky průkazné rozdíly. Dalším cílem bylo srovnat analyzovaný obsah živin s aktuálními nutričními standardy AAFCO a FEDIAF a s analýzou deklarovanou výrobcem na obalu krmiva a posoudit, zda krmiva odpovídají nutričním požadavkům kategorií psů, pro které jsou určena.

Materiál a metodika

V obchodní síti České republiky bylo zakoupeno celkem 60 vzorků suchých kompletních krmiv pro psy od 15 různých českých a zahraničních výrobců. Krmiva byla rozdělena do tří skupin na základě ceny za 12 kg balení (skupina 1 do 800,- Kč, skupina 2 mezi 800-1200,- Kč, skupina 3 nad 1200,- Kč) a podle zastoupení obilovin (skupina 1 a 2 s obsahem obilovin, skupina 3 bez obilovin). Každá skupina obsahovala 20 vzorků od pěti různých výrobců krmiv a byla v ní rovnoměrně zahrnuta krmiva pro štěňata, štěňata velkých plemen, dospělé psy a seniory.

U vzorků krmiv byla provedena chemická analýza v laboratoři Ústavu výživy zvířat FVHE. Byl stanoven obsah vlhkosti, hrubého proteinu, tuku, hrubé vlákniny a popela a ze zjištěných hodnot byly vypočítány bezdusíkaté látky výtažkové (BNLV). Z analyticky stanovených živin byl dále vypočten obsah metabolizovatelné energie (ME) podle prediktivní rovnice NRC (9). Ve všech 60 vzorcích krmiv byl dále stanoven obsah vybraných minerálních látek metodou atomové absorpční spektrometrie a obsah fosforu pomocí spektrofotometru. U 30 vzorků krmiv pro dospělé psy a pro štěňata byl stanoven obsah vybraných aminokyselin metodou ionexové sloupcové chromatografie na analyzátoru AAA 400 (*Ingos a.s.*).

Naměřené hodnoty byly porovnány s aktuálními doporučeními pro obsah živin v kompletních krmivech pro psy FEDIAF (2018) a AAFCO (2014). Hodnoty zahrnuté do povinné deklarace podle Nařízení EP a Rady (ES) č. 767/2009 o uvádění na trh a používání krmiv (hrubý protein, tuk, vláknina a popel) byly porovnány s informacemi uváděnými výrobcem na obalu krmiv a vyhodnoceny na základě tolerance uvedené v Nařízení Komise (EU) 2017/2279.

Získané výsledky byly vyhodnoceny ve statistickém programu Unistat CZ for Excel verze 5.6. (2005). Bylo provedeno statistické vyhodnocení rozdílů v obsahu analyzovaných živin a energie mezi skupinami krmiv 1-3. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí jednofaktorové analýzy variance (ANOVA) za použití multikomparativního testu Tukey-HSD, na hladině významnosti $P < 0,05$ a $P < 0,01$.

Výsledky

1. Srovnání obsahu základních živin v sušině mezi skupinami suchých krmiv pro psy všech kategorií (n = 20, průměr ± střední chyba průměru).

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	P
Hrubý protein (g.kg ⁻¹)	269,45±9,97 ^A	292,18±7,64 ^A	355,19±16,68 ^B	**
Hrubý tuk (g.kg ⁻¹)	161,25±9,54	146,38±5,79	157,46±6,41	NS
Hrubá vláknina (g.kg ⁻¹)	19,17±1,94	14,54±1,35	20,05±2,05	NS
BNLV (g.kg ⁻¹)	484,53±17,83 ^B	474,81±13,73 ^B	383,16±21,00 ^A	**
Hrubý popel (g.kg ⁻¹)	68,45±2,62 ^A	72,10±2,50 ^A	85,21±1,51 ^B	**
ME (kcal.kg ⁻¹)	3942,01±49,73 ^A	4196,35±31,00 ^B	4190,46±40,59 ^B	**

**A,B - rozdílná písmena v řádku = statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$)

NS – statisticky neprůkazný

2. Srovnání obsahu minerálních látek v sušině mezi skupinami suchých krmiv pro psy všech kategorií (n = 20, průměr ± střední chyba průměru).

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	<i>P</i>
Vápník (g.kg ⁻¹)	15,05±0,81	14,99±0,94	16,49±0,78	NS
Fosfor (g.kg ⁻¹)	9,94±0,42	9,87±0,55	11,03±0,41	NS
Hořčík (g.kg ⁻¹)	1,32±0,13 ^{B,b}	0,76±0,03 ^{A,a}	1,08±0,08 ^b	**
Sodík (g.kg ⁻¹)	3,16±0,20	3,48±0,28	3,62±0,20	NS
Draslík (g.kg ⁻¹)	4,70±0,27 ^A	5,85±0,54 ^{A,B}	6,90±0,50 ^B	**
Měď (mg.kg ⁻¹)	18,34±1,09 ^{a,b}	14,95±0,61 ^a	24,49±3,73 ^b	*
Železo (mg.kg ⁻¹)	261,89±12,86 ^A	195,61±16,35 ^A	364,69±30,94 ^B	**
Zinek (mg.kg ⁻¹)	176,54±5,12	148,91±10,59	162,14±12,38	NS

**A,B - rozdílná písmena v řádku = statisticky vysoce významný rozdíl (P < 0,01)

*a,b - rozdílná písmena v řádku = statisticky významný rozdíl (P < 0,05)

1. Srovnání obsahu esenciálních aminokyselin v sušině mezi skupinami suchých krmiv pro štěňata a dospělé psy (n = 10, průměr ± střední chyba průměru).

	Skupina 1	Skupina 2	Skupina 3	<i>P</i>
Thr (g.kg ⁻¹)	9,64±0,48 ^A	10,56±0,37 ^A	14,18±1,15 ^B	**
Val (g.kg ⁻¹)	13,27±0,66 ^{A,a}	14,28±0,59 ^a	17,84±1,44 ^{B,b}	**
Met (g.kg ⁻¹)	1,83±0,37 ^a	4,48±0,87 ^b	4,86±0,86 ^b	*
Ile (g.kg ⁻¹)	10,34±0,47 ^{A,a}	11,58±0,53 ^a	14,95±1,25 ^{B,b}	**
Leu (g.kg ⁻¹)	20,67±0,98 ^a	22,75±1,06 ^{a,b}	26,80±2,12 ^b	*
Phe (g.kg ⁻¹)	10,79±0,57	12,51±0,71	13,91±1,49	NS
His (g.kg ⁻¹)	6,31±0,40 ^{A,a}	7,35± 0,49 ^a	9,66±±0,88 ^{B,b}	**
Lys (g.kg ⁻¹)	12,64±0,92 ^{A,a}	15,24±1,21 ^a	22,21±2,29 ^{B,b}	**
Arg (g.kg ⁻¹)	16,45±0,75 ^{A,a}	18,28±0,83 ^a	23,07±1,70 ^{B,b}	**

Obsah hrubého proteinu a tuku odpovídal u všech krmiv požadavkům AAFCO i FEDIAF s výjimkou jednoho vzorku pro dospělé psy ze skupiny 3, kde se obsah proteinu nacházel pod doporučeným minimem. Z aminokyselin byly zjištěny nedostatky především u methioninu a threoninu, nejzávažnější nedostatky byly ve skupině 1. V obsahu minerálních látek byly zjištěny nedostatky zejména v obsahu K, nejvyšší počet deficitních vzorků byl také ve skupině 1. Dále se ve všech skupinách vyskytovaly ojedinělé případy nedostatečného obsahu P, Ca, Na, Mg, Cu a Zn. V některých vzorcích byly zjištěny zvýšené hodnoty Ca nad horní hranici. Ve skupině 3 byly u vzorků od jednoho výrobce naměřeny také vyšší hodnoty Cu a Zn. Hodnoty hrubého proteinu a

popela deklarované na obalu odpovídaly analyzovaným hodnotám a jejich rozdíly se nacházely v mezích tolerance, zatímco v obsahu tuku a hrubé vlákniny byly výsledky analýzy u části vzorků nižší než deklarace a nacházely se pod spodní hranicí tolerance.

Závěr

Krmiva ze skupiny 3 (bez obilovin, nejvyšší cena) měla vysoce významně ($P < 0,01$) vyšší obsah proteinu, a většiny esenciálních aminokyselin než obě skupiny s obsahem obilovin z nižší a střední cenové kategorie. Při srovnání s nutričními standardy byly zjištěny deficity v obsahu aminokyselin methioninu a threoninu a některých minerálních látek, přičemž největší počet deficitních vzorků byl ve skupině 1 z nejnižší cenové kategorie. Skupina 1 měla také vysoce významně ($P < 0,01$) nižší obsah metabolizovatelné energie než další dvě skupiny.

Seznam literatury:

1. Donadelli R. A., Aldrich C. G., Jones C. K., Beyer R. S. (2019): The amino acid composition and protein quality of various egg, poultry meal by-products, and vegetable proteins used in the production of dog and cat diets. *Poultry Science* 98, p. 1371-1378.
2. Steiff E. L., Bauer J. E. (2001): Nutritional adequacy of diets formulated for companion animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219(5), p. 601-604.
3. Hill R. C., Choate C. J., Scott K. C., Molenberghs G. (2009): Comparison of the guaranteed analysis with the measured nutrient composition of commercial pet foods. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 234(3), p. 347-351.
4. Rolinec M., Bíro D., Gálik B., Šimko M., Juráček M., Tvarožková K., Ištuková A. (2016): The nutritive value of selected commercial dry dog foods. *Acta fytotechnica et zootechnica* 19(1), p. 25-28.
5. Burdett S. W., Mansilla W. D., Shoveller A. K. (2018): Many Canadian dog and cat foods fail to comply with the guaranteed analyses reported on packages. *Canadian Veterinary Journal* 59(11), p. 1181-1186.
6. Alvarado C. A., Hodgkinson S., Alomar D., Boroschek D. (2008): Evaluation of the chemical composition of dry dogfoods commercialized in Chile used for growing dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 60, p. 218-226.
7. Gagné J. W., Wakshlag J. J., Center S. A., Rutzke M. A., Glahn R. P. (2013): Evaluation of calcium, phosphorus, and selected trace mineral status in commercially available dry foods formulated for dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243, p. 658-666.
8. Davies M., Alborough R., Jones L., Davis C., Williams C., Gardner D. S. (2017): Mineral analysis of complete dog and cat foods in the UK and compliance with European guidelines. *Scientific Reports* 7 (1), p. 1-9.
9. National Research Council (2006): Nutrient Requirements of Dogs and Cats. 10th ed. National Academy Press, Washington DC. 424 pp.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 225/2019/FVHE

Sekvenovanie štvrtej generácie u plazmidov kódujúcich klinicky významné beta-laktamázy získaných z ľudí a zvierat

Adam Valcek^{1,2}, Louise Roer³, Søren Overballe-Petersen³, Frank Hansen³, Valeria Bortolaia⁴, Pimlapas Leekitcharoenphon⁴, Helle B Korsgaard⁵, Anne Mette Seyfarth⁶, Rene S Hendriksen⁴, Henrik Hasman³, Anette M Hammerum³, Monika Dolejska^{1,2}

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic¹

CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic²

Department of Bacteria, Parasites and Fungi, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark³

Research Group for Genomic Epidemiology, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark⁴

Division for Risk Assessment and Nutrition, National Food Institute, Technical University of Denmark, Kongens Lyngby, Denmark⁵

Danish Veterinary and Food Administration, Laboratories Division, Ringsted, Denmark⁶

Úvod

Rezistencia voči cefalosporínovým antibiotikám u *Escherichia coli* je často spôsobovaná plazmidovo nesenými génmi kódujúcimi širokospektrálnymi beta-laktamázami (ESBL). Plazmidy skupiny inkompatibility I1 (IncI1) sú často asociované s ESBL génom *bla*_{CTX-M-1} a nesené *E. coli*. Tieto plazmidy majú veľkosť 90 – 120 kb a môžu niesť aj iné determinanty antimikrobiálnej rezistencie [1]. Výskyt baktérií produkujúcich CTX-M-1 v potravinových zvieratách sa v posledných desiatich rokoch zvýšil, čo môže naznačovať, že tieto zvieratá slúžia ako ich rezervoár [2]. Táto štúdia zobrazuje 12 kompletných nukleotidových sekvencií IncI1 plazmidov z potravinových zvierat, potravy a ľudských krvných infekcií a porovnanie ich príbuznosti.

Materiál a metodika

Zbierka izolátov

Zbierku tvorilo 518 izolátov *E. coli* produkujúcich ESBL získaných z potravinových zvierat alebo potravy a 179 izolátov *E. coli* produkujúcich ESBL z humánných infekcií krvného riečiska. Pomocou PCR boli z oboch skupín vzoriek selektované tie, ktoré nesú rovnaký ESBL gén (*bla*_{CTX-M-1}) a rovnaký plazmidový replikón (IncI1, ST3 a ST7). Takto bolo vybraných 10 vzoriek nesúcich IncI1/ST3 (2 humánne, 6 z potravín, 2 z potravinových zvierat) a po jednom izoláte z humánných a animálnych vzoriek nesúcich IncI1/ST7.

Izolácia DNA a sekvenovanie

Celogenómová DNA bola získaná kitom DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Knižnica DNA fragmentov bola pripravená kitom Nextera XT a následne 2 x 250 bp paired-end sekvenovaná na platforme MiSeq (Illumina). Pre získanie dlhých readov bola extrahovaná plazmidová DNA kitom Qiagen-tip 100 Plasmid Midi Kit. Knižnica bola pripravená kitom 1D Ligation Barcoding Kit [Oxford Nanopore Technologies (ONT)] a sekvenovaná na platforme MinION (ONT).

Bioinformatická analýza

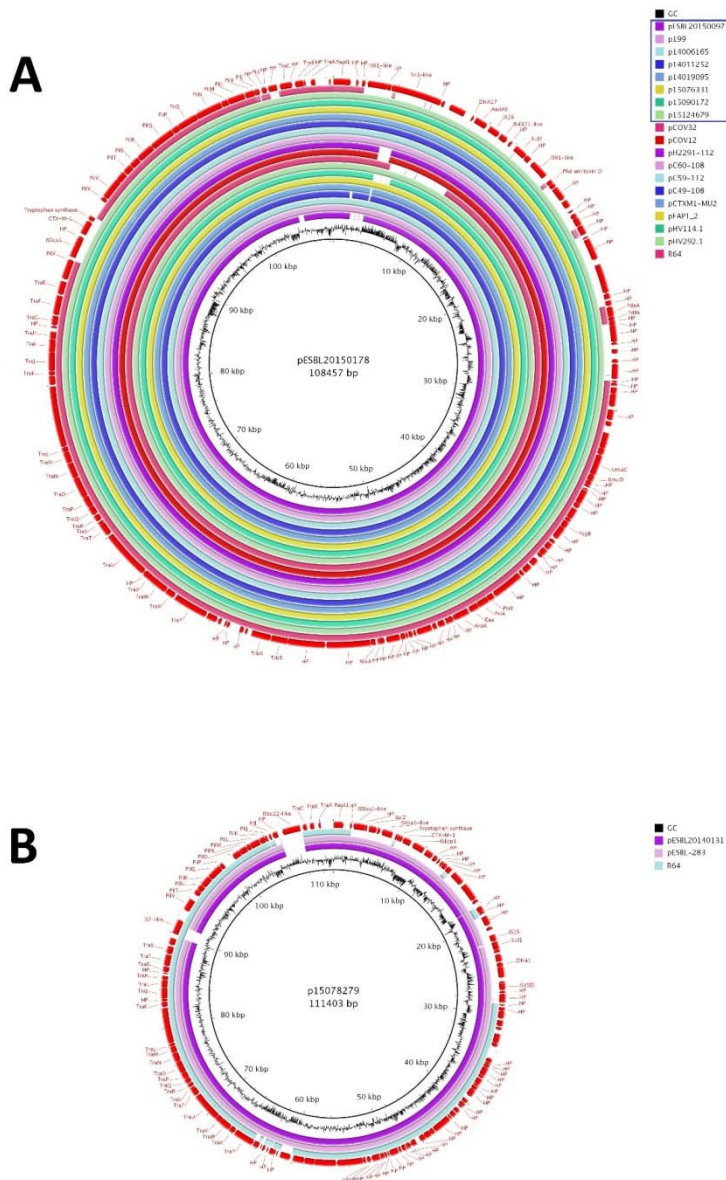
Získané dáta boli kvalitatívne upravené programom Trimmomatic na štandard $Q \geq 30$ a programom Unicycler hybridne assemblované za vzniku kompletných plazmidových sekvencií. Presnosť získaných sekvencií bola manuálne overená mapovaním krátkych readov s vysokou presnosťou na kompletné sekvencie plazmidov. Takto overené sekvencie boli anotované programom RAST a manuálne upravené na základe vyhľadávania blast v GenBank. Prítomnosť génov antibiotickej rezistencie bola overená webovým nástrojom ResFinder 3.1 [3]. Taktiež boli získané plazmidové sekvencie využité na vyhľadanie podobných sekvencií v databáze GenBank a porovnané s nimi programom BRIG.

Výsledky

Sekvenčná analýza plazmidov odhalila vysokú podobnosť medzi plazmidmi získanými z humánných a animálnych izolátov. Porovnanie podobnosti pre jednotlivé sekvenčné typy plazmidov (Inc11/ST3 a Inc11/ST7) je zobrazené v Obrázku 1.

Toto zistenie naznačuje možný prenos plazmidov medzi baktériami z ľudí a zvierat, prípadne poukazuje na zvieratá ako na možný rezervoár týchto mobilných genetických elementov. Prehľad analyzovaných plazmidov, ich pôvod a gény antibiotickej rezistencie sú zobrazené v Tabuľke 1.

Taktiež sme našli plazmidy s vysokou podobnosťou v rôznych geografických lokalitách (Francúzsko, Dánsko, Holandsko, Švajčiarsko a Austrália), čo naznačuje, že sa jedná o globálne rozšírenú a dobre adaptovanú plazmidovú líniu. Je preto nevyhnutné naďalej vykonávať podobné štúdie za účelom sledovania rozšírenia a príbuznosti klonálnych línií baktérií, resp. plazmidov aby tak bolo možné predchádzať alebo obmedziť prenos antibiotickej rezistencie medzi ľuďmi, zvieratami a životným prostredím v rámci konceptu „One Health“.



Ob. 1: Porovnanie sekvencií plazmidov **A:** IncI1/ST3 a **B:** IncI1/ST7.

Tab. 1: Metadáta k plazmidom kódujúcim *bla*_{CTX-M-1}.

ST	Plazmid	Pôvod	Krajina	Profil AMR	GenBank
ST3	pESBL20150178	človek	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181568
	pESBL20150097	človek	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181567
	p199	prasa	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181559
	p14006165	kura	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181560
	p14011252	kura	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181561
	p14019095	kura	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181557
	p15076331	mix mäsa	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181558
	p15090172	prasa	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181562
	p15095941	kura	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181563
	p15124679	kačica	Dánsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MK181564
	pH2291-112	človek	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KJ484629
	pC49-108	kura	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KJ484638
	pC60-108	kura	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KJ484635
	pC59-112	kura	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KJ484637
	pCOV12	brojler	Francúzsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MG648914
	pCOV32	brojler	Francúzsko	<i>tet(A), sul2</i>	MG649045
	pCTXM1-MU2	prasa	Austrália	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	MF152729
	pFAP1_2	prasa	Holandsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	CP009580
	pHV114.1	človek	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KM377238
	pHV292.1	brojler	Švajčiarsko	<i>dfrA17, aadA5, sul2</i>	KM377239
pESBL20140131	človek	Dánsko	<i>dfrA1, sul1, sul2</i>	MK181565	
ST7	p15078279	prasa	Dánsko	<i>dfrA1, sul1, sul2</i>	MK181566
	pESBL-283	prasa	Holandsko	<i>dfrA1, sul1, sul2</i>	CP008736

Seznam literatury:

- [1] BROUWER, Michael SM, et al. Complete genome sequences of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β -lactamase genes. *Genome Announc.*, 2014, 2.4: e00859-14.
- [2] TADESSE, Daniel A., et al. Whole-Genome sequence analysis of CTX-M containing *Escherichia coli* isolates from retail meats and cattle in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24.7: 939-948.
- [3] ZANKARI, Ea, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2012, 67.11: 2640-2644.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 204/2019/FVHE

Vliv křížení plemene meklenburský strakáč s hybridními králicemi na růstové schopnosti, jatečnou hodnotu a kvalitu masa vykrmovaných králíků

David Zapletal¹, Petra Jakešová¹, Eva Straková², Tatiana Tančáková³, Petra Bělohradová³,
Eliška Žáková³

¹Ústav zootechniky a zoohygiény, ²Ústav výživy zvířat, *Fakulta veterinární hygieny a ekologie,*
³studenti MSP, *Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Fenotypový projev významných užitkových vlastností králíků je zásadně ovlivněn interakcí konkrétního genotypu a specifických podmínek prostředí, ve kterých k dané produkci dochází. V tomto ohledu lze za podstatné považovat zejména zvolený nutriční management, technologii ustájení, techniku výkrmu, nálezovou situaci v chovu aj. Potřebu neustálého šlechtění a testace nových genotypů králíků, pak vyvolává zejména samotná ekonomická efektivnost produkce, která je, mimo jiné, stále častěji u králíků ovlivňována i postojem společnosti v oblasti jejich welfare (Tillmann et al., 2019). Plemeno meklenburský strakáč (MS) vykazuje velmi dobré ukazatele růstu (Tančáková et al., 2019) i jatečné hodnoty a lze předpokládat, že plemeno MS by mohlo být v otcovské pozici vhodným genofondem pro tvorbu hybridních brojlerových králíků. Králíčí maso je považováno za vynikající zdroj proteinů pro lidskou výživu, přičemž vliv genofondu působí i na konkrétní spektrum aminokyselin v tomto mase (Nasr et al., 2017; Li et al., 2019). Cílem této studie bylo zhodnotit vliv užitkového křížení samců MS s mateřskými hybridními liniemi brojlerových králic HYLEA na ukazatele výkrmnosti, jatečné hodnoty a vybrané ukazatele kvality masa vykrmovaných králíků v intenzivních produkčních podmínkách.

Materiál a metodika

Zvířata a design experimentu

Studie byla realizována v genetickém centru brojlerových králíků HYLEA. Do hodnocení byla zahrnuta mláďata z 2 skupin genofondu králíků. Kontrolní skupinou byli finální hybridní brojleroví králíci HYLEA (HYLA AB♂ x HYLEA CD♀; $n = 56$) a pokusnou skupinou byli králíci z realizovaného křížení MS♂ x HYLEA CD♀ ($n = 56$). Mláďata hybridních králíků byla v rámci obou skupin odchována a vykrmována za zcela identických chovatelských podmínek, včetně shodně předkládaných diet (KS „K-optimum“, „K-finišer“ od fa De Heus a.s.) a použité nutriční strategie. V průběhu růstu byla u obou skupin genotypů zjišťována individuální živá hmotnost králíků (LW) v 19., 35., 49., 63., 77. a 91. dnu věku. V rámci hodnocených období byla sledována

také skupinová spotřeba krmiva a následně byl za jednotlivá období zjištěn průměrný přírůstek živé hmotnosti a konverze krmiva.

Na konci výkrmu ve 103. dnu věku bylo z každé skupiny poraženo vždy 30 králíků (15♂ + 15♀). Následně byl proveden jatečný rozbor poraženého těla králíků podle metodiky WRSA, kdy byly zjišťovány hmotnosti těchto ukazatelů: kůže, jater, srdce, ledvin, ledvinového tuku, jatečně opracovaného těla (JOT), hlavy, obou zadních končetin, beder, přední části JOT a dále hmotnost svaloviny z obou zadních končetin a obou svalů m. longissimus thorasic et lumborum (MLLT). Ze zjištěných hmotností byla zjištěna jatečná výtěžnost (JV) a podíl zadních nohou, beder a přední části z hmotnosti JOT. K hodnocení ukazatelů základního chemismu, vybraných minerálních látek a spektra aminokyselin masa byly odebrány vzorky svaloviny zadních končetin (stehen) a MLLT vždy od 20 králíků (10♂ + 10♀) v rámci hodnoceného genotypu.

Chemické vyšetření masa

V laboratoři Ústavu výživy zvířat FVHE VFU Brno bylo provedeno stanovení obsahu těchto základních ukazatelů chemického složení masa: sušina, dusíkaté látky (metoda dle Kjeldahla pomocí analyzátoru Buchi, *CENTEC AUTOMATIKA*), organická hmota, tuk (ANKOM^{XT10} Fat Analyzer; *O.K. SERVIS BioPro*) a minerálních látek (spálení při 550 °C). Dále byly stanovovány tyto minerální látky (ML): P, Ca, Na, K, Mg a popelovin - Fe, Mn a Zn. Aminokyselinové spektrum (AMK) vzorků masa bylo stanoveno po kyselé hydrolyze vzorku 6 N HCl při 110 °C po dobu 24 hodin automatickým analyzátozem aminokyselin AAA 400 (*INGOS a.s. Praha*).

Statistická analýza

Statistické zhodnocení rozdílů mezi hodnocenými genotypy králíků bylo provedeno jednofaktorovou Anovou v programu Statistica CZ, verze 10; pro následné testování průkaznosti mezi průměry byl použit Tukeyův test.

Výsledky

Jak vyplývá z tabulky 1, k průkaznému snížení průměrné LW u pokusné skupiny králíků došlo pouze v 49. a 63. dnu věku, následně se do 91. dne věku jejich LW průkazně nelišila, přičemž na konci pokusu dosáhli průkazně vyšší ($P < 0,01$) LW již kříženci z pokusné skupiny. Navíc, příznivější konverze krmiv za období mezi 35. až 91. dnem věku byla zjištěna u testovaných kříženců oproti kontrolní skupině (3,5 vs. 4,1 g/g, resp.).

Průkazně vyšší jatečná hmotnost kříženců na konci pokusu byla spojena i s průkazně vyšší hmotností jejich JOT, kůže, zadních nohou, beder, přední části, ledvin, ledvinového tuku (Tab. 2) a také s vyšší hmotností svaloviny zadních nohou (stehen) a MLLT oproti králíkům v kontrolní

skupině (Tab. 3 a 4). Co se týče podílu významných tělesných partií z hmotnosti JOT (Tab. 2), u kříženců byla zjištěna průkazně nižší výtěžnost zadních nohou a naopak průkazně vyšší výtěžnost beder a přední části oproti finálním hybridům v kontrolní skupině. Jatečná výtěžnost se mezi hodnocenými genotypy králíků ve věku 103 dnů nelišila ($P > 0,05$).

Skupina	Věk (den)							Konverze krmiva (g/g)
	19.	35.	49.	63.	77.	91.	103.	
Kontrolní	422±17,3	968±21,9	1322±16,3	1714±30,3	2251±28,9	2657±45,3	2863±48,1	4,1
Pokusná	398±12,7	948±25,4	1196±32,9	1539±37,8	2302±46,4	2713±46,7	3325±54,4	3,5
<i>P</i>	NS	NS	*	*	NS	NS	**	XXXX

P - signifikance; NS - statisticky neprůkazné; * - $P < 0,05$.

Tabulka 1. Vliv genotypu králíků na průměrné živé hmotnosti v g ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) v průběhu výkrmu a na konverzi krmiva mezi 35. a 91. dnem.

Skupina	Hmotnost (g)										Podíl (%)			
	JOT	Kůže	Zadní nohy	Bedra	Přední část	Játra	Srdce	Ledviny	Ledvin. tuk	JV	Zadní nohy	Bedra	Přední část	
Kon	\bar{x}	1549	287	524	349	551	79,0	6,9	15,8	15,1	59,6	33,8	22,5	35,5
	SEM	33,32	7,19	10,75	9,65	12,72	3,19	0,19	0,36	1,94	0,52	0,14	0,24	0,19
Pok	\bar{x}	1817	414	596	433	661	113	7,6	19,0	42,0	60,6	32,8	23,9	36,4
	SEM	31,37	9,35	10,58	9,71	13,45	34,20	0,23	0,52	3,30	0,38	0,18	0,41	0,26
<i>P</i>	*	**	**	**	**	NS	NS	**	**	NS	**	**	*	

Kon - kontrolní; Pok - pokusná; JOT - jatečně opracované tělo; JV - jatečná výtěžnost; \bar{x} - průměr; SEM - střední chyba průměru; *P* - signifikance; NS - statisticky neprůkazné; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Tabulka 2. Vliv genotypu králíků na vybrané ukazatele jatečné hodnoty ve věku 103 dnů

V případě ukazatelů základního chemického složení svaloviny zadních nohou, byl v kg původní hmoty zjištěn pouze zvýšený obsah ML u kontrolní skupiny oproti testovaným křížencům ($P < 0,05$; Tab. 3); nicméně, v tomto mase kříženců byl zjištěn průkazně vyšší obsah Mg a Zn a zejména pak P a Mn. Naopak, kříženci vykazovali v mase zadních nohou průkazně nižší obsah všech AMK a dále obsah treoninu, serinu, glycinu, valinu, isoleucinu, leucinu a zejména pak tyrosinu.

Skupina	Ukazatel																	
	Svalovina (g)	Sušina (%)	NL (g)	Tuk (g)	ML (g)	P (g)	Ca (g)	Mg (g)	Mn (mg)	Zn (mg)	ΣAMK (g)	Thr (g)	Gly (g)	Val (g)	Iso (g)	Leu (g)	Tyr (g)	
Kon	\bar{x}	384	23,9	213	23	12,4	1,3	0,31	0,20	0,62	8,7	193	9,0	10,3	11	9,6	16,3	8,1
	SEM	11,56	0,29	1,74	1,63	0,06	0,07	0,03	0,01	0,09	0,18	1,63	0,13	0,18	0,21	0,14	0,24	0,20
Pok	\bar{x}	433	24,4	218	26	12,2	2,6	0,25	0,24	1,3	9,7	186	8,2	9,7	9,8	8,9	15,1	6,4
	SEM	8,15	0,21	15,4	1,31	0,06	0,06	0,01	0,01	0,04	0,22	1,62	0,20	0,20	0,24	0,20	0,35	0,08
<i>P</i>	**	NS	NS	NS	*	**	NS	**	**	**	*	**	*	*	**	**	**	

Kon - kontrolní; Pok - pokusná; \bar{x} - průměr; SEM - střední chyba průměru; NL - dusíkaté látky; ML - minerální látky; P - fosfor; ΣAMK - všechny aminokyseliny; Thr - treonin; Gly - glycin; Val - valin; Iso - isoleucin; Leu - leucin; Tyr - tyrosin; *P* - signifikance; NS - statisticky neprůkazné; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Tabulka 3. Hmotnost svaloviny zadních nohou a vybrané ukazatele jejího chemického složení (v kg původní hmoty) v závislosti na genotypu králíků

Co se týče svaloviny *MLLT*, v obsazích hodnocených ukazatelů základního chemického složení nebyly mezi genotypy králíků zjištěny průkazné rozdíly (Tab. 4). Dále, podobně jako u stehenní svaloviny, vykazovali kříženci v mase *MLLT* průkazně vyšší obsah P, Mn, Mg a Zn a také Ca oproti kontrolní skupině. V případě spektra AMK, byl ve svalech *MMLT* zjištěn u kříženců průkazně nižší obsah valinu a zejména glycinu a tyrosinu vůči finálním hybridům HYLA.

Skupina		Ukazatel													
		Svalovina (g)	Sušina (%)	NL (g)	Tuk (g)	ML (g)	P (g)	Ca (g)	Mg (g)	Mn (mg)	Zn (mg)	ΣAMK (g)	Gly (g)	Val (g)	Tyr (g)
Kon	\bar{x}	219	24,9	225	16,7	11,9	1,5	0,18	0,22	0,71	9,2	209	10,3	12	8,8
	SEM	8,72	0,28	1,83	1,38	0,11	0,15	0,02	0,01	0,07	0,28	1,76	0,15	0,17	0,24
Pok	\bar{x}	249	25,3	229	16,4	12,0	2,7	0,25	0,24	1,30	10,0	203	9,2	11	7,2
	SEM	6,48	0,27	1,18	0,84	0,03	0,06	0,01	0,01	0,04	0,20	1,73	0,25	0,31	0,17
<i>P</i>		**	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	*	NS	**	*	**

Kon - kontrolní; Pok - pokusná; \bar{x} - průměr; SEM - střední chyba průměru; NL - dusíkaté látky; ML - minerální látky; P - fosfor; ΣAMK - všechny aminokyseliny; Gly - glycin; Val - valin; Tyr - tyrosin; *P* - signifikance; NS - statisticky neprůkazné; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Tabulka 4. Hmotnost obou svalů *MLLT* a vybrané ukazatele jejich chemického složení (v kg původní hmoty) v závislosti na genotypu králíků

Závěr

Využití samců plemene MS v křížení s mateřskou linií hybridních králic HYLA CD vedlo ke zvýšení jatečné hmotnosti vykrmovaných kříženců ve věku 103 dnů oproti skupině finálních hybridních králíků HYLA. V 91 dnech věku nebyly zjištěny průkazné rozdíly v živé hmotnosti hodnocených genotypů králíků; testovaní kříženci však dosáhli do tohoto věku příznivější konverzi krmiv. Vyšší jatečná hmotnost kříženců byla spojena s vyšší hmotností jejich JOT, zadních nohou, beder, přední části a svaloviny zadních nohou a *MLLT* oproti králíkům v kontrolní skupině.

Co se týče ukazatelů základního chemického složení hodnocených svalů, nebyl, vyjma celkového obsahu ML ve svalovině stehen, zjištěn rozdíl v jejich obsahu mezi pokusnou a kontrolní skupinou. Kříženci však vykazovali v mase zadních nohou nižší obsah jak všech AMK, tak jednotlivě obsah treoninu, serinu, glycinu, valinu, isoleucinu, leucinu a zejména tyrosinu. V případě spektra AMK ve svalech *MLLT*, byl u kříženců zjištěn nižší obsah valinu a zejména glycinu a tyrosinu. Naopak, v obou typech svaloviny kříženců byl zjištěn vyšší obsah Mg, Zn a zejména P a Mn.

Seznam literatury:

LI S., HE Z., HU Y., LI H. (2019). Shotgun proteomic analysis of protein profile changes in female rabbit meat: the effect of breed and age. *Italian Journal of Animal Science* 18: 1335-1344.

NASR M.A.F., ADB-ELHAMID T., HUSSEIN M.A. (2017). Growth performance, carcass characteristics, meat quality and muscle amino-acid profile of different rabbits breeds and their crosses. *Meat Science* 134: 150-157.

TANČÁKOVÁ T., ŽÁKOVÁ E., JAKEŠOVÁ P., BĚLOHRADOVÁ P., ŠIMEK V., BARTOŠOVÁ H. (2019). Effect of genotype of the Mecklenburger Checked rabbit breed on live weight during growth. In *NutriNET 2019 – International Animal Nutrition PhD Conference*, VFU Brno, s. 12-16.

TILLMANN K., WINDSCHNURER I., GAMPER J., HINNEY B., RULICKE T., PODESSER B.K., TROXLER J., PLASENZOTTI R. (2019) Welfare assessment in rabbits raised for meat and laboratory purposes in enclosures with two floor types: Perforated plastic with holes versus slats. *Research in Veterinary Science* 122: 200-209.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 202/2019/FVHE

Příspěvky

Farmaceutické fakulty

Vývoj perorálneho prípravku s biologickým obsahom k enterickému podání

Nicole Fülöpová¹, Aleš Franc¹, Miroslava Pavelková¹, Michaela Garajová¹, Marie Jančálková¹, Alois Čížek², Patrik Sivulič²

¹Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Molekulární biologie, CEITEC VFU Brno

Úvod

Dysbióza hrubého čreva, vznikajúca ako dôsledok nadužívania antibiotík napríklad pri infekcií *Clostridium difficile* (CDI), patrí medzi komplikácie vedúce ku ťažkým črevným problémom. Jednou z možností liečby sa zdá byť fekálna mikrobiálna transplantácia (FMT), kedy je do čriev pacienta za účelom obnovy mikrobioty aplikovaná stolica zdravého jedinca[1]. Pre podanie FMT boli skúmané tobolky DrCapsTM, v ktorých bol fekálny materiál (FM) suspendovaný vo fyziologickom roztoku a hlboko zmrazený[2]. Pri prechode tráviacim traktom dochádza k roztopeniu obsahu tobolky, čo viedlo k jej rozpadu. Pokiaľ sa vodná náplň vemulguje do vonkajšej oleofilnej fáze, tobolka testom vyhovuje. Boli skúmané tobolky DrCapsTM s obsahom emulzie W/O, kde bolo experimentálne ukázané, že náplň je schopná bez ich poškodenia pojať suspenziu *Lactobacillov*[3]. Alternatívou k FM môže byť využitie čistých kultúr baktérií, tzv. repopulačných konsorcií izolovaných zo zdravých darcov [4].

Projekt bol zameraný na vytvorenie liekovej formy ku perorálnemu podaniu s využitím acidorezistentných, avšak nie enterosolventných tobolek DrCapsTM. Životaschopné anaeróbne baktérie obsiahnuté vo vhodnom médiu by mali byť z tobolek uvoľnené až vo vzdialenejších častiach tráviaceho traktu. Ako indikátor uvoľňovania bol použitý kofeín a na vytvorenie enterosolventnosti slúžili polymérne látky reagujúce na zmenu pH celacefát, Eudragit[®] S a Acryl-EZE[®]. Súčasťou tohto projektu bolo testovanie viability anaeróbnych baktérií na pracovisku Molekulární biologie CEITEC VFU Brno v matriciach, potencionálne vhodných ako náplň do enterosolventných tobolek.

Materiál a metodika

Príprava a hodnotenie matric na enkapsuláciu baktérií:

Boli použité kmene anaeróbnych baktérií *Anaerobutyricum hallii*, *Blautia producta*. Inkubácia baktérií prebiehala v boxe Concept 400 (Baker Ruskinn, USA) v anaeróbnom prostredí (10% CO₂, 5% H₂ a 85% N₂) pri teplote 37 °C po dobu 24 až 96 hod. Médiá boli v zložení: Matrice A (PRAS), Matrice B (PRAS s 5 % inulínu), Matrice C (PRAS s 5 % inulínu a 0,1 % L-cysteínu), Matrice D (PRAS s 5 % inulínu, 0,1 % L-cysteínu a 5 % želatíny), Matrice E (PRAS

s 5 % inulínu a 3 % pektinu). Zloženie redukovaného fosfátového pufru PRAS: 0.1 g MgSO₄ x7H₂O, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 3.0 g NaCl, 1.0 g thioglykolát sodný, 0.5 g L-cysteín, 1000 ml destilovaná voda. Ako matrica bol skúšaný oleofilný základ Synderman, škrob a agar. Bakteriálne suspenzie (BS) boli zmiešané s matricami v zamrazovacích ampuliach na anaeróbne uchovávanie a uložené do mraziaceho boxu s teplotou -20 °C. V čase t₀ (pred zamrazením) a v čase t₇ (po 7 dňoch po rozmrazení a nariedení BS), bola miera životaschopnosti BS hodnotená metódou MPN (most probable number).

Príprava a hodnotenie tobieliek k enterickému podaniu:

Príprava tobieliek: 10% roztoky polymérov boli pripravené rozpúšťaním, s použitím miešačky Heidolph RZR 2020 (Nemecko) pri 200 otáčkach (Tab. 1). Prášková zmes obsahujúca 470 mg laktózy a 100 kofeínu na jednu tobičku bola homogenizovaná na mixéri Turbula (Švajčiarsko) pri 40 otáčkach po dobu 30 minút. Následne bola pomocou strojčeka na plnenie tobieliek rozplnená do 60 DrCaps™ tobieliek. Tobielky veľkosti 0 boli obalené ponorom v roztoku 10% polyméru. Jednotlivé takto pripravené vzorky sú prezentované v Tab. 1.

Vzorka	Obal	
	Polymér	Rozpúšťadlo
DrCaps	-	-
DrCaps-celacefát	Celacefát	Acetón
DrCaps-Eudragit S	Eudragit® S	Ethanol 96%
DrCaps-Acryl-EZE	Acryl-EZE™	Voda

Tab. 1 Jednotlivé vzorky pripravených tobieliek

Stanovenie uvoľňovania kofeínu z tobieliek: Profil liberácie kofeínu zo všetkých typov vzoriek v prostrediach simulujúcich rôzne oblasti gastrointestinálneho traktu bol stanovený metódou disolúcie. Skúška prebiehala na zariadení Sotax AT-7 (Švajčiarsko) pádlovou metódou. Profil uvoľňovania bol najskôr sledovaný v tlmivom roztoku pH 1.2 (900 ml, pri teplote 37 °C) po dobu 120 minút. Hodnota pH bola následne zmenená na 6.8 pridaním 18,7 g fosforečnanu trisodného dodekahydrátu. Po 360 min bolo pH opätovne zvýšené na 7.5 pridaním 5,8 g fosforečnanu trisodného dodekahydrátu. Test disolúcie trval celkovo 720 min a jednotlivé odbery boli po 15 min. Každá vzorka bola meraná šesťkrát a následne bola stanovená RSD. Obsah kofeínu vo vzorkách bol stanovený spektrofotometricky pri vlnovej dĺžke 240 nm.

Test rozpadu enterosolventných tobieliek: Prebiehal u všetkých vzoriek podľa Európskeho liekopisu, stať 2.9.1. na rozpadostroji Erweka ZT4.

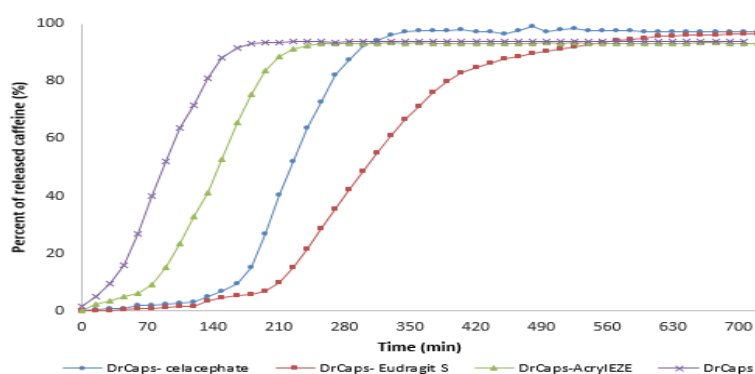
Výsledky

V priebehu výskumu boli overené techniky kultivácie anaeróbných baktérií a prípravy matric s BS, ktoré by potencionálne bolo možné využiť na naplnenie DrCaps™ toboliek. S médiami obsahujúcimi Synderman, agar a škrob bolo obtiažné pracovať a preto boli z ďalšieho výskumu vyradené. Dosiahnuté výsledky popisujúce životaschopnosť testovaných baktérií sú zobrazené v Tab. 2. Je tu viditeľný pokles viability zamrazených BS v porovnaní s čerstvou BS suspendovanou v Matrici A v čase t_0 . Najvyššia životaschopnosť baktérií bola dosiahnutá v maticiach obsahujúcich inulín (Matrica B) a inulín s L-cysteínom (Matrica C) pri oboch testovaných kultúrach (Tab. 2).

Bakteriálna kultúra	Matrice	MPN . ml ⁻¹
<i>Anaerobutyricum hallii</i>	Matrice A - (kontrola v čase t_0)	$2,7 \cdot 10^9$
	Matrice B	$5,5 \cdot 10^8$
	Matrice C	$2,45 \cdot 10^8$
	Matrice D	$5,0 \cdot 10^6$
	Matrice E	$2,5 \cdot 10^5$
<i>Blautia producta</i>	Matrice A - (kontrola v čase t_0)	$4,7 \cdot 10^9$
	Matrice B	$2,5 \cdot 10^9$
	Matrice C	$6,2 \cdot 10^8$
	Matrice D	$1,0 \cdot 10^8$
	Matrice E	$7,0 \cdot 10^7$

Tab. 2 Viabilita anaeróbných baktérií uchovaných v maticiach pri -20°C v čase t_7 a pred zamrazením v t_0

Samotné DrCaps™ tobolky nie sú enterosolventné v pH 1.2 podľa testu rozpadu a disolúcie (Obr. 1 a Tab. 3). Enterosolventnosť bola dosiahnutá obalením tobolky celacefátom (rozpúšťa sa v prostredí $\text{pH} \geq 5.5$) a Eudragit® S (rozpúšťa sa v prostredí $\text{pH} > 7$) [5].



Obr. 1 Disolučný profil kofeínu z toboliek s rôznym obalom

(RSD < 5% počas 120 min, RSD < 10% v čase 540-720 min)

Tobolky obalené týmito polymérmi splnili požiadavky disolúcie a testu rozpadavosti pre enterosolventné tobolky podľa Európskeho liekopisu (Obr. 1 a Tab. 3). Náhla zmena pH z 1.2 na 6.8 zvýšila uvoľňovanie kofeínu z toboliek obalených celacefátom, kým obal z Eudragitu®

S bol viac stabilný v tomto pH a rozpúšťal sa pomalšie. Acryl-EZE[®] a celacefát sa rozpadnú približne v rovnakom čase (Tab. 3), avšak podľa testu disolúcie tobolky obalené Acryl-EZE[®] začnú uvoľňovať kofeín skôr. Acryl-EZE[®] bol kvôli tomuto nevyhovujúcemu testu disolúcie vyradený z ďalšieho testovania (Obr. 1).

Vzorka	Čas rozpadu vzoriek (min)					
	1	2	3	4	5	6
DrCaps	110	110	105	120	120	110
DrCaps-celacefát	160	170	150	160	155	160
DrCaps-Eudragit [®] S	205	205	175	220	175	220
DrCaps-Acryl-EZE [®]	160	180	160	165	165	180

Tab. 3 Rozpad jednotlivých toboliek v čase (min),

Záver

Cieľom tohoto experimentu bolo pripraviť liekovú formu na transport biologického materiálu do hrubého čreva. Z disolučných profilov jednotlivých vzoriek je zrejmé, že potiahnutie toboliek 10% roztokom polyméru (celacefátu alebo Eudragit[®] S) je dostatočné na dodanie ich obsahu do tenkého čreva. Ako najvhodnejší polymér na transport do vzdialenejších častí tráviaceho traktu sa podľa výsledkov javí Eudragit[®] S. Experimentálne bolo potvrdené, že obal tvorený Acryl-EZE[®] nie je odolný proti kyslému prostrediu.

Z výsledkov životaschopnosti aneróbných baktérií vyplýva, že ich vloženie do oleofilného emulgujúceho prostredia (Synderman), agaru alebo škrobu nie je vhodné kvôli nemožnosti praktického prevedenia pokusu. Najväčšiu viabilitu podľa výsledkov vykazovali anaeróbne baktérie suspendované do matrice s obsahom inulínu a inulínu s L-cysteínom. BS v podobe zmrazeného média však tiež môže rozpúšťať tobolku z jej vnútra, preto bude nutné v ďalšej časti výskumu bakteriálny materiál lyofilizovať, alebo tobolku obaliť vhodným neutrálnym polymérom aj z jej vnútornej strany.

Zoznam literatúry:

- [1] KELLY, Colleen R., et al. Update on fecal microbiota transplantation 2015: indications, methodologies, mechanisms, and outlook. *Gastroenterology*, 2015, 149.1: 223-237.
- [2] YOUNGSTER, Ilan, et al. Oral, capsulized, frozen fecal microbiota transplantation for relapsing *Clostridium difficile* infection. *Jama*, 2014, 312.17: 1772-1778.
- [3] FULOPOVA, Nicole, et al. Vývoj perorálnej liekovej formy ku kolonickému podaniu biologického materiálu. 71. Zjazd chemikov, Vysoké Tatry, Slovakia, 2019.

- [4] PETROF, Elaine O., et al. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome*, 2013, 1.1: 3.
- [5] FELTON, Linda A. *Aqueous polymeric coatings for pharmaceutical dosage forms*. Press, 2016.

Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 306/2019/FAF

Syntéza a studium derivátů dihydroxynaftalenkarboxamidů s potenciálním antimikrobiálním účinkem

Tomáš Goněc, Magda Drozdowiczová, Kateřina Kleinerová, Matouš Michálek
Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Na ústavu chemických léčiv byly v poslední době syntetizovány série derivátů naftalenkarboxamidů s antimikrobiálním účinkem, z nichž některé vykazovaly zajímavou biologickou aktivitu^{1,2,3,4}. Antimikrobiální aktivitu prokázaly deriváty N-fenylnaftalen-2-karboxamidu⁴, zavedení hydroxyly jak do α polohy ke karboxamidu^{1,3}, tak na druhé jádro naftalenu² přineslo zvýšení aktivity. Látky syntetizované v rámci tohoto projektu jsou přímými strukturními analogy těchto účinných látek. N-fenylnaftalenkarboxamidy působí blokádu dýchacího řetězce mikroorganismů. Výsledky ukazují, že rozdílná poloha hydroxyly vede k vazbě na odlišná místa systému. Předpokládáme, že kombinace dvou hydroxylů povede k získání účinnějších derivátů.

Materiál a metodika

Pro syntézu látek byly vyzkoušeny tři na ÚCHL již osvědčené postupy (Schéma 1).

Časově i finančně nejjednodušší je jednokroková syntéza: příslušná dihydroxynaftalen-2-karboxylová kyselina reaguje s příslušným anilinem v přítomnosti chloridu fosforitého v prostředí chlorbenzenu a při působení mikrovlnného záření.

O něco náročnější je použití karbonyldiimidazolu: příslušná dihydroxynaftalen-2-karboxylová kyselina reaguje s karbonyldiimidazolem v bezvodém tetrahydrofuranu za vzniku příslušného acylimidazolu, který následně reaguje s anilinem. Produkt je nutné získat z reakční směsi sloupcovou chromatografií.

Třetí možností je chránění hydroxylů acetylací: příslušná dihydroxynaftalen-2-karboxylová kyselina reaguje s acetanhydridem v ledové kyselině octové za vzniku acetoxy-derivátu, který je po izolaci převeden thionylchloridem v tetrahydrofuranu na příslušný chlorid. Po izolaci reaguje příslušný chlorid s anilinem v prostředí tetrahydrofuranu za vzniku karboxanilidu. Po izolaci a rekrystalizaci je provedena hydrolýza ekvivalentem NaOH ve směsi methanol-voda.

Všechny získané surové produkty byly přečištěny krystalizací nebo sloupcovou chromatografií a byla u nich stanovena teplota tání. Struktura byla ověřena spektrálně (NMR, IČ, HRMS),

čistota pak chromatograficky (TLC). Látky byly odeslány k hodnocení antibakteriální aktivity vůči různým kmenům G+ i G- bakterií a mykobakteriím.

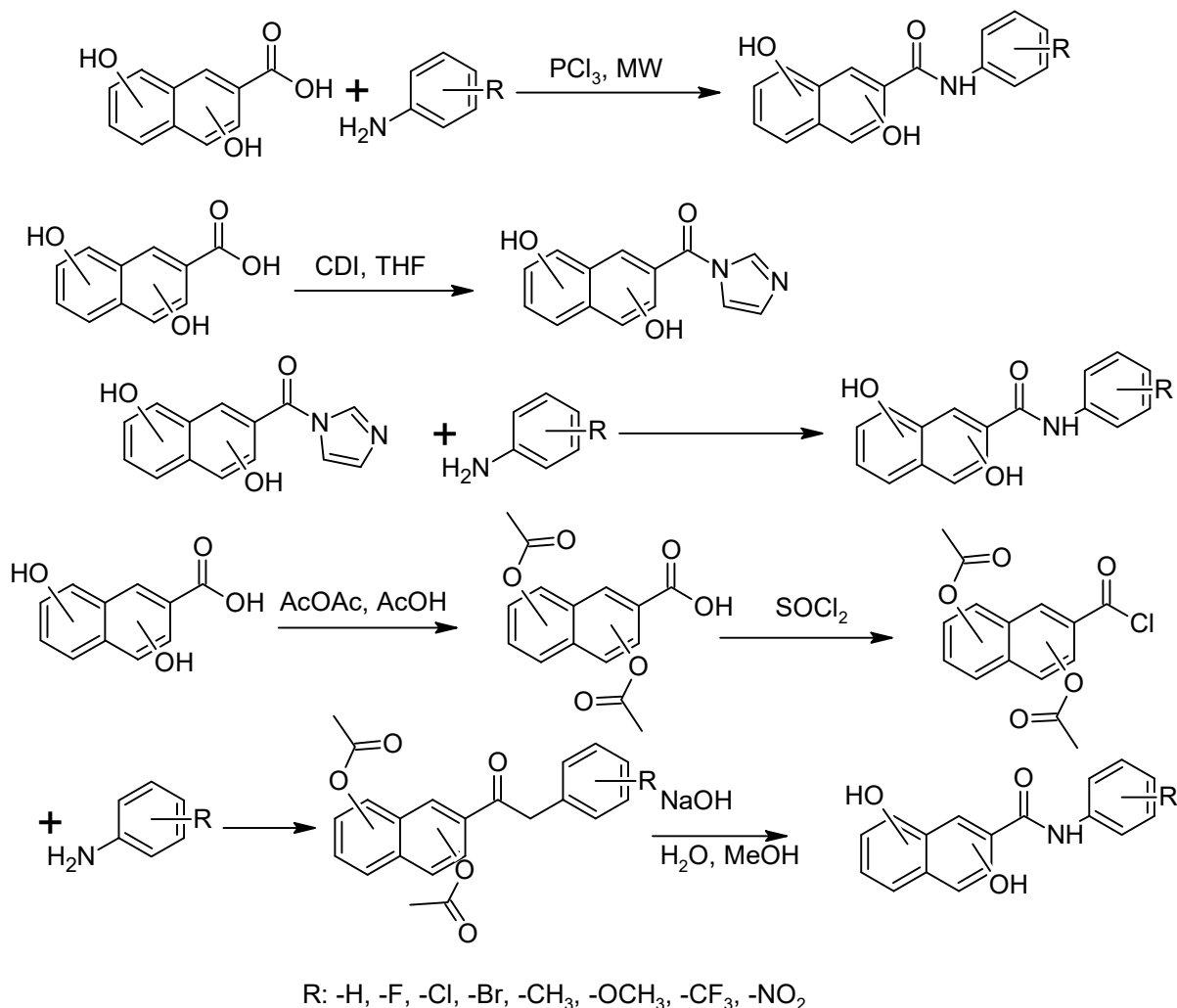


Schéma 1. Syntéza substituovaných N-fenyl dihydroxynaftalen-2-karboxamidů

Výsledky

Byly vyzkoušeny všechny tři navrhované syntetické metody. Bohužel, látky jsou náchylné k oxidaci a proto reakční směsi obsahovaly vždy směs oxidovaných vedlejších produktů. Bylo nejprve nutné vyvinout metody k separaci produktů – byly vyzkoušeny krystalizace z různých rozpouštědel a jejich směsí, avšak pouze s malým úspěchem. Krystalizací z toluenu se podařilo získat čisté produkty, avšak v neuspokojivém množství. Větší úspěch přineslo použití sloupcové chromatografie s mobilní fází toluen methanol (1:1). Hlavním produktem metody využívající karbonyldiimidazol je dimer kyseliny spojený dvěma esterovými vazbami (Schéma 2). Výtěžek karboxamidu byl neuspokojivý – do 10%. V případě využití acetylových chránících skupin nastal problém hned v prvním kroku, neboť preferovaným produktem byl opět výše zmíněný ester. Úspěšné syntézy bylo dosaženo třetí metodou s využitím PCl₃ a mikrovlnného

záření. Bylo dosaženo výtěžků 15 - 40 %. Bylo syntetizováno a charakterizováno (t.t., Rf, ^1H NMR, ^{13}C NMR, IČ) 12 originálních látek – ze sérií N-fenyl-3,5-dihydroxynaftalen-2-karboxamidů a N-fenyl-3,7-dihydroxy-naftalen-2-karboxamidů vždy šest derivátů s o-, m- a p-methoxy a fluor substitucí. Látky byly izolovány v dostatečné kvalitě a pilotní série byly postoupeny k hodnocení biologické aktivity: antimikrobiální (*Staphylococcus aureus*, methicilin – rezistentní *Staphylococcus aureus*) a antimykobakteriální (*Mycobacterium tuberculosis*, *avium*, *marinum*, *kansasii*) aktivita. Výsledky hodnocení biologické aktivity ještě nejsou k dispozici.

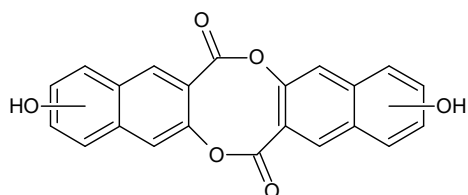


Schéma 2. Vedlejší produkt syntézy

V současné době probíhá syntéza ostatních látek těchto sérií tak, aby mohly být v nejbližší době předány k hodnocení biologické aktivity. Optimalizací postupu syntézy a nakoupením potřebných chemikálií a laboratorního vybavení byly vytvořeny podmínky pro syntézu dalších účinnějších derivátů, které mohou být vybrány na základě SAR z více jak 300 strukturních možností

Seznam literatury:

1. Goněc T., et al. Bioorg. Med. Chem. 21, 2013, 6531-6541
2. Kos J., et al. Bioorg. Med. Chem. 23, 2015, 2035-2043
3. Goněc T., et al. Molecules, 20, 2015, 9767-9787
4. Goněc T., et.al. Molecules, 19, 2014, 10386-10409

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 314/2019/FAF

Testování antibakteriální aktivity přírodními látkami, inhibice tvorby bakteriálního biofilmu a ovlivnění quorum sensing

Martin Helcman¹, Jakub Tremel², Karel Šmejkal¹, Zuzana Burclová²

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Bakterie rostoucí v biofilmu jsou obecně více odolné vůči působení imunitního systému, biofilm také výrazně zvyšuje bakteriální rezistenci k antimikrobním látkám. Jelikož jsou infekce způsobené bakteriemi produkujícími biofilm zpravidla velmi perzistentní, dlouhotrvající a těžko léčitelné, je jedním z aktuálních směrů výzkumu hledání látek inhibujících tvorbu biofilmu, popř. inhibujících quorum sensing.

Na Ústavu přírodních léčiv (ÚPL) byla izolována skupina přírodních fenolických látek, z nichž mnohé jsou substituované prenylem nebo geranylem. Prenylované fenolické sloučeniny, mezi které patří i kanabinoidy vyskytující se v rostlinách rodu *Cannabis*, vykazují výraznou a různorodou biologickou aktivitu (protizánětlivou, protinádorovou, antimikrobiální), ale jejich aktivita proti quorum sensing a tvorbě biofilmu zatím není podrobně prozkoumaná.

Materiál a metodika

Izolace a identifikace obsahových látek C. indica

Sušený květ *Cannabis indica* L. (Cannabaceae) byl extrahovaný pomocí etanolu. Takto získaný extrakt jsme odpařili do sucha a následně ho pomocí liquid-liquid extrakce rozdělili na 4 podíly (hexan, chloroform, etylacetát, metanol-voda) lišící se polaritou. Podle reakce s činidlem (Fast Blue B) byl na fenolické látky nejbohatší chloroformový podíl, proto byl zvolen na další separaci. Na tu byla použita sloupcová chromatografie (mobilní fáze dichlorethan, stacionární fáze silica gel). Všechny získané frakce byly analyzovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) a analytické vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Na základě těchto výsledků byli vybrané frakce vhodné pro pročištění pomocí semipreparativní HPLC, co vedlo k získání několika čistých látek. Tyto látky byly znovu změřené pomocí analytické HPLC a NMR. S pomocí dr. Béresa z Výzkumného ústavu rostlinné výroby v Olomouci byly některé frakce

analyzovány i pomocí vysokoúčinné plynové chromatografie spojené s hmotnostní spektroskopií. Na základě výsledků bylo identifikováno 5 čistých látek (kanabigerol **CBG**, kanabigerolová kyselina **CBGA**, kanabidiolová kyselina **CBDA**, kanabinol **CBN**, Δ^9 -tetrahydrokanabinol **THC**). Jedna látka byla identifikovaná jako změs dvou forem kyseliny tetrahydrokanabinolové (**THCA-A** a **THCA-B**), které se liší polohou karboxylové skupiny. Kromě toho jsme k testování použili ještě komerčně dostupný kanabidiol (**CBD**).

Stanovení MIC (TTC assay)

Pro stanovení MIC u gram pozitivních a gram negativních bakterií byl použitý stejný postup. Kanabinoidy jsme rozpustili v DMSO, naředili v Müller Hintonově médiu (MH médium) a napipetovali do mikrotitrační destičky ve finální koncentraci 64 $\mu\text{g/ml}$. Roztoky kanabinoidů jsme poté ředili dvojkovou řadou z 64 na 1 $\mu\text{g/ml}$. V posledním řádku destičky bylo pouze MH médium a tento řádek sloužil jako kontrola růstu. Zároveň jsme testovali vliv rozpouštědla DMSO. Následně jsme si připravili inokulum rozmícháním bakteriálních buněk (získaných odběrem z kultury pěstované na agaru), v MH médiu tak, aby měl výsledný roztok zákal přibližně 0,5 McFarlandových jednotek. Takto připravenou destičku jsme na 24 hodin inkubovali v případě *Ch. violaceum* (NCTC 13278) na 25°C a v případě *S. epidermidis* (CCM 7221) na 37°C. Poté byl zákal vyhodnocen okem a také pomocí readeru. Pro kontrolu výsledku jsme si přidali 1% roztok tetrazolium chloridu (TTC) ve vodě. Po 30 minutách v inkubátoru se v těch jamkách, kde byli stále přítomné bakterie schopné metabolismu vytvořilo červené zbarvení. To jsme změřili pomocí readeru při vln. délce 485 nm.

Optimalizace experimentu pro stanovení MBIC (minimální biofilm inhibující koncentrace)

Po nanesení inokula *S. epidermidis* (0,5 McFarland) na mikrotitrační deštičku a inkubování 24 hodin při teplotě 37°C byl vzniklý biofilm promytý PBS pro odstranění planktonických buněk a 15 minut fixovaný metanolem. Poté byl přidán 0,5% roztok krystalové violeti, který jsme po 30 minutách vymyly vodou. Po rozpuštění v roztoku 33% kyseliny octové jsme změřili absorbanci při vln. délce 590 nm [1].

Optimalizace experimentu pro stanovení účinku proti quorum sensing

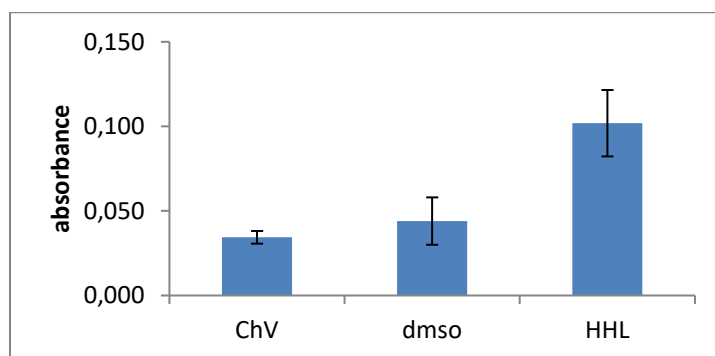
Po nanesení inokula *Ch. violaceum* (0,5 McFarland) na mikrotitrační deštičku a inkubování 24 hodin při teplotě 25°C byl přidán N-hexanoyl homoserin lakton (HHL) v koncentraci 0,5 μM .

Použitý mutantní kmen *Ch. violaceum* (NCTC 13278) totiž není schopný produkce fialového barviva violaceinu, který jinak běžné kmeny *Ch. violaceum* produkují. HHL vyvolává u mutantního kmenu produkci barviva skrze mechanismus quorum sensing. Pro optimalizaci bylo třeba ověřit, že se syntéza violaceinu spustí. Jako kontrola byl použitý rádek na deštičce s čistým DMSO a inokulum bez přidaného HHL. Měřili jsme absorbanci při 595 nm [2].

Výsledky

Optimalizace experimentu pro stanovení účinku proti quorum sensing

Pro měření inhibice quorum sensingu bylo nutné ověřit, že zakoupený mutantní bezbarvý kmen *Ch. violaceum* bude po přidání autoinduceru quorum sensingu HHL produkovat fialový pigment. Jak je patrné z grafu č. 1, je po 48 hodinové inkubaci produkce pigmentu dostatečná.



Graf č. 1 – Optimalizace produkce fialového pigmentu působením HHL v *Ch. violaceum*.

Stanovení MIC (TTC assay)

U grampozitivní bakterie (*S.epidermidis*) vykazovala většina látek inhibiční účinek již v nízkých koncentracích. Neaktivnější byly látky CBN, CBG a CBD (2 µg/ml), nejméně aktivní byla CBGA, která tlumila růst *S. epidermidis* jen v nejvyšší testované koncentraci 64 µg/ml. Měření bylo provedeno jako triplikát:

	MIC (µg/ml)
CBN	2
THC	8
CBGA	64
CBG	2
CBDA	4
CBD	2
THCA	4

U gramnegativních bakterií (*Ch. violaceum*) se v trojitě provedeném měření všechny testované látky ukázali jako neúčinné v koncentraci 64 µg/ml a méně, což je v souladu s dostupnou literaturou. Testování inhibice quorum sensingu kanabinoidy zatím probíhá, ale ještě nemáme relevantní data.

Stanovení MBIC

Většina testovaných látek tlumila produkci biofilmu *S. epidermidis* až při minimální inhibiční koncentraci a nejedná se tedy o čistě inhibici biofilmu jako takovou. Nicméně z hlediska dalšího výzkumu se chceme zaměřit na velmi účinné látky CBN, CBG a CBD.

Jedinou významnou výjimkou byla CBGA (MIC 64 µg/ml, MBIC 8 µg/ml) – což znamená specifickou inhibici tvorby biofilmu.

Seznam literatury:

[1] Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Čirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 2007;115:891–9.

[2] Skogman, M. E., Kanerva, S., Manner, S., Vuorela, P. M., & Fallarero, A. (2016). Flavones as Quorum Sensing Inhibitors Identified by a Newly Optimized Screening Platform Using *Chromobacterium violaceum* as Reporter Bacteria. *Molecules*, 21(9), 1211. doi:10.3390/molecules21091211

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 310/2019/FaF

Výroba a testování "umělých" trombů pro experimentální modely trombembolických mozkových příhod

Jana Hložková, Martina Bodnárová

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Trombembolické modely mrtvice jsou pro svou komplexnost a náročnost považovány za jedny s nejsložitějších. Kromě vlastního chirurgického zákroku spojeného s katetrizací externí a interní krkavice je stěžejním problémem standardizace výroby v experimentu použitého vmetku/trombembolu. Vzhledem k tomu, že aktuální složení krve má zásadní vliv na formování trombu *in vitro*, nelze jeho výrobu standardizovat s ohledem na biologické a morfologické vlastnosti. Interindividuální rozdíly, ale i vzorky od stejných dárců vykazují v čase významnou variabilitu a u červených trombů vytvrzených trombinem nelze predikovat výsledný poměr mezi fibrinem a buněčným podílem. Požadavkem experimentální praxe je mít k dispozici stabilní vmetek s konstantním složením a vlastnostmi. Jednou z možností, jak standardizovat výrobu trombu je vyrobit jej z jednotlivých komponentů nutných pro formaci solidního (zřetěženého příčnými můstky) fibrinu. Pro výrobu „umělých trombů“ (artificial clot, AC) lze použít originální set Tisseel Kit od fy Baxter. Kromě výroby fibrinu s hustotou sítě podobnou jako u reálných trombembolů pacientů, lze do umělých trombů přidávat RTG a MRI kontrastní látky (BaSO₄, komerční nanočástice zlata, komerční jodové lipozomy a na FaF vyrobené jodové nanočástice) pro jejich nutnou vizualizaci *in vivo* ale i *in vitro*. Cílem projektu bylo vyrobit a otestovat umělé tromby na bázi lidského fibrinu pro využití v *in vivo* a *in vitro* experimentech systémových embolizací, zejména u modelů mozkové mrtvice.

Materiál a metodika

Analýza lidských trombembolů:

Trombemboly od anonymních pacientů získané při trombektomii nebo při sekci byly analyzovány po fixaci formalínem morfologicky pomocí světelné a elektronové mikroskopie. Počet vyšetřených vzorků byl 19 z toho se pro světelnou mikroskopii použilo 19 a pro

elektronovou mikroskopií 2. Vzorky na světelnou mikroskopií byly barveny Hematoxilin eosinem (HE), Weigertovým barvením a barvením dle Van Giesona.

Hodnocení poměrného zastoupení fibrinu ve sraženině u lidských trombů.

Pro kvantifikaci poměru byly použity vzorky obarvené HE (po potvrzení lokalizace fibrinových okrsků speciálním barvením – Van Gieson, Weigert). Analýza 8 vzorků byla provedena pomocí programu ImageJ. Byla kvantifikována plocha fibrinových deposit vůči ploše celého trombu.

Výroba a testování „umělého trombembolu“ (AC).

Z originálního setu Tisseel Kit (Baxter) byly v různých ředěních produktu vyrobeny „umělé“ tromby (celkem 19 typů, značení DT – Diluted Tisseel). Vzhledem k tomu, že neznačený DT je zcela průhledný bylo základní ředění DT3 použito v dalších typech AC jako základ a postupně se přidávaly jednotlivé typy značení: tuš, eosin, patentní modrá (jenom pro vizualizaci AC v hadičce) a dále BaSO₄, Mvivo Au, Fenestra VC a MAOETIB jako značení vhodné pro vizualizaci RTG nebo MRI. U 4 AC byly hodnoceny jejich morfologické vlastnosti (ultrastruktura na rastrovacím elektronovém mikroskopu) a u 8 AC mechanicko-biologické vlastnosti – hmotnost, přilnavost, elasticita a fragilita. Testovány byly tromby o stejné tloušťce a délkách 5, 10, 15 a 20 mm.

Štěpení AC alteplázou.

U 12-ti vzorků (v tripletech) byla provedena *in vitro* fibrinolýza alteplázou (rekombinantní tkáňový aktivátor plasminogenu, rtPA) při teplotě 37 st. C a v prostředí bovinního séra (zdroj plasminogenu a ostatních faktorů aktivace i inhibice fibrinolýzy) a při horizontálním míchání. Po hodině fibrinolýzy byl odebrán vzorek lyzátu (tekutiny) pro stanovení D-dimeru. Vzorek byl bezprostředně po odběru zmražen na -20 st. C, Lýzy proběhly v rozmezí 10 dnů. Všechny tyto vlastnosti byly komparovány s "klasicky" *in vitro* vyrobeným červeným trombem vytvrzeným trombinem a některými vlastnostmi vzorků lidských trombů získaných po trombektomii (ultrastruktura fibrinových vláken a jejich řetězení).

Nad rámec původních cílů projektu byla testována radioopacita umělých trombu pro jejich potenciál pro testování nových fibrinolytik jak *in vivo*, tak *in vitro* modelech. A byla provedena syntéza potenciálně vhodných biologicky degradovatelných jodových nanočástic – MAOETIB dle Galperinové a Margela 2006.

Výsledky

Hodnocení poměrného zastoupení fibrinu ve sraženině u lidských trombů.

Procentuální zastoupení fibrinu v lidských trombembólech se pohybovalo od 45,5 % - 88,25 %, průměr 57,58 % + SD 13,28 %. Tento výsledek je v souladu s výsledky dostupnými v recentní literatuře (Chueh et al. 2011, Sporns et al. 2017). Dle výsledků elektronové mikroskopie jsou fibrinová depozita hustě zřetězena a v některých částech tvoří kompaktní hmotu, stejný obraz poskytuje i světelná mikroskopie.

Test elasticity a fragility.

Vzorky DT 11 a DT 14 se při testu rozpadli na 2 a více fragmentů. Vzorek červeného trombu se po 20 průchodech kanylami zmenšil na ¼ svého původního rozměru. Fragilita se zvyšuje při použití vysoké koncentrace fibrinu a při použití vysokého objemového zastoupení BaSO₄. Mražení zhoršuje elasticitu.

Test lepivosti:

Všechny vzorky testovaných „umělých trombů“ vykazovali dostatečnou lepivost podobnou, jako má vzorek krevního trombu, lepivost se snižuje zvýšením obsahu anorganické složky a mražením.

Schopnost být štěpen alteplázou (lidský rekombinantní tkáňový aktivátor plazminogenu):

Vykazují ji všechny vzorky, které byly chlazeny nebo mrazeny. Fixace formalínem inhibuje schopnost fixovaného fibrinu být štěpen alteplázou.

Hodnocení radioopacity umělých trombů:

Nejvyšší opacitu měl vzorek DT 17 s BaSO₄, komerční kontrastní látky – Mvivo-Au a Fenestra VC nejsou bez přítomnosti specifického binderu schopné zůstat v umělém trombu. Jako alternativu k BaSO₄ lze použít jodové nanočástice s pevným jádrem (MAOETIB) které jsou v těle plně degradovatelné, a tedy potenciálně vhodné k použití v klinické praxi.

Stanovení d-dimerů v lyzátu z AC:

Stanovení bude provedeno vzhledem k technickým možnostem pracoviště 29/11/2019 tj. výsledky budou prezentovány až na studentské konferenci, diplomové práci a v publikaci.

Syntéza MAOETIB

Byla provedena úspěšná syntéza pevných jodových částic o velikosti 25-340 nm. Částice vykazují vyšší radioopacitu, než komerční preparát Fenestra VC a srovnatelnou nanočásticemi zlata.

Diskuze a závěr

Projekt potvrdil vhodnost umělých trombů pro použití jak v *in vitro*, tak *in vivo* experimentech. Potvrdil nevhodnost použití *in vitro* vyrobených červených trombů (nestabilita, nízký obsah fibrinu). Do umělého trombu lze přimíchávat kontrastní látky dle zaměření experimentu, popřípadě lze trombus stabilizovat aprotininem a zvýšit jeho odolnost proti fibrinolýze (experimenty studující nové kontrastní látky zobrazující fibrin, nebo nácvik trombektomických technik pod kontrolou RTG technik) v libovolné lokalizaci *in vivo* nebo na fantomech.

Seznam literatury:

Chueh JK, Wakhloo AK, Hendricks GH, et al.: Mechanical characterisation of thrombemboli in Acute ischemic stroke and laboratory embolus analogs. Am J Neuroradiol 2011, 32:1237-1244.

Galperin A, Margel S: Synthesis and characterisation of new radioopaque microspheres by the dispersion polymerization of an iodinated acrylate monomer for X-ray imaging applications. J Polym Sci, part A: Polym Chem 2006, 44:3859-3868.

Sporns PB, Hanning U, Schwandt W, et al.: Ischemic stroke. What does the histological composition tell us about the origin of the thrombus? Stroke 2017, 48:2206-2210.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 318/2019/FaF

Příprava a hodnocení polymerních částic pro plicní aplikaci

Jakub Karas¹, Jan Gajdziok¹, Hana Hořavová¹, Martin Veselý¹

¹*Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Suché práškové formulace určené k plicní aplikaci se v medicíně využívají k lokální (CHOPN, tuberkulóza, infekce DCD, nádorová onemocnění, atd.) i systémové léčbě (např. DM II - inhalační inzulin) (Cryan, 2007). Pro dosažení požadovaného účinku je důležitá vhodná depozice částic, která je zajištěna jejich fyzikálními parametry. V současné době je jedním z nejdůležitějších parametrů tzv. aerodynamický průměr, který vychází z fyzické velikosti a hustoty částic (Edwards, 1997). Aerodynamický průměr částice by se měl pohybovat kolem 5 μm , přičemž fyzická velikost částic je větší, což zabraňuje jejich eliminaci buňkami imunitního systému - makrofágy (Gardon, 2014).

Cílem projektu byla optimalizace formulačních a procesních parametrů sprejového sušení a hodnocení fyzikálních vlastností vzniklých částic, vhodných jako nosiče léčiv určených k inhalačnímu podání. Dalším cílem bylo nalezení vhodného porogenu, který má zajistit optimální aerodynamické parametry částic pro jejich depozici v dolních částech plic a omezit jejich eliminaci přirozenými mechanismy dýchací soustavy.

Materiál a metodika

Pro přípravu částic byla použita sprejová sušárna (LabPlant model PD-06, UK). Jako částice formující látka byl použit D-mannitol (Penta, CZ; $M_r=182,18$). Tento cukerný alkohol má schopnost na základě své osmotické aktivity snižovat viskozitu hlenu např. u cystické fibrózy, nebo dalších plicních onemocněních.

K nalezení vhodných procesních parametrů byla vytvořena experimentální škála pokusů o různých parametrech teploty sušení, průtoku vzduchu sušárnou a rychlosti nástřiku disperze. Parametry pro průtok vzduchu, rychlost pumpy a teploty byly nastaveny na tři hladiny, které se mezi sebou kombinovaly dle (Box-Behnken plánu) při jedné hladině koncentrace roztoku mannitolu 10 % (w/w). Bylo připraveno 13 vzorků (středový bod 3x) (Tab. 1). Disperze mannitolu byla při tlaku 3 bar nástřikována přes dvoukapalinovou trysku o průměru 2 mm do sušící komory. U výsledného suchého práškového produktu byla měřena fyzická velikost částic laserovou difrakcí (Horiba model LA-690, JP), aerodynamické parametry na APS

(aerodynamic particle sizer -TSI™ model 3321). Dále byla zjištěna sypná a setřesná hustota a Hausnerův poměr částic a pořízeny fotky mikročástic elektronovým mikroskopem (Mira 3, Tescan, CZ).

Experiment	Opakování	Teplota (°C)	rychlost pumpy	průtok vzduchu
1	1	100	10	35
2	1	140	10	35
3	1	100	30	35
4	1	140	30	35
5	1	100	20	20
6	1	140	20	20
7	1	100	20	50
8	1	140	20	50
9	1	120	10	20
10	1	120	30	20
11	1	120	10	50
12	1	120	30	50
13 (centrální bod)	3	120	20	35

Tabulka 1: Experimentální škála se třemi proměnnými.

Výsledky

Aerodynamický průměr (AD) se u všech vzorků pohyboval v rozmezí 7,00-8,66 μm (Tab. 2). Lze tedy konstatovat, že v tomto případě neměly měnit se procesní parametry zásadní vliv na výsledné aerodynamické vlastnosti. Výraznější rozdíly byly pozorovatelné na fyzickém průměru částic (S). Nejmenší částice byly detekovány u vzorku 1 (8,41 μm) a 11 (8,83 μm) (Tab. 2). V obou případech byla rychlost pumpy nastavena na nízkou hodnotu (10 jednotek – nastavení přístroje), teplota na nízkou (100 °C - vzorek 1) a střední (120 °C - vzorek 11). Při zachování stejných hodnot teplot a průtoků vzduchu, se u vzorku 3 (39,82 μm) v porovnání se vzorkem 1 (8,41 μm) zvětšuje fyzický průměr částic (S) s rostoucí rychlostí pumpy. Stejný trend je pozorován při porovnání vzorku 2 a 4 mezi sebou, vzorku 9 a 10 mezi sebou, 11, 12 mezi sebou. Ve všech jmenovaných případech se zvýšením rychlosti pumpy zvětšuje velikost

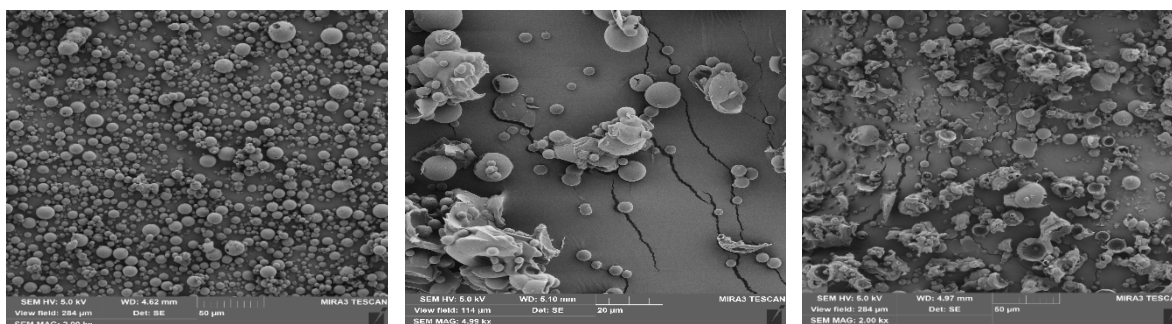
výsledného produktu. U vzorku 7 (10,98 μm) a 5 (227,22 μm), se při stejných parametry teploty a rychlosti pumpy, zvýšením průtoku vzduchu fyzická velikost částic (S) zmenšovala. U vzorku 7 byl průtok vzduchu nastaven na 50 jednotek (nastavení přístroje), u vzorku 5 byl průtok vzduchu 20. Mezi těmito vzorky byl rozdíl fyzické velikosti částic extrémně vysoký. Stejný trend bylo možné pozorovat ve vztahu mezi vzorky 6 a 8, 9 a 11, 10 a 12. Zvýšením průtoku vzduchu, se při konstantních teplotách a rychlostech pumpy, fyzický průměr částic S zmenšuje. Při sledování vlivu třech proměnných parametrů na velikost aerodynamického průměru (AD) se tento trend jednoznačně nepotvrdil.

vzorek	AD (μm)	S (μm)	hmotnost [g]	objem					sypná hustota h_0 [g/cm ³]	setřesná hustota h_n [g/cm ³]	Hausnerův poměr
				V ₀ [ml]	V ₁₀	V ₅₀₀	V ₁₂₅₀	V ₂₅₀₀			
1	7,50	8,41	1,53	5,00	4,80	3,90	3,90	3,90	0,31	0,39	1,28
2	8,10	22,40	1,44	5,00	4,10	3,90	3,80	3,80	0,29	0,38	1,32
3	7,20	39,82	1,23	5,00	4,50	3,60	3,60	3,60	0,25	0,34	1,39
4	8,35	35,87	1,45	5,00	4,60	4,00	3,90	3,90	0,29	0,37	1,28
5	8,40	227,22	1,63	5,00	4,40	4,20	4,20	4,20	0,33	0,39	1,19
6	8,50	32,00	1,41	5,00	4,50	4,00	4,00	4,00	0,28	0,35	1,25
7	7,30	10,98	1,36	5,00	4,70	3,50	3,50	3,50	0,27	0,39	1,43
8	8,00	18,29	1,36	5,00	4,30	3,50	3,40	3,40	0,27	0,40	1,47
9	7,20	12,92	1,25	5,00	4,60	3,70	3,60	3,60	0,25	0,35	1,39
10	8,66	74,22	1,60	5,00	4,40	4,00	4,00	3,80	0,32	0,42	1,32
11	8,70	8,83	1,32	5,00	4,70	3,80	3,80	3,80	0,26	0,35	1,32
12	7,50	11,10	1,33	5,00	4,60	3,60	3,60	3,60	0,27	0,37	1,39
13a	7,30	15,54	1,30	5,00	4,60	3,60	3,60	3,60	0,26	0,36	1,39
13b	7,23	11,92	1,41	5,10	4,70	3,80	3,60	3,60	0,28	0,39	1,42
13c	7,00	12,11	1,30	4,90	4,30	3,50	3,50	3,50	0,27	0,37	1,40

Tabulka 2: Výsledky experimentální škály: AD – aerodynamický průměr měřený APS (MMAD - mass median aerodynamic diameter); S – fyzický průměr částice měřený laserovou difrakcí, sypná hustota, setřesná hustota po 2500 sklepnutích, HP

Pro optimalizaci formulačních parametrů byl sestaven experiment o třech různých hladinách koncentrace D-mannitolu. K nástřiku všech tří vzorků byla sprejová sušárna nastavena na střední hodnoty předchozího experimentu (vzorek 13, Tab. 1). Částice s největším fyzickým průměrem $S=15,00 \mu\text{m}$ byly připraveny z roztoku mannitolu o koncentraci 10% (w/w) vzorek - M10, nejmenší ($S=6,60 \mu\text{m}$) z 15% roztoku - vzorek M15 a střední velikost ($S = 7,90 \mu\text{m}$) částic byla naměřena u produktu připraveného z 20% vodného roztoku D-mannitolu – vzorek M20. Nelze tedy usuzovat, že je mezi koncentrací roztoku a velikostí částic přímá úměra, jak bylo předpokládáno. Aerodynamický průměr (AD) pro dané vzorky byl: M10=6,20 μm , M15=7,10 μm , M20=7,00 μm . Malé rozdíly v těchto hodnotách jsou pravděpodobně způsobeny tím, že částice se liší svou hustotou a tím i porozitou.

Při posledním experimentu bylo zkoušeno přidání porogenu do roztoku D-mannitolu (10 % w/w). Pro tento experiment byly parametry pro nástřik nastaveny na centrální bod (vzorek 13, Tab. 1). Celkově byly provedeny dva experimenty: vzorek P2 - hydrogenuhličitan amonný, vzorek P1 - uhličitan amonný, vždy ve složení disperze 1 % porogenu a 9 % D-mannitolu (w/w) v destilované vodě. Pro porovnání účinnosti porogenu byl připraven i kontrolní vzorek P s parametry shodnými s centrálním bodem. Oba experimenty vykazovaly v porovnání s kontrolním vzorkem ($S=15,00 \mu\text{m}$, $AD=7,50$) vyšší fyzický a menší aerodynamický průměr částic (P1: $S=63,00 \mu\text{m}$, $AD=5,10 \mu\text{m}$; P2: $S=57,70 \mu\text{m}$, $AD=5,80 \mu\text{m}$). Tento výsledek, nebyl v souladu s očekávanými předpoklady. Na snímcích z elektronového mikroskopu je patrné, že při použití porogenu dochází k výraznému narušení struktury částic (Obr. 1). Tento poznatek povede ke snižování koncentrace porogenu v dalších experimentech.



Obrázek 1: zleva vzorek P – hladké částice, uprostřed vzorek P1 a vpravo vzorek P2 – poškozené částice s porogenem.

Závěr

V experimentu byly ověřeny optimalizační parametry pro přípravu mikročástic jako nosičů určených k plicní aplikaci. U všech vzorků se hodnota aerodynamického průměru

pohybovala ve vhodném intervalu (7-9 μm) pro depozici v dolních částech plic. Dále bude cílem připravit částice s fyzickou velikostí kolem 20 μm a aerodynamickou kolem 5 μm , čehož se pokusíme dosáhnout snížením jejich hustoty – zvýšením porozity přidavkem porogenu v koncentraci, která výrazně nenaruší jejich strukturu jako v provedeném experimentu.

Seznam literatury:

EDWARDS, David A., et al. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science*, 1997, 276.5320: 1868-1872.

GRADON, Leon; SOSNOWSKI, Tomasz R. Formation of particles for dry powder inhalers. *Advanced Powder Technology*, 2014, 25.1: 43-55.

CRYAN, Sally-Ann; SIVADAS, Neeraj; GARCIA-CONTRERAS, Lucila. In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007, 59.11: 1133-1151.

Tato práce byla financovaná za podpory IGA VFU Brno, projekt 302/2019/FaF

Stanovení vlivu obsahových látek *Broussonetia papyrifera* na signální kaskádu insulinu a NF- κ B v buněčných kulturách

Veronika Leláková¹, Jakub Tremel¹, Jan Hošek¹, Lenka Jobusová¹

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Broussonetia papyrifera (L.) L'Hér. ex Vent. (Moraceae) je strom pocházející z východní Asie, známý taky pod názvem *paper mulberry*, jelikož se hojně využívá k výrobě papíru. Několik publikací popisuje biologickou aktivitu extraktů z různých částí rostliny, jedná se především o antioxidační, protizánětlivou, antidiabetickou a antimikrobiální aktivitu [1]. Složení extraktů z tohoto druhu a biologická aktivita jednotlivých obsahových látek však není doposud dostatečně definována, zejména pokud jde o protizánětlivou, antidiabetickou a antioxidační aktivitu. Cílem tohoto projektu bylo stanovit vliv jedenácti látek izolovaných z chloroformového extraktu *B. papyrifera* na signální kaskádu NF- κ B, včetně sekrece prozánětlivých cytokinů TNF- α , IL-1 β a volných kyslíkových radikálů u lidských monocytů THP-1. A dále stanovit vliv na signální dráhu insulinu, resp. následný proces translokace GLUT4 transportérů na buněčnou membránu.

Materiál a metodika

Testované látky

Látky byly získány z chloroformového extraktu *B. papyrifera* chromatografickými metodami (kolonová chromatografie, preparativní HPLC, analytické TLC). Jejich molekulová hmotnost byla stanovena pomocí HRMS měření, následně byly identifikovány struktury analýzou NMR spekter. Jedná se o tyto polyfenolické látky: marmesin (**1**), 8-methoxymarmesin (**2**), broussin (**3**), kazinol B (**4**), kazinol M (**5**), kazinol N (**6**), fipsotwin (**7**), threo-(7S,8S)-dadahol B (**8**), erythro-(7S,8R)-dadahol A (**9**), brousoflavonol A (**10**) a brousoflavonol B (**11**).

Buněčné linie

Lidské monocyty THP-1 a THP-1-XBlue-MD2-CD14

Phorbol myristát acetát (PMA)-diferencovány lidské makrofágy THP-1

Myší svalové buňky C2C12 (diferencované v DMEM High Glucose medium s obsahem 2 % koňského séra)

Měření viability

Pro stanovení protizánětlivého efektu byl nejdřív ověřen možný toxický efekt látek v koncentracích 0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 25 - 50 μM . Viabilita buněk byla měřená po 24 h WST-1 testem. Pomocí 4PL analýzy byly vypočítány hodnoty IC_{50} . Pro další testování a možné porovnání biologického efektu byla vybrána jednotná, farmakologicky relevantní koncentrace 1 μM .

Měření NF- κB /AP-1 aktivity

Aktivita transkripčních faktorů NF- κB /AP-1 byla stanovena na buněčné linii THP-1-XBlueTM-MD2-CD14. Buňky (50.000/jamka) byly proléčeny látkami 1-11 v koncentraci 1 μM . Po 1 h byl k buňkám přidán lipopolysacharid (LPS) z *E. coli* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). LPS-vyvolána zánětlivá odpověď vede u tyto linie k stimulaci TLR4 receptorů, aktivaci NF- κB /AP-1 a následné produkci proteinu SEAP, který byl po 24 h měřen Quanti-BlueTM testem.

Stanovení cytokinů

Expres prozánětlivých proteinů TNF α , IL-1 β , které jsou pod transkripční kontrolou NF- κB , byla stanovena pomocí ELISA testu. Pro toto testování byly vybrány látky, které v předchozím experimente prokázali nejlepší inhibiční aktivitu vůči NF- κB . PMA-diferencované lidské makrofágy byly proléčeny látkami 4, 10 a 11. Po 1 h byly buňky stimulovány LPS, koncentrace cytokinů v médiu byla měřena 24 h.

Měření míry translokace proteinu GLUT4 na buněčnou membránu

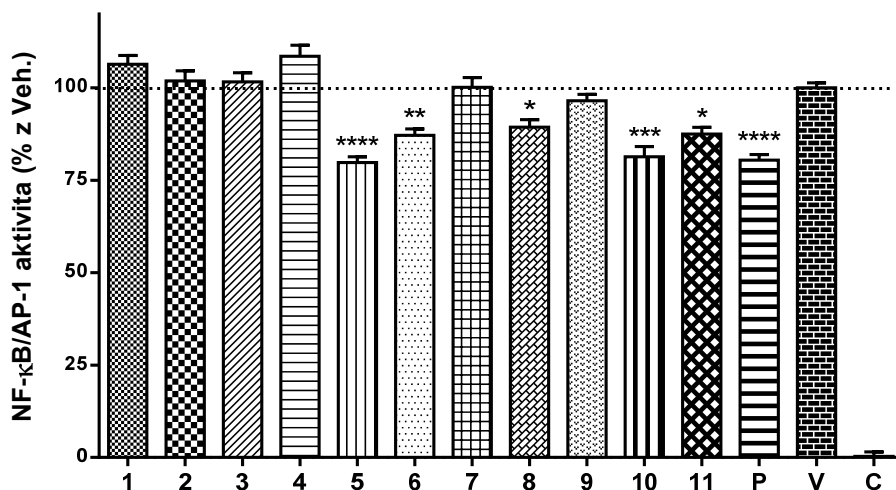
Buňky C2C12 byly inkubovány v kontejnerech s plochou 75 cm^2 , dokud nebylo dosaženo 100% konfluency v běžném růstovém médiu. Poté bylo médium vyměněno za DMEM High Glucose médium s obsahem 2 % koňského séra a buňky se nechaly diferencovat během 6 dní z myoblastů na myocyty.

Poté byly k buňkám na 24 hodin přidány testované látky a po uběhnutí této doby byly buňky lyzovány. Lyzáty byly zpracovány pomocí metody Yamamoto et al. 2016 [3] s mírnými úpravami, kdy byly z celkového lyzátu izolovány membránové proteiny pomocí různých koncentrací detergentu. Jednotlivé frakce lyzátů byly rozděleny pomocí polyakrylamidové elektroforézy a množství proteinů bylo detekováno pomocí Western blotu a specifických protilátek – jednak vůči GLUT4 a dále vůči Na^+/K^+ -ATPáze (která fungovala jako marker membránových proteinů).

Výsledky

Látky **1**, **2**, **3**, **7** a **10** neprokázali v rámci testovaných koncentrací negativní vliv na viabilitu THP-1 buněk. Jejich IC_{50} je větší než $20 \mu M$. Relativně bezpečný profil měla taky látka **11** s $IC_{50} 17.5 \pm 1.0$. IC_{50} látky **6** je vyšší než $10 \mu M$. Ostatní látky **4**, **5**, **8** a **9** dokázali snížit viabilitu THP-1 buněk, jejich IC_{50} odpovídalo hodnotám $7.5 \pm 1.1 \mu M$, $3.6 \pm 1.0 \mu M$, $5 \mu M$ a $2.7 \pm 1.0 \mu M$, v tomto pořadí. Pro další testování protizánětlivé aktivity a možné porovnání efektu, byla pro všechny látky vybrána jednotná a farmakologicky relevantní koncentrace $1 \mu M$ [2].

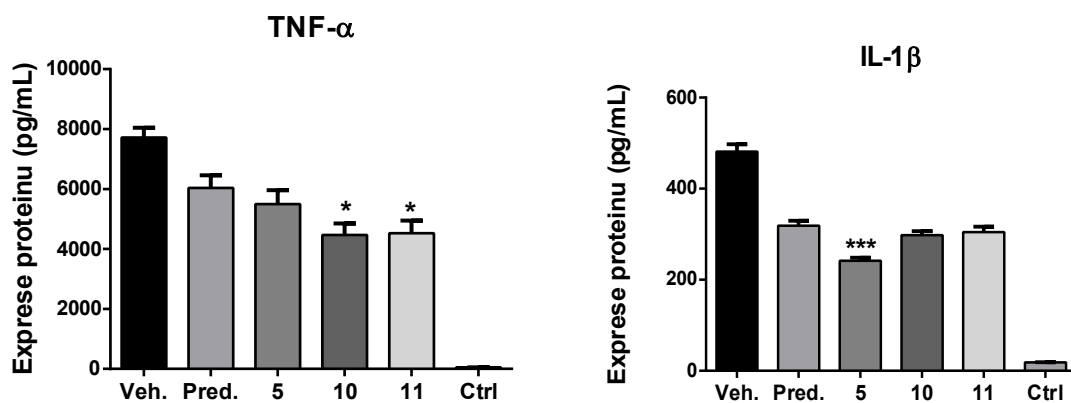
V následovném kroku jsme se zaměřili na aktivitu transkripčních faktorů NF- κ B/AP-1, které kontrolují transkripci prozánětlivých cytokinů, včetně TNF- α a IL-1 β . Pět z jedenácti látek prokázalo schopnost snížit aktivitu NF- κ B/AP-1 (Obr. 1), z toho dvě látky (**5** a **10**) porovnatelně s prednisonem (P), rutinně používaným kortikoidním lékem. Tyto dvě látky, spolu s látkou **11**, která prokázala inhibiční efekt a zároveň i netoxický charakter, byly tyto tři vybrány do dalšího testování, kde jsme se podívali na schopnost snížit down-stream sekreci prozánětlivých cytokinů.



Obr. 1: Vliv látek z *B. papyrifera* na aktivitu transkripčních faktorů NF- κ B/AP-1 měřena po 24 h na THP-1-XBlue-MD2-CD14 buňkách. N=4; 6-plikáty. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Kruskal-Wallis test.

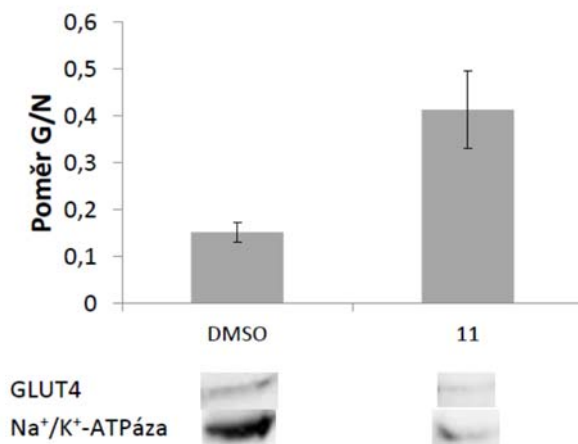
Broussonoflavonol A (**10**) a broussonoflavonol B (**11**) dokázali snížit sekreci TNF- α u THP-1 makrofágů víc než pozitivní kontrola prednison, zatímco efekt kazinolu M (**5**) byl

srovnatelný s prednisonem. Podobně tomu bylo v případě IL-1 β . Tady kazinol M (5) prokázal vyšší inhibiční efekt než prednison, látky 10 a 11 prokázali efekt porovnatelný pozitivní kontrole (Obr. 2).



Obr. 2: Vliv vybraných látek z *B. papyrifera* na expresi prozánětlivých cytokinů TNF- α a IL-1 β u PMA-diferencovaných makrofágů po 24 h od vyvolání zánětu. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Kruskal-Wallis test.

Měření míry translokace proteinu GLUT4 na buněčnou membránu



Obr. 3: Vliv brousoflavonolu B (11) na translokaci GLUT4 vyjádřený jako poměr množství GLUT4 vůči Na⁺/K⁺-ATPáze v membránové frakci.

Seznam literatury:

- [1] WANG, Guo-Wei; HUANG, Bao-Kang; QIN, Lu-Ping. The genus *Broussonetia*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 2012, 26.1: 1-10.
- [2] Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M. H., Oatis, J. E., & Walle, U. K. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism & Disposition*, 32(12), 1377-1382. doi:10.1124/dmd.104.000885.
- [3] Yamamoto, N., Yamashita, Y., Yoshioka, Y., Nishiumi, S., and Ashida, H. 2016. Rapid preparation of a plasma membrane fraction: western blot detection of translocated glucose transporter 4 from plasma membrane of muscle and adipose cells and tissues. *Curr. Protoc. Protein Sci.* 85:29.18.1-29.18.12. doi: 10.1002/cpps.13

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 309/2019/FaF.

Izolace obsahových látek z dřevní části *Broussonetia papyrifera* (L.) L'Hér. ex Vent.

Milan Malaník¹, Kateřina Pomykalová¹, Tereza Pospíšilová¹, Hana Šafářová¹, Karel Šmejkal¹
Ústav přírodních léčiv¹, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Broussonetia papyrifera (L.) L'Hér. ex Vent. (Moraceae) je listnatý strom dorůstající do výšky 15 m, známý jako paper mulberry. Pochází z východní Asie, kde se využívá na výrobu nábytku a především vysoce kvalitního papíru [1]. Jedná se také o rostlinu tradiční čínské medicíny, která využívá různé části *B. papyrifera* pro léčebné účely. Extrakty *B. papyrifera* vykazují antioxidační, protizánětlivou, antidiabetickou a antimikrobiální aktivitu [1]. Tato rostlina představuje bohatý zdroj rozmanitých sekundárních metabolitů. Mezi hlavní obsahové látky patří flavonoidy, především pak jejich prenylované deriváty. Dále byly v rostlině popsány také lignany, triterpeny, alkaloidy a další chemicky různorodé látky [1;2], o jejichž bioaktivitě existuje minimum informací.

Materiál a metodika

Separace rostlinného materiálu

Projekt navazuje na práci, která byla již dříve započata na ÚPL, a to když byl ze dřeva větví *B. papyrifera* připraven celkový ethanolický extrakt, který byl následně rozdělen mezi vzájemně nemísitelná rozpouštědla na hexanový, chloroformový, ethylacetátový a vodný podíl. Chloroformový podíl byl dále podroben sloupcové chromatografii, čímž bylo získáno 150 frakcí. Z nich byly pro další analýzu vybrány frakce BP-15-20, BP-21-22, BP-25-26, BP-29-30 a BP-31-32, které obsahovaly různé látky (dle porovnání UV spekter a retenčních časů) a které představovaly potenciální zdroj prenylovaných fenolických sloučenin. V závislosti na hmotnosti a profilu frakcí dle TLC (F₂₅₄ 20×20 cm, Merck) a HPLC-DAD (Agilent HP1100 s DAD, USA) byly vybrané frakce dále podrobeny vhodné separační metodě. Pro každou frakci byla vybrána vždy vhodná specifická mobilní fáze a následně provedena separace pomocí sloupcové chromatografie za použití skleněných kolon o různých parametrech na silikagelu (velikost částic 0,04-0,063 mm, Merck) jakožto stacionární fáze. Subfrakce byly jímány do baněk po objemech cca 125 ml, následně zahuštěny pomocí rotační vakuové odparky a na základě podobnosti na TLC a HPLC-DAD byly viditelně stejné frakce spojeny. Poté byly tyto subfrakce přečištěny pomocí prep. TLC (skleněné desky 20×20 cm, 500 μm, Merck) nebo semiprep. HPLC (Ascentis RP-Amide 250×10 mm, 5 μm, Supelco, USA), čímž bylo získáno

celkově 28 strukturně odlišných látek, jejichž čistota byla ověřena pomocí analytické TLC a HPLC-DAD.

Strukturní charakteristika získaných látek

Všechny získané látky byly podrobeny dostupným spektrálním metodám (UV, HRMS, NMR) za účelem objasnění jejich struktury. Porovnáním UV spekter s knihovnou spekter na ÚPL jsme získali základní představu o struktuře dané látky, která však byla objasněna až po důkladném vyhodnocení jednodimenzionálních ^1H NMR a dvoudimenzionálních HSQC, HMBC, COSY a NOESY spekter. Pro NMR analýzu byl použit NMR spektrometr JeolTM JNM-ECZ400R s pracovní frekvencí 400 MHz pro ^1H . Následně byla struktura jednotlivých látek potvrzena také pomocí HRMS metodou HESI (Heated electrospray ionization) za použití vysokorozlišovacího hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, USA). U vybraných látek byla stanovena absolutní konfigurace pomocí NMR a CD (JASCO J-815, Jasco, USA).

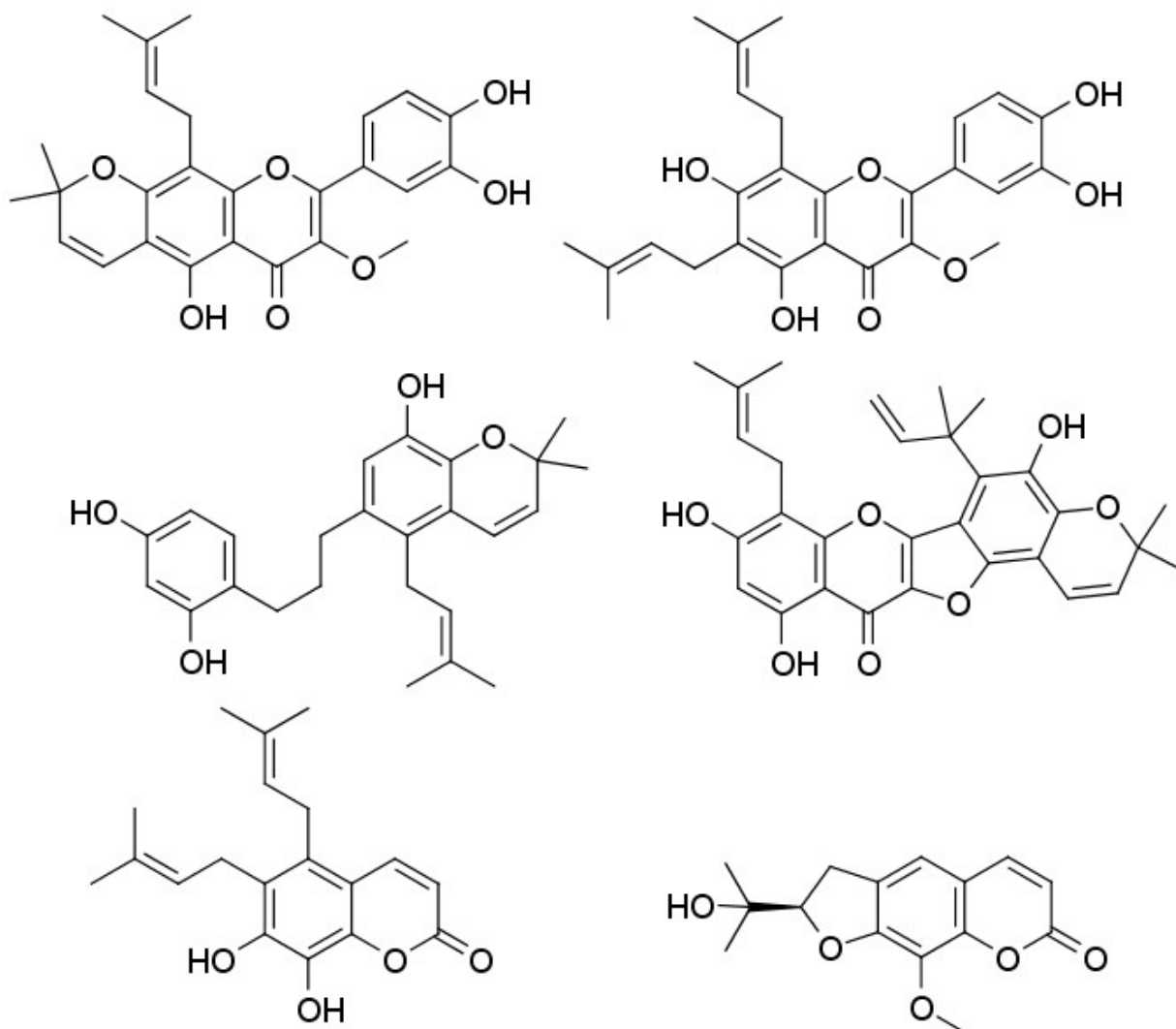
Výsledky

Kombinace různých separačních technik vedla k izolaci 28 čistých látek, jejichž čistota byla více než 90 %, ve většině případů pak více než 96 % (dle HPLC-DAD). Strukturně se jedná o rozmanité látky, které patří mezi prenylované flavonoidy (brousoflavonol A, brousoflavonol B, kazinol B, kazinol Q, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxy-8,5'-diprenylflavon), methoxylované flavonoidy (genkwanin, chrysoeriol, 3'-*O*-methyltaxifolin, broussin, sakuranetin), flavonoidní aglykony (naringenin), chalkony (isoliquiritigenin), difenylpropany (kazinol M, kazinol N, broussonin A), stilbeny (pterostilben), kumariny (umbeliferon, fipsotwin, (*S*)-marmesin, včetně nového derivátu (*R*)-8-methoxymarmesinu), lignany (syringaresinol, pinoresinol, *erythro*-(7*S*,8*R*)-dadahol A, *threo*-(7*S*,8*S*)-dadahol B). Podařilo se izolovat také jeden derivát vyšší mastné kyseliny (13-hydroxy-*cis*-9-*trans*-11-octadekadienová kyselina) a jeden nový flavonoidní derivát pojmenovaný brousofluorenone C. Látky brousoflavonol A, brousoflavonol B, kazinol B, 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxy-8,5'-diprenylflavon, broussin, naringenin, isoliquiritigenin, broussonin A a (*S*)-marmesin byly z *B. papyrifera* již dříve izolovány. Všechny ostatní látky byly v rostlině popsány poprvé. Přestože se ve většině případů nejedná o nové látky, tak nejsou dostupné téměř žádné informace o jejich bioaktivitě.

Závěr

Závěrem tedy můžeme konstatovat, že se podařilo získat zajímavý set látek, který bude následně použit pro testování biologické aktivity. Vybrané látky již byly poskytnuty pro

testování protizánětlivé a antidiabetické aktivity, furanokumariny (*S*)-marmesin a (*R*)-8-methoxymarmesin pak byly podrobeny testování antikonvulzivní aktivity.



Obr. 1: Vybrané struktury látek izolovaných z *B. papyrifera* (brousoflavonol A, brousoflavonol B, kazinol M, nová látka brousofluorenone C a kumariny fipsotwin a (*R*)-8-methoxymarmesin)

Seznam literatury:

- [1] WANG, Guo-Wei; HUANG, Bao-Kang; QIN, Lu-Ping. The genus *Broussonetia*: a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 2012, 26.1: 1-10.
- [2] LEE, Dongho; KINGHORN, A. Douglas. Bioactive compounds from the genus *Broussonetia*. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, 2003. 3-33.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 303/2019/FaF

Izolácia a identifikácia obsahových látok z plodov *Paulownia tomentosa* a ich cytotoxická aktivita

Lenka Molčanová¹, Kateřina Filipská¹, Tereza Kauerová², Karel Šmejkal¹

Ústav přírodních léčiv¹, Ústav humánní farmakologie a toxikologie², Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Paulownia tomentosa Steud. (Paulowniaceae) je veľmi prispôsobivý a extrémne rýchlo rastúci strom pôvodom zo strednej a západnej Číny, používaný v tradičnej čínskej medicíne. Je bohatým zdrojom sekundárnych metabolitov, hlavne prenylovaných flavonoidov. Prenylový reťazec zvyšuje lipofilitu zlúčeniny a udeľuje jej silnú afinitu k biologickým membránam, čím zvyšuje farmakologickú účinnosť molekuly. Tri látky s prenylovým (C5) a 63 zlúčenín s geranylovým (C10) bočným reťazcom pripojeným na flavonoidný skelet bolo v minulosti izolovaných z rôznych častí rastliny [1, 2]. Geranylované flavanóny izolované z *P. tomentosa* vykazujú silnú antibakteriálnu, antioxidantnú [3], protizápalovú [4] a v neposlednom rade cytotoxickú aktivitu. Niekoľko z týchto látok bolo testovaných na rôznych bunkových líniách a niektoré preukázali podobnú alebo dokonca vyššiu aktivitu ako používané protinádorové liečivá [5]. Príkladom môže byť tomentodiplakon B, prenylovaný flavonoid izolovaný z *P. tomentosa*, ktorý bol v minulosti študovaný z hľadiska potenciálnych antiproliferačných účinkov voči ľudskej monocytárnej bunkovej línii. V súvislosti s ovplyvnením priebehu bunkového cyklu bola preukázaná jeho schopnosť kumulovať bunky v G₁ fáze bunkového cyklu so súčasným poklesom množstva buniek v syntetickej fáze [6].

Materiál a metodika

Izolácia obsahových látok

Vybrané frakcie získané z plodov *P. tomentosa* boli separované stĺpcovou chromatografiou a preparatívnou HPLC.

Stĺpcová chromatografia

Na stĺpcovú chromatografiu bola použitá kolóna s dĺžkou 72 cm a vnútorným priemerom 4,5 cm a druhá kolóna s dĺžkou 65 cm a vnútorným priemerom 2,8 cm, pričom výška stĺpca silikagélu bola približne $\frac{3}{4}$ dĺžky kolóny. Ako stacionárna fáza bol použitý silikagél Sigma-60A o veľkosti častíc 40 – 63 μm . Ako mobilná fáza bol použitý metanol:chloroform 5:95 (v/v) s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej, pričom polarita mobilnej fázy bola v priebehu separácie

postupne zvyšovaná. Boli zbierané frakcie o objeme 125 ml a podobné frakcie boli spájané na základe TLC a HPLC.

Spájanie a analýza frakcií

Na tenkovrstvovú chromatografiu boli využívané analytické TLC platne o rozmeroch 20 × 20 cm s hrúbkou vrstvy silikagélu 200 µm a fluorescenčným indikátorom. Ako mobilná fáza bol využívaný metanol a chloroform v rôznych objemových pomeroch s prídavkom 0,1 % kyseliny mravčej. Na analytickú HPLC bol využívaný systém Agilent 1100 Series s detektorom DAD UV/Vis. Ako stacionárna fáza bola použitá kolóna Supelco Ascentis Express RP-Amide 10 cm × 2,1 mm s veľkosťou častíc 2,7 µm. Ako mobilná fáza bol použitý acetonitril a voda s prídavkom 0,2 % kyseliny mravčej.

Preparatívna HPLC

Na preparatívnu HPLC boli použité systémy Young Lin 9100 so zberačom frakcií, Dionex UltiMate 3000 so zberačom frakcií a Agilent 1100 Series s manuálnym odchyťovaním frakcií. Ako stacionárna fáza boli použité kolóny Supelco Ascentis RP-Amide 25 cm × 10 mm s veľkosťou častíc 5 µm a Supelco Ascentis C18 25 cm × 10 mm s veľkosťou častíc 5 µm. Ako mobilná fáza boli použité rôzne pomery acetonitrilu, resp. metanolu a vody s prídavkom 0,2 % kyseliny mravčej. Frakcie boli zbierané na základe odpovede UV-detektora (λ 254, 280 a 350 nm).

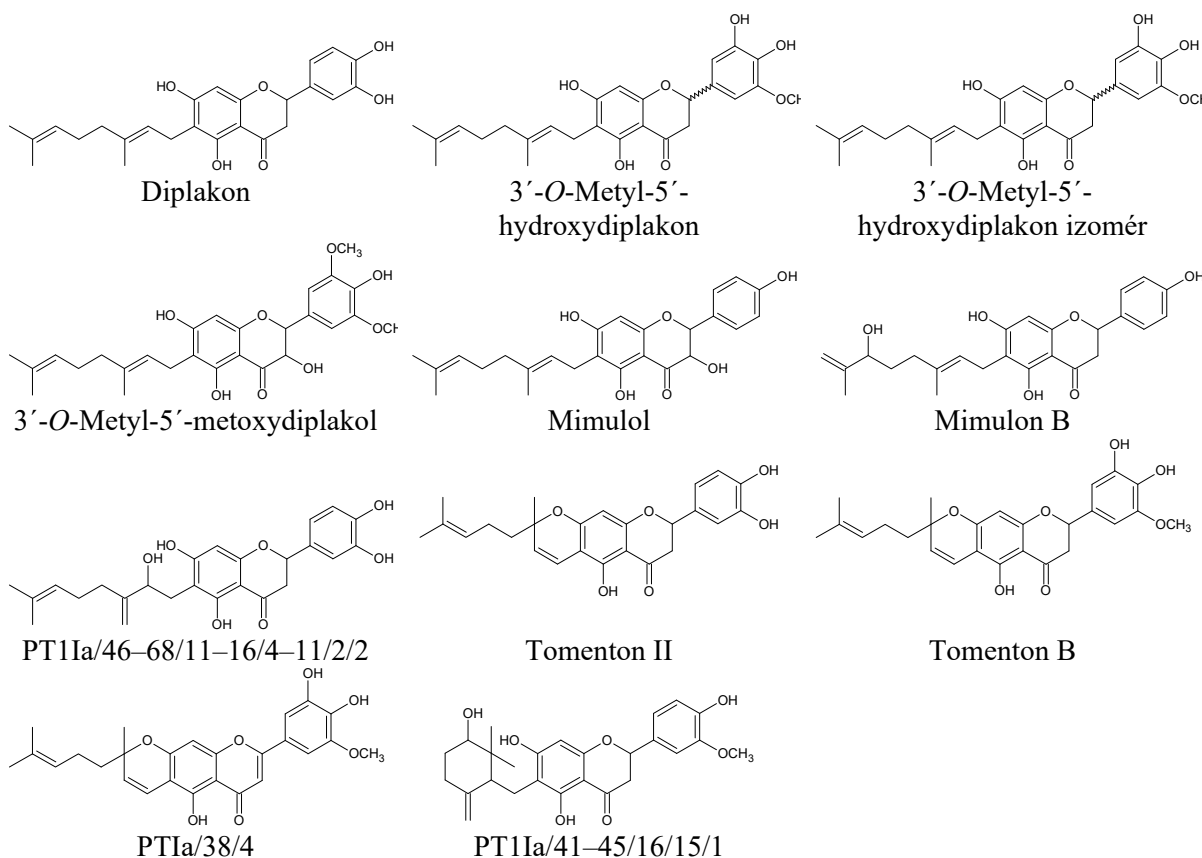
Testovanie antiproliferačnej a cytotoxickej aktivity

Pre hodnotenie antiproliferačnej a cytotoxickej aktivity *in vitro* bola zvolená nádorová línia ľudských monocytárnych leukemických buniek THP-1. Bunky boli kultivované v RPMI 1640 médiu obohatenom o 10 % fetálneho bovinného séra, antibiotika (100 U/ml penicilínu, 100 mg/ml streptomycínu) a 2 mmol/l L-glutamínu. Kultivácia buniek prebiehala v prostredí inkubátora s 5 % CO₂ v atmosfére pri 37 °C. Testované látky boli rozpustené v dimetylsulfoxide, jeho výsledná koncentrácia v rámci experimentov nepresiahla koncentráciu 0,1 %. Roztoky látok boli pripravované vždy nanovo pred každým experimentom. Efekt látok bol hodnotený v rozmedzí ich koncentrácií 1 – 30 µmol/l po 24-hodinovej inkubácii s uvedenou bunkovou líniou. Antiproliferačná aktivita izolovaných látok bola stanovená pomocou WST-1 analýzy. K tomuto hodnoteniu bol použitý WST-1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko) podľa postupu doporučeného výrobcom. Cytotoxický efekt testovaných látok bol hodnotený pomocou LDH analýzy, na čo bol použitý Cytotoxicity Detection Kit^{Plus} (LDH)

(Roche Diagnostics, Mannheim, Nemecko) podľa postupu doporučeného výrobcem. Uvedené výsledky sú priemerom minimálne troch nezávislých meraní prevedených v triplicáte. Získané dáta boli štatisticky hodnotené pomocou neparametrického one-way ANOVA testu v kombinácii s Dunnettovým testom na hladine významnosti $\alpha = 0,05$.

Výsledky

Zo separovaných frakcií z plodov *P. tomentosa* bola získaná séria čistých látok, ktorých štruktúra bola určená pomocou kombinácie identifikačných metód – UV, MS a NMR.



U izolovaných látok bol hodnotený antiproliferačný a cytotoxický efekt voči THP-1 bunkovej línii. V rámci tejto skupiny boli identifikované látky, ktoré v testovanom koncentračnom rozmedzí 1 – 30 $\mu\text{mol/l}$ po 24 hodinách inkubácie navodili inhibíciu metabolickej aktivity THP-1 buniek. Najsilnejší antiproliferačný efekt v tejto skupine vykazoval diplakon, $\text{IC}_{50} = 9,31 \pm 0,72 \mu\text{mol/l}$. V skupine testovaných látok boli v uvedenom rozmedzí koncentrácií stanovené hodnoty IC_{50} tiež pre nasledujúce látky: 3'-O-metyl-5'-hydroxydiplakon ($\text{IC}_{50} = 12,61 \pm 0,90 \mu\text{mol/l}$), tomenton II ($\text{IC}_{50} = 19,99 \pm 0,24 \mu\text{mol/l}$) a mimulon B ($\text{IC}_{50} = 16,43 \pm 0,59 \mu\text{mol/l}$) (Tabuľka 1). Súčasne bol po pôsobení týchto štyroch látok detegovaný tiež koncentračne závislý pokles bunkovej viability, pričom najsilnejší cytotoxický efekt vyvolala opäť látka diplakon, zatiaľ čo látka 3'-O-metyl-5'-hydroxydiplakon vykazovala z týchto štyroch látok

najširšie rozpätie medzi poklesom bunkovej proliferácie a viability. Látky štruktúrne príbuzné s vyššie uvedenými, konkrétne 3'-*O*-metyl-5'-hydroxydiplakon izomér, 3'-*O*-metyl-5'-hydroxydiplakon a tomenton B, navodili tiež pokles metabolickej aktivity THP-1 buniek, avšak s nižšou intenzitou v porovnaní so štruktúrne príbuznými látkami a hodnoty IC₅₀ pre nich neboli stanovené, pretože sú pravdepodobne vyššie než najvyššia testovaná koncentrácia 30 μmol/l. Podobne látky PTIIa/41–45/16/15/1, PTIIa/38/4, PTIIa/46–68/11–16/4–11/2/2 navodili koncentračne závislý pokles bunkovej proliferácie, avšak opäť bez dosiahnutia hodnôt IC₅₀. Látka mimulol ako jediná z tejto hodnotenej skupiny negatívne neovplyvnila proliferáciu THP-1 buniek v žiadnej z testovaných koncentrácií.

Tabuľka 1 Hodnoty IC₅₀ testovaných látok stanovené WST-1 analýzou po 24-hodinovej inkubácii s THP-1 bunkami

<i>Testovaná látka</i>	<i>IC₅₀ ± SD (μmol/l)</i>
<i>Diplakon</i>	9,31 ± 0,72
<i>3'-O-Metyl-5'-hydroxydiplakon</i>	12,61 ± 0,90
<i>3'-O-Metyl-5'-hydroxydiplakon izomér</i>	> 30
<i>3'-O-Metyl-5'-methoxydiplakon</i>	> 30
<i>Mimulol</i>	> 30
<i>Mimulon B</i>	16,43 ± 0,59
<i>PTIIa/46–68/11–16/4–11/2/2</i>	> 30
<i>Tomenton II</i>	19,99 ± 0,24
<i>Tomenton B</i>	> 30
<i>PTIIa/38/4</i>	> 30
<i>PTIIa/41–45/16/15/1</i>	> 30

Záver

Zo separovaných frakcií z plodov *P. tomentosa* bola získaná séria čistých látok, u ktorých bola zhodnotená antiproliferačná a cytotoxická aktivita voči nádorovej bunkovej línii THP-1. V rámci tejto série boli identifikované látky s vhodnými vlastnosťami pre ďalšie testovanie a bližšiu špecifikáciu ich potenciálneho cytotoxického, prípadne cytostatického pôsobenia. Diplakon bol identifikovaný ako látka s najsilnejším antiproliferačným a súčasne cytotoxickým pôsobením. Výsledky získané u látky 3'-*O*-metyl-5'-hydroxydiplakon potom môžu poukazovať na jeho potenciál cytostatickej aktivity.

Zoznam literatúry:

- [1] Schneiderová K, Šmejkal, K (2015) Phytochemical profile of *Paulownia tomentosa* (Thunb). Steud. Phytochem Rev 14: 799–833
- [2] Cheng CL, Jia XH, Xiao CM et al (2019) *Paulownia* C-geranylated flavonoids: their structural variety, biological activity and application prospects. Phytochem Rev 18: 549–570
- [3] Šmejkal K, Grycová L, Marek R et al (2007) C-Geranyl compounds from *Paulownia tomentosa* fruits. J Nat Prod 70: 1244–1248
- [4] Hanáková Z, Hošek J, Babula P et al (2015) C-Geranylated flavanones from *Paulownia tomentosa* fruits as potential anti-inflammatory compounds acting *via* inhibition of TNF- α production. J Nat Prod 78: 850–863
- [5] Šmejkal K, Svačinová J, Šlapetová T et al (2010) Cytotoxic activities of several geranyl substituted flavanones. J Nat Prod 73: 568–572
- [6] Kollár P, Bárta T, Závalová V et al (2011) Geranylated flavanone tomentodiplacone B inhibits proliferation of human monocytic leukaemia (THP-1) cells. Br J Pharmacol 162: 1534–1541

Tato práce bola financovaná grantom IGA VFU Brno 311/2019/FaF

Syntéza a biologické hodnocení substituovaných 5-hydroxy- γ -pyronů

Magdaléna Onuščáková, Michal Greguš, Pavel Bobál

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

Úvod

V posledních letech se pozornost odborné veřejnosti obrací k problematice antimikrobiální rezistence a to z důvodů rezistence některých bakterií vůči všem dostupným antibiotickým léčivům. Velká skupina mikroorganismů, které mají současně rezistenci na několik léčiv, jsou původci závažných akutních i chronických infekcí nejen v nemocničním prostředí, ale i v běžné populaci. Například meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) nebo vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE).¹ Proto je potřeba nacházet nové sloučeniny s baktericidním a bakteriostatickým účinkem, na které ještě mikroorganismy nevytvořili rezistenci. Vhodnou strukturou s potenciálním antibakteriálním a antimykotickým účinkem se jeví deriváty 5-hydroxy- γ -pyronů. Tyto látky jsou strukturálně odvozené od kyseliny kojové. Velkou pozornost si kyselina kojová a hlavně její deriváty zaslouží, kvůli vykazující antimikrobiální aktivitě vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*),² antimykotické aktivitě vůči kvasinkám (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*).¹ Rovněž byl zaznamenán antivirový účinek těchto struktur s cílovým působením na virovou RNA-dependentní RNA polymerázu (*Influenzavirus*).³ Kromě uvedených vlastností kyselina kojová a její deriváty vykazují vynikající chelatační schopnosti a tím je její struktura nositelem taktéž antineoplastické aktivity⁴. Konverzí pyronového kruhu na pyridinový kruh se zvýší zásaditost struktury a tím i vazba na kov. Právě kvůli výborné chelatační schopnosti mohou být tyto látky použity jako synthony v syntéze nových inhibitorů histondeacetylasy.

Materiál a metodika

V tomto projektu byla připravena série sloučenin, jejichž základní strukturální jednotkou je 5-hydroxy- γ -pyron. Výchozím substrátem pro syntézu celé této skupiny látek s potenciální antimikrobiální a antineoplastickou aktivitou byla komerčně dostupná kyselina kojová. Po ochránění kyselé hydroxyskupiny v poloze 5 několika chránícími skupinami (PG = Me, Bn, Ts)

byla modifikována struktura různou substitucí v poloze 2. Původně plánované použití lehce odchránitelné trimethylsilyl chránící (TMS) skupiny se ukázalo neperspektivní z důvodu opačné selektivity při jejím zavádění.

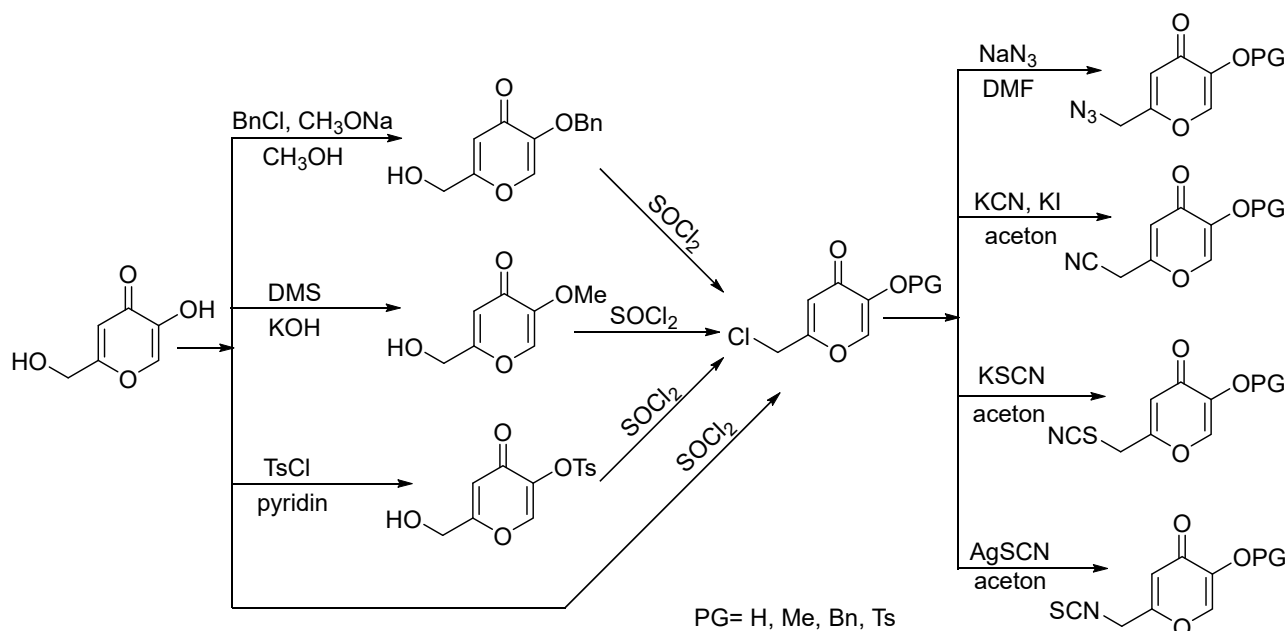
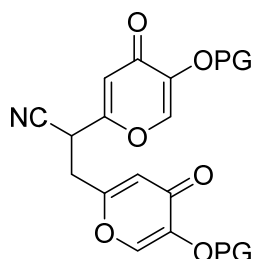


Schéma 1. První část syntézy

Z předchozích experimentů jsme také zjistili výrazný vliv chránící skupiny na reaktivitu substrátu. Po převedení hydroxylové, resp. hydroxymethylové skupiny (CH_2OH) v poloze 2 na dobře odstupující skupinu (halogen, OMs) jsme získali substrát vhodný pro nukleofilní substituci s anionty, jako jsou například pseudohalogenidy. (Schéma 1) Z literatury je známa antimikrobiální aktivita některých těchto derivátů. Při přípravě substituovaných 2-(5-hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)acetonitrilů jsme pozorovali také vznik produktu reakce těchto acetonitrilů s další molekulou chlormethyl derivátu. Struktura připraveného vedlejšího produktu byla potvrzena pomocí spektrálních metod. (Obr. 1)



Obr. 1. Struktura vznikajícího vedlejšího produktu.

Pro další modifikace připravených derivátů pseudohalogenidů byly úspěšně použity 1,3-dipolární cykloadiční reakce syntetizovaných organických azidů s deriváty propiolové

kyseliny. (Schéma 2) Tímto způsobem nazývaným také „click“ proces byly připraveny deriváty 1,2,3-triazolů ve vynikajících výtěžcích. Syntetizované isothiokyanáty budou v dalším kroku modifikovány na příslušné disubstituované thiomocoviny. Dalším plánem je záměna γ -pyronového kruhu za pyridinový, resp. dihydropyridinový kruh, kde získáme další sérii zkoumaných struktur, u kterých předpokládáme antimikrobiální a antineoplastický účinek.

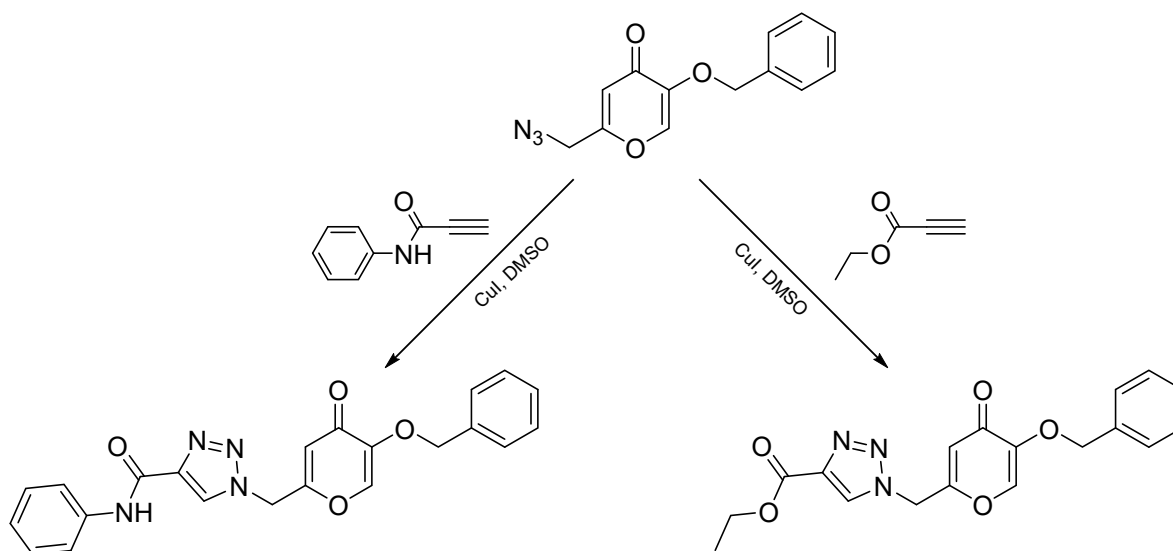


Schéma 2. Další modifikace derivátů pseudohalogenidů

Pro syntézu uvedené série látek byly použity jak klasické, tak moderní tzv. „click“ metodiky. Syntéza látek byla prováděná podle údajů dostupných v odborné literatuře s různými modifikacemi postupů nebo novými postupy vyvinutými v našich laboratořích. Kromě hodnocení antimikrobiální aktivity budou vybrané připravené struktury v tomto projektu dále použity k hodnocení těchto látek jako nových potenciálních inhibitorů histondeacetylas, které mají významný potenciál při léčbě nádorových onemocnění.

Výsledky

Cílem práce bylo připravit sérii látek, jejichž základní strukturní jednotkou je 5-hydroxy- γ -pyron. Byly vypracovány postupy přípravy těchto nových doposud nesyntetizovaných látek s potenciální antibakteriální, resp. antineoplastickou aktivitou. Byla vytvořena série zatím 30 látek s variací v polohách 2 a 5. Připravené nové a v literatuře nepopsané látky byly charakterizovány pomocí spektrálních metod (^1H a ^{13}C NMR, IČ, HRMS) a budou testovány na jejich antibakteriální aktivitu a poskytnuty na *in vitro* hodnocení jejich antineoplastické aktivity.

Seznam literatury:

- 1) Aytemir, M. D.; Özçelik, B., A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, (9), 4089-4095.
- 2) Xiaoli, L.; et al. Chitosan oligosaccharide-N-chlorokojic acid mannich base polymer as a potential antibacterial material. *Carbohydrate polymers* **2018**, 182, 225-234.
- 3) Credille, C. V.; Chen, Y.; Cohen, S. M., Fragment-Based Identification of Influenza Endonucleas Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 6444-6454.
- 4) Maier, S.M.; et. al., Identification of the Structural Determinants for Anticancer Activity of a Ruthenium Arene Peptide Conjugate. *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 9297-9307.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU č. 315/2019/FaF

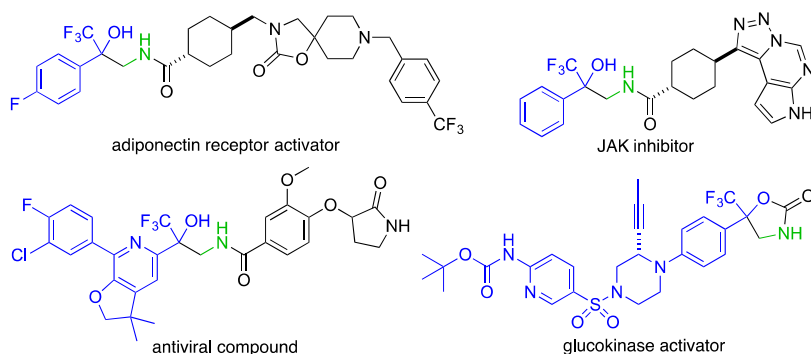
Vývoj organokatalyzované asymetrické Henryho reakce fluorketonů

Kristýna Šudomová, Kateřina Šenkeříková, Jan Otevřel

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

Úvod

Molekula fluoru se vyskytuje přibližně ve 20 % léčiv, která jsou v současné době na trhu a



zhruba ve 30 % chemických látek využívaných v zemědělství.^[1] Konkrétně CF₃ skupina se vyz-

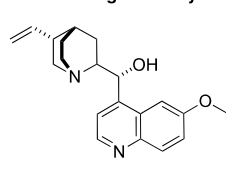
Obr. 1 Biologicky aktivní molekuly obsahující fragment připravitelný Henryho reakcí.

načuje elektronegativitou blíží se atomu chloru (3,2) a van der Waalsovým poloměrem podobným isopropylové skupině (2,2 Å), mimo to je značně metabolicky stabilní a lipofilní, čímž zlepšuje řadu farmakokinetických a farmakodynamických parametrů bioaktivních látek. Seskupení R-CH(NH₂)-CF₃ se jako bioisosterní náhrada amidické funkční skupiny využívá např. u molekul peptidomimetik.

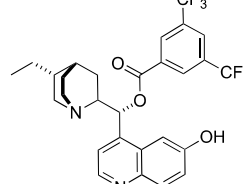
Difluoromethylová skupina je díky svému slabě kyselému charakteru dobrým donorem vodíkových vazeb. CHF₂ je bioisosterní alternativou alkoholické, thiolové, amidické nebo hydroxamové funkční skupiny.^[2]

je díky svému slabě kyselému charakteru dobrým donorem vodíkových vazeb. CHF₂ je bioisosterní alternativou alkoholické, thiolové, amidické nebo hydroxamové funkční skupiny.^[2]

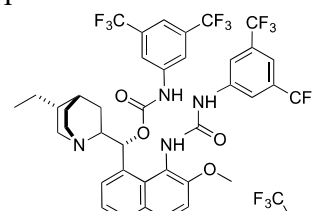
Available organocatalysts:



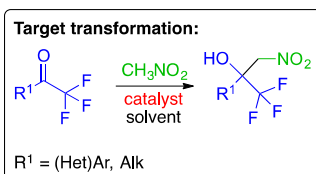
Matsumoto 2002
examples: 1
cat. loading: 20 mol%
solvent: MePh (1 bar)
reaction temp.: -78 °C
reaction time: 8 h
yields: 81%
ee: 21%



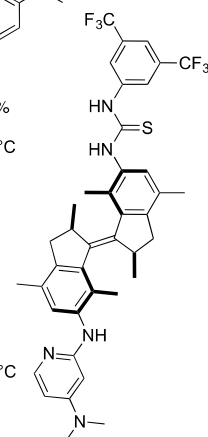
Bandini, Ronchi 2008
examples: 10
cat. loading: 5 mol%
solvent: DCM
reaction temp.: -25 °C
reaction time: 48 h
yields: 67–99%
ee: 76–99%



Connon 2010
examples: 9
cat. loading: 10 mol%
solvent: MTBE
reaction temp.: -30 °C
reaction time: 72 h
yields: 69–85%
ee: 82–96%



Feringa 2014
examples: 5
cat. loading: 5 mol%
solvent: MePh
reaction temp.: -25 °C
reaction time: 8 h
yields: 70–93%
ee: 14–72%



Obr. 2 Struktury popsaných organokatalyzátorů asymetrické Henryho reakce fluorketonů.

Chirální neracemické terciární alkoholy obsahující α -CF₃ nebo α -CHF₂ skupinu představují z hlediska medicínální chemie velmi zajímavé a slibné sloučeniny, které lze najít v řadě biologicky aktivních molekul.^[3]

Tyto látky se dají připravit redukcí aduktů získaných asymetrickou nitroaldolovou reakcí mezi fluorketonem a nitroalkanem. Obecně je však asymetrická syntéza takového kvarterního stereocentra poměrně náročná. Ketony jsou totiž oproti aldehydům v nitroaldolové reakci mnohem méně reaktivní, enantiodiskriminace bývá také nižší kvůli výrazné podobnosti substituentů na chirálním uhlíku a dále je reakce komplikovaná přítomností nekatalyzované nitroaldolové, retro-nitroaldolové reakce, dehydratace ad.^[4]

Z dostupných literárních údajů vyplynulo, že na počátku našeho projektu byly k dispozici pouze 4 organokatalyzátory pro nitroaldolovou reakci fluorketonů a nitromethanu a z tohoto počtu jen dva organokatalyzátory poskytovaly synteticky využitelnou enantioselektivitu (Obr. 2). Tři tyto katalyzátory obsahují velmi podobný skelet odvozený z cinchonidinu a ve všech čtyřech dříve zmíněných případech je pro průběh reakce s deklarovanou stereoselektivitou zapotřebí značně nízké reakční teploty, dlouhá reakční doba a relativně velká množství katalyzátoru (5–20 mol%). Množství testovaných substrátů v předchozích pracích bylo poměrně omezené a doposud také u žádné z organokatalyzovaných reakcí nebyla úspěšně zkoumána diastereoselektivita při použití vyššího nitroalkanu.^[4,5]

Materiál a metodika

Jelikož vývoj metodiky pro stereoselektivní aldolové reakce patří k našemu dlouhodobému výzkumnému záměru, disponujeme řadou potenciálních organokatalyzátorů ze skupiny donorů vodíkových vazeb, která zahrnuje homochirálních molekuly obsahující zejména močovinové, thiomčovinové a squaramidové funkční skupiny.^[6]

V pilotní fázi projektu byl proveden screening 18 thiomčovinových katalyzátorů na

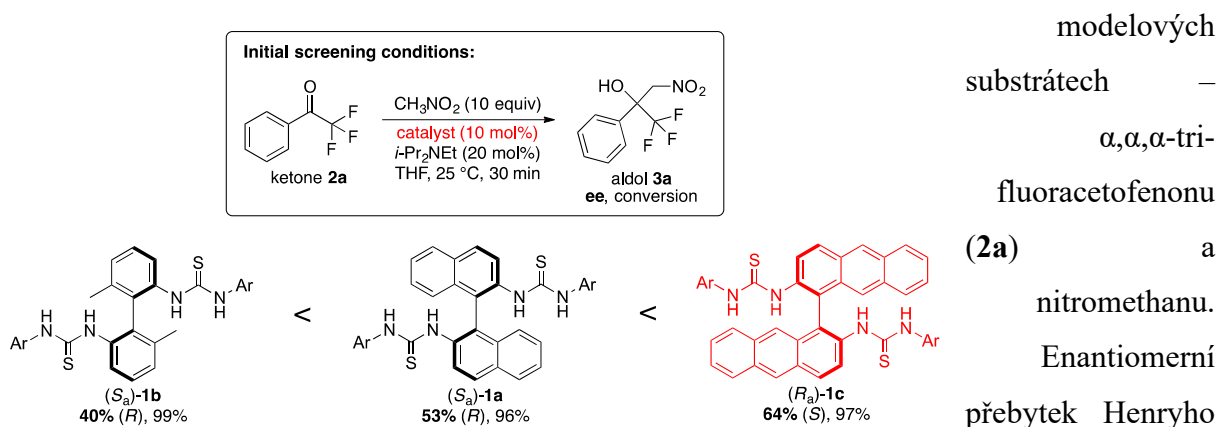
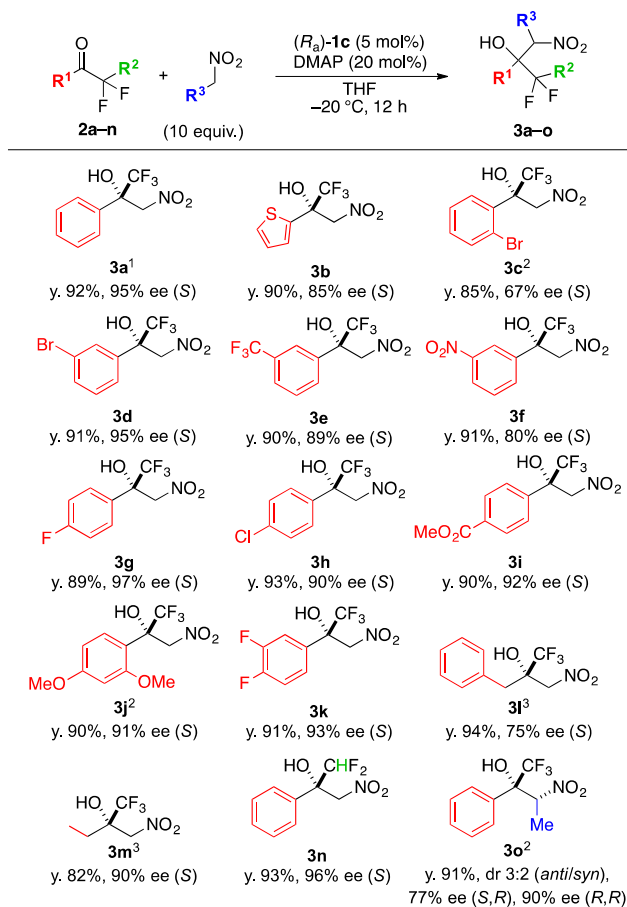


Schéma 1 Pilotní screening katalyzátorů se třemi neúčinnějšími strukturami.

stanoven pomocí HPLC s chirální stacionární fází. Z testovaných thiomocovin byly vybrány dvě nejslibnější struktury **1a** (53% ee) a **1b** (40% ee), které byly dále derivatizovány za účelem zvýšení enantiomerního přebytku. Bohužel, ani jedna z nových sloučenin nevykazovala lepší výsledky než **1a**. Na základě pozorování, že zvýšením počtu kondenzovaných aromatických jader v molekule katalyzátoru docházelo ke zvýšení ee produktu (**1b** vs. **1a**), byl syntetizován katalyzátor **1c** odvozený od 1,1'-bianthryl-2,2'-diaminu. Ten v modelové reakci vykazoval až 64% ee. Od tří neúčinnějších chirálních skeletů byly připraveny také odpovídající močoviny, čímž byl ověřen vliv kyselosti donoru vodíkových vazeb na enantioselektivitu reakce. Ani v jednom případě ale močoviny nevykazovaly lepší výsledky (30–43% ee), což je pravděpodobně zapříčiněno jejich nižší aciditou ve srovnání s analogickými thiomocovinami. V rámci zkoušení dalších typů donorů vodíkových vazeb byly připraveny z některých chirálních aminů i squaramidy. Tyto sloučeniny však poskytovaly pouze nízký nebo nulový enantiomerní přebytek a bis(squaramidy) z atropoizomerních biarylů vzhledem k jejich velmi nízké rozpustnosti ve standardních organických rozpouštědlech nebylo možné použít v katalytických experimentech ani dostatečně charakterizovat jejich strukturu pomocí NMR a HRMS. Po nalezení nejvhodnějšího katalyzátoru, thiomocoviny **1c**, byla realizována série experimentů zaměřená na optimalizaci reakčních podmínek.

Výsledky

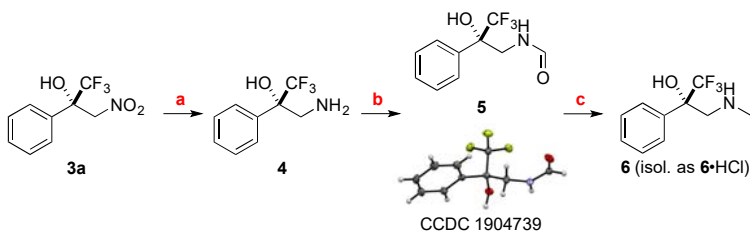


Notes: reported yields are of isolated products obtained after the full conversion of starting material; ee values were analyzed by HPLC with CSP; dr ratios were determined by ¹H and ¹⁹F NMR; ¹y. 81% at the 1.5 mmol scale; ²reaction performed at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h; ³reaction performed at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ for 12 h.

Tab. 1 Substrátová selektivita asymetrické Henryho reakce.

podářilo uskutečnit organokatalyzovanou diastereoselektivní adici nitroethanu na α,α,α -trifluoroacetofenon. Úplná konverze výchozích látek nastala za 24 h, produkt **3o** byl izolován jako směs *anti*- a *syn*-izomeru v poměru 3 : 2, *anti*-adukt vykazoval 77% ee a *syn*-adukt dokonce 90% ee.

Robustnost vyvinuté metodiky enantioselektivní organokatalyzované Henryho reakce byla



Reagents and conditions: a) H₂ (15 psi), 10% Pd(OH)₂/C, MeOH, rt, 3 h, y. 86%; b) AcOCHO, THF, 0 °C to rt, 12 h, y. 63%; c) 60% SMEAH in MePh, MePh, rt, 48 h, y. 56%.

Schéma 2 Katalytická asymetrická syntéza analogu halostachinu.

V rámci další části práce bylo provedeno hodnocení enantioselektivity reakce na různých substrátech. Bylo syntetizováno celkem 15 opticky obohacených Henryho aduktů. Nejlepších hodnot enantiomerního přebytku bylo dosaženo u substrátů bez substituce aromatického jádra nebo substituovaných v *para*-poloze. Produkty **3b** a **3g** byly získány s nejvyšším dosud zaznamenaným enantiomerním přebytkem u organokatalyzované reakce. Nitroaldoly **3a**, **3e**, **3h**, **3m** a také látka **3n** obsahující skupinu $-\text{CHF}_2$ vykazovaly optickou čistotu srovnatelnou s nejlepšími literárními výsledky, avšak k úplné konverzi reakce došlo v našem případě ve 4krát až 6krát kratším čase, což představuje významné vylepšení. Hranici 90% ee překročily také adukty **3i**, **3k**, *meta*-substituovaný **3d** a také vysoce donorně substituovaný **3j**. Vůbec poprvé se také

ověřena čtyřstupňovou syntézou CF₃ analogu protoalkaloidu (*S*)-halostachinu vycházející z 1,5 mmol α,α,α -trifluoroacetofenonu. Celkový výtěžek syntézy činil 25 % a produkt (*S*)-**6** byl izolován jako

hydrochlorid. Poslední část projektu se týkala studia závislosti enantiomerního přebytku katalyzátoru na enantiomerním přebytku produktu, přičemž se podařilo prokázat lineární závislost, která svědčí pro to, že je aktivní formou katalyzátoru monomer.^[7]

Na tomto místě bychom chtěli poděkovat Davidu Švestkovi a Pavlu Bobál'ovi, za pomoc na projektu.

Seznam literatury:

[1] Müller, K.; Faeh, C; Diederich, F. *Science* 2007, 317, 1881. [2] (a) Kirsch, P. *Modern Fluoroorganic Chemistry: Synthesis Reactivity, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 2013; (b) Ojima, I. *Fluorine in Medicinal Chemistry and Chemical Biology*, Wiley-Blackwell, Chichester, 2009; (c) Begu, J.- P.; Bonnet-Delpon, D. *Bioorganic and Medicinal Chemistry of Fluorine*, Wiley-VCH, Hoboken, 2008. [3] Např. (a) Nakano, S. et al. (Nissan Chemical Industries) Patent WO 2011142359, 2011; *Chem. Abstr.* 2011, 155, 683703; (b) Hayashi, K. et al. (Nissan Chemical Industries) Patent WO 2013024895, 2013; *Chem. Abstr.* 2013, 158, 359769; (c) Wang, G. et al. (Alios BioPharma) Patent WO 2015026792, 2015; *Chem. Abstr.* 2015, 162, 388124. (d) Nishimura, N. et al. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 3094. [4] Bandini, M.; Sinisi, R.; Umani-Ronchi, A. *Chem. Commun.* 2008, 4360. [5] (a) Misumi, Y.; Bulman, R. A.; Matsumoto, K. *Heterocycles*. 2002, 56, 599; (b) Palacio, C.; Connon, S. *J. Org. Lett.* 2011, 13, 1298; (c) Vlatkovic, M. et al. *Chem. Commun.* 2014, 50, 7773. [6] a) J. Otevrel, P. Bobal, *Synthesis* **2017**, 49, 593–603; b) J. Otevrel, P. Bobal, *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 8342–8358. [7] J. Otevrel, D. Svestka, P. Bobal, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17, 5244–5248.

Tato práce byla financovaná grantem IGA č. 301/2019/FaF

Rychlá metoda stanovení isomaltulosity vedle glukosy a sacharosy pomocí hydrofilní interakční kapalinové chromatografie (HILIC) s detektorem ELSD

Jiří Pazourek, Tomáš Crha

Ústav chemických léčiv, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Isomaltulosa, (6-*O*- α -*D*-glucopyranosyl-*D*-fruktofuranosa), známá také pod názvem Palatinosa, se skládá z glukosy a fruktosy spojených α -1,6-glykosidickou vazbou na rozdíl od sacharosy, kde je glukosa a fruktosa spojena přes α -1,2-glykosidickou vazbu. Jako sladidlo je v Japonsku používána od roku 1985 [1]. V porovnání se sacharosou je isomaltulosa déle trávena, nepůsobí nepříznivě na zuby, má 40-50% sladícího účinku a je to prebiotikum [2]. Dnes je Palatinosa již na trhu k dostání v mléčných výrobcích, ale i jako náhrada sacharosy v cukrovinkách, v poslední době i dalších produktech speciální výživy (energetické potraviny a nápoje zdravé výživy). Isomaltulosa má nižší glykemický index, dlouhotrvající účinnost. Isomaltulosa je tedy vhodnou alternativou pro diabetiky a pacienty s pre-diabetickými dispozicemi. Nedávno byl u isomaltulosity *in vivo* prokázáno snížení glykemie [3], což otvírá nové možnosti medicínského použití.

Materiál a metodika

Vycházeli jsme ze zkušeností [4], proto byla využita kolona Penta HILIC (AMT), Dionex a výparný detektor rozptylu světla a zachován průtok 2,0 ml/min.

Většina experimentů při optimalizaci metody se prováděla se směsí glukosa-isomaltulosa-sacharosa o koncentraci 1 mg/ml (každý analyt), příp. s nástřikem dalších individuálních polyolů. Kritické vždy bylo rozlišení obou disacharidových isomerů sacharosy a isomaltulosity.

Byly postupně optimalizovány tyto parametry:

Složení mobilní fáze (MF): acetonitril + 5-30%(v/v) vody (isokratická eluce).

Byly testovány tři různé teploty MF (10/25/40°C) a zjištěno, že nejvyšší rozlišení bylo dosaženo při nejnižší teplotě 10°C, která byla používána dále. Protože však absolutní plochy píku analytů byly malé (pravděpodobně kvůli adsorpci sacharidů při nízké iontové síle mobilní fáze), byla zaměněna voda v MF za mravenčanový pufr pH=3,75, jehož koncentrace byla testována v rozmezí 10-50 mM (isokratická eluce).

Kvůli následní aplikaci této metody na reálné vzorky, aby nedocházelo k zanášení kolony oligosacharidy, které se běžně vyskytují v potravinových doplncích, byl po isokratické separaci monosacharidů a disacharidů (18% mravenčanového pufru/82% acetonitrilu) aplikována gradientová eluce (zvýšen obsah pufru na 30%), aby se z kolony eluovaly maltodextriny.

Výsledky

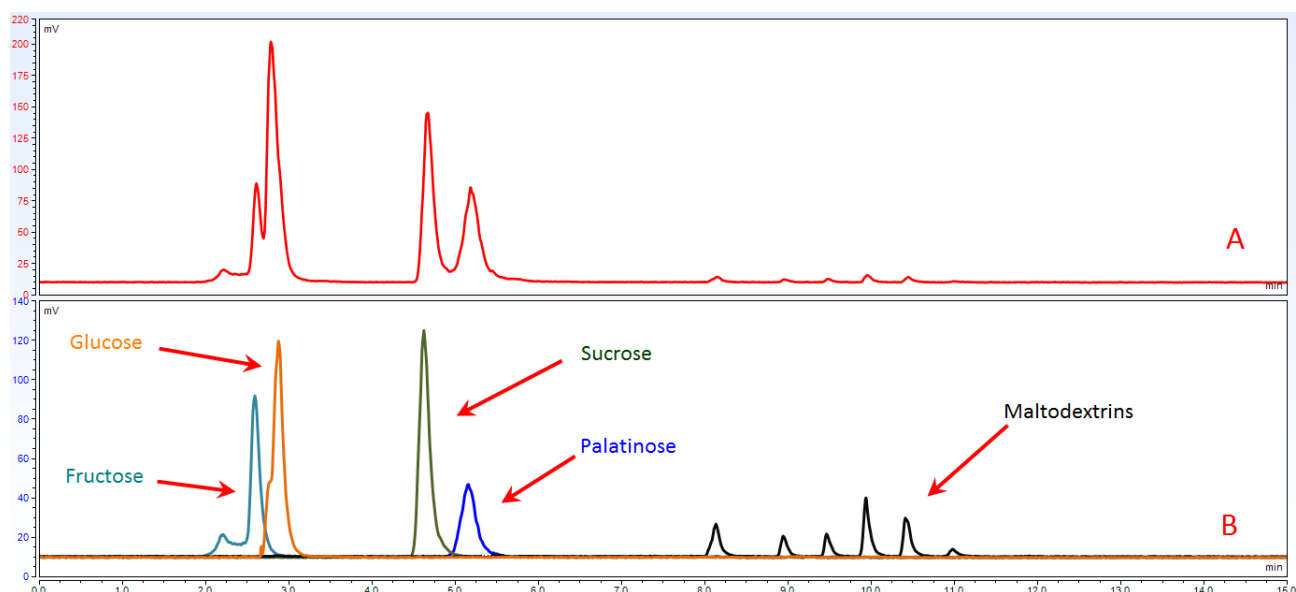
Optimální podmínky separace: Kolona HALO Penta-HILIC 4.6 x 150 mm, 2.7 μ m, mobilní fáze 35 mM mravenčan amonný pH=3,75 + acetonitril, průtok MF 2,0 ml/min, teplota MF 10°C, dávkovaný objem 4 μ l.

Parametry ELSD: gain 1, smooth 10, teploty evaporator 40°C, nebulizer 40°C, průtok dusíku 1 slm

Byly stanoveny základní validační parametry metody pro kalibrační rozsah isomaltulose 0,75-2 mg/ml. Krátkodobá opakovatelnost: retenční čas RSD= 0,2%, kalibrační plocha píku RSD=1,1%; dlouhodobá opakovatelnost: retenční čas RSD=0,3%, kalibrační plochy píku RSD=2,4%,

Výtěžnost (matrice Carbo snack, Nutrend, CZ): 97,7-103,8%, LOD: 0,01 mg/ml.

Separace analytů (monosacharidy a disacharidy – individuálně a ve směsi) za optimalizovaných podmínek je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1. Separace analytů (monosacharidy a disacharidy – individuálně a ve směsi) za optimalizovaných podmínek (viz text).

Tabulka 1. Výsledky stanovení isomaltulose (Palatinose) ve vzorcích speciální výživy

Sample	ENDURO snack gel flavour Green apple	ENDURO snack gel flavour Apricot	MANA Unflavoured	BABYDREAM Früchte Tee	EXPRESS Energy Gel
Determined isomaltulose	22,611 g / 75 g pack	24.045 g / 75 g pack	7.093 g / 330 mL	92.83 % of content	4217 mg / 80 g pack
Declared content	-	-	-	93.7 % of content	4000 mg / 80 g pack

Isomaltulosa ve vzorcích speciální výživy byla stanovena ve shodě s deklarovanou hodnotou. Tam, kde výrobci přímo neudávali množství tohoto cukru, spadaly stanovené hodnoty do deklarovaných údajů, např. celkových sacharidů.

Závěr

Celková doba analýzy reálných vzorků byla 18 minut, takže vzhledem ke komplexnosti matrice lze vyvinutou metodu považovat za rychlou. Tato metoda může proto být aplikována pro stanovení obsahu cukrů v potravinových doplňcích v tzv. zdravé výživě, jejíž sortiment se v současné době prudce rozšiřuje; příp. aplikaci pro stanovení isomaltulose jako potenciálního léčiva.

Seznam literatury:

1. T. Nakakuki, Development of functional oligosaccharides in Japan, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 15 (2003) 57-64.
2. S. Shyam, A. Ramadas, S.K. Chang, Isomaltulose: Recent evidence for health benefits, Journal of Functional Food., 48 (2018) 173-178.
3. D. Hwang, H.R. Park, S.J. Lee, H.W. Kim, J.H. Kim, K.S. Shin, Oral administration of palatinose vs sucrose improves hyperglycemia in normal C57BL/6J mice, Nutrition Research, 59 (2018) 44-52.
4. Pazourek J., Determination of glucosamine and monitoring of its mutarotation by hydrophilic interaction liquid chromatography with evaporative light scattering detector. Biomedical Chromatography, 32(2018):e4368. doi:10.1002/bmc.4368

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 317/2019/FaF

Studium vlivu ligandů a pH prostředí na interakci nádorového supresoru p53 s guaninovými kvadruplexy

Marek Petr¹, Barbora Krsková¹

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹*

Úvod

Jedny z dnes nejstudovanějších nekanonických struktur nukleových kyselin jsou guaninové kvadruplexy, které jsou tvořeny G-kvartety, planárními uspořádáními guaninů spojených vodíkovými můstky. Sekvence tvořící velmi stabilní kvadruplexy *in vitro* se nachází v genomech různých druhů virů, bakterií, rostlin i živočichů. U eukaryot se tyto sekvence často nachází v telomerních oblastech nebo v regulačních místech genů. Stále je objeveno mnoho látek, přírodních i syntetických, které fungují jako ligandy specifické pro kvadruplexy, a tudíž by mohly být využity jako nové léčiva ovlivňující biologické procesy spojené s tvorbou kvadruplexů. Funkce alternativních struktur nukleových kyselin se předpokládá mimo jiné při procesech rekombinace DNA a regulace exprese genů na úrovni transkripce a translace.

Mezi proteiny interagující s kvadruplexy patří např. helikázy asociované s dědičnými chorobami nebo tvorbou nádorů. Další skupinou proteinů jsou transkripční faktory, např. rodina proteinů p53. Nádorový supresor p53 reguluje expresi svých cílových genů, které dále zprostředkovávají odpověď buňky pomocí zastavení buněčného cyklu a spuštění oprav DNA nebo apoptózy. Protein p53 se váže specificky na konsenzní sekvence DNA, mimo to rozpoznává mnoho jiných sekundárních struktur DNA, mezi které patří i guaninové kvadruplexy. Byla popsána interakce p53 s kvadruplexy telomerní sekvence, kde byl ukázán vliv struktury kvadruplexu v různém prostředí a délky telomerní repetice na tuto interakci (1). Vazba proteinu p53 na paralelní kvadruplex promotoru genu *MYC* byla zkoumána jako jeden z možných molekulárních mechanismů jeho regulace (2).

Materiál a metodika

V této práci byly studovány DNA-proteinové interakce pomocí gelové retardační analýzy za použití fluorescenčně značených oligonukleotidů a rekombinantních proteinů p53. Rekombinantní protein p53 byl exprimován v bakteriálních buňkách *E. coli* a purifikován pomocí afinitní chromatografie (1, 2). Struktura vybraných oligonukleotidů byla analyzována

pomocí CD spektroskopie v prostředí pufru 5 mM Tris-HCl pH 7,6 s přídavky 0 – 100 mM KCl. Fluorescenčně značené oligonukleotidy byly před vazebními experimenty inkubovány 5 min při 95 °C v prostředí 5 mM Tris-HCl (pH 6,4; 7,6 nebo 8,0), poté byl přidán KCl do výsledné koncentrace 100 mM a vzorky byly ponechány samovolně vychladnout na 25 °C. Ligandy guaninových kvadruplexů byly přidány k oligonukleotidům v molárním poměru ligand:DNA 5:1 nebo 10:1. Protein p53 byl inkubován s fluorescenčně značenými oligonukleotidy (1 pmol) ve vazebném pufru o složení 5 mM Tris-HCl pH 7,6; 0,01% Triton X-100; 50 mM KCl; 0,5 mM EDTA; 0,5 mM DTT. Gelová retardační analýza byla provedena v 6% polyakrylamidovém gelu v pufru 0,5× TBE s přídavkem 50 mM KCl.

Výsledky

Nejprve byla zkoumána vazba proteinu p53 na různé strukturní typy guaninových kvadruplexů (paralelní, hybridní, antiparalelní) a tato vazba byla srovnávána se sekvenčně specifickou vazbou. Byly vybrány sekvence z promotorových oblastí genů (např. MYC, EGFR, KRT14, BTG2, HRAS), lidské telomerní sekvence nebo LTR elementu viru HIV-1. Pomocí CD spektroskopie byla analyzována struktura vybraných oligonukleotidů, u kterých nebyla struktura v prostředí s draselnými kationty předem známá. Sekvence z promotorů genů MYC, EGFR, KRT14 a BTG2 tvoří paralelní typy kvadruplexů, zatímco oligonukleotid lidské telomerní sekvence a sekvence LTR elementu viru HIV-1 tvoří hybridní typy kvadruplexů. Byly použity dvě různé sekvence z promotoru genu HRAS, z nichž jedna tvoří paralelní a druhá antiparalelní typ kvadruplexu.

Byl testován vliv přítomnosti ligandů kvadruplexů (TMPyP4, pyridostatin, karboxypyridostatin, BRACO-19, berberin, NMM) na interakci proteinu p53 s kvadruplexy. V přítomnosti ligandu TMPyP4 byla pozorována inhibice vazby proteinu p53 ke kvadruplexům i vazby na specifickou konsenzní sekvenci p53CON. V případě ligandů pyridostatinu, karboxypyridostatinu, BRACO-19, berberinu a NMM nedocházelo za zvolených podmínek k inhibici vazby proteinu p53 ke konsenzní sekvenci. V přítomnosti pyridostatinu byla pozorována inhibice vazby proteinu p53 k paralelním kvadruplexům z promotorů genů MYC, KRT14, BTG2 a hybridnímu kvadruplexu z LTR elementu viru HIV-1.

Ve druhé části práce byl zkoumán vliv pH prostředí na interakci p53 ke guaninovým kvadruplexům. Byly zvoleny tři různé podmínky vazebného prostředí s pH 6,4; 7,6 nebo 8,0. Pro tuto část projektu byly použity DNA oligonukleotidy tvořené různými strukturami guaninových kvadruplexů uzavřenými v rámci dvouřetězcové DNA, které více simulují

prostředí uvnitř buněk. Byly vybrány sekvence modelových paralelních a antiparalelních kvadruplexů (LOCK-P a LOCK-AP), sekvence z promotoru genu MYC tvořící paralelní kvadruplex (LOCK-Pu22) a její komplementární sekvence (LOCK-Py22). Za zvolených podmínek nebyl pozorován vliv pH na selektivitu vazby proteinu p53 mezi jednotlivými kvadruplexy. Při nižším pH (6,4) byla pozorována zvýšená celková vazebná aktivita proteinu p53 ke studovaným oligonukleotidům oproti podmínkám s vyšším pH (7,6 nebo 8,0).

Výsledky získané v této práci by měly pomoci k lepšímu pochopení molekulárních interakcí proteinu p53 s guaninovými kvadruplexy nebo jinými strukturami DNA či RNA, u kterých se předpokládá význam při regulaci exprese cílových genů jak standardního proteinu p53, tak jeho mutantních forem, které jsou často přítomny v nádorových buňkách (3).

Seznam literatury:

1. ADÁMIK, MATEJ, KEJNOVSKÁ, IVA, BAŽANTOVÁ, PAVLA, PETR, MAREK, RENČIUK, DANIEL, VORLÍČKOVÁ, MICHAELA A BRÁZDOVÁ, MARIE. P53 BINDS HUMAN TELOMERIC G-QUADRUPLEX IN VITRO. *BIOCHIMIE*. 2016, **128-129**, 83-91.
2. PETR, MAREK, HELMA, ROBERT, POLÁŠKOVÁ, ALENA, KREJČÍ, ANETA, DVOŘÁKOVÁ, ZUZANA, KEJNOVSKÁ, IVA, NAVRÁTILOVÁ, LUCIE, ADÁMIK, MATEJ, VORLÍČKOVÁ, MICHAELA A BRÁZDOVÁ, MARIE. WILD-TYPE P53 BINDS TO MYC PROMOTER G-QUADRUPLEX. *BIOSCIENCE REPORTS*. 2016, **36(5)**, E00397.
3. HELMA, Robert, BAŽANTOVÁ, Pavla, PETR, Marek, ADÁMIK, Matej, RENČIUK, Daniel, TICHÝ, Vlastimil, PASTUCHOVÁ, Alena, SOLDÁNOVÁ, Zuzana, PEČINKA, Petr, BOWATER, Richard, FOJTA, Miroslav a BRÁZDOVÁ, Marie. p53 Binds Preferentially to Non-B DNA Structures Formed by the Pyrimidine-Rich Strands of GAA.TTC Trinucleotide Repeats Associated with Friedreich's Ataxia. *Molecules*. 2019, **24(11)**, 2078.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 319/2019/FaF

Kombinované kolagenové matrice pro terapii ran a účely kosmetické dermatologie

Kateřina Tenorová, Ruta Masteiková, Josef Příkryl

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

Úvod

Kolagen je rozšířen v celé říši živých organismů. Představuje 25 – 30 % všech bílkovin v těle – tvoří hlavní organickou složku kůže, kostí, chrupavek, šlach a vaziva [1]. Jako základní složka extracelulární matrice (ECM) úzce interaguje s buňkami, čímž ovlivňuje jejich schopnost migrovat, proliferovat, diferencovat a přežít [2]. Jedná se o materiál bezpečný, biokompatibilní a biologicky odbouratelný. Kolagen je výborným materiálem pro hojení ran, a to nejen z důvodu přirozené afinity k buňkám a ECM, ale též pro schopnost absorbovat exsudát rány, potlačovat činnost matricových metaloproteináz a udržovat požadované mikroprostředí v ráně [3]. Další oblastí, kde se začíná uplatňovat, je kosmetická dermatologie. Bylo prokázáno, že aplikace kolagenových masek před/po aplikaci takových procedur jako je mikrodermoabrazé, mikro Jehličky, frakční laser apod. výrazně snižuje následné zarudnutí, otoky a urychluje regeneraci [4], a proto jsou takové výrobky na trhu značně žádané. V současné době je kolagen, jako prostředek pro terapii ran, používán převážně v podobě polštářků (lyofilizát). Filmové kolagenové krytí se na trhu téměř nevyskytuje, přitom má řadu pozitivních vlastností – je schopno ránu chránit, hydratovat, vytvářet optimální prostředí pro hojení, dodávat účinné látky a současně umožňuje kontrolu stavu bez odstranění z rány. Určitou nevýhodou kolagenu ve filmové podobě jsou zhoršené mechanické a manipulační vlastnosti ve vlhkém stavu [5]. Zlepšit pevnost a odolnost kolagenu lze zesílením [1], což se obvykle provádí u implantabilních aplikací, kde je zapotřebí též zpomalit degradovatelnost/resorbovatelnost. U krátkodobých aplikací to však nutné není, navíc účinná síťující činidla nejsou většinou fyziologicky indiferentní. Technologicky jednodušším a levnějším řešením by mohla být inkorporace zpevňující vrstvy/složky [5]. Takové řešení by navíc umožnilo připravit libovolně velké filmy s nižší vrstvou kolagenu, což by se pozitivně projevilo v cenové rovině, jelikož kolagen je poměrně drahá surovina. Takové kombinované kolagenové filmy by mohly být účinným prostředkem pro krytí velkoplošných ran, např. při popáleninách a po inkorporaci aktivních látek sloužit pro podporu hojení a regenerace, ať už v terapii ran, nebo v oblasti kosmetické dermatologie.

Proto cílem tohoto projektu byla formulace, příprava a hodnocení složených kolagenových matic tvořených kombinací kolagenu a látek/materiálů, jež měly za cíl poskytnout těmto

přípravkům lepší aplikační vlastnosti. Byly hodnoceny různé druhy kolagenu, vliv pomocných látek i technologických proměnných na finální vlastnosti produktu.

Materiál a metodika

Kombinované kolagenové matrice filmového charakteru byly připraveny metodou odpaření rozpouštědla. Jako základ byl použit kolagen bovinního, prasečího a koňského původu (Collado, s.r.o., Brno) v kombinaci s látkami/materiály poskytujícími lepší vlastnosti výsledných přípravků především ve vlhkém stavu. Byly připraveny a hodnoceny následující varianty:

1. kombinace kolagenového gelu a karboxymethylcelulosy v disperzi pro odlévání
2. kombinace kolagenového gelu a kyselé formy karboxymethylcelulosy v textilní podobě
3. kombinace kolagenového gelu a PES mřížky Sanatyl
4. kombinace kolagenového gelu a netkané textilie pro kosmetické účely (pleťové masky)
5. kombinace kolagenového gelu a karboxymethylcelulosy ve dvouvrstvých filmech.

K přípravě disperze sloužila sodná sůl karboxymethylcelulosy (NaCMC) v podobě netkané textilie se stupněm substituce (DS) 0,398 – 0,519 (Holzbecher, spol. s. r. o. Zlín). Dále byla použita kyselá forma CMC v podobě netkané textilie, PES mřížka Sanatyl (Tylex Letovice a. s.) a masky z netkané textilie (MedHelp, s.r.o.). Ostatní pomocné látky byly farmaceutické kvality. Účinné látky farmaceutické a kosmetické kvality byly pořízeny od různých dodavatelů. Všechny výše zmíněné varianty měly společný nosný technologický krok a to tvorbu kolagenové disperze. Bylo zjištěno, že optimální složení této disperze představuje 1 % kolagenu a množství změkčovadla v poměru ke kolagenu 1:1 až 1:1,5. Jako změkčovadla byla použita makrogol 300 a glycerol 85%.

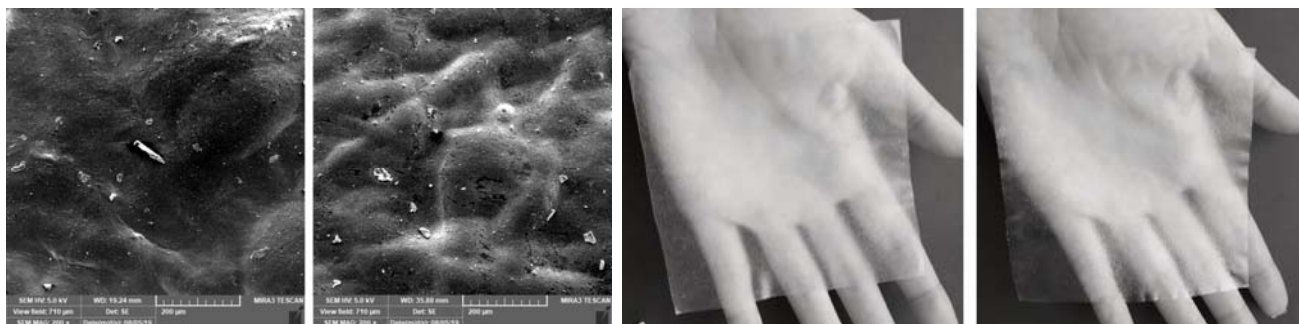
Připravené matrice byly podrobeny hodnocení. Organoleptické vlastnosti se hodnotily nejenom u finálních produktů, ale i u disperzí k odlévání (kolagen, karboxymethylcelulosa). Fyzikálně-chemické vlastnosti výsledných přípravků byly hodnoceny především z hlediska aplikace na ránu a pokožku, a to bobtnavost, povrchové pH, změny povrchového pH v čase po aplikaci na model rány, mechanické vlastnosti (pevnost v tahu, práce, deformace) a tloušťka v suchém i vlhkém stavu. U většiny přípravků byla hodnocena i hmotnostní stejnoměrnost. U vybraných přípravků byla zkoumána mikroskopická struktura pomocí elektronového mikroskopu a s použitím z projektu pořízené jednoúčelové sondy Corneometer se hodnotila schopnost hydratovat pokožku *in vivo*.

Výsledky

Metoda odpaření rozpouštědla je vhodná pro přípravu všech 5 výše uvedených typů směsných kolagenových matic filmového charakteru. Všechny zkoumané druhy kolagenu – koňský, prasečí i bovinní – lze vyhodnotit jako vhodné pro potencionální účely terapie ran i kosmetické dermatologie. Do vyvíjených produktů je možno zapracovat aktivní látky, neboť disperze pro odlévání filmů byly s většinou zkoumaných potenciálních účinných látek kompatibilní. Organoleptické hodnocení všech připravených variant filmů/produktů prokázalo jejich homogenitu, pevnost a soudržnost a to i po navlhčení. Všechny vzniklé varianty měly vhodné vlastnosti z hlediska aplikace na ránu či kůži. Jelikož rozsah tohoto příspěvku neumožňuje detailněji popsat všechny zkoumané varianty, uvádíme výsledky varianty 5, které jsou již připraveny k publikaci ve vědeckém časopisu.

Kombinace kolagenového gelu a karboxymethylcelulosy ve dvouvrstvých filmech

Filmy se odlévaly na plastové Petriho misky o rozměrech 12x12 cm. Množství disperze na misku vycházelo z předchozích zkušeností. První vrstvu těchto filmů tvořila 1% na pH 3 okyselená disperze karboxymethylcelulosy (57 g CMC nebo 45 CMC g) a druhou disperze kolagenu (vždy 45 g). Obě dvě vrstvy se vytvářely postupně, tj. po odlití a usušení první vrstvy se na ni nalila a usušila druhá. Jednotlivé filmy se lišily druhem použitého kolagenu (bovinní nebo koňský) a změkčovadlem (glycerol 85% nebo makrogol 300). Disperze byly homogenizovány pomocí přístroje Cito-Unguator 2000 (Sophis a.s., Česká republika). Celkem bylo připraveno 8 typů dvouvrstvých filmů. Všechny připravené filmy měly vhodné organoleptické vlastnosti (obr. 1 napravo). Mikroskopické hodnocení prokázalo, že pod vrchní vrstvou kolagenu jsou patrné obrysy mikrofibrilárních vláken částečně substituované CMC ve spodní vrstvě (obr. 1 nalevo). Právě přítomnost těchto mikrofibrilárních vláken poskytuje připraveným filmům lepší mechanické vlastnosti ve vlhkém stavu.



Obr. 1: Napravo – vzhled připravených filmů – zleva doprava film z bovinního kolagenu a koňského kolagenu, nalevo – mikroskopický vzhled filmů při 200 násobném přiblížení – zleva doprava film z bovinního kolagenu a

koňského – vrchní vrstvu tvoří kolagen, pod ním jsou patrné obrysy mikrofibrilárních vláken částečně substituované CMC ve spodní vrstvě

Filmy dosahovaly hodnot stupně nasákavosti (g/g) v čase v rozmezí 2,0 – 4,5 (dle hmotnosti odlité disperze, typu změkčovadla), což lze považovat za nasákavost optimální pro filmová krytí, neboť se v tomto případě vysoké hodnoty nasákavosti neočekávají, důležité je zajištění vlhkého prostředí, které vytváří příznivé podmínky pro hojení rány. Nasákavější byly filmy z bovinního kolagenu. U filmů bylo hodnoceno povrchové pH po navlhčení kapkou vody a změny povrchového pH v čase. Nasákavost a změny povrchového pH v čase se hodnotily s použitím umělého modelu rány obsahujícího fyziologický tlumivý roztok o pH 7,2 blízkého svým složením exsudátu rány. Po navlhčení měly filmy hodnoty povrchového pH v rozmezí 2,3 – 2,8. Povrchové pH filmů v čase bylo i po 8 hodinách na modelu rány zachováno v kyselé oblasti (dosáhlo hodnot max. 4,11), což značí schopnost krytí pH v ráně modulovat a přispívat tak k rychlejšímu hojení. V případě mechanických vlastností filmů hodnocených jak v suchém, tak i ve vlhkém stavu můžeme konstatovat, že se po navlhčení u všech filmů snížily hodnoty síly nutné k přetržení vzorku i práce při tom vykonané, avšak hodnoty deformace zůstaly téměř ve všech případech zachovány. Tato skutečnost značí dobrou manipulaci, soudržnost a flexibilitu filmů i po navlhčení.

Závěr

Bylo prokázáno, že metodou odpaření rozpouštědla lze připravit všech 5 variant kombinovaných kolagenových matric pro terapii ran a účely kosmetické dermatologie. Byla stanovena optimální koncentrace a poměry kolagenu, změkčovadel a dalších látek. Připravené produkty vyhovovaly organoleptickému i fyzikálně-chemickému hodnocení z hlediska aplikace na ránu nebo pokožku. Důležitou vlastností je i schopnost těchto prostředků hydratovat kůži, což je v případě jejich zamýšlené aplikace pro hojení ran a regeneraci kůže, žádoucí.

Seznam literatury:

1. Peterková, P., Lapčík, L. Kolagen – vlastnosti, modifikace a aplikace. Chem. Listy, 2000, 94, 371-379.
2. Yang, C. et al. Application of recombinant human collagen in tissue engineering. Tissue Eng., 2004, 18 (2), 103-119.
3. Rangaraj, A., Harding, K., Leaper, D. Role of collagen in wound management. Wounds UK, 2014, 7 (2), 54-63.

4. Van Aardt, R. Use of occlusive, collagen gel masks as an adjunctive to aesthetic medical skin treatments: a split-face case study. Beauty Wire Magazine, 2016, 34-37. <https://collagenveil.com/wp-content/uploads/2016/09/Dr-Renier-van-Aardt-Collagen-Mask-Study-Final.pdf>

5. Wang, W. et al. Fabrication and characterization of microfibrillated cellulose and collagen composite films. J. Bioresources Bioprod., 2016, 1 (4), 162-168.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 304/2019/FAF

Testování nepřímého antioxidačního potenciálu rostlinných fenolických látek aktivací systému Nrf2/ARE v buněčných kulturách

Jakub Treml¹, Petra Herczegová²

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie, Farmaceutická fakulta,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Stilbenoidy jsou skupinou rostlinných sekundárních metabolitů patřících do široké skupiny rostlinných fenolických látek. Jedním z nejznámějších stilbenů je *trans-resveratrol*, jemuž jsou připisovány antioxidační, protizánětlivé, imunomodulační účinky. Zároveň jsou stilbeny pravděpodobně zodpovědné za tzv. francouzský paradox [1].

Cílem toho projektu bylo stanovení nepřímé antioxidační aktivity stilbenů již izolovaných na ÚPL, konkrétně na jejich vliv na aktivaci systému Nrf2/ARE v buněčné kultuře HepG2. A dále jejich vliv na expresi antioxidačních enzymů (např. kataláza, superoxid dismutáza 1 a 2, glutathion peroxidáza 1, hemoxygenáza) v buněčné kultuře THP-1, což je následný krok po aktivaci Nrf2/ARE.

Materiál a metodika

Testované látky

Pro testování byly zvoleny tyto přírodní stilbeny: *trans-resveratrol* (1), *pinostilben* (2), *thunalben* (3), *piceatannol* (4), *piceatannol-3'-O-β-glucopyranosid* (5), *batatasin III* (6), *pinostilbenosid* (7), *1-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-ethanon* (10), *3,5-dimethoxystilben* (11), *pterostilben* (15), *pinosylvin monomethyl ether* (17), and *isorhapontigenin* (18). Dále syntetické *trans-stilben* (12), *cis-stilben* (13), *4-stilbenekarboxylová kyselina* (14), *trans-α-methylstilben* (16), a *2,4,3',5'-tetramethoxystilben* (19). Dále látky *2-karboxyl-3-O-methyl-4'-β-D-glucopyranosyl-dihydroresveratrol* (8) a *3-O-caffeoyl-(9→5)β-apiosyl-(1→6)-β-glucopyranosyl-5,3'-O-dimethyldihydropiceatannol* (9) byly poskytnuty od Dr. Sebastiana Granicy (Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland), který je izoloval z rostliny *Tragopogon tommasinii* Sch.Bip. (Asteraceae, Cichorieae).

Buněčné linie

Lidské monocyty THP-1 a THP-1-XBlue-MD2-CD14

Měření antioxidační aktivity

Suspenze buněk THP-1 v médiu RPMI 1640 bez séra v koncentraci 500 000 buněk/ml byla rozdělena na do 96-jamkové mikrotitrační destičky (100 μ l na jamku). Buňky byly inkubovány po dobu 2 hodin při 37°C v atmosféře 5% CO₂, aby se aklimatizovaly, a byly přidány testované stilbeny o finální koncentraci 2 μ M. Jako referenční sloučenina byl použit kvercetin, spolu s negativní kontrolou – DMSO, což bylo rozpouštědlo stilbenů. Po tomto postupu následovala 1 h inkubace. Roztok pyocyaninu (jako pozitivní kontrola) byl poté přidán do všech jamek po této době a inkubace následovala dalších 30 minut. Poté byl přidán roztok DCFH-DA a po 30 minutách v krátkodobém experimentu nebo 24 hodinách při dlouhodobé expozici byla měřena fluorescence (excitace při 485 nm; emise při 538 nm) pomocí spektrofotometru FluoStar Omega (BMG Labtech).

Aktivace systému Nrf2-ARE

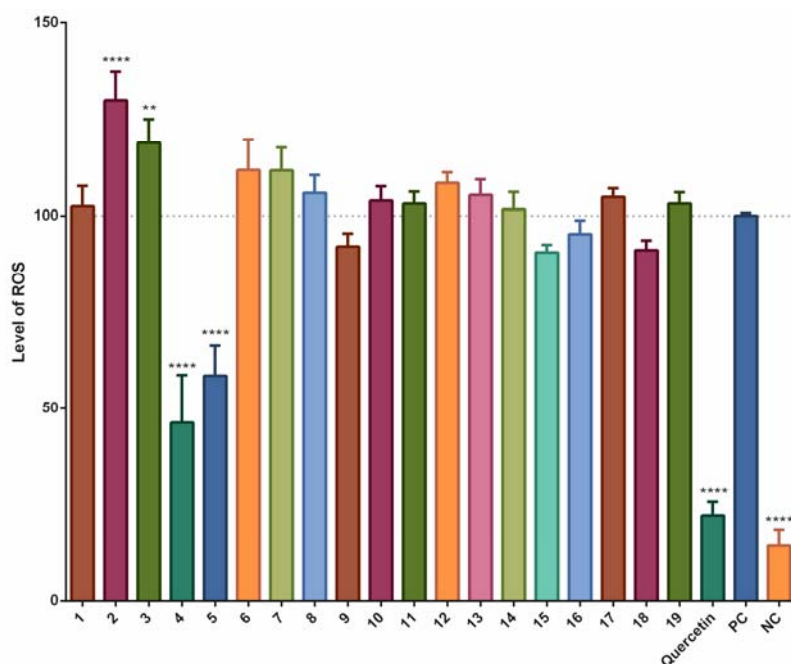
Vliv testovaných sloučenin na aktivitu Nrf2 byl odhadnut s použitím reportérového kitu ARE (BPS Bioscience, USA). Buňky HepG2 byly přechodně transfekovány po dobu 24 hodin (35 000 buněk / jamka v 96-jamkových destičkách) s ARE luciferázovým reportérovým vektorem (fire-fly luciferáza) a konstitutivně exprimovaným vektorem (Renilla luciferáza) za použití TransFast kitu (Promega, USA). Poté byly buňky inkubovány po dobu 24 hodin s testovanými látkami v koncentraci 2 μ M rozpuštěné v DMSO (netoxická koncentrace). Jako pozitivní kontrolu pro tento experiment jsme použili DL-sulforaphan (Sigma Aldrich) v koncentraci 10 μ M (v DMSO). Luciferázová aktivita z buněčných lyzátů byla detekována pomocí duálního luciferázového reportérového kitu (Promega, USA) a spektrofotometru. Data byla normalizována na luminiscenci Renilla.

Proteinová exprese antioxidačních enzymů

Účinek testovaných sloučenin na proteinovou expresi antioxidačních enzymů byl pozorován v buňkách THP-1. Buňky byly inkubovány ve formě monocytů (1 000 000 buněk/ml) ve 3 ml RPMI 1640 média 6 hodin v přítomnosti testovaných látek v koncentraci 2 μ M. Po ukončení experimentu byly buňky lyzovány a rozděleny pomocí polyakrylamidové elektroforézy a množství proteinů bylo detekováno pomocí Western blotu a specifických protilátek.

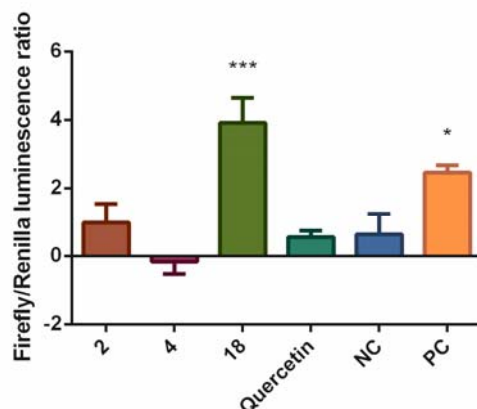
Výsledky

Výsledkem bylo nejprve stanovení přímé antioxidační aktivity testovaných látek pomocí 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetátu (DCFH-DA) a pyocyyaninu, který vyvolával oxidační stres v buňkách THP-1. Z tohoto prvního screeningu vyšly jako nejvíce aktivní látky **2**, **4** a **18**. Látka 2 prokázala nejvíce pro-oxidační účinek, látka 4 byla nejsilnějším antioxidantem a látka 18 v 24 hodinovém experimentu také působila antioxidačně. Všechny testované látky byly rozpuštěny v DMSO a byly testovány v netoxické koncentraci 2 μ M.



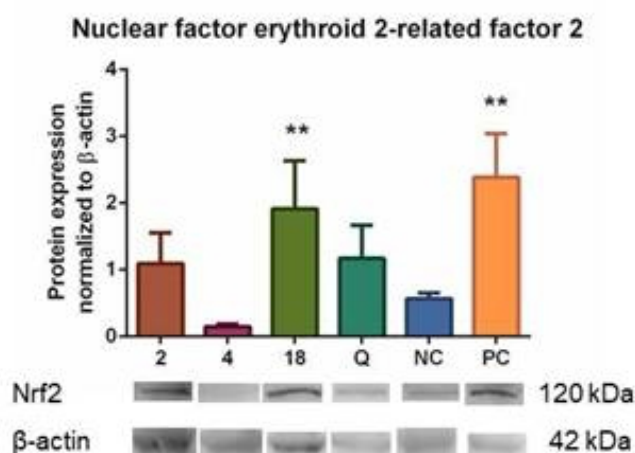
Obr. 1 – Antioxidační a pro-oxidační efekt stilbenů po 1 h inkubaci s pyocyyaninem (100 μ M); pyocyyanin je pozitivní kontrola (PC) a DMSO samotné je negativní kontrola (NC). ** = $p < 0.01$; **** = $p < 0.0001$.

Testované látky (2, 4 a 18) byly dále podrobeny testování na aktivaci systému Nrf2/ARE v buněčné kultuře HepG2. V tomto experimentu nejvyšší aktivitu prokázala látka 18, dokonce více aktivovala Nrf2 než pozitivní kontrola DL-sulforaphan (10 μ M).



Obr. 2 – Efekt stilbenů 2, 4 a 18 na aktivaci Nrf2-ARE systému. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$

Dále sledován vliv testovaných látek (2, 4 a 18) na expresi antioxidantních enzymů (kataláza, superoxid dismutáza 1 a 2, glutathion peroxidáza 1, hemoxygenáza) a dále proteinu Nrf2. V tomto experimentu látka 18 signifikantně zvýšila expresi proteinu Nrf2:



Z uvedeného vyplývá, že pinostilben (2) má pro-oxidační efekt a snižuje antioxidantní připravenost buněk THP-1 (nižší exprese katalázy). Piceatannol (4) působí pouze přímým antioxidantním zhášením radikálů bez vlivu na Nrf2 kaskádu. A isorhapontigenin (18) působí pouze slabě antioxidantně, zato aktivuje Nrf2-ARE systém a zvyšuje expresi Nrf2 a katalázy.

Seznam literatury:

[1] Leláková, V.; Šmejkal, K.; Jakubczyk, K.; Veselý, O.; Landa, P.; Václavík, J.; Bobál, P.; Pížová, H.; Temml, V.; Steinacher, T.; Schuster, D.; Granica, S.; Hanáková, Z.; Hošek, J. Parallel in vitro and in silico investigations into anti-inflammatory effects of non-prenylated stilbenoids. *Food Chem.* 2019, 285, 431-440. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.128

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 308/2019/FaF

Nové potenciální antibakteriální léčiva a stanovení jejich aktivity vůči gram-pozitivním bakteriím

Peter Zubáč¹, Oldřich Farsa¹, Marcela Nejezchlebová²,

Veronika Ballayová¹, Kateřina Krystýnková²

Ústav chemických léčiv¹,

Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie²,

Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Celosvětově prudce rostoucí rezistence bakterií vůči antibiotikům a antimikrobiálním chemoterapeutikům se ukázala jako velmi těžce zvládnutelný problém. Navíc je velmi dobře známá a to nejenom odborné veřejnosti z oblasti humánní a veterinární medicíny, farmacie a dalších zdravotnických odvětví, ale dostala se i do povědomí široké veřejnosti. Jak uvádí popřední světový časopis v této oblasti, *The Lancet Infectious Diseases* (IF₂₀₁₈ = 27,516), farmaceutický výzkum a vývoj selhal naplnit potřeby kliniků na nová antibiotika. Specifickou oblastí v tomto směru zůstává i výzkum nových antituberkulotik, na což opakovaně upozorňovala a upozorňuje i SZO (Strategie DOTS, 1995 – 2005 a Strategie Stop TB, 2006–2015).[1]

Po důkladné evaluaci možností bylo cílem našeho farmakochemicko-mikrobiologického týmu ne pouze zjišťování a upozorňování na přítomnost této rezistence, ale rovnou vývoj nových potenciálních antibakteriálních léčiv a stanovení jejich aktivity primárně vůči gram-pozitivním bakteriím. Byly vybrány dvě strukturální řady: první představuje thiosemikarbazony bazických 4-acylaminoacetofenonů, strukturální předlohou zde byli dvě léčiva – thioacetazon a perchlozon; druhou tvoří deriváty (2-substituovaných) fenothiazinů s bazicky substituovanými (amino)acyly, zejména s bazickou částí tvořenou thiomorfolinem, zde byly předlohou neuroleptické fenothiaziny, které vykazali výraznou antituberkulotickou aktivitu – zejména thioridazin a chlorpromazin.[2]

Materiály

K synthese byly použity komerčně dostupné chemikálie tříd čistoty *purum* a *pro analysi*. Část chemikálií byla již k dispozici (v držení Ústavu chemických léčiv, dále jen ÚChL), větší část však byla zakoupena výhradně pro účely projektu, a to zejména od společností Merck™ (i pod značkou Sigma-Aldrich™) a Acros Organics™. Použitá rozpouštědla od spol. Lach-Ner™

byla užita přímo, nebo byla upravena sušením *ex tempore* za použití standardních metodik sušení rozpouštědel.

Pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (dále jen MIC) byli použity sbírkové bakteriální kultury (kmeny) CCM (Czech Collection of Microorganisms = Česká sbírka mikroorganismů), dodávané v lyofilizovaném stavu. Dále pak média pro kultivaci mikroorganismů (od společnosti Merck™), 96-jamkové mikrotitrační destičky s rovným dnem a ostatní spotřební plasty. Ke zpracování dat byl použit software Omega – Data Analysis™ a tabulkový procesor Microsoft™ Excel™.

Metodika

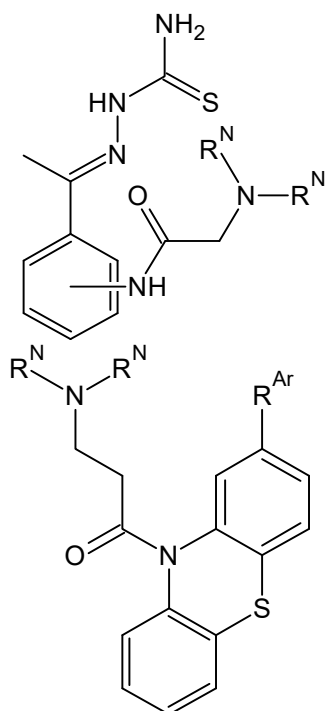
Látky první strukturální řady byly syntetizovány z jednotlivých polohových izomerů aminoacetofenonu. Po převedení na chloracylderiváty působením příslušných chloracylchloridů s použitím metodiky, vyvinuté během řešení projektu IGA č. 304/2018/FaF byly substituovány různými sekundárními aminy (acyklickými i heterocyklickými). Takto vzniklé bazické acetofenony poskytovali reakci s thiosemikarbazidem příslušné thiosemikarbazony. Obdobně se postupovalo i v případě 2. strukturální řady, jenom reakce s thiosemikarbazidem byla vypuštěna. Ze vzniklých bází byly v případě nutnosti připraveny soli, a to zejména hydrochloridy a soli vhodných organických karboxylových kyselin.

U všech látek (kde to bylo možné) byla stanovena teplota tání kapilárním bodotávkem Büchi™ 520 a provedena TLC na deskách Merck™ 60 F₂₅₄ (detekce UV zářením při 254 nm nebo vizualizace párami jodu). Strukturální charakterizace byla provedena IČ spektrometrií na přístroji Nicolet™ Impact FTIR, ¹H- a ¹³C-NMR spektra byla získána na NMR spektrometru Jeol™ JNM-ECZ400R s pracovní frekvencí 400 MHz pro ¹H.

Stanovení MIC se provádělo v mikrotitračních destičkách pomocí modifikované metody dle EUCAST.[3] Testovaly se koncentrace 512 µg/ml, 256 µg/ml, 128 µg/ml, 64 µg/ml a 32 µg/ml, každé ředění po čtyřech opakováních (tzn. 4 látky na jedné destičce). Výsledný růst/inhibice mikroorganismů byl odečítán spektrofotometricky ze zákalu a takto získaná data byla softwarově zpracována do tabulkové podoby.

Výsledky

Připravené látky první strukturní řady odpovídají uvedenému obecnému vzorci:



R^N = ethyl, n-propyl, n-butyl nebo tvoří součást těchto heterocyklů: pyrrolidin, piperidin, azepan, morfolin, thiomorfolin

Připravené látky druhé strukturní řady odpovídají uvedenému obecnému vzorci:

R^{Ar} = H, Cl, COCH₃, SCH₃

R^N = pyrrolidin, piperidin, azepan, morfolin, thiomorfolin

U látek 1. strukturní řady se povedlo získat hodnoty MIC v rozmezí 256 až 32 $\mu\text{g/ml}$, přičemž tyto se výrazně mění v závislosti od testovaného mikroorganismu a bazické a polohové substituce na benzenovém jádru použité látky. Látky 2. strukturní série přinesli smíšené výsledky, které ještě musí být správně interpretovány.

Závěry

Zatím bylo celkem připraveno více než 28 strukturně originálních sloučenin v rámci obou strukturních řad. Antibakteriálně nejúčinnější se ukazuje být látka IGA312-I-VB3 (chemicky N-(4-(1-(2-karbamothioylhydrazono)ethyl)fenyl)-2-(piperidin-1-yl)acetamid) se selektivním účinkem na mikrokoky a *Mycobacterium smegmatis*. U látek 2. strukturní řady probíhá opakování stanovení MIC, aby se potvrdily předešlé výsledky, které byly velmi nadějně. Není pochyb, že další strukturní optimalizace přinese do budoucna antibakteriálně účinnější látky, dosahující svými MIC možná i na hodnoty klinicky používaných antibiotik, resp. antituberkulotik.

Seznam literatury:

[1] TACCONELLI, Evelina, Elena CARRARA, Alessia SAVOLDI, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018, **18**(3), 318-327. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3. ISSN 14733099. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309917307533>

[2] AMARAL, Leonard a Miguel VIVEIROS. Thioridazine: A Non-Antibiotic Drug Highly Effective, in Combination with First Line Anti-Tuberculosis Drugs, against Any Form of Antibiotic Resistance of Mycobacterium tuberculosis Due to Its Multi-Mechanisms of Action. *Antibiotics*. 2017, **6**(1). DOI: 10.3390/antibiotics6010003. ISSN 2079-6382.

Dostupné také z: <http://www.mdpi.com/2079-6382/6/1/3>

[3] MIC determination of non-fastidious and fastidious organisms. *EUCAST* [online]. [cit. 2019-11-25]. Dostupné z: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 312/2019/FaF

Editovali:	<p>doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. prof. MVDr. Jirí Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM doc. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. doc. PharmDr. Jan Gajdziok, Ph.D. doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.</p>
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	203
Vydání:	První
Vydavatel:	<p>Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2019</p>

ISBN 978-80-7305-830-2