

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

BRNO 2015

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2015

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2015 financovaných z prostředků účelové podpory
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2015

Editovali:

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

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

Prof. Ing. Eva Straková, Ph.D.

Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.

Prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc.

Doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2015

ISBN 978-80-7305-766-4

Vážené kolegyně / Vážení kolegové

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

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

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

Děkuji všem

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

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

předsedkyně IGA komise VFU

OBSAH

Příspěvky FVL

Studium vylučování viru PRRS trusem v korelaci s IgA protilátkovou odpovědí.....	2
Exprese a funkce FZD6 v odontogenezi.....	6
Optimální protokol injekční anestezie u ocasatých obojživelníků s použitím alfaxalonu.....	9
Použití kontrastní ultrasonografie a počítačové tomografie k vyšetření jater u zdravých želv.....	12
Studium vlivu sepse na rozvoj diseminované intravaskulární koagulace a funkci ledvin.....	15
Role virového a hostitelského genomu ve vnímavosti koní k infekci gamaherpesviru.....	20
Bakterie produkující beta-laktamázy širokého spektra u koní v ČR – analýza rizik a vyplývající preventivní opatření.....	24
Kvantifikace humeroulnární inkongruity loketních kloubů psů pomocí počítačové tomografie.....	29
Imunogenetická analýza vnímavosti k morbillivirové infekci u kytovců.....	32
Měření úhlu tibiálního plató na rentgenových snímcích a na sagitálních reformátech počítačové tomografie kolenního kloubu u psů.....	37
Využití endoskopie v diagnostice zánětlivých změn bachorové sliznice způsobené subakutní bachorovou acidózou.....	40
Zhodnocení účinnosti a bezpečnosti injekční aplikace selenopyranu u odstávčat.....	43
Diagnostika akutních bakteriálních mastitid prasníc po porodu.....	47
Metabolický profil a změny vnitřního prostředí u telat narozených císařským řezem a ztíženým porodem.....	53
Acidobazická rovnováha neonatálních telat před a po napití kolostra.....	56
Srovnání spolehlivosti vyvolání chemické ejakulace u hřebců koně (<i>Equus caballus</i>) a osla (<i>Equus asinus</i>).....	59
Hodnocení vlivu parazitárních infekcí na gastrointestinální mikrobiotu volně žijících goril nížinných.....	63

Příspěvky FVHE

Detekce aktuálních způsobů falšování medu.....	68
Vliv pasteračních teplot na inaktivaci stafylokokových enterotoxinů typu A, B, C v mléce.....	72
Využití lupinových semen v dietách určených pro výkrm brojlerových kuřat.....	76
Charakteristika meticilin-rezistentních <i>Staphylococcus aureus</i> izolovaných z potravinového řetězce v České republice.....	80
Plazmidově kódovaná rezistence k cefalosporinům a fluorochinolonům u izolátů <i>Escherichia coli</i> z vrány americké.....	84
Zoonotické bakteriální patogeny v klišťatech <i>Hyalomma aegyptium</i>	88
Vliv léčebných koupelí v roztoku formaldehydu a NaCl na ryby se zaměřením na imunitní systém.....	91
Účinky vybraných léčiv kontaminujících povrchové vody na raná vývojová stádia ryb.....	95
Detekce hrachové bílkoviny v masných výrobcích mikroskopickými metodami.....	99
Aktivace vrozené imunitní odpovědi netopýrů na infekci plísní <i>Pseudogymnoascus destructans</i> ..	103
Vliv kyseliny šťavelové na roztoče <i>Varroa destructor</i> a na jeho hostitele včelu medonosnou.....	106
Stanovení akutního toxického účinku imidaclopridu a permetrinu pro buněčné linie netopýra velkého <i>Myotis myotis</i>	110
Akumulace rtuti ve tkáních kormorána velkého (<i>Phalacrocorax carbo</i>).....	113
Porovnanie efektivity identifikácie pôvodcu vírusovej hemoragickej septikémie pomocou real-time RT-PCR a RT-PCR na terénnych izolátoch z Českej republiky.....	117
Referenční hodnoty biochemických a hematologických parametrů krve u netopýra velkého (<i>Myotis myotis</i>).....	121
Diverzita a evoluce plazmidů u bakterií produkujících karbapenemázy z racků australských.....	125
Sledování vývoje proliferativního onemocnění ledvin v podmínkách intenzivního chovu lososovitých ryb s využitím imunohistochemické diagnostiky.....	129
Hodnocení účinků tonalidu na vybrané druhy ryb s důrazem na posouzení endokrinní disrupce...133	
Vyhodnocení vlivu fluorochinolonu enrofloxacinu na genovou expresi a na parametry oxidativního stresu u dania pruhovaného (<i>Danio rerio</i>).....	137

Příspěvky FaF

Účinek nanočástic oxidu zinočnatého na modelové halofyty rodu <i>Salicornia</i>	142
Hodnocení derivátů alaptidu jako potencionálních modifikátorů transdermální penetrace.....	147
Využití vícerozměrné analýzy dat ve farmaceutické technologii.....	151
Syntéza a studium karbamátových derivátů naftalenkarboxanilidů.....	155
Syntéza 1,3,5-triazinů s novými piperazinovými strukturálními motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „Zelené chemie“.....	158
Protiinvazivní aktivita nových antimikrobiálních chemoterapeutik.....	162
Závislost <i>per os</i> dávky tacrolimu na genotypu příjemce štěpu srdečního transplantátu.....	165
<i>In vitro</i> analýza antiproliferačních účinků nových inhibitorů tyrozinkinázy se zaměřením na buněčný cyklus.....	169
Syntéza a studium biologických vlastností polysubstituovaných hydroxynaftanilidů.....	173
Biologické hodnocení vlivu modifikovaných karboxymethylcelulóзовých materiálů na hojení ran u laboratorních potkanů s navozeným <i>diabetes mellitus</i>	177
Imobilizace homochirálních bis(thiomočovinných) organokatalyzátorů a jejich aplikace u asymetrické Henryho reakce	181
Příprava a hodnocení heteroarylkarbonyloxyaminopropanolů a jejich kvarterních amoniových derivátů - látek s potenciální biologickou aktivitou.....	184
Příprava mukoadhezivních částic na bázi biokompatibilních polymerů s biologickým účinkem proti vaginálním patogenům.....	188
Izolace prenylovaných sloučenin s potenciální antiflogistickou aktivitou z kůry kořene <i>Morus alba</i>	192
Zlepšovanie predikcie biodostupnosti pomocou biorelevantnej disolúcie a <i>in vitro</i> – <i>in vivo</i> korelácií	196
Vliv cudraflavonu B na expresi a aktivitu zánětlivých markerů u experimentálního modelu kolitidy potkana.....	200
Příprava a hodnocení matricových orálních filmů jako potenciálních nosičů léčiv	205

Příspěvky

Fakulty veterinárního lékařství

Studium vylučování viru PRRS trusem v korelaci s IgA protilátkovou odpovědí

Dobromila Molinková^{1,2}, Vendula Kleinová¹, Petra Kuchařová¹, Jitka Frölichová¹, Vladimír Celer^{1,2}

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

Úvod

Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV), patřící mezi RNA viry z čeledi *Arteriviridae*, způsobuje reprodukční problémy (potraty v pozdním stádiu březosti, předčasné porody, nevyrovnané vrhy) a respirační onemocnění u mladých prasat (zvýšená teplota, pneumonie) (Conzelmann a kol., 1993; Hopper a kol., 1992; White, 1992). Virus je přenášen především aerogenní cestou nebo vertikálně infikovaným semenem (Rossow a kol., 1995). Nedávno byl virus PRRS prokázán také v trusu selat (Song a kol., 2012). Cílem této práce bylo sledování vylučování viru PRRS trusem a detekce IgA protilátek v trusu u experimentálně infikovaných prasat a prasat vakcinovaných inaktivovanými a živými atenuovanými vakcínami.

Materiál a metodika

Vyšetřované vzorky

Celkem bylo vyšetřeno 238 vzorků trusu od 25 selat rozdělených do 5 skupin po 5 zvířatech. Dvě skupiny selat byly vakcinovány dvěma různými inaktivovanými vakcínami (In-A, In-B) ve dvou dávkách (v den experimentu D0 a D21), další dvě skupiny selat byly vakcinovány dvěma různými živými vakcínami (MLV-A, MLV-B) v jedné dávce (D21) a jedna skupina selat zůstala bez vakcinace (C). Následně byly všechny skupiny experimentálně infikovány virem PRRS (kmen Lelystad, 10^6 TCID₅₀, D42). Celkem bylo provedeno 10 odběrů (D0, D21, D24, D28, D35, D42, D45, D49, D56, D63).

Detekce viru

Virová RNA byla extrahována z homogenizovaného vzorku trusu kitem NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel) podle instrukcí výrobce. Získaná RNA byla rozpuštěna v RNase-free vodě a ihned použita pro amplifikaci nebo zamražena při -80 °C do dalšího použití.

Detekce a kvantifikace virové RNA byla provedena komerčně dostupným EZ-PRRSV™ MPX 4.0 Real Time RT-PCR kitem (Tetracore) v celkovém objemu 25 µl podle návodu výrobce na přístroji Light Cycler® 480 II (Roche).

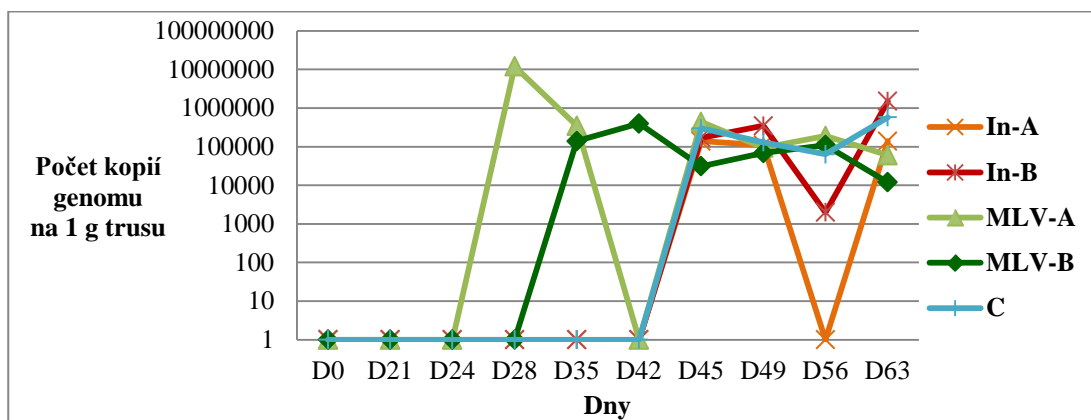
Detekce IgA protilátek

Vzorky trusu (0,2 g) byly důkladně resuspendovány ve 400 μ l roztoku T-PBS s 3 % netučným mlékem, následně prudce odstředěny (max. otáček, 10 min) a takto vzniklý supernatant byl použit bez dalšího ředění přímo k sérologickému vyšetření.

Přítomnost protilátek třídy IgA byla testována pomocí ELISA testu vyvinutého na našem pracovišti. Jako antigeny byly použity rekombinantní proteiny viru PRRS připravené na pracovišti – nukleokapsidový protein N a nestrukturální protein nsp7 (Janková a Celer, 1012), které byly přes noc navázány na mikrotitrační destičku Maxisorp II [®] Immunoplates (Nunc). Druhý den byla mikrotitrační destička blokována v roztoku PBS s 3 % netučným mlékem 1,5 h při 37 °C. Vzorky (po 100 μ l v jednotlivých jamkách) byly inkubovány 1 h při 37 °C a poté následovala inkubace 1 h při 37 °C s anti-Pig IgA peroxidázovým konjugátem (Bethyl, 1:3000) ředěným v T-PBS s 3 % netučným mlékem. Mezi jednotlivými inkubacemi byla mikrotitrační destička promyta 3x roztokem T-PBS a 1x roztokem PBS. Barevná reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l komerčně dostupného substrátu TMB-Complete (TestLine) a po 5-10 min inkubaci byla měřena absorbance při vlnové délce 450 nm při laboratorní teplotě.

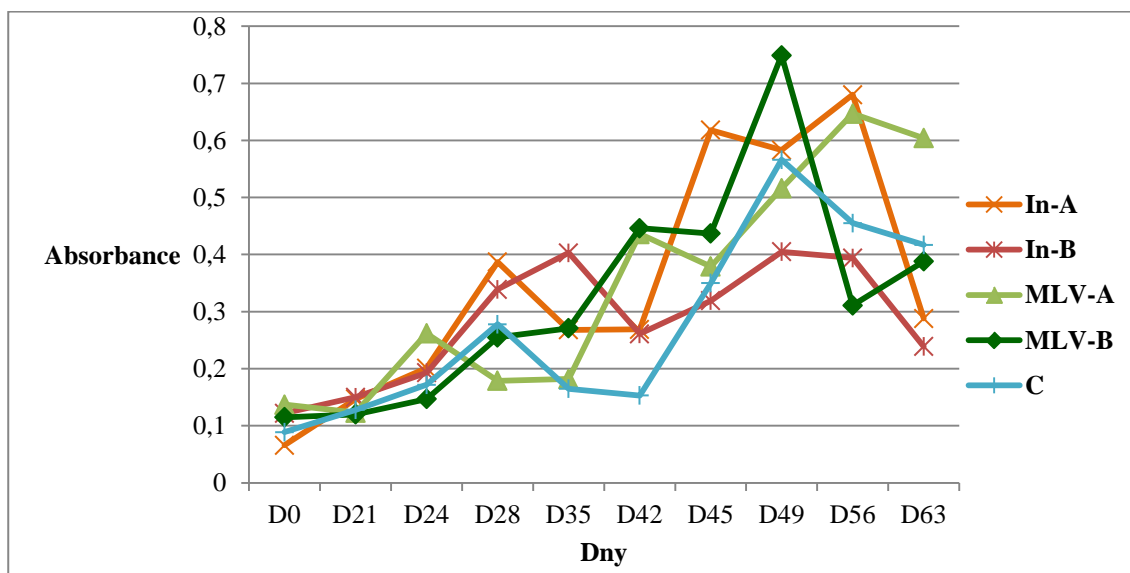
Výsledky

Virová RNA nebyla prokázána ve vzorcích trusu před infekcí (D0-D42) u selat vakcinovaných inaktivovanými vakcínami a u selat nevakcinovaných (C). Virus PRRS byl v trusu přítomen u většiny selat po vakcinaci živou vakcínou nebo po experimentální infekci. Nicméně u některých zvířat bylo pozorováno přerušované vylučování viru. Virová RNA byla prokázána celkem u 55 vzorků. Počet kopií genomu na 1 g vyšetřovaného vzorku trusu se pohyboval v rozmezí 10^3 - 10^5 . Výsledky qRT-PCR vyšetření jsou znázorněny v grafu 1.

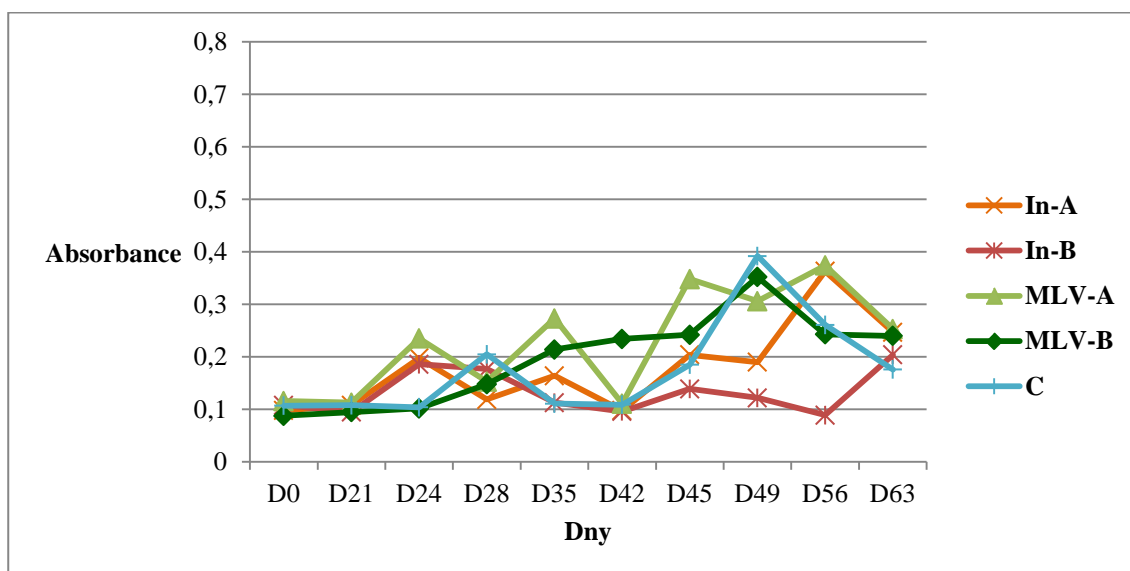


Graf 1 – Výsledky qRT-PCR vyšetření

Tvorba protilátek třídy IgA proti N proteinu byla prokázána u všech skupin vakcinovaných selat a u selat infikovaných virem PRRS, zatímco IgA protilátky proti nsp7 proteinu byly prokázány pouze u skupiny selat vakcinovaných živými vakcínami nebo po infekci virem PRRS. Vyšší hladiny protilátek byly detekovány proti N proteinu než proti nsp7 proteinu. Získané výsledky jsou shrnuty v grafech 2 a 3.



Graf 2 – Výsledky ELISA testu s N proteinem



Graf 3 – Výsledky ELISA testu s nsp7 proteinem

Mezi jednotlivými vakcínami použitými v tomto experimentu byly pozorovány jisté odlišnosti. U skupiny selat MLV-B byla virová RNA detekována později než u skupiny MLV-A a bylo pozorováno pozvolnější zvyšování hladiny protilátek u skupiny MLV-B. Mezi selaty

vakcinovanými inaktivovanými vakcínami byla hladina IgA protilátek srovnatelná u obou skupin (In-A, In-B) jen po vakcinaci, po experimentální infekci byla hladina IgA protilátek vyšší u skupiny In-A, zatímco počet virové RNA byl nižší než u skupiny In-B.

Závěry

Bylo prokázáno, že virus PRRS je vylučován trusem selat po nejméně 22 dní. Všechny vakcíny byly schopné indukovat tvorbu IgA protilátek v trávicím traktu selat. V některých případech byla protilátková odpověď slabá, zatímco množství vylučovaného viru bylo vysoké. Naproti tomu u některých zvířat byla prokázána vysoká hladina IgA protilátek bez vylučování viru.

Vzorky trusu mohou být tedy využity pro průkaz virové RNA pomocí qRT-PCR bez zásadních inhibičních vlivů na reakci. Byla navržena velmi jednoduchá metoda zpracování vzorků trusu prasat pro detekci IgA protilátek. Získané výsledky jsou významné zejména z hlediska role trusu jako potenciálního zdroje šíření viru PRRS a tím pro následné ozdravovací programy.

Seznam literatury:

1. Conzelmann, K.K., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, H.J. Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology* 1993, 193, 329-339.
2. Hopper, S.A., White, M.E., Twiddy, N. An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *The Veterinary record* 1992, 131, 140-144.
3. Janková, J., Celer, V. Expression and serological reactivity of Nsp7 protein of PRRS genotype I virus. *Res Vet Sci.*, 2012, vol. 93, no. 3, p. 1537-1542.
4. Rossow, K.D., Collins, J.E., Goyal, S.M., Nelson, E.A., Christopher-Hennings, J., Benfield, D.A. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.*, 1995, 32, 361-373.
5. Song, T., Fang, L., Zeng, S., Li, B., Chen, H., Xiao, S. Complete Genome Sequence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolated from Piglet Stool Samples. *J. Virol.* 2012, 86(7), p. 4040-4041.
6. White, M.E.C. The clinical signs and symptoms of blue-eared pig disease (PRRS). *Pig veterinary journal* 1992, 28, 62-68.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 107/2015/FVL.

Expres a funkce FZD6 v odontogenezi

Hana Dosedělová, Iveta Putnová, Kristýna Glocová, František Tichý, Marcela Buchtová

Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Receptory Wnt dráhy hrají během embryonálního vývoje významnou roli. Ovlivňují buněčnou proliferaci, diferenciaci, orientaci a růst axonů a synaptogenezi (1,2,3). Tyto receptory jsou rovněž exprimovány v mozkové tkáni, játrech, plicích a ledvinách fětů a v buňkách neoplazií (4). Ve svém projektu jsme se zaměřili na transmembránový receptor FZD6 aktivující buněčnou nekanonickou dráhu, která také bývá označována jako „planar cell polarity“ dráha (PCP). Aktivace tohoto receptoru ovlivňuje budoucí orientaci buněk ve tkáni a určuje tak směr jejich růstu. Během vývoje zubů dochází k prorůstání orálního ektodermu do mesenchymu fetální čelisti. U námi vybraných živočišných druhů je patrné, že roste pod určitým úhlem vzhledem k orálnímu epitelu. Tato práce objasňuje, jakou roli v tomto procesu hraje právě FZD6.

Materiál a metodika

Expresi FZD6 jsme sledovali ve tkáních dolních čelistí embryí laboratorní myši (*Mus musculus* var. *alba*) stáří E11,5 až E17,5; prasete domácího (*Sus strofa f. domestika*) stáří E25, E36, E56, E67 a krajty tmavé (*Python molurus bivittatus*) stáří E5, E10, E15, E20, E30, které byly součástí embryologických sbírek ústavu. Fixované mandibuly byly po dehydrataci vzestupnou alkoholovou řadou převedeny do parafínu, zality do histologických bločků a nakrájeny na sériové řezy. Blokační sérum jsme aplikovali na vzorky po deparafinizaci, rehydrataci a odhalení epitopů antigenu varem v 97°C horkém citrátovém pufru s pH7 (vzorky prasečích embryí) nebo Dako Antigen Retrieveru s pH 9 (vzorky myších a hadích embryí). Na takto připravená skla jsme nanесли primární protilátku v ředění 1:150 a inkubovali po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. K vizualizaci protilátky jsme využili značenou sekundární protilátku a po zamontování prohlíželi pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným fotoaparátem.

Vzorky humánních adultních ameloblastomů fixovaných ve 4% pufovaném formaldehydu jsme získali díky spolupráci s Lékařskou fakultou Ostravské univerzity. Po zpracování vzorků a jejich zalití do parafínu byly vytvořeny histologické preparáty vhodné k imunohistochemické detekci vybraných markerů (FZD6, proliferující buňky - PCNA, cytokeratin). Ke zjištění

přítomnosti FZD6 v nádorové tkáni jsme použili totožný protokol jako u experimentálních embryonálních tkání. Po drobné modifikaci protokolu jsme dále provedli dvojité barvení vzorků v kombinacích FZD6 s proliferujícími buňkami a FZD6 s cytokeratinem.

Výsledky

U všech tří sledovaných živočišných druhů jsme během vývoje zubní lišty pozorovali expresi FZD6 v orálním epitelu. Rozdílná byla jeho exprese v právě se vyvíjející zubní liště. U myši ve stádiu E11,5 a E13,5 bylo možné pozorovat FZD6 v orálním ztluštění, avšak v apikální části následného zubního pupene byla jeho exprese pouze slabá. Na rozdíl od zástupců ostatních živočišných druhů jsme přítomnost Fzd6 zaznamenali rovněž v mesenchymálních buňkách, které kondenzují v okolí zubního pupene a prominující zubní lišty. Ve stádiu zubního zvonku byl signál patrný v bazální vrstvě buněk zubní lišty pouze v malém rozsahu v oblasti hraničící s orálním epitelem. Úrovně zubního základu nedosahoval. Nejsilnější exprese FZD6 byla patrná ve stádiu E18 na linguální straně nyní již plně vyvinuté zubní lišty. V žádném z vývojových stádií jsme nezaznamenali rozšíření markeru do náhradní zubní lišty či vyvíjejícího se zubu.

U krajty byl signál FZD6 v průběhu vývoje zubní lišty lokalizován nejen v buňkách její bazální membrány, ale také v celém jejím objemu. Dále bylo patrné, že pozitivní buňky byly distribuovány v celé její délce, tedy včetně jejího apikálního konce a ve stádiích s vyvinutým zubním základem a diferencujícím se zubem přecházel i na tyto struktury. Rovněž byl FZD6 exprimován v náhradní zubní liště. Ačkoliv bývá zubní lišta krajty linguálně zakřivená, oboustranné rozdíly v intenzitě signálu FZD6, které by tento fenomén mohly vysvětlovat, jsme nezaznamenali.

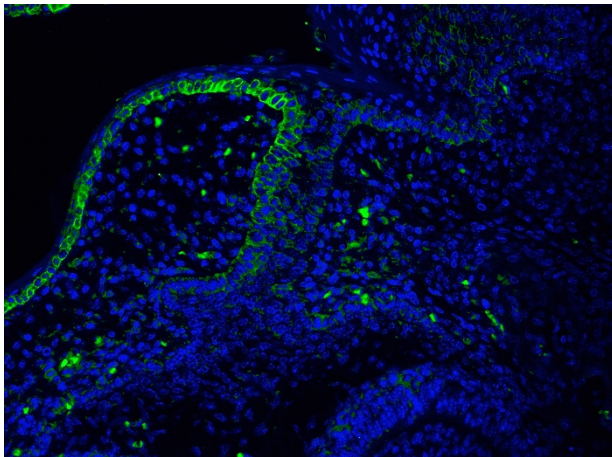
V mladších embryonálních stádiích prasete domácího byl signál FZD6 velmi slabý v kraniofaciální oblasti a ne příliš specifický (E25, E29, E30). Rovněž nebyl patrný v okolním mesenchymu. Ve stádiu E36 je signál soustředěn v celé šíři orálního epitelu i na krátké zubní liště, na vytvořený zubní zvonek však nezasahuje. V dalším stádiu (E56) již dochází k odpojení zubní lišty od orálního epitelu a místy se vytváří epitelové perly, tvořené několika vrstvami zploštělých buněk. Vnější vrstva těchto buněk byla také FZD6-pozitivní. V zubní liště jsme signál FZD6 lokalizovali zejména v labiální vrstvě, nejsilnější pak byl v oblasti rozpadající se zubní lišty. V apikálním zakončení lišty a na lingvální straně lišty dochází k vymizení signálu. Dále jsme pozorovali výskyt signálu ve vrstvě odontoblastů a ve starším stádiu i ve vytvořených ameloblastech.

V nádorové tkáni ameloblastomů jsme pozorovali různé úrovně intenzity signálu FZD6. Obarvením tkáně epitelovým markerem cytokeratinem jsme zjistili, že se signál FZD6 kryje

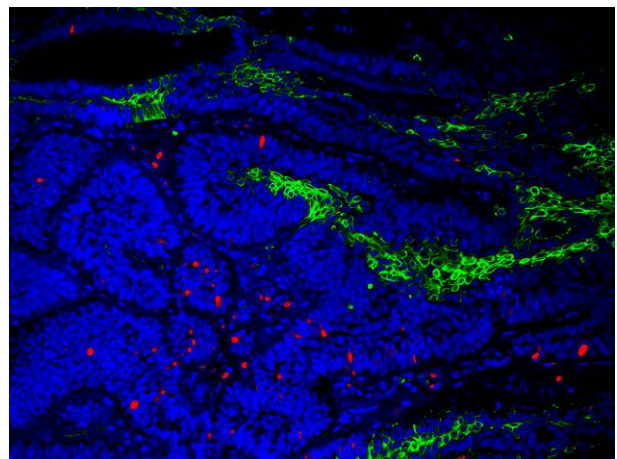
s buňkami pozitivními na cytokeratin. Oblasti s velmi intenzivním signálem byly nepravidelně rozprostřeny v celé tkáni nádoru, avšak nezahrnovaly všechny epitelové buňky. Proliferující buňky nádoru se mezi buňkami exprimujícími FZD6 nevyskytovaly.

Závěr

Ačkoliv během embryonálního vývoje dochází u všech námi studovaných živočišných druhů k jistému zaúhlení rostoucí zubní lišty, na základě námi získaných výsledků se nám nepodařilo potvrdit, že by se na tomto procesu podílela PCP dráha. Rozdíly v expresi FZD6 jsme našli ve starších vývojových stádiích myši, u nichž byl pozitivní signál lokalizován na lingvální straně zubní lišty a u prasete, kde byl signál exprimován labiálně. Naopak u krajty je signál viditelný po celý vývoj zubní lišty i v oblasti zubu ve stejné intenzitě. Nádorová tkáň ameloblastomů exprimuje signál FZD6 v buňkách epiteliálního původu nerovnoměrně. Dalším plánovaným krokem našeho výzkumu bude objasnění načasování ztráty exprese receptoru v nádorových buňkách.



Obr. 1: Exprese Fzd6 (zeleně) v zubní liště myši - stádium E18, jádra (modře)



Obr. 2: Nádorová tkáň ameloblastomu s proliferujícími buňkami (červeně) a Fzd6 (zeleně), jádra (modře)

Seznam literatury

1. [Logan CY, Nusse R.](#): The Wnt signaling pathway in development and disease. [Annu Rev Cell Dev Biol.](#) 2004; 20:781-810.
2. [Chien AJ, Conrad WH, Moon RT.](#): A Wnt survival guide: from flies to human disease. [J Invest Dermatol.](#) 2009 Jul;129(7):1614-27.
3. [Borello U, Buffa V, Sonnino C, Melchionna R, Vivarelli E, Cossu G.](#): Differential expression of the Wnt putative receptors Frizzled during mouse somitogenesis. [Mech Dev.](#) 1999 Dec;89(1-2):173-7.
4. [Tokuwara M, Hirai M, Atomi Y, Terada M, Katoh M.](#): Molecular cloning of human Frizzled-6. [Biochem Biophys Res Commun.](#) 1998 Feb 13;243(2):622-7.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 108/2015/FVL.

Optimální protokol injekční anestezie u ocasatých obojživelníků s použitím alfaxalonu

Eva Čermáková, Barbora Ondřejková, Zdeněk Knotek

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

Úvod

V klinické i experimentální praxi u obojživelníků je v mnoha případech nezbytné použít spolehlivý a bezpečný model sedace a anestezie. Na rozdíl od plazů, kde se alfaxalon ukázal jako vhodné anestetikum, jsou s jeho použitím u obojživelníků doposud minimální zkušenosti a publikovaná data se týkají žab nebo aplikací u ocasatých obojživelníků ve formě koupelí¹⁻². U drápatků se ukázala jako vhodná dávka alfaxalonu 18 mg/kg intramuskulárně (i.m.)², u skokanů se k imobilizaci osvědčily dávky 10, 12, 15 a 17.5 mg/kg i.m.³ Potřeba vypracovat spolehlivý protokol krátkodobé anestezie u ocasatých obojživelníků vyplývá z aktuální situace ohrožení těchto obratlovců ve volné přírodě faktory infekčními i civilizačními⁴. Hlavním cílem projektu bylo vypracování optimálního protokolu injekční anestezie u ocasatých obojživelníků a stanovení účinné a bezpečné dávky alfaxalonu pro laboratorní, klinickou i terénní praxi.

Materiál a metodika

Experimentální zvířata

Pokusnou skupinu tvořilo 14 dospělých, klinicky zdravých žebrovníků, druh žebrovník Waltlův (*Pleurodeles waltl*). Jedinci byli chováni v akváriích experimentálního oddělení Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců za definovaných podmínek (teplota vody, filtrace, sloupec vody, dieta). Byl prováděn pravidelný monitoring zdravotního stavu experimentálních obojživelníků a kvality vody. Před vlastním pokusem byl obojživelníkům zamezen přísun potravy na 24 hodin.

Anestezie

V první fázi bylo obojživelníkům aplikováno steroidní anestetikum alfaxalon (Alfaxan® Vétoquinol, Francie) v dávce 15 mg/kg do svalu hrudní končetiny. Monitoring v průběhu anestezie zahrnoval pravidelnou kontrolu srdeční frekvence ve dvouminutových intervalech pomocí dopplerovské sondy. Dále byly hodnoceny následující reflexy: únikový, *righting* a korneální reflex a reakce na povrchovou a hlubokou citlivost, tzv. *withdrawal/toe-pinch* reflex.

Po uplynutí dvou týdnů od ukončení první fáze (tzv. *washout period*), byla zahájena druhá fáze pokusu s vyšší dávkou alfaxalonu (20 mg/kg i.m.) a po uplynutí dalších dvou týdnů bylo provedeno sledování s dávkou 30 mg/kg i.m. Takto byly postupně ověřeny tři dávky alfaxalonu.

Výsledky

Ani u jedné ze sledovaných skupin (15, 20, 30 mg/kg) nedošlo k signifikantnímu poklesu srdeční frekvence (viz. Tabulka č. 1). Až na výjimky došlo u většiny zvířat při všech testovaných dávkách k vymizení únikového a *righting* reflexu. Se stoupající dávkou alfaxalonu došlo nejen k narůstání celkového počtu sledovaných jedinců, u nichž došlo k úplnému vymizení reflexu, ale zároveň docházelo ke zkrácení doby nástupu tohoto účinku, tedy času, který vedl k úplnému vymizení reflexu. Ani u jedné ze skupin nedošlo k vymizení citlivosti (povrchová, hluboká), avšak s narůstající dávkou se zvyšoval počet jedinců, u nichž došlo k oslabení povrchové citlivosti.

Tabulka č.1 – Monitoring srdeční frekvence při testování tří různých dávek injekčního anestetika alfaxalonu

Anestetikum [dávka]	Parametr	Průměr																									
		T ⁰	T ²	T ⁴	T ⁶	T ⁸	T ¹⁰	T ¹²	T ¹⁴	T ¹⁶	T ¹⁸	T ²⁰	T ²⁵	T ³⁰	T ³⁵	T ⁴⁰	T ⁴⁵	T ⁵⁰	T ⁵⁵	T ⁶⁰	T ⁷⁵	T ⁹⁰	T ¹⁰⁵	T ¹²⁰			
Alfaxalon [15 mg/kg] n= 14	Srdeční frekvence*	39	47	47	46	46	43	43	42	43																	
		45	45	42	42	42	43	42	43	43																	
		43	39	38	39	37																					
Alfaxalon [20 mg/kg] n= 14	Srdeční frekvence*	39	44	44	43	43	43	43	42	43																	
		41	41	43	40	41	40	41	40	43																	
		42	42	41	42	40																					
Alfaxalon [30 mg/kg] n= 14	Srdeční frekvence*	44	43	42	39	40	36	37	38	38																	
		37	37	36	37	37	37	37	38	40																	
		40	39	40	40	39																					

* počet srdečních akcí za minutu

Závěr

Steroidní injekční anestetikum představuje u námi zvoleného zástupce obojživelníků velice účinnou formu sedace, resp. anestezie. Jedná se o šetrnou formu aplikace, která v rámci pokusu nevedla k poškození měkkých tkání, i přes velice citlivou kůži obojživelníků. U žádného z testovaných zvířat rovněž nedošlo ke zdravotním komplikacím či výraznému ovlivnění kardiorespiratorního aparátu. Výsledná sedace a imobilizace zvířat umožnila důkladné klinické vyšetření a dále možnost případného odběru vzorků. Je však třeba brát zřetel na to, že ani u jedné ze sledovaných dávek alfaxalonu nedošlo k vymizení citlivosti (povrchová, hluboká). Proto nelze tento protokol doporučit k využití v rámci bolestivých úkonů (vč. chirurgických) a je třeba vždy jedince premedikovat vhodně zvolenými analgetiky. V další fázi testování bude vhodné nejen rozšířit početní základnu sledovaných zvířat při ověřování účinnosti zvolených dávek alfaxalonu, ale rovněž ověřit kombinaci vybraných analgetik a alfaxalonu.

Použitá literatura

1. McMillan MW, Leece EA. Immersion and brachial/transcutaneous irrigation anaesthesia with Alfaxalone in Mexican axolotl. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 2011; 38: 619-623.
2. Hadzima E, Mitchell AM, Knotek Z, Reavill D, Filip A, Parker S, Weston K. Alfaxalone use in *Xenopus laevis*: comparison of IV, IM, IP and water immersion of alfaxalone with dose of 18mg/kg and 18mg/l. Proc. 21st ARAV Annual Conference, 18-24 October Orlando 2014:60-64.
3. Posner LP, Bailey KM, Richardson EY, Harms CA. Alfaxalone anesthesia in bullfrogs (*Rana catesbeiana*) by injection or immersion. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2013; 44(4):965-971.
4. O'Rourke DP. Reptiles and amphibians in laboratory animal medicine. In: Mader DR, Divers SJ (eds.) *Current therapy in reptile medicine and surgery*. St. Louis:Elsevier 2014:290-295.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury VFU Brno (IGA VFU 110/2015/FVL).

Použití kontrastní ultrasonografie a počítačové tomografie k vyšetření jater u zdravých želv

Veronika Sochorcová, Zdeněk Knotek

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

Úvod

Intravitální diagnostika různých typů onemocnění jater je dlouhodobým cílem medicíny humánní i veterinární. Možnost využít laboratorní analýzu krve (případně séra nebo plazmy) závisí na existenci a praktické dostupnosti specifických markerů, dokumentujících specifické poškození stavby a narušení funkce jater.¹ V tomto směru patří naše klinika k několika málo pracovištím, které se problematikou systematicky zabývají, a které rozšířily spektrum parametrů krve vyhodnotitelných v případě poškození jaterní tkáně u plazů.² Dalším nutným předpokladem rozvoje základního i aplikovaného výzkumu onemocnění jater plazů je dostupnost a praktická zkušenost s využitím moderních zobrazovacích metod. Doposud publikované výsledky potvrzují vysoký diagnostický potenciál metod magnetické rezonance a počítačové tomografie při studiu poškození jater u plazů.³⁻⁵ Význam včasné intravitální diagnostiky morfologických změn a funkčních poruch jater vyplývá též z existence nových onemocnění infekční etiologie, která jsou souborně zařazována do skupiny emerging diseases. Cílem předkládaného projektu je proto unikátní využití počítačové tomografie k vytvoření map zdravé a plně funkční jaterní tkáně u plazů a rovněž sledování specifických změn u pacientů s narušenými funkcemi jater (definovanými pomocí hematologie, biochemie krevní plazmy, veterinární endoskopie a patologické morfologie).

Materiál a metodika

Experimentální zvířata

Do studie bylo zařazeno 10 dospělých, klinicky zdravých želv *Trachemys scripta elegans*, chovaných v experimentálním oddělení Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců. Před zahájením experimentální práce (ultrasonografie a počítačová tomografie) byl u všech plazů stanoven hematologický a biochemický profil krve.

Chirurgické zavedení nitrožilního katétru

Před vlastní experimentální prací bylo nutné provést chirurgické zavedení nitrožilního katétru do *vena jugularis*. Želvám byla podána analgetika v kombinaci tramadolu (10 mg/kg IM) s

meloxicamem (1 mg/kg IM) a následně byla indukována anestezie alfaxalonem (5 mg/kg IV do subvertebrálního plexu). Po drobné incizi kůže v laterální oblasti krku byl do jugulární žíly zaveden nitrožilní katétr a zde krátkodobě fixován jednoduchou suturou vstřebatelným šicím materiálem (4-0 Caprolon, Resorba, Německo).

Počítačová tomografie

Pro účely počítačové tomografie byly želvy polohovány ve ventrální poloze s hlavou a končetinami volně vytaženými z krunýře. Vyšetření bylo provedeno na multidetektorovém CT přístroj s 16 řadami detektorů (LightSpeed, GE HealthCare, Milwaukee, USA). Nejprve byla provedena série nativních snímků v transverzální rovině. Po manuální aplikaci kontrastní látky v dávce 2 ml/kg 800 mg I/kg (Iomeron 300, Bracco, Konstanz, Německo) přes nitrožilní katétr byly provedeny další série transverzálních snímků v čase 20 s, 1 min a 3 min po aplikaci kontrastní látky.

Ultrasonografie

Nativní ultrasonografické vyšetření bylo provedeno v B-módu za použití mikrokonvexní sondy (5 až 8 MHz) na přístroji Vivid 7 (GE Vingmed Ultrasound AS, Horten, Norsko). Želvy byly polohovány ve ventrální poloze a pro lepší kontakt sondy s povrchem těla bylo použito větší množství gelu. Kontrastní vyšetření bylo provedeno za použití mikrobublin fluoridu sírového (SonoVue, Bracco, Konstanz, Německo) aplikovaného přes nitrožilní katétr v dávce 0,03 ml/kg s bezprostřední aplikací fyziologického roztoku (bolus v objemu 1,0 ml).

Výsledky

Vyšetření želv pomocí počítačové tomografie umožnilo vytvoření série snímků v transverzální, dorzální a sagitální rovině. Následně bylo na nativních snímcích provedeno hodnocení jaterní tkáně a měření denzity jaterního parenchymu na transverzálních řezech v úrovni kraniální části žaludku (Tab. 1). Jaterní parenchym vykazoval homogenní strukturu s denzitou v rozmezí 45 – 80 HU. Aplikace kontrastní látky v časech 20 s, 1 min a 3 min zajistila dostatečné sycení cév jak v arteriální fázi, tak i v parenchymatózní a venózní fázi plnění cév.

Tabulka 1. Hodnoty denzity jaterní tkáně želv nádherných získané pomocí počítačové tomografie.

Želvy	Denzita tkáně (HU)
Želva č. 1	49,21
Želva č. 2	58,56
Želva č. 3	66,44
Želva č. 4	79,30
Želva č. 5	45,91

HU denzita tkáně vyjádřená v Hounsfieldových jednotkách

Vyšetření pomocí kontrastní ultrasonografie neprokázala žádné výrazné rozdíly mezi běžným ultrasonografickým vyšetřením jater bez a s použitím kontrastní látky.

Závěr

Použití počítačové tomografie se ukázalo jako perspektivní zobrazovací metoda pro vyšetření jater želv bez superpozice okolních struktur, kterými jsou kosti krunýře. Využití kontrastní látky podpořilo zvýraznění struktury jednotlivých orgánů. Naměřené hodnoty denzity jaterní tkáně získané v tomto projektu budou sloužit jako základní hodnoty pro následná vyšetření u vybraných pacientů s podezřením na onemocnění jater. Získané snímky budou rovněž archivovány jako praktický atlas topografie vnitřních orgánů želv.

Seznam použité literatury:

1. Wagner RA, Wetzel R. Tissue and plasma enzyme activities in juvenile green iguanas. *Am J Vet Res.* 60(2):201-3, 1999.
2. Knotkova Z, Dorrestein GM, Jekl V, Janouskova J, Knotek Z. Fasting and postprandial serum bile acid concentrations in 10 healthy female red-eared terrapins (*Trachemys scripta elegans*). *Vet Rec.* 163:510-4, 2008.
3. Knotek Z, Knotkova Z, Trnkova S, Dorrestein GM, Lewis W. Chronic Liver Disease and Subchronic Nephritis in a Male Warty Chameleon (*Furcifer verrucosus*) with Transient Hyperglycemia – Case Report. *Acta Veterinaria (Brno)* 2011, 80(4):397-400.
4. Knotek Z, Dorrestein GM, Hrda A, Tomek A, Proks P, Knotkova Z, Jekl V, Lewis W. Hepatocellular Carcinoma in a Green Iguana – A Case study. *Acta Veterinaria (Brno)* 2011, 80(3):243-247.
5. Nardini G, Di Girolamo N, Leopardi S, Paganelli I, Zaghini A, Origgi FC, Vignoli M. Evaluation of liver parenchyma and perfusion using dynamic contrast-enhanced computed tomography and contrast-enhanced ultrasonography in captive green iguanas (*Iguana iguana*) under general anesthesia. *BMC Veterinary Research* 2014, 10:112

Tento projekt byl podpořen grantem IGA VFU Brno 111/2015/FVL.

Studium vlivu sepse na rozvoj diseminované intravaskulární koagulace a funkci ledvin

Macháčková K¹, Uhríková I¹, Bartošková A², Ramešová A¹, Bošelová M¹, Sobak Malin R²

Ústav fyziologie¹, Oddělení reprodukce KCHPK², Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) je charakterizovaná nadměrnou aktivací koagulační kaskády. Vyskytuje se jako komplikace mnoha závažných onemocnění, především pak u sepsí a polytraumat.¹ Ohrožení života u pacientů s onemocněním doprovázeným sepsí tak přetrvává i po úspěšné terapii primárního onemocnění. Cotovio a kol.² prokázali přítomnost fibrinu v mikrovaskulatuře parenchymatózních orgánů u koní s kolikou, rozvoj DIC je popisován i u dilatace a torze žaludku nebo pyometry. Studie zabývající se pyometrou se zaměřují především na terapeutické řešení tohoto onemocnění, DIC bývá zmíněna pouze jako jedna z možných komplikací. Radwińska a kol.³ se jako jedni z mála zabývali incidencí DIC u fen s pyometrou, neřešili však vztah mezi koagulopatií a selháním ledvin. Vzhledem k průkazu fibrinu v mikrovaskulatuře ve studii Cotoviy a kol.² je zde možná souvislost mezi rozvojem poruch koagulace a selháním ledvin. Je tedy třeba zaměřit pozornost na vztah mezi koagulačním profilem a stavem ledvin. Jako nový slibný marker onemocnění ledvin se jeví lipokalin-2 (NGAL, lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů), jeho evaluace pro konkrétní onemocnění však musí být ještě provedena.⁴

Materiál a metodika

Ke studiu koagulačního profilu a stavu ledvin u fen s pyometrou bylo použito 34 fen přijatých s diagnózou pyometra na oddělení reprodukce KCHPK VFU Brno. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 7 zdravých fen, které byly vyšetřovány v rámci předchozí studie „Hodnocení koncentrace neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) u psů s azotemií“ P. Saláškové⁵. Od fen byla ihned po příjmu odebrána krev do zkumavek s citrátem sodným (Dispolab s.r.o., Česká republika) pro hemostazeologické vyšetření. V rámci hemostazeologického vyšetření byl stanoven protrombinový čas (PT - Dialab, s.r.o., Česká republika), aktivovaný parciální tromboplastinový čas (aPTT - Dialab, s.r.o., Česká republika) a hladina fibrinogenu (FBG - Dialab, s.r.o., Česká republika) pomocí dvoukanálového analyzátoru (Coatron M2, Tecco, Německo) a D-dimerů (DD - Nycocard, Axis-Shield PoC, Norsko). Incidence DIC byla stanovena na hranici alespoň 4 změněných výsledků koagulačního profilu - snížený počet trombocytů ($<200 \times 10^9/l$), prodloužený protrombinový čas (>13 s), prodloužený aktivovaný parciální tromboplastinový čas ($>19,5$ s), snížená koncentrace fibrinogenu ($<1,5$ g/l) a zvýšená koncentrace D-dimerů ($>0,2$ mg/l). Pro vyšetření kreatininu,

urey a NGAL (Dog NGAL ELISA Kit, BioPorto Diagnostics A/S, Dánsko) byla krev odebrána do zkumavek obsahujících částice urychlující srážení (Sarstedt, s.r.o., Brno, Česká republika).

Ke studiu uniformního modelu sepse byl proveden pokus na potkanech. U pokusných jedinců (n=8) byla v celkové anestezii: indukce éterem 1ml/l vzduchu, dále diazepam (Apaurin, Krka, Slovinsko), xylazin (Xylapan, Vétoquinol, Německo) a ketamin (Narketan, Vétoquinol, Německo) v dávce dle hmotnosti potkana, provedena mediánní laparotomie s vybavením mezenteria a ligací *a. mesenterica*, repozicí střeva a suturou dutiny břišní. U kontrolních jedinců (n=4) bylo provedeno pouze vybavení a repozice střeva bez ligace. Krev byla odebrána po 6 hodinách a bylo provedeno rutinní hematologické a hemostazeologické vyšetření (stanovení protrombinového času, parciálního aktivovaného tromboplastinového času a koncentrace fibrinogenu a D-dimerů). Ve vzorcích séra byla stanovena koncentrace NGAL (Rat NGAL ELISA Kit, BioPorto Diagnostics A/S, Dánsko), antitrombinu (AT - Rat antithrombin III (ATIII) ELISA kit, Cusabio Biotech Co. USA) a tkáňového faktoru (TF - Rat tissue factor, BlueGene, Shanghai). Statistické zpracování bylo provedeno pomocí Mann-Whitneyova nepárového testu v programu MedCalc (MedCalc Software bvba, Belgie).

Výsledky

Stanovení koagulačního profilu a ledvinného profilu u fen s pyometrou

Porovnání hemostazeologického profilu a hodnot NGAL u fen s pyometrou je uvedeno v tabulce 1. Nebyla nalezena korelace mezi koagulačními parametry a koncentrací NGAL.

Tabulka 1: Srovnání hemostazeologického vyšetření s koncentrací NGAL

	PT (s)	aPTT (s)	FBG (g/l)	DD (mg/l)	NGAL (pg/ml)
pacienti (Ø)	10,96	22,26	3,25	0,48	272,76
korelace s NGAL (r)	0,0157	-0,119	0,004	0,329	

PT - protrombinový čas, aPTT - aktivovaný parciální tromboplastinový čas, FBG - koncentrace fibrinogenu, DD - koncentrace d-dimerů, NGAL - lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů.

Pro evaluaci stanovení NGAL pro hodnocení renálního poškození byly fen s pyometrou rozděleny podle přítomnosti azotemie. Porovnání vyšetření NGAL se standardním vyšetřením profilu ledvin u zdravých fen a fen s pyometrou s azotemií je uvedeno v tabulce 2. Byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi hodnotami NGAL u fen s pyometrou s azotemií a u zdravých fen. Nebyla prokázána korelace mezi NGAL a některým z

ostatních parametrů. Pouze jedna fena byla detekována jako DIC pozitivní dle stanovených kritérií, dalších 7 bylo pozitivní ve 3 kritériích. U 24 fen bylo prodloužené aPTT.

Tabulka 2: Srovnání vyšetření NGAL a standardního vyšetření profilu ledvin

skupina	Urea (mmol/l)	Crea (μmol/l)	NGAL (pg/ml)
kontrolní (Ø)	5,70	74,81	176,74
pacienti (Ø)	14,00	133,54	346,08
korelace s NGAL (r)	0,0471	-0,432	
p	<0,01	<0,01	0,01

Crea - koncentrace kreatininu, NGAL - lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů.

Stanovení hematologického, koagulačního profilu a funkce ledvin u potkanů

Porovnání hematologického, hemostazeologického profilu a hladin NGAL u potkanů je uvedeno v tabulkách 3 a 4.

V hematologickém profilu kontrolní a pokusné skupiny nebyly signifikantní rozdíly.

Tabulka 3: Srovnání hematologického profilu pokusných a kontrolních potkanů

skupina	Leucs (*10 ⁹)	Neu (*10 ⁹)	Lymph (*10 ⁹)	Mono (*10 ⁹)	Eos (*10 ⁹)	Baso (*10 ⁹)	Erys (*10 ¹²)	Hb (g/l)	Ht (l/l)	PLT (*10 ⁹)
kontrolní (Ø)	7,16	1,74	4,94	0,31	0,17	0,01	8,90	153,25	0,47	813,25
pokusná (Ø)	7,98	3,00	4,18	0,67	0,10	0,02	8,43	139,00	0,46	764,00

Leucs - počet leukocytů, Neu - počet neutrofilních granulocytů, Lymph - počet lymfocytů, Mono - počet monocytů, Eos - počet eosinofilních granulocytů, Baso - počet basofilních granulocytů, Erys - počet erytrocytů, Hb - koncentrace hemoglobinu, Ht - hematokrit, PLT - počet trombocytů

V koncentracích NGAL a AT byl mezi pokusnou a kontrolní skupinou signifikantní rozdíl. V koncentraci TF nebyl signifikantní rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou. V hemostazeologickém profilu kontrolní a pokusné skupiny nebyly signifikantní rozdíly.

Tabulka 4: Hemostazeologická vyšetření u potkanů

skupina	NGAL (pg/ml)	AT (ng/ml)	TF (ng/ml)	PT (s)	aPTT (s)	FBG (g/l)	DD (mg/l)
kontrolní Ø	34,66	579,57	0,92	23,75	25,45	1,90	0,10
pokusná Ø	171,96	2554,98	1,01	27,64	22,36	1,15	0,14
p	0,015	0,02	1,00	0,90	0,33	0,40	0,80

NGAL - lipokalin asociovaný s želatinázou neutrofilů, AT - antitrombin, TF - tkáňový faktor, PT - protrombinový čas, aPTT - aktivovaný parciální tromboplastionový čas, FBG - koncentrace fibrinogenu, DD - koncentrace d-dimerů

Závěry

Renální selhání spolu s rozvojem DIC se stávají život ohrožujícími komplikacemi úspěšně chirurgicky řešené pyometry u fen^{3,6}. Vzhledem k tomuto faktu vyvstává potřeba zjištění souvislostí mezi vznikem DIC a renálního selhání a také potřeba co včasné diagnostiky rozvoje renálního selhání. V naší studii byla stanovena negativní korelace mezi jednotlivými koagulačními parametry a stanovením NGAL, jakožto časného markeru renálního poškození u psů⁷. Z toho tedy vyplývá, že je velmi malá pravděpodobnost, že by DIC mohla být jedním z důvodů vzniku renálního selhání. Tento fakt potvrzuje i velmi nízká incidence DIC prokázaná touto studií.

U fen, u kterých byla nalezena azotemie byla stanovena korelace mezi hodnotami NGAL, urey a kreatininu. Mezi těmito parametry nebyla nalezena korelace. Byly však zjištěny signifikantní rozdíly mezi hodnotami NGAL u fen zdravých a fen s pyometrou a s azotemií, je tedy pravděpodobné, že NGAL může sloužit k detekci renálního poškození u fen s pyometrou.

Vzhledem k tomu, že klinické výzkumy jsou často limitovány nejednotností fáze onemocnění, byly parametry posuzovány i u potkanů s uniformním modelem sepse. I přesto, že u těchto potkanů nebyly signifikantní rozdíly v hematologickém, ani hemostazeologickém profilu, které by svědčily pro rozvoj sepse, byly zjištěny signifikantní rozdíly v koncentraci AT a NGAL mezi kontrolními a pokusnými jedinci. Lze tedy říci, že koncentrace AT může sloužit ke včasné detekci rozvoje sepse a s ním spojené DIC. Koncentrace NGAL potom může sloužit pro včasnou detekci renálního poškození u septických onemocnění.

Seznam literatury

1. Ho LWW, Kam PCA, Thong CL. Disseminated intravascular coagulation. *Curr Anesth Crit Care*, 2005, 16(3): 151-161.
2. Cotovio M, Monreal L, Navarro M, Segura D, Prada J, Alves A. Detection of fibrin deposits in tissue from horses with severe gastrointestinal disorder. *J Vet Intern Med*, 2007, 21(2):308-313.
3. Radwińska J, Domsławska A, Pomianowski A, Zarcynska K, Jurczak A. Implications of blood coagulation and fibrinolytic disorders in severe endometritis-pyometra complex in bitches. *Bull of the Vet Inst in Pulawy*, 2013, 56:293–297.
4. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nickolas TL, Devarajan P, Barasch J. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2012, 1823(9):1451-1458.
5. Salášková P. Hodnocení koncentrace neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) u psů s azotemií. Brno, 2015. 81s. Diplomová práce na Veterinární a farmaceutické fakultě Brno na Ústavu fyziologie. Vedoucí diplomové práce Prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.
6. Heiene, R., Kristiansen, V., Teige, J., Jansen, J. H. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 2007, 49:13.
7. Segev, G., Palm, C., Leroy, B., Cowgill, L. D., Westropp, J. L. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med*, 2013, 27:1362-7.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 112/2015/FVL.

Role virového a hostitelského genomu ve vnímavosti koní k infekci gamaherpesviru

Marie Klumplerová¹, Karla Stejskalová¹, Dobromila Molinková², Dagmar Kolařová²

Ústav genetiky FVL VFU, Ceitec RG 6¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie FVL VFU, Ceitec RG 1²

Úvod

Koňské herpesviry jsou celosvětově rozšířenými patogeny. Do popředí zájmu se v současné době dostávají vedle EHV-1 a EHV-4 (podčeleď *Alphaherpesvirinae*) také zástupci podčelede *Gamamaherpesvirinae*, EHV-2 a EHV-5. Infekce herpesviru je celoživotní díky schopnosti herpesvirů přežívat v buňkách hostitele v latentním stádiu, ze kterého může být virus za vhodných podmínek reaktivován. Gamaherpesviry koní vykazují afinitu k lymfatickému systému, v případě EHV-2/5 k B-lymfocytům, ve kterých dochází jak k replikaci viru, tak ke vzniku latence [1]. Diagnostika klinického onemocnění způsobeného gamaherpesviru je velmi obtížná, díky různorodému průběhu infekce [2–4]. Vnímavost/rezistence hostitele je dána především variabilitou v genech imunitní odpovědi mezi které patří geny pro Toll-like receptory (TLRs) [5], aktivující a inhibiční receptory na NK buňkách (KLRs, NCRs) [6] a geny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) [7]. Schopnost viru infikovat buňku může být také ovlivněna variabilitou v genech kódujících molekuly, které slouží jako virové receptory. Zdá se, že klíčovou roli pro infekci B-lymfocytů hraje u lidí receptor CR2 [8]. Genetická variabilita patogena také hraje významnou roli, neboť ovlivňuje jeho invazivní, reprodukční a imunomodulační schopnosti.

Materiál

Pro účely asociační studie byly získány vzorky krve pacientů Kliniky chorob koní FVL s klinickými symptomy suspektní gamaherpesviróvé infekce. Jako kontrolní skupina klinicky negativních koní sloužili ortopedičtí pacienti bez známek respiračního nebo horečnatého onemocnění. Celkem bylo za tímto účelem virologicky vyšetřeno 70 koní. Na základě molekulárního průkazu přítomnosti jednotlivých herpesvirů pak byli tito koně rozděleni na skupinu virologicky pozitivních a negativních. Pro odhad cirkulace virů v populaci koní byl dále vyšetřen soubor 23 hřibů (nosní výtěry) z jednoho chovu. Vzorky byly odebírány od narození do věku půl roku (odstav) v intervalu 6 týdnů.

Metody

Virologická vyšetření. DNA byla ze vzorků periferní krve extrahována kitem NucleoSpin-Blood (Macherey-Nagel, Německo). K detekci přítomnosti a k určení množství virové DNA EHV-2 a

EHV-5 byl použit protokol duplex qPCR, navržený a optimalizovaný na pracovišti virologie ÚICHM VFU Brno. Pro real-time PCR na detekci EHV-2/5 byl vybrán úsek virového genomu kódující virový enzym DNA terminázu. Byly navrženy dva oligonukleotidové primery společné pro oba viry, mezi nimi byly navrženy 2 oligonukleotidové sondy specifické pro EHV-2 a pro EHV-5. Pro kalibraci testu byla použita plazmidová DNA o známé koncentraci. Intenzita signálu z několika desítkových ředění plazmidové kontroly byla srovnávána s intenzitou u vyšetřovaných vzorků. Pro ověření stability sekvence genu pro DNA terminázu a tedy jeho vhodnosti pro účely diagnostické qPCR byla provedena Sangerova sekvenace úseku o délce 301bp.

Genetická analýza vnímavosti hostitele k infekci. Pomocí PCR byly amplifikovány funkčně významné oblasti hostitelských kandidátních genů. U genů pro TLR byl studován exon 3 a 4 genu *TLR3* (5286 bp), exon 5 a 6 genu *TLR3* (4808 bp), exon 3 genu *TLR7* (3805 bp) a poslední exon genu *TLR8* (3530 bp). U MHC byl vyšetřen druhý exon genů II. třídy *DRB2* (303 bp) a *DQB2* (522 bp). Pro analýzu genu *CR1-L* byly vybrány oblasti promotoru až intron 2 (1820 bp), intron 13 (1487 bp) a intron 15 (1118 bp). U genu *KIR3DL1* se vyskytly problémy při amplifikaci. Proto byly z genů NKR vyšetřeny geny *NCR1* (exon 1 až 4 - 2417 bp), exon 4 až 7 (1773 bp) a *NCR3* (kódující oblast 2501 bp). Primery pro amplifikaci genů *DRB2*, *DQB2*, *TLR3*, *TLR7* a *TLR8* byly již na ústavu genetiky používané, ostatní primery byly nově navrženy na základě koňského referenčního genomu EquCab2.0. Za ortologní gen lidského CR2 byl u koní považován *CR1-like* (Gene ID:100057298). PCR produkty byly sekvenovány ve třech bězích NGS umožňujících individuální genotypování. V genech *DRB* a *DQB* byly vyhodnoceny haplotypové sekvence dlouhé 180 bp, což umožnilo přiřadit vzorky ke známým alelovým sekvencím podle databáze Genbank. V ostatních genech byly identifikovány jednonukleotidové polymorfismy (SNPs). Vybrané sekvence byly potvrzeny pomocí Sangerova sekvenování. U čtyř genů *KLRA* (dříve *Ly49*) (*LY49A*, *LY49B*, *LY49D* a *LY49*) bylo provedeno genotypování 4 SNP pomocí PCR-RFLP. Další variabilita v MHC a KLR oblastech byla studována pomocí sad mikrosatelitních markerů vyvinutých v naší výzkumné skupině Ceitec. Pro účely asociační analýzy byla přítomnost/nepřítomnost virového genomu určena na základě dynamiky křivek duplex qPCR. Analýza asociací mezi přítomností/nepřítomností virového genomu EHV-2 a EHV-5 a polymorfními markery byla provedena pomocí Fisherova testu.

Výsledky

Virologická vyšetření. Byla získána částečná sekvence genu pro DNA terminázu u 9 izolátů EHV-2 a u 2 izolátů EHV-5. Byla potvrzena možnost superinfekce téhož zvířete dvěma různými kmeny viru EHV-2 izolovanými v tutéž dobu. Promořenost populace oběma gamaherpesviry se zdá být

značná, přičemž k reaktivaci dochází častěji u EHV-2. Virologické vyšetření nosních stěrů hřibat naznačuje, že jsou virem EHV-2 nakažena v nižším věku na rozdíl od viru EHV-5, kde dochází k primoinfekci později pravděpodobně kvůli méně častým reaktivacím viru u klisenmatek. V populačním vzorku hřibat docházelo k prvním záchytům viru EHV-2 již těsně po narození, ale koncentrace viru ve vzorcích byly malé, což svědčí spíše o pasivním přenosu z matky na hříbě než o aktivní infekci. Titry, odpovídající aktivnímu vylučování replikujícího se viru se objevují u většiny koní mezi 6. a 12. týdnem života. K prvním záchytům EHV-5 jsme dospěli výjimečně ve 12. týdnu v nízkých titrech, aktivní infekce pak byla zaznamenávána u většiny hřibat ve věku 24 týdnů. U dospělých koní (pacientů KCHK) nebyla přítomnost EHV potvrzena u všech jedinců s klinickým podezřením na EHV, zatímco koně bez klinických EHV příznaků byli v několika případech EHV pozitivní. Z celkem 70 vyšetřených vzorků byl EHV-2 detekován ve 22 (31%), EHV-5 v 11 (16%) a oba viry v 5 (7%) případech. Tato data byla využita pro asociační analýzy.

Genetická analýza vnímavosti hostitele k infekci. Nalezené jednonukleotidové polymorfismy kandidátních genů jsou shrnuty v Tabulce 1.

Tabulka 1: Identifikované jednonukleotidové polymorfismy (SNPs).

Gen	Počet vyšetřených zvířat	Exonové SNP	Intronové SNP
CR1-L	65	2	23
TLR3	44	4	0
TLR7	67	1	0
TLR8	67	5	0
NCR1	70	2	8
NCR3	16	0	2

V případě MHC bylo sestaveno 9 a 11 haplotypů pro geny *DQB*, respektive *DRB*. Statisticky významné ($p < 0.05$) asociace s infekcí gamaherpesviru byly nalezeny pro markery *LY49B*, *LY49F*, *DRB*, *TLR7*, *CR1-L* a pro 5 mikrosatelitních markerů MHC a 8 mikrosatelitních markerů KLR, přičemž z těchto byly u tří pozorovány asociace na hladině $p < 0.001$.

Seznam literatury

1. BELL, Stephanie A., Udeni B. R. BALASURIYA, Robert W. NORDHAUSEN a N. James MACLACHLAN. Isolation of equine herpesvirus-5 from blood mononuclear cells of a gelding. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2006, roč. 18, č. 5, s. 472–475. ISSN 1040-6387.
2. RUSHTON, James Oliver, Jolanta KOŁODZIEJEK, Alexander TICHY, Barbara NELL a Norbert NOWOTNY. Detection of equid herpesviruses 2 and 5 in a herd of 266 Lipizzaners in association with ocular findings. *Veterinary Microbiology* [online]. 2013, roč. 164, č. 1-2, s. 139–144. ISSN 1873-2542. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2013.01.035
3. HARTLEY, Carol A., Kemperly J. DYNON, Zelalem H. MEKURIA, Charles M. EL-HAGE, Steven A. HOLLOWAY a James R. GILKERSON. Equine gammaherpesviruses: perfect parasites? *Veterinary Microbiology* [online]. 2013, roč. 167, č. 1-2, s. 86–92. ISSN 1873-2542. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2013.05.031
4. WILLIAMS, Kurt J., N. Edward ROBINSON, Ailam LIM, Christina BRANDENBERGER, Roger MAES, Ashley BEHAN a Steven R. BOLIN. Experimental induction of pulmonary fibrosis in horses with the gammaherpesvirus equine herpesvirus 5. *PloS One* [online]. 2013, roč. 8, č. 10, s. e77754. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0077754
5. WLASIUK, Gabriela a Michael W. NACHMAN. Adaptation and Constraint At Toll-Like Receptors in Primates. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 2010, s. msq104. ISSN 0737-4038, 1537-1719. Dostupné z: doi:10.1093/molbev/msq104
6. RAPPOCCIOLO, Giovanna, James BIRCH a Shirley A. ELLIS. Down-regulation of MHC class I expression by equine herpesvirus-1. *Journal of General Virology* [online]. 2003, roč. 84, č. 2, s. 293–300. ISSN 0022-1317, 1465-2099. Dostupné z: doi:10.1099/vir.0.18612-0
7. TAMORI, Akihiro a Norifumi KAWADA. HLA class II associated with outcomes of hepatitis B and C infections. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2013, roč. 19, č. 33, s. 5395–5401. ISSN 2219-2840. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v19.i33.5395
8. SHANNON-LOWE, Claire a Martin ROWE. Epstein Barr virus entry; kissing and conjugation. *Current Opinion in Virology* [online]. 2014, roč. 4, s. 78–84. ISSN 1879-6265. Dostupné z: doi:10.1016/j.coviro.2013.12.001

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 114/2015/FVL.

Bakterie produkující beta-laktamázy širokého spektra u koní v ČR – analýza rizik a vyplývající preventivní opatření

Ludmila Kohoutová¹, Martina Masaříková¹, Petr Jahn¹, Monika Dolejská², Dominik Jelínek¹,
Ondřej Vitula¹, Alois Čížek¹

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární
hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²*

Úvod

Prevence a kontrola infekčních chorob má zásadní význam pro zdraví koní. Bakterie z čeledi Enterobacteriaceae, např. *E. coli* a *Klebsiella spp.*, bývají příčinou gastrointestinálních a extraintestinálních infekcí, zejména infekcí reprodukčních orgánů, měkkých tkání, kloubů a neonatálních sepsí s fatálním průběhem. Zmíněné infekce mohou negativně ovlivnit sportovní výkonnost a reprodukci koní (Maragakis et al., 2008). Prevalence bakterií čeledi Enterobacteriaceae s produkcí širokospektrých beta-laktamáz (Extended Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) celosvětově narůstá a tyto bakterie byly izolovány rovněž z koní (Schmiedel et al., 2014). K terapii těchto infekcí jsou využívána antibiotika, ale rostoucí antibiotická rezistence komplikuje jejich úspěšnost (EMEA, 2009).

Cílem tohoto projektu bylo stanovit prevalenci kolonizace koní v chovných zařízeních a na veterinárních klinikách bakteriemi druhu *E. coli* produkujícími ESBL. Nedílnou součástí projektu bylo stanovit míru rizika dalšího šíření těchto bakterií v rámci kliniky a chovu; definovat faktory umožňující kolonizaci a případnou následnou infekci koní těmito bakteriemi. Na základě výsledků projektu navrhnout preventivní a hygienická opatření pro snížení rizik kolonizace a infekce koní a přenosu rezistentních bakterií na další jedince.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Sběr vzorků probíhal na dvou veterinárních klinikách, další vzorky dodali terénní veterinární lékaři, kteří zasílají vzorky k bakteriologickému vyšetření do diagnostické laboratoře na Ústav infekčních chorob a mikrobiologie FVL VFU Brno. U několika hospitalizovaných koní byl odebrán trus nebo rektální výtěr při příjmu na kliniku, v průběhu hospitalizace (minimálně jednou za týden) a při

jejich propuštění. Pokud majitel koně vyjádřil souhlas, tak v případě prokázané kolonizace či infekce producenty ESBL byl také odebrán trus v období po propuštění pacienta.

Celkem jsme vyšetřili 336 vzorků zahrnujících trus, rektální výtěry, výplašky a výtěry dělohy, stěry z ran, kloubů, z pupku a stěry z prostředí kliniky (viz. Tabulka č. 1).

Izolace ESBL pozitivních *E. coli*

Metodika mikrobiologického vyšetření vzorků probíhala podle standardizovaných protokolů zavedených na pracovišti a uvedených v předchozích studiích (Dolejská et al., 2011). Vzorky byly kultivovány přímo na MacConkeyho agaru s cefotaximem (2 mg/L), při negativním nárůstu předcházelo tomuto selektivnímu kroku pomnožení v MacConkeyho bujónu. Izoláty rostoucí na půdě s cefotaximem, které vykazaly aktivitu k laktóze, byly identifikovány metodou MALDI – TOF MS (Bruker Daltonic, Německo). K dalšímu posouzení fenotypových vlastností byly vybrány izoláty *E. coli*.

Charakterizace fenotypových a genotypových vlastností rezistentních *E. coli*

Cefotaxim rezistentní *E. coli* byly vyšetřeny Double Disc Synergy testem (DDST) pro průkaz přítomnosti ESBL. U pozitivních izolátů byla následně vyšetřena citlivost ke dvanácti různým antimikrobiálním látkám – k ampicilinu, streptomycinu, směsi sulfonamidů, tetracyklinu, chloramfenikolu, sulfametoxazol/trimetoprimu, cefalotinu, kyselině nalidixové, gentamicinu, co-amoxicilinu, ciprofloxacinu a ceftazidimu diskovým difúzním testem (DDT).

U všech ESBL pozitivních *E. coli* byla izolována DNA, která sloužila jako templát pro identifikaci genů rezistence metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Byly prokazovány geny kódující ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} a *bla*_{OXA}). Získané amplikony byly použity pro specifikaci konkrétní varianty genu sekvenací. Metoda PCR byla použita na detekci přítomnosti plazmidových replikonů (Carattoli et al., 1005) a pro zařazení izolátů do fylogenetických skupin (Clermont et al., 2013).

Pulzní gelovou elektroforézou (PFGE) bylo provedeno srovnání klonální příbuznosti kmenů. Makrorestrikční profily byly porovnány softwarem BioNumerics (Applied Maths, Belgie) pro stanovení míry příbuznosti.

Výsledky

Izolace ESBL pozitivních *E. coli*

Z celkového souboru 336 vzorků bylo získáno 136 izolátů *E. coli* s rezistentních k cefotaximu (Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Prevalence ESBL pozitivních *E. coli* v odebraných vzorcích

Lokalita	Druh vzorku	Počet vzorků	Počet pozitivních	% pozitivních
1	trus	138	63	46
	výtěr z pochvy, dělohy	1	0	0
	stěr z prostředí	20	6	30
	rektální výtěr	10	8	80
	výplašek z dělohy	2	2	100
	stěr z rány	7	2	29
	tracheální aspirát	1	1	100
	synoviální tekutina	1	0	0
2	trus	14	1	7
	stěr z prostředí	17	4	24
	rektální výtěr	3	0	0
	stěr z rány	3	2	67
3	trus	12	2	17
	rektální výtěr	2	0	0
4	trus	21	18	86
	výtěr z pochvy, dělohy	26	3	12
	výplašek z dělohy	4	1	25
	sperma	1	0	0
5	trus	36	23	64
6	výtěr z pochvy, dělohy	11	0	0
	výplašek z dělohy	6	0	0
celkem		336	136	40

Charakterizace fenotypových a genotypových vlastností rezistentních *E. coli*

Nejčastěji se vyskytujícím fenotypem rezistence u ESBL pozitivních izolátů *E. coli* byla rezistence k ampicilinu, cefalothinu (129 vzorků) a streptomycinu (120 vzorků). Polymerázovou řetězovou reakcí jsme identifikovali geny kódující ESBL typu CTX-M u 97 izolátů ze 136. U 31 *bla*_{CTX-M} negativních *E. coli* byly ESBL kódovány geny *bla*_{SHV}, u tří geny *bla*_{TEM}. U posledních *bla*_{CTX-M} negativních izolátů byla prokázán jiný typ beta-laktamázy (AmpC). Plazmidy prokázané u sledovaného souboru *E. coli* byly zařazeny do tříd inkompatibility P, B/O, FIA, FIB, FIIA, Y, HI1, N, I1, X1, X2, X3 a X4. Nejčastěji prokazovanou fylogenetickou skupinou byla skupina B1. Na základě porovnání makrorestrikčních profilů získaných metodou PFGE, byla prokázána přítomnost shodných klonů ESBL pozitivních *E. coli* u koní chovaných v rámci stejných chovů. Dále jsme identifikovali shodný ESBL pozitivní klon ve stájovém prostředí veterinární kliniky a hospitalizovaných koní.

Závěry

- z koní byly izolovány ESBL pozitivní *E. coli* s nebezpečným rozsahem rezistence
- ESBL pozitivní *E. coli* byly izolovány také z prostředí, kde jsou koně ustájeny
- byl prokázán shodný ESBL pozitivní klon *E. coli* v prostředí veterinární kliniky a v trusu zde léčených koní
- hospitalizace koní v kontaminovaném prostředí může vést k jejich kolonizaci ESBL pozitivními *E. coli*
- někteří koně, kteří byli kolonizováni v průběhu hospitalizace na klinice s výskytem ESBL pozitivní *E. coli* v prostředí, vylučovali tyto *E. coli* i po několika měsících
- koně v rámci jednoho chovu mohou sdílet shodný klon ESBL pozitivní *E. coli*

Seznam literatury

1. Carattoli, [A.](#), Bertini, [A.](#), Villa, [L.](#), Falbo, [V.](#), Hopkins [K.L.](#), Threlfall, [E.J.](#) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 2005;63(3):219-28. Epub 2005 Jun 2.
2. Clermont, O., Christenson, J.K., Denamur, E., Gordon, D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*, 2013;5(1):58-65.
3. Dolejska, M., Duskova, E., Rybarikova, J., Janoszowska, D., Roubalova, E. Plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} and *qnr* genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother*, 2011;66(4):757-64.
4. EMEA, European Medicines Agency – Veterinary Medicines and Inspections. Reflection paper on the use of 3rd and 4th generation cephalosporins in food-producing animals in the European union: development of resistance and impact on human and animal health. London, 16 March 2009.

(http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004307.pdf).

5. Maragakis, L.L., Perencevich, E.N., Cosgrove, S.E. Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2008;6(5):751-63.
6. Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Domann, E., Bauerfeind, R., Prenger-Berninghoff, E. et al. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. *BMC Microbiology*, 2014;14:187. doi: 10.1186/1471-2180-14-187.

Tato studie byla financována grantem IGA 116/2015/FVL.

Kvantifikace humeroulnární inkongruity loketních kloubů psů pomocí počítačové tomografie

Robert Snášil, Alois Nečas, Pavel Proks, Andrea Nečasová, Karolína Michalčáková

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

Brno

Úvod

Dysplazie loketního kloubu je u velkých a obřích plemen psů nejčastější příčinou kulhání na hrudní končetinu. Inkongruita kloubních ploch je považována za důležitý faktor v rozvoji dysplazie loketního kloubu. Subjektivní odhad a objektivní měření radioulnární inkongruity *in vivo* pomocí rtg a CT vyšetření bylo již v literatuře popsáno. Humeroulnární (HU) inkongruita se hodnotí v klinické praxi převážně subjektivně. Význam HU inkongruity v etiopatogenezi dysplazie loketních kloubů není jednoznačně objasněn. Předpokladem zjištění významu HU inkongruity v etiopatogenezi dysplazie loketních kloubů je její objektivní měření. Měření inkongruity kloubních ploch v loketním kloubu z rtg snímků je zatíženo řadou chyb vyplývajících ze zobrazení trojrozměrného objektu v dvojrozměrném obraze. CT umožňuje zobrazit kostní podklad v tenkých řezech bez superpozice okolních tkání a je pokládána za zlatý standard v diagnostice inkongruity loketních kloubů u klinických pacientů. HU inkongruita byla doposud hodnocena pomocí CT pouze subjektivně a byla publikována pouze v jedné studii. Objektivní měření HU inkongruity *in vivo* pomocí počítačové tomografie nebylo, podle znalostí řešitelů, doposud v odborné literatuře publikováno.

Cílem práce bylo kvantifikovat HU inkongruitu pomocí CT vyšetření měřením indexu subluxace (IS) a porovnat ji s velikostí HU inkongruity naměřené z digitálních rentgenogramů.

Materiál a metodika

Materiál

Do studie bylo zařazeno 102 loketních kloubů 51 psů. Průměrný věk vyšetřených psů byl 2,78 roků (0,5-9). V souboru bylo 27 samců, 17 fen a 7 kastrovaných fen.

Rentgenové vyšetření a vyšetření počítačovou tomografií

Rtg a CT vyšetření loketních kloub bylo provedeno v celkové anestezii. Při rtg vyšetření byly zhotoveny tři projekce, mediolaterální (ML) extenzní v postojovém úhlu, ML flexní a

kraniokaudální šikmá projekce (Cr15L-MCdo). Ve stejné anestezii bylo provedeno CT vyšetření (helikální mód, kolimace 0,625 mm). Vyšetření bylo provedeno ve sternální poloze s předními končetinami v extenzi. Z takto získaných izotropických dat byly zhotoveny multiplanární rekonstrukce (MPR) v sagitální a dorzální rovině.

HU inkongruita byla měřena z ML rentgenogramů v postojovém úhlu a z CT sagitálních MPR zhotovených v sagitální rovině v programu JiveX.

Měření HU inkongruity

HU byla vyjádřena indexem subluxe. K měření indexu humeroulnární subluxe jsme použily dříve popsanou metodiku měření HU inkongruity. V MPR v sagitální rovině a na ML projekcích loketního kloubu v postojovém úhlu byla proložena kružnice, která svým tvarem nejvíce odpovídala kladkovému zářezu loketní kosti. Průměr kružnice byl vymezen vzdáleností mezi kranioventrálním okrajem processus anconeus a distálním okrajem kladkového zářezu ulny. Dále byla zhotovena kružnice, která svou velikostí nejvíce odpovídala velikosti kladky pažní kosti v sagitální rovině. Byla změřena vzdálenost mezi středy obou kružnic (x). Pro zohlednění velikosti loketního kloubu (resp. velikosti pacienta) byla tato vzdálenost vydělena poloměrem kružnice (r) vymezujícím kladku pažní kosti. Výsledný index humeroulnární subluxe (IS) kladky humeru udává míru kranální dislokace kladky humeru z kladkového zářezu loketní kosti ($IS = x/r$). (Obr. 1 a,b).

Analýza dat

Statistická analýza dat byla provedena v programu Excel (Excel 2010).



Obr.1a



Obr.1b

Obr. 1 Metodika měření indexu subluxe (IS) na rtg ML projekci loketního kloubu v postojovém úhlu (a). CT MPR sagitální rekonstrukce loketního kloubu určená k měření IS (b).

Výsledky

U 64,7 % (n= 66) loketních kloubů byl identifikován fragmentovaný processus coronoideus (FCP). U 35,3 % (n=36) loketních kloubů nebyla zjištěna žádná patologie. Průměrná velikost indexu subluxe (IS) naměřené na ML projekci loketního kloubu v postojovém úhlu byla 8,99 ($\pm 7,35$). Průměrná velikost indexu subluxe (IS) naměřené v MPR v sagitální rovině na CT byla 7,99 ($\pm 9,43$). Mezi těmito měřeními nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Mezi měřeními IS na rtg a na CT byla zjištěna střední korelace ($r = 0,49$).

Závěr

Mezi velikostmi HU inkongruity měřené *in vivo* z CT sagitálních MPR a z ML extenzních rentgenogramů loketních kloubů byla stanovena střední korelace a nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl. Před uvedením techniky měření HU inkongruity pomocí CT bude nutné ověřit opakovatelnost a reprodukovatelnost systému měření.

Seznam literatury:

1. COOL CHR, COOK JL. Diagnostic imaging of canine elbow dysplasia: a review. *Vet Surg* 2009, 38: 144-153.
2. KRAMER A, HOLSWORTH IG, WISNER E, KASS PH, SCHULZ KS. Computed tomographic evaluation of canine radioulnar incongruence in vivo. *Vet Surg* 2006, 35: 24-39.
3. PROKS P, NEČAS A, STEHLIK L, SRNEC R, GRIFFON DJ. Quantification of humeroulnar incongruity in labrador retrievers with and without medial coronoid disease. *Vet Surg* 2011, 40: 981-986.
4. SAMOY Y, GIELEN I, SAUNDERS J, VAN BREE H, VAN RYSSSEN B. Sensitivity and specificity of radiography for detection of elbow incongruity in clinical patients. *Vet Radiol Ultrasound* 2012, 53: 236-244.
5. SAMOY Y, GIELEN I, VAN CAELENBERG A, VAN BREE, DUCHATEAU L, VAN RYESSEN B. Computed tomography findings in 32 joints affected with severe elbow incongruity and fragmented medial coronoid process. *Vet Surg* 2012, 41: 486-494.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno IGA 118/2015/ FVL

Imunogenetická analýza vnímavosti k morbillivirové infekci u kytovců

Karla Stejskalová¹, Kristýna Hrazdilová², David Modrý², Petr Hořín¹

¹Ústav genetiky, FVL VFU, Ceitec RG 6

²Ústav Parazitologie FVL VFU, Ceitec RG 3

Úvod

Morbillivirus kytovců (CeMV) z čeledi Paramyxoviridae je původcem série epidemií s vysokou mortalitou u středomořských delfinů pruhovaných (*Stenella coeruleoalba*)¹. Cílem studie bylo: (1) rozšíření virologické diagnostiky o detekci infekcí CeMV u středomořských kytovců a průkaz CeMV u kytovců Černého moře sviňuch obecných (*Phocoena phocoena*), (2) Zjištění přítomnosti, sekvence a polymorfismů u vybraných genů antivirové obrany u modelových druhů, (3) Identifikace genetických faktorů přispívajících k rozdílné vnímavosti k infekci CeMV u *Stenella coeruleoalba*. Vybrané kandidátní geny: SLAM, PVRL4, BSG – buněčné receptory pro virový hemaglutinin a cyclophilin B^{2,3}; TLR3,7,8 - evolučně konzervované, specifický motiv (ds,ssRNA virů) rozeznávající receptory⁴; SLC11a1 - transportní protein, který je součástí membrány fagolysosomů, ovlivňuje schopnost makrofágů eliminovat intracelulární patogeny; MHC – DQB - polymorfismy u tř.II u kytovců jsou dobře popsány⁵; NK receptory – KIR, KLRA, NCR1 – jejich existence u kytovců je nejasná.

Materiály a metodika řešení projektu

Modelové druhy: *Stenella coeruleoalba*, *Phocoena phocoena*

Biologický materiál: Vzorky pocházely z odběrů tkání v různém stupni rozkladu z přirozeně uhynulých kytovců vyvržených na břeh Středozemního a Černého moře, uložených v kryobankách University of Teramo a University of Valencia, It, a National Institute for Marine Research and Development, Constanta, Ro. Bohužel se ukázalo, že původní odhad italských partnerů byl značně naddimenzovaný a pro účely naší studie nakonec mohlo být vybráno pouze 33 vzorků *Stenella coeruleoalba* a 6 vzorků *Phocoena phocoena*. Vzorky sér i tkání byly zamrazeny na -80°C. 9 vzorků *Stenella coeruleoalba* bylo virologicky vyšetřeno na přítomnost CeMV spolupracujícími institucemi. U 6 z nich byla zjištěna přítomnost CeMV.

Detekce CeMV: K optimalizaci detekce CEMV u dosud nevyšetřených vzorků byly vybrány vzorky se známým CEMV statutem (2 negativní, 1 pozitivní), z nichž byla izolována celková RNA dvěma různými metodami (TriReagent, NucleoSpin RNA kit Macherey-Nagel). Tato byla následně použita pro reverzní transkripci (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, ThermoFisher Scientific) jak za použití CEMV specifického primeru, tak random hexamerů. Množství RNA pro reverzní transkripci bylo optimalizováno

v rozsahu jednotek až stovek nanogramů. K amplifikaci 1358 nt fragmentu z oblasti N a P proteinu byly využity primery CEMV N1 a CEMV P2⁶. Specifita reakce ověřena sekvenováním (Macrogen, Netherland).

Vyšetření kandidátních genů: Pro část kandidátních genů je známa pouze parciální genová sekvence (SLAM, MHC DQB) u *Stenella coeruleoalba*, u ostatních genů není známa vůbec. Primery pro amplifikace vybraných úseků kandidátních genů byly proto navrženy na základě známé genomové sekvence ostatních kytovců: *Tursiops truncatus*, *Orcinus orca*, *Lipotes vexillifer*, *Physeter catodon*, *Balaenoptera acutorostrata*. Genomová DNA byla izolována kitem JETquick, Genomed. PCR amplifikované úseky byly individuálně sekvenovány ve třech runech NGS (MiSeq, Illumina) a vybrané sekvence ověřeny Sangerovým sekvenováním (Macrogen, Netherland). Bioinformatické zpracování dat za použití software Tablet, BioEdit, SamTools, Gatk, VarScan stále probíhá. Po jeho ukončení bude provedena asociační analýza vztahu nalezených polymorfismů k vnímavosti k CeMV u *Stenella coeruleoalba* a to s použitím standardních statistických nástrojů, přičemž jako vnímaví budou označeni jedinci s pozitivním nálezem CeMV ve tkáni; k závěrům virologického vyšetření bude přihlédnuto.

Výsledky

1. Virologické vyšetření. Z celkového počtu 24 virologicky dosud nevyšetřených jedinců *Stenella coeruleoalba* byla provedena detekce CeMV u 21 z nich. Pro zbývající 3 jedince nebyla k dispozici vhodná tkáň (plíce, mozek). Sekvence virových izolátů odpovídala publikované sekvenci KR377460. Sekvence izolátů u *Phocoena phocoena* zatím nebyla potvrzena.

Celková prevalence virové infekce u vyšetřených vzorků je uvedena v tab. 1.

CeMV status	pozitivní	dubiózní	negativní *
<i>Stenella coeruleoalba</i>	9 (6+3)		21(3+18)
<i>Phocoena phocoena</i>		2	4

Tab.1 Výsledky detekce viru CeMV u obou druhů.

* Vzhledem k nízké odolnosti virů z čeledi Paramyxoviridae (rychlá degradace RNA) a vysokému stupni rozkladu některých testovaných jedinců (osm jedinců se stupněm 3 a vyšším) lze předpokládat falešnou negativitu části testovaných vzorků.

2. Genetická vyšetření. Sekvence specifické pro *Stenella coeruleoalba* a *Phocoena phocoena* byly na základě zpracování NGS dat určeny pro všechny amplifikované oblasti kandidátních genů, s výjimkou KLRA, jehož existenci se nepodařilo prokázat ani u jednoho z obou druhů; u genu KIR byla u obou druhů prokázána přítomnost pouze fragmentární sekvence odpovídající exonu 1-3. Sangerovo sekvenování

potvrdilo správnost stanovených sekvencí. Zatím nalezené polymorfismy shrnují tab.2 a 3. Analýza polymorfismů u vzorků *Phocoena phocoena* zatím čeká na bioinformatické zpracování.

Gen	Zkoumaná oblast	Vyšetřených vzorků	Snp+ in/del celkem	Nonsyn snp
SLAM	Exony 2,6-7	32	25	4
PVRL4	Exony 2-8	30	53	4
BSG	Kompletní cds	32	82	5
TLR3	Exony 2-3, 4-5	16	19	5
TLR7	Exon 3	30	4	0
TLR8	Exon 2	32	13	8
NCR1	Kompletní cds	16	14	7
SLC11a1	Kompletní cds	30	75	1

Tab.2 Přehled nalezených polymorfních míst v kandidátních genech (mimo MHC-DQB) u *Stenella coeruleoalba*

U genu MHC-DQB byla vyšetřena oblast exonu 2, a to celkem u 31 vzorků *Stenella coeruleoalba* a 2 vzorků *Phocoena phocoena*. Celkem osm jedinců bylo v tomto lokusu homozygotních.

Alela	Frekvence	Alela	Frekvence
DQB_StC_a	0,03	DQB_StC_k	0,03
DQB_StC_b	0,03	DQB_StC_l	0,03
DQB_StC_c	0,05	DQB_StC_m	0,03
DQB_StC_d	0,10	DQB_StC_n	0,03
DQB_StC_e	0,03	DQB_StC_o	0,03
DQB_StC_f	0,08	DQB_StC_p	0,02
DQB_StC_g	0,26	DQB_StC_q	0,02
DQB_StC_h	0,06	DQB_StC_r	0,02
DQB_StC_i	0,08	DQB_PhP_a	0,75
DQB_StC_j	0,06	DQB_PhP_b	0,25

Tab.3 Přehled nalezených alel exonu 2 MHC-DQB a jejich pozorované četnosti u obou druhů

Závěr

Byla vypracována metodika detekce CeMV u obou studovaných druhů. Z 21 vyšetřených vzorků *Stenella coeruleoalba* byly 3 pozitivní, avšak lze oprávněně předpokládat, že část vzorků vykazuje falešnou negativitu. Asociační studie vezme tuto skutečnost v potaz, stejně jako nízký počet vzorků.

Vypracování metodiky detekce viru i pro druh *Phocoena phocoena* dále umožní studium přítomnosti CeMV v této izolované populaci a identifikaci přítomných kmenů viru.

Byly získány unikátní druhově specifické sekvence genů SLAM, PVRL4, BSG, TLR3,7,8, SLC11a1 a NCR1 a u většiny vzorků individuální genotypy. Zatím bylo v těchto genech nalezeno celkem 285 polymorfních míst, z toho 36 mělo charakter nesynonymní substituce v kódující oblasti. Tyto substituce vedou k záměně aminokyseliny v syntetizovaném proteinu a mohou mít funkční význam, zvláště jedná-li se o změnu aminokyseliny ve funkční doméně proteinu nebo vazebném místě receptoru. Dále bylo zjištěno, že u obou druhů se vyskytuje pouze fragment původního genu KIR (stejně jako u ostatních kytovců), ačkoliv fylogeneticky příbuzní přežvýkavci mají v genomu bohatou KIR genovou rodinu. Rovněž se nepodařilo prokázat přítomnost KLRA receptoru a zdá se, že u studovaných druhů se tento gen nevyskytuje. Značná variabilita haplotypů byla zjištěna v oblasti druhého exonu HLA-DQB. Všechny sekvence DQB lze považovat za nové, neboť zahrnují delší oblast než je běžně studována.

Závěrem lze říci, že studie splnila stanovené cíle s tím, definitivní závěry budou učiněny po dokončení všech analýz získaných dat. Přínosem studie je také v neposlední řadě získání materiálu pro studium dalších infekcí vyšetřených zvířat.

Seznam literatury

1. DI GUARDO, G., MAZZARIOL, S., 2014. Cetacean morbillivirus in Northern and Southern Hemispheres. *Front Microbiol* **5**. doi:10.3389/fmicb.2014.00211
2. SHIMIZU, Y. et al, 2013. Amino acid sequence variations of signaling lymphocyte activation molecule and mortality caused by morbillivirus infection in cetaceans. *Microbiol Immunol* **57**, 624–632. doi:10.1111/1348-0421.12078
3. WATANABE, A. et al., 2010. CD147/EMMPRIN acts as a functional entry receptor for measles virus on epithelial cells. *J. Virol.* **84**, 4183–4193. doi:10.1128/JVI.02168-09
4. JANSSENS, S., BEYAERT, R., 2003. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 637–646. doi:10.1128/CMR.16.4.637-646.2003
5. ARBANASIĆ, H. et al., 2014. Major histocompatibility complex class II variation in bottlenose dolphin from Adriatic Sea: inferences about the extent of balancing selection. *Mar Biol* **161**, 2407–2422. doi:10.1007/s00227-014-2515-6

6. BELLIÈRE, E.N. et al., 2011. Phylogenetic analysis of a new Cetacean morbillivirus from a short-finned pilot whale stranded in the Canary Islands. *Research in Veterinary Science* **90**, 324–328. doi:10.1016/j.rvsc.2010.05.038

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 119/2015/FVL.

Měření úhlu tibiálního plató na rentgenových snímcích a na sagitálních reformátech počítačové tomografie kolenního kloubu u psů

Ladislav Stehlík, Michaela Paninárová

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

Úvod

Ruptura předního zkříženého vazů (LCCr) je nejčastějším onemocněním pánevních končetin středních a velkých plemen psů.¹ Úhel tibiálního plató (TPA) má vliv na laxitu kolenního kloubu s rupturou LCCr.² Pro stabilizaci kolenního kloubu s poškozeným LCCr jsou v současné době nejvíce používané tzv. dynamické metody, u kterých se provádí různé typy osteotomie tibie. Cílem těchto chirurgických zákroků je změna biomechaniky kolenního kloubu s poškozeným LCCr.³ Běžně používaná metoda měření TPA (zlatý standard) vyžaduje rentgenový (rtg) snímek celé tibie.^{4,5} Na těchto snímcích je pak možno zakreslit osu celé tibie, která je nutná pro změření TPA dle zlatého standardu. V klinické praxi, a s ohledem na radiační bezpečnost, se však nejčastěji zhotovuje rtg snímek kolenního kloubu zobrazující pouze distální femur a proximální tibi. Zatím byla publikována pouze jedna studie popisující měření TPA z rtg snímků zobrazujících pouze proximální tibi. Z výsledků této studie vyplývá, že pro měření TPA jsou vhodnější metody využívající delší osu tibie.⁵ Osy proximální tibie z této publikace nebyly paralelní s osou celé tibie, a to může vést k nepřesným výsledkům. Přesnějších výsledků může být dosaženo metodou, která využívá k měření TPA osu proximální tibie paralelní s osou celé tibie. Dosud nebyla publikovaná studie, která by potvrdila správnost této hypotézy. V této studii bude k měření TPA použita modifikovaná metoda, která bude srovnána s metodou zlatého standardu.

Materiál a metodika

Do studie byli zařazeni psi středních a velkých plemen, kteří byli referováni na Oddělení zobrazovacích metod, Kliniky chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno s podezřením na onemocnění kolenního kloubu a v rámci diagnostických procedur podstoupili rentgenologické (rtg) vyšetření a vyšetření počítačovou tomografií (CT). Vyšetření probíhalo v sedaci nebo celkové anestezii. Pro účely studie byly zhotoveny rtg snímky obou kolenních kloubů v mediolaterální (ML) projekci zobrazující kolenní kloub a celou tibi i s tarzálním kloubem. Rtg paprsek byl centrován na střed diafýzy tibie. Pro účely CT vyšetření byli psi ve sternální poloze s maximální extenzí zadních končetin. Rozsah vyšetřované oblasti byl od distální diafýzy femuru po

metatarzální kosti. Po nativním CT vyšetření byla studie zopakována s aplikací iodové neionické kontrastní látky (600 – 700 mg/kg i.v.; Iomeron 300, Bracco, Německo; Xenetix 300, Guerbet, Francie). Pro účely CT měření byl zhotoven reformát v sagitální rovině zobrazující všechny struktury potřebné pro měření. Tento snímek byl uložen v archivačním systému kliniky (PACS). Všechna opakovaná měření daného kolenního kloubu tak mohla být prováděna na stejném snímku.

TPA bylo změřeno dvěma různými metodami na rtg i CT snímcích. První metoda (TA-0) je zlatý standard pro měření TPA na rtg snímku. Linie představující tibiální plató (TP) byla určena kraniálním okrajem kloubní plochy tibie a kaudálním okrajem mediálního kondylu tibie. Dlouhá osa celé tibie probíhala od proximálního okraje *eminentia intercondylaris* až ke středu kladky talu. Úhel mezi linií TP a kolmicí k ose je TPA. Druhá metoda (TA-2i) byla naše modifikace již dříve publikované metody pro měření TPA pomocí osy proximální tibie. Linie TP byla určena stejně jako v předchozí metodě. Proximální bod osy tibie byl proximální okraj *eminentia intercondylaris*. Pro určení distálního bodu byla vytvořena kružnice se středem ve vrcholu *eminentia intercondylaris* a poloměrem rovným dvojnásobku šířky proximální tibie (PTW). PTW je změřeno mezi nejkraniálnějším bodem *tuberositas tibiae* a kaudálním okrajem mediálního kondylu tibie. V místě kde protíná kružnice vnitřní okraj kaudálního kortexu tibie je druhý bod pro osu proximální tibie. TPA je definován stejně jak u předchozí metody, tj. úhel mezi linií TP a kolmicí k ose proximální tibie. Všechna měření byla provedena nezávisle dvěma hodnotiteli a zopakována s týdenním odstupem od prvního měření. Hodnoty TPA byly zaznamenány a podrobeny statistické analýze pomocí komerčního programu Minitab, verze 16 (Minitab Inc., Coventry, Velká Británie). Pro určení rozdílu hodnot TPA mezi modalitami a mezi jednotlivými metodami byl použit párový t-test. Statistická významnost byla určena jako $p < 0,05$. Pro určení variability měřícího procesu byla použita analýza systému měření.

Výsledky

Do studie bylo zařazeno celkem 28 kolenních kloubů 14 psů. Některé snímky byly vyřazeny z důvodu chybného polohování nebo z důvodu nezobrazení tarzálního kloubu na rtg nebo CT snímcích. Pro měření TPA dle metody TA-0 bylo použito pouze 9 kolenních kloubů od 5 psů a pro metodu TA-2i 21 kolenních kloubů od 11 psů. Pro porovnání měření mezi modalitami a metodami bylo použito pouze první měření jednoho hodnotitele. Všechna měření obou hodnotitelů pak byla použita pro určení variability měření v této studii. Nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami TPA změřenými metodou TA-0 ($p=0,889$) a ani metodou TA-2i ($p=0,603$) při porovnání rtg vs. CT. Rovněž nebyl zjištěn statistický rozdíl mezi hodnotami TPA při porovnání obou metod vzájemně (TA-0 vs. TA-2i) z rtg měření ($p=0,161$) a ani z CT měření ($p=0,126$).

Podle výsledků analýzy systému měření je největším zdrojem variability reprodukovatelnost (variabilita vzniklá měřením stejného objektu různými hodnotiteli). Hodnoty této variability přesahovaly 30 % pro všechny modalitty a metody měření. Hodnota 30 % je obecně považována za neakceptovatelnou.

Závěr

Na základě našich měření nebyly prokázány rozdíly hodnot TPA získaných pomocí modifikované metody TA-2i v porovnání s metodou zlatého standardu, která je obecně akceptována a rutinně využívána pro měření TPA v klinické praxi. CT měření bylo zahrnuto z důvodu přesnějšího zobrazení struktur nutných pro měření TPA. Vzhledem k superpozici struktur na rtg snímku není vždy možné přesně definovat body nutné pro měření TPA. Tato situace je horší v případě, že už jsou rozvinuty osteoartrotické změny. Z výsledků vyplývá, že ačkoli CT poskytuje přesnější zobrazení kostního podkladu, tak nebyly zaznamenány významné rozdíly v hodnotách TPA. Vzhledem k malému počtu změřených objektů nelze vyvodit jednoznačné závěry, ale můžeme předpokládat, že metoda TA-2i by mohla být použita pro měření TPA.

Seznam literatury

1. DUVAL, JM, BUDSBERG, SC, FLO, GL A SAMMARCO, JL. Breed, sex, and body weight as risk factors for rupture of the cranial cruciate ligament in young dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 1999. **215**(6), 811–814.
2. SLOCUM, B A DEVINE, T. Cranial tibial thrust: a primary force in the canine stifle. *J Am Vet Med Assoc*, 1983. **183**(4), 456–459.
3. BOUDRIEAU, RJ. Tibial plateau leveling osteotomy or tibial tuberosity advancement? *Vet Surg*, 2009. **38**(1), 1–22.
4. CAYLOR, KB, ZUMPANO, CA, EVANS, LM A MOORE, RW. Intra- and interobserver measurement variability of tibial plateau slope from lateral radiographs in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 2001. **37**(3), 263–268.
5. ABEL, SB, HAMMER, DL A SHOTT, S. Use of the proximal portion of the tibia for measurement of the tibial plateau angle in dogs. *Am J Vet Res*, 2003. **64**(9), 1117–1123.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 120/2015/FVL.

Využití endoskopie v diagnostice zánětlivých změn bachorové sliznice způsobené subakutní bachorovou acidózou

Martin Romanský, Josef Illek, Jana Šmídková, Jaroslav Chyba

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

Úvod

Subakutní bachorová acidóza (SARA) patří v současné době mezi nejčastější bachorové dysfunkce u vysokoprodukčních dojnic. Studie dělané ve Spojených státech ukazují její výskyt u 19% dojnic na začátku laktace a 26% dojnic uprostřed laktace¹. Ve studii provedené v Německu a Nizozemsku byl výskyt onemocnění u dojnic na začátku laktace 11% a uprostřed laktace 18%. Ekonomické ztráty způsobené tímto onemocněním spočívají zejména ve snížené produkci mléka, změně obsahových látek v mléce a dřívějším vyřazování zvířat.² Diagnostika subakutní bachorové acidózy je obtížná, protože klinické projevy jsou nevýrazné. V diagnostice se využívají hlavně paraklinická vyšetření, zejména analýza bachorové tekutiny, vyšetření krve a stanovení obsahu tuku ve vzorcích mléka.³ Vlivem bachorové acidózy dochází k zánětu sliznice bachoru a k parakeratóze bachoru.^{4,5} Cílem projektu bylo zjistit možnosti využití endoskopie, jako neinvazivní metody pro zjištění změn bachorové sliznice v chovu vysokoprodukčních dojnic s výskytem subakutní bachorové acidózy.

Materiál a metodika

Pro řešení projektu byl vybrán chov vysokoprodukčních dojnic, ve kterém byla v minulosti diagnostikována subakutní bachorová acidóza na základě vyšetření bachorové tekutiny a výsledků obsahu tuku v mléce. Bylo vybráno 6 dojnic s nejvyšší užitkovostí , u nichž lze předpokládat nejvyšší příjem krmiva. Jako kontrolní skupina bylo zvoleno 6 krav, hospitalizovaných na Klinice chorob přežvýkavců a prasat , které byly krmeny pouze senem a obilným šrotem. Před endoskopií byla u zvířat odebrána bachorová tekutina pro její laboratorní vyšetření s pomocí bachorové sondy, zavedené přes ústní dutinu. Pro endoskopii byl použit flexibilní endoskop STORZ gastro pack o pracovní délce 250,0cm a bioptické kleště KARL STORZ s vnějším průměrem 2,3 mm, pracovní délkou 300 cm. Před samotným zákrokem byla zvířata sedována 1 ml 2% xylazinu podaným intravenózně do ocasní žíly. Po nástupu sedace, byl bachor přes břišní stěnu insuflován vzduchem

s pomocí intravenózní kanyly VASOVET 14G 2,2x100mm. Poté byl do dutiny ústní zaveden rozvěrač, který chránil endoskop před jeho poškozením zubama zvířete. Endoskop byl zaveden přes jícn do bachoru, kde byly s pomocí bioptických kleští odebrány bioptické vzorky bachorových papil. Vzorky byly poté fixovány ve formalinu a poslány k histologickému vyšetření.

Výsledky

Při endoskopickém vyšetření bylo možné zavést endoskop pouze do dorsálního bachorového vaku, díky matraci vytvořené v bachoru z přijaté potravy endoskop neklesl do bachorové tekutiny a bylo jím možné vyšetřit alespoň dorsální bachorový vak. U kontrolní skupiny krav, jejíž příjem potravy není tak velký jako u vysokoprodukčních dojnic, byla bachorová sliznice po insuflaci bachoru vzduchem poměrně dobře pozorovatelná. Velkou komplikací byly při odběru biopsie sliznice bachorové rotace, které probíhaly neustále během vyšetření a velmi ztěžovaly odběr vzorků kvůli neustálým pohybům potravy a endoskopu v bachoru.

Kontrolní skupina :



Obr.1: bachor po insuflaci
vzduchem

obr.2: bachorová sliznice

obr.3: detail bachorových papil

Při endoskopii vysokoprodukčních dojnic byla největší komplikací naplněnost bachoru, vzhledem k vysokému příjmu krmiva u této kategorie zvířat. Přes neustálé bachorové rotace a promíchávání potravy byla bachorová sliznice jen těžko přístupná, většinou jen na pár sekund, což velmi ztěžovalo odběr vzorků. Pouze u 2 ze 6 krav se u této kategorie podařilo odebrat bioptické vzorky.

Odebrané bioptické vzorky byly ve většině případů tvořeny pouze povrchovým dlaždicovým epitelem, nebo fragmenty epitelu. Pro posouzení případných změn by bylo potřeba odebrat vzorky z hlubších vrstev sliznice, což díky neustálým bachorovým rotacím a přítomností potravy v bachoru nebylo možné.



obr.4: naplněnost bachoru u vysokoprodukční dojnice 1

obr.5: naplněnost bachoru u vysokoprodukční dojnice 2

obr.6: detail bachorových papil u vysokoprodukční dojnice

Závěr

Pro posouzení patologických změn bachorové sliznice při subakutní bachorové acidóze, není tato metoda vhodná kvůli velmi obtížné vizualizaci bachorové sliznice během neustálých bachorových rotací, které znemožňují zobrazení sliznice na déle než několik sekund. Vzorky odebrané tímto způsobem obsahovaly pouze porchový dlaždicový epitel nebo jeho fragmenty, což k posouzení patologických lézí v bachorové sliznici nebylo dostatečné.

Seznam literatury

1. E.F. Garret, K.V. Nordlund, W.J. Goodger, G.R. Oetzel A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows . Journal of Dairy science, 80 (Suppl.1) (1997), p.169
2. Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., Noordhuizen, J. P. Subacute Ruminant Acidosis (SARA). Journal of Veterinary Medicine Series A, 2003, 50, 8, 406-414
3. Jörg M.D. Enemark. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. Veterinary Journal Volume 176, Issue 1, April 2008, Pages 32–43
4. G.Dirksen. Der Pansenazidose-Komplex – neuere Erkenntnisse und Erfahrungen (1). Tierärztliche Praxis, 13 (1985), pp.501-512
5. C.R. Krehbiel, R.A. Britton, D.L. Harmon, T.J. Wester, R.A. Stock. The effect of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. Journal of Animal Science, 73 (1995), pp. 3111–3121

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 121/2015/FVL.

Zhodnocení účinnosti a bezpečnosti injekční aplikace selenopyranu u odstávčat

Martin Svoboda, Jonáš Vaňhara, Jan Vašek, Barbora Vopatřilová

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, FVL, VFU Brno

Úvod

Selen patří mezi látky s výraznými antioxidačními účinky. Selen je součástí enzymu glutathionperoxidázy (GPx). U prasat se v souvislosti s nedostatkem selenu a vitamínu E popisuje tzv. VESD syndrom (Vitamin E - Selenium Deficiency). Má za následek degenerativní myopatii srdeční a kosterní svaloviny a nekrózu jater (hepatosis dietetica). Tento syndrom se objevuje nejčastěji u rychle rostoucích prasat obvykle v období po odstavu (3 týdny až 4 měsíce věku). Nedostatek selenu u prasat může mít i další nepříznivé následky. Negativními projevy působení oxidačního stresu mohou být poruchy metabolismu a imunosuprese. To může přispívat ke vzniku zdravotních problémů u selat (Likkesfeldt and Svendsen, 2007).

Odstav selat představuje zvýšené riziko vzniku oxidačního stresu. Odstavená selata proto potřebují větší úroveň antioxidační ochrany organismu. Prevence nedostatku selenu u prasat je dosahováno jeho přidáváním do krmiva. Jako problematická se jeví kategorie selat po odstavu, to je v období přechodu z mléčné výživy na pevné krmivo. Proto bývá příjem krmiva po odstavu nedostatečný. Kromě toho se u selat po odstavu často setkáváme s průjmovými onemocněními, které mohou významným způsobem snižovat množství selenu přijatého z krmiva.

Jako řešení se nabízí preventivní injekční aplikace selenu selatům po odstavu. Výhodou je možnost přesného dávkování a rychlý nástup účinku. Kromě toho nedochází ke snižování využitelnosti selenu v důsledku gastrointestinálních poruch.

Doposud byla k tomuto účelu používána anorganická forma selenu, tzn. seleničitan sodný. Vzhledem k tomu, že se nejedná o depotní přípravek, má omezenou dobu účinku a je nutno používat nižších dávek. Při použití vyšších dávek existuje riziko negativního působení na organismus selat někdy až s projevy otravy (Stewart et al. 1999). Pokud je použito příliš vysokých dávek selenu nedochází již ke snižování oxidačního stresu ale k jeho zvyšování. Fyziologické i toxické dávky selenu jsou metabolizovány stejnými metabolickými drahami. Přitom vzniká superoxid, peroxid vodíku a kyslíkové radikály. V poslední době narůstá zájem o nahrazování anorganického selenu organickým. Výhoda organického selenu spočívá v tom, že je méně toxický a má vyšší biologickou dostupnost (Kim et Mahan, 2001). Doposud byly organické formy selenu (hlavně selenem obohacené kvasinky) používány jako doplněk do krmiva.

Selenopyran představuje organickou formu selenu, kterou je možno aplikovat injekčně. Tento organický zdroj selenu obsahuje 24% Se a má několik výhod. Je rozpustný v tuku, vytváří depo, ze kterého je selen postupně uvolňován podle potřeb organismu (Boryavev and Kravchenko, 2006). Z tohoto důvodu je možno předpokládat i jeho nižší toxicitu v porovnání s anorganickým seleničitanem sodným. Možnost využití zvýšených dávek organické formy selenu při injekční aplikaci, které by sloužily jako déle trvající zdroj selenu a zároveň byly pro organismus bezpečné, by mohlo mít významný praktický přínos.

Minimální toxická dávka v případě injekční aplikace anorganického selenu pro prasata je 0,9 mg Se/kg. Podle publikovaných údajů nehrozí úhyn prasat při použití maximální dávky 0,8 mg Se/kg (Van Vleet et al. 1974). V našem experimentu jsme se rozhodli použít injekční dávku 0,44 mg Se/kg. Tuto dávku lze považovat za zvýšenou nikoli však toxickou.

Cílem našeho experimentu bylo zjistit vliv přídatné dávky selenu ve formě injekčně aplikovaného selenopyranu na organismus prasat a porovnat ho se stejnou dávkou anorganického seleničitanu sodného. Zároveň byla zhodnocena účinnost těchto preparátů jako zdroje selenu pro organismus.

Materiály a metodika

Pokus byl realizován v podmínkách experimentální stáje Kliniky chorob přežvýkavců a prasat, v pavilonu Profesora Dražana VFU Brno. Byla použita selata odstavená ve věku 28 dnů. Selata byla rozdělena do tří skupin. Každá skupina měla po 10 kusech. Aplikace jednotlivých preparátů byla provedena 7 dní po odstavu.

U první skupiny A byl aplikován i.m. selenopyran v dávce 0,44 mg Se na kg živé hmotnosti. Ve skupině B byl aplikován ve stejném věku i.m. seleničitan sodný ve stejné dávce. Ve skupině C byl injikován fyziologický roztok a bylo s nimi manipulováno stejně jako v ostatních skupinách

Přípravek selenopyran byl poskytnut výrobcem (Penza Agricultural Academy, Russia). Jeho injekční forma byla připravena pomocí sterilního olivového oleje. Přípravek je termostabilní. Seleničitan sodný byl zakoupen jako čistá chemická látka. Jedná se o látku rovněž termostabilní. V tomto případě byla použita voda pro injekci. Takto připravené roztoky byly sterilizovány v autoklávu.

Krev byla odebírána z vena cava cranialis pomocí sterilních jehel do zkumavek s aktivátorem srážení za účelem získání séra a do zkumavek s heparinem na krevní plazmu. Selata byla před každým odběrem krve vážena. První odběr byl proveden před aplikací injekčních roztoků. Druhý odběr byl uskutečnen za 48 hodin poté, třetí odběr 7 dní, čtvrtý odběr 14 dní a pátý odběr 21 dní po aplikaci.

Analýzy zahrnovaly následující vyšetření: koncentrace selenu a vit. E v séru, aktivita GPx, ALP, ALT, AST, GMT, CK, LDH a koncentrace kreatininu a močoviny v krevní plazmě. Jako biomarker poškození biologických systémů volnými radikály byl stanovován malondialdehyd v séru. Dále byla stanovena celková antioxidační kapacita krevní plazmy.

Výsledky

Po injekční aplikaci seleničitanu sodného došlo k výraznému nárůstu koncentrace selenu v séru již za 48 hodin po aplikaci. Poté začala koncentrace selenu postupně klesat a 21 dní po aplikaci dosahovala hodnot, které byly srovnatelné s kontrolní skupinou selat, ve které byl aplikován pouze fyziologický roztok.

V případě skupiny selat, kde byl aplikován injekčně selenopyran, byla situace odlišná. V průběhu pokusu byl sice zjištěn postupný nárůst koncentrace selenu v séru, nicméně tyto hodnoty byly v jednotlivých intervalech srovnatelné s kontrolní skupinou, kde byl selatům aplikován pouze fyziologický roztok.

V průběhu experimentu nebyly mezi jednotlivými skupinami zjištěny významné rozdíly v koncentraci GPx. Hodnoty dalších biochemických parametrů ALP, ALT, AST, GMT, CK, LDH a koncentrace kreatininu a močoviny v krevní plazmě zjištěné ve skupinách, kde byla provedena injekční aplikace selenu (seleničitan, selenopyran), se od kontrolní skupiny významně nelišily. Rovněž antioxidační kapacita krevní plazmy byla srovnatelná mezi skupinami.

Závěr

Z dosažených výsledků vyplývá, že významné navýšení koncentrace selenu v krevním séru selat bylo možné pouze injekční aplikací anorganického seleničitanu sodného. V případě selenopyranu došlo také k určitému navýšení, ale dosažené hodnoty se nelišily od kontrolní skupiny. Protože nárůst koncentrace selenu ve skupině ošetřené selenopyranem byl srovnatelný s kontrolní skupinou, lze předpokládat, že hlavním zdrojem selenu byl jeho příjem z krmiva. Možným vysvětlením jsou výrazné depotní vlastnosti injekčně aplikovaného selenopyranu a jeho pomalé zpracování v organismu selat.

Seznam literatury

1. Boryaev GI, Kravchenko, YuV 2006: Selenopyran is organic compound of selenium with original biological properties. International Congress Euromedica, Hannover, Germany.
2. <http://www.congress-euromedica.de/abstrakt/broshuere2006.pdf>
3. Kim YY, Mahan DC 2001: Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. J. Anim. Sci. 79: 942-948.

4. Likkesfeldt J, Svendsen, O 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173: 502 – 511.
5. Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC 1999: Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26: 42-48.
6. Van Vleet JF, Meyer KB, Olander HJ, Ruth GR 1974: Efficacy and safety of selenium-vitamin E injections in newborn pigs to prevent subclinical deficiency in growing swine. *Am. J. Vet. Res.* 36: 387 - 393.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 150/2015/FVL.

Diagnostika akutních bakteriálních mastitid prasnic po porodu

Jan Vašek¹, Jonáš Vaňhara¹, Kateřina Vidová¹, Barbora Prokešová¹, Martina Masaříková³, Jiří Smola^{1,2}

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

²*CEITEC VFU, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

³*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Jedním z tradičně popisovaných onemocnění prasnic po porodu je syndrom Mastitis-Metritis-Agalactia (MMA), jehož existenci však někteří autoři zpochybňují. Označují jej za mylný s ohledem na to, že metritis je zjišťována jen příležitostně, a o agalaktii se ve skutečnosti rovněž nejedná, protože často dochází pouze ke snížení sekrece. Doporučují rozlišovat klinicky samostatné akutní mastitidy a dále pak syndrom dysgalaktie post partum (PPDS), při kterém jsou pozorovány příznaky zpožděného růstu a hladovění selat, zatímco mléčné žlázy prasnice jsou nedotčeny (Martineau et. al. 2012). Mastitida u prasnice může být omezena na jednu mléčnou žlázu (uniglandular mastitis) nebo několik, případně všechny mléčné žlázy prasnice (multiglandular mastitis). Záněty mléčné žlázy prasnic, které se objevují krátce po porodu do 3 až 4 dnů, mají akutní průběh, který se vyznačuje systémovými i lokálními příznaky onemocnění. Akutní záněty se dávají do souvislosti s infekcí kmeny *E. coli*, proto se také někdy označují jako koliformní mastitidy (CM). V případě, že se jedná o mastitidu vyvolanou kmeny *E. coli*, dochází k rozvoji akutního zánětu v parenchymu mléčné žlázy. Ten hrozí endotoxinovým šokem jak pro prasnici, tak i pro selata sající tento sekret. Z různých studií je zřejmé, že k akutním zánětům dochází nejdříve v mléčných žlázách u místěných kaudálně v inkuinální krajině. Zde se tvoří nejméně mléka a proud je nejslabší, což umožňuje průnik bakterií. Původci mastitid pronikají do mléčné žlázy strukem nejen z povrchu těla prasnice, ale také při sání z dutiny ústní selat. Kromě mastitidy se dále klinicky diagnostikuje tzv. syndrom tvrdého vemene, který má pouze lokální příznaky a jeho etiologie je zatím nejasná. Na rozdíl od infekčních mastitid dojného skotu se etiologie akutních mastitid prasnic v podmínkách praxe vůbec nesleduje, protože chybí potřebné diagnostické postupy, včetně návodů pro interpretaci laboratorních výsledků. V praxi to znamená, že jednotlivé případy infekčních mastitid prasnic se diagnostikují s různou přesností v rámci syndromu MMA, a že jejich léčba probíhá výlučně empiricky bez znalosti původce. Přitom léčba mastitid nebo MMA syndromu prasnic po porodu patří k nejčastějším indikacím pro použití antibiotik. Z nedávných výsledků

bakteriologických vyšetření případů akutních mastitid vyplývá, že hlavním etiologickým agens jsou kmeny *Escherichia coli* (Kemper et. al. 2013). U takto získaných izolátů byly již dříve prokázány geny související s virulencí (Gerjetes et. al. 2011). Kmeny *E. coli* se se však prokázaly v podobné frekvenci i ve vzorcích mléka odebraných ze zdravé mléčné žlázy (Kemper et. al. 2013). Kromě *E. coli* byly z případů mastitid zachyceny také bakteriální druhy z rodů *Streptococcus* a *Staphylococcus*, které se rovněž vyskytovaly ve vzorcích mléka odebraných z mléčné žlázy nepostižené zánětem (Kemper et al. 2011). Nejasnosti týkající se klinické diagnostiky či bakteriologických nálezů stále neumožňují přesnější stanovení diagnózy infekční mastitidy, včetně její racionální léčby pomocí antibiotik. Řešení tohoto problému je však nutné s ohledem na stále rostoucí počet živě rozených selat, který přesahuje počet struků. Akutní mastitidy navíc ohrožují zdraví prasnic a mohou být i příčinou vyrazení prasnice. Cílem našeho projektu bylo vypracovat komplex metod, které by umožnily zpřesnit diagnostiku infekčních mastitid. Jmenovitě vypracovat metodiku odběru vzorků sekretu mléčné žlázy za účelem kultivačního průkazu bakterií, včetně stanovení jejich přibližných počtů ve vzorku sekretu metodikou použitelnou v podmínkách farmy. Z takto získaných výsledků stanovit nejčastěji se vyskytující bakteriální druhy a jejich počty ve vzorcích pocházejících z mléčné žlázy suspektně postižené i nepostižené zánětem. U vybraných kmenů s patogenním potenciálem stanovit jejich citlivost a získanou resistenci na antibakteriální látky používané k léčbě zánětů mléčné žlázy.

Materiál a metodika

Ke studii jsme použili prasnice pocházející většinou z užitkového chovu o kapacitě 1300 prasnic. Zaměřili jsme se na vypracování metodiky odběru individuálního vzorku z každé mléčné žlázy v období od prvního do pátého dne po porodu u prasnic s anamnézou zánětu mléčné žlázy a bez příznaků zánětu mléčné žlázy. Vlastní metodika spočívala v aseptickém odběru určitého objemu sekretu odstříknutím ze struku po jeho předchozí desinfekci. V případě nedostupnosti sekretu jsme podpořili ejekci mléka aplikací oxytocinu v dávce 10-30 IU (Oxytocin Bio). Od každé prasnice jsme při jednom odběru takto získali v průměru celkem 14 vzorků, odebraných do sterilních zkumavek typu Ependorf. Tyto vzorky jsme uchovávali při teplotě 5-7°C. V nejkratší době po odběru (1 - 4 h) jsme vzorek sekretu kultivovali přímo na několik kultivačních médií (krevní agar, Mac Conkey agar) ve standardním objemu (10 μ l). Po 24 a 48h inkubaci v aerobní atmosféře při 37 °C jsme odečetli předběžné výsledky a stanovili CFU v jednom mililitru sekretu. Po subkultivaci vybraných izolátů byla provedena jejich identifikace metodou hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF MS). V případě prokázání suspektního etiologického agens akutní mastitidy bylo provedeno vyšetření citlivosti na antimikrobiální látky metodou diskového difuzního testu dle standardního

postupu (Anonymus 2008). V podmínkách chovu byly formou dotazníku získávány údaje týkající se chování, výživného a zdravotního stavu selat vyšetřovaných prasnic.

Výsledky

Metodika odběru sekretu mléčné žlázy prasnice zahrnuje následující aseptický postup:

1. Použití jednorázových sterilních rukavic
2. Odstranění nečistot a desinfekce struků mléčné žlázy sterilním tamponem smočeným desinfekčním roztoku
3. Odstříknutí prvního stříku sekretu do sběrné nádoby, v případě nutnosti aplikace 10-30 UI oxytocinu
4. Aseptický odběr vzorku sekretu do sterilních zkumavek typu Ependorf o objemu 1,5 ml
5. Záznam odběru v protokolu (číslo prasnice, označení mléčné žlázy, např. L7)
6. Uchovávání vzorků v chladicím boxu při teplotě 4-5 °C
7. Transport do laboratoře během 1 – 4 h

Postup kultivace. S ohledem na vyloučení rizik kultivace v silně kontaminovaném prostředí farmy byly podmínky kultivace ověřovány simulací v laboratorních podmínkách. Postup byl následující:

1. Protřepání obsahu uzavřené zkumavky. Po jejím otevření, odběr 10 µl sekretu použitím sterilní jednorázové špičky a mikropipety
2. Inokulace 10 µl na povrch agarových médií (krevní agar a MC agar)
3. Roztěr inokula na povrchu média pomocí jednorázové plastové sterilní kličky
4. Inkubace médií v aerobní atmosféře při 37°C po dobu 18 – 48 h
5. Odečítání výsledků kultivace – předběžná identifikace a počítání CFU
6. Výběr suspektních izolátů a jejich subkultivace na další agarové půdě za účelem purifikace izolátu pro další identifikaci

Stanovení nejčastěji se vyskytujících bakteriálních druhů. Vyšetřením celkem 840 vzorků sekretu mléčné žlázy jsme kultivačně prokázali celkem 21 bakteriálních druhů. Nejčastěji se vyskytující druhy jsme zaznamenali v následující frekvenci: 31,6% *Streptococcus pluranimalium*; 24,6% *Staphylococcus chromogenes*; 10% *Streptococcus dysgalactiae*; 9,4% *Escherichia coli*; 6,2% *Staphylococcus hemolyticus*; 4,2% *Staphylococcus simulans*; 3,5% *Streptococcus hyovaginalis*; 3,5% *Staphylococcus aureus*; 1,1% *Staphylococcus hyicus*; 0,3% *Manheimia hemolytica*

Vypracování metodiky pro určení původců akutních mastitid. Za výchozí kritérium pro interpretaci etiologického agens infekční mastitidy jsme považovali zjištěné množství bakteriálních buněk (CFU na 1 ml) sekretu. Z dosavadních výsledků je zřejmé, že počty přítomných bakterií v 1 ml sekretu dosahují hodnot 10^{3-5} CFU. V 64 případech však byly zjištěny počty přesahující hodnoty 10^5 CFU v 1 ml. Nejčastější souvislost mezi vysokými počty bakterií a mléčnou žlázou byla v případě její lokalizace v inquinální krajině. Neprokázali jsme úplnou korelaci s případy klinicky diagnostikovaných akutních mastitid vzhledem k jejich malé četnosti.

Určení citlivosti a rezistence u 52 vybraných izolátů ze sekretu mléčné žlázy. Výsledky vyšetření izolátů druhu *S. dysgalactiae* shrnuje tabulky č. 1. Jak je zřejmé, citlivost všech kmenů *S. dysgalactiae* byla prokázána k penicilínu G, dále pak k florfenikolu a enrofloxacinu. Naproti tomu rezistence všech testovaných izolátů byla zjištěna k 1. generaci tetracyklinů, erytromycinu jako zástupci makrolidů a linkomycinu ze skupiny linkosamidů. Velmi vysoká je rovněž frekvence rezistencí k doxycyklinu (2. generace tetracyklinů), ale i potencovaným sulfonamidům. Pro účely terapie by pak byly první volbou penicilíny základní případně s rozšířeným spektrem tedy amoxicilin. Výsledky vyšetření citlivosti izolátů *S. aureus* shrnuje tabulka č. 2. Testované izoláty byly citlivé k gentamicinu, florfenickolu, erytromycinu a enrofloxacinu. U všech kmenů byla zjištěna rezistence k penicilinu G, linkomycinu a tetracyklinu. Kmeny nevykazovaly rezistenci k cefalosporinům 1. a 3. generace není uvedeno v tabulce). Z tabulky č. 3 je zřejmá rezistence všech izolátů *E. coli* k ampicilinu, streptomycinu a tetracyklinům první generace a části z nich k potencovaným sulfonamidům. K ostatním testovaným látkám byly citlivé. Tyto výsledky dávají představu o výskytu rezistencí v určitém stádě (A) prasnic a lze je proto využít k přípravě terapeutického plánu.

Tab. 1 Výsledky vyšetření citlivosti a rezistence izolátů *S. dysgalactiae* (39) k AML

testované AML											
Fenotyp	Frekvence	P	DA	FFC	TIL	E	MY	SXT	TE	DO	ENR
1	5	C	R	C	C	R	R	C	R	R	C
2	9	C	R	C	R	R	R	C	R	R	C
3	6	C	C	C	C	R	R	R	R	R	C
4	5	C	C	C	R	R	R	R	R	R	C
5	6	C	C	C	C	R	R	R	R	C	C
6	8	C	R	C	C	R	R	R	R	C	C

Tab. 2 Výsledky vyšetření citlivosti izolátů *S. aureus* (6) k AML

testované AML										
Fenotyp	frekvence	P	CN	FFC	E	MY	SXT	TE	DO	ENR
1	4	R	C	C	C	R	C	R	C	C
2	2	R	C	C	C	R	C	R	R	C

Tab. 3 Výsledky vyšetření citlivosti a rezistence izolátů *E. coli* (7) k AML

testované AML											
Fenotyp	Frekvence	AMP	S3	S	C	KF	NA	AMC	CAZ	CN	IMP
1	3	R	R	R	C	C	C	C	C	C	C
2	4	R	C	R	C	C	C	C	C	C	C

Vysvětlivky: AMP - Ampicillin, AMC - Amoxicillin-clavulanic acid, C - Chloramphenicol, CAZ - ceftazidime, CN - Gentamicin, DA - Clindamycin, DO - Doxycycline, E - Erythromycin, ENR - Enrofloxacin, FFC - Florphenicol, IMP - Imipenem, KF - Cephalothin, MY - Lincomycin, NA - Nalidixic acid, P - Penicillin, S - Streptomycin, SXT - Suphamethoxazole trimethoprim, S3 - Sulphonamides compound, TE - Tetracyclin, TIL - Tilmicosin

Závěry

V této studii jsme vypracovali a ověřili metodiku odběru individuálních vzorků sekretu mléčné žlázy prasnic po porodu. Námi použitý způsob odběru umožňuje na rozdíl od jiných studií, nejenom kvalitativní ale i kvantitativní stanovení bakterií v určitém objemu sekretu. K přímé kultivaci ze vzorků, krátce po jejich odběru jsme použili způsob vhodný pro podmínky na farmě. Přesná identifikace izolátů však proběhla na základě použití sofistikované metody MALDI TOF, což odpovídá současným standardům ve výzkumu. V odebraných vzorcích byly nejčastěji (89,7 %) prokázány grampozitivní bakterie z rodů *Streptococcus* s druhy: 31,6% *Streptococcus plurimalium*; 10% *Streptococcus dysgalactiae*; 3,5% *Streptococcus hyovaginalis* a rodu *Staphylococcus* s koaguláza negativními druhy: 24,6% *Staphylococcus chromogenes*; 6,2% *Staphylococcus hemolyticus*; 4,2% *Staphylococcus simulans*; 3,5% a koaguláza pozitivními druhy *Staphylococcus aureus*; 1,1% *Staphylococcus hyicus*. Na rozdíl od jiných studií byly gram negativní bakterie zastoupené druhem *E. coli* méně často (9,4%). Z výsledků je zřejmé, že hlavními agens souvisejícími s infekcí mléčné žlázy jsou pravděpodobně gram pozitivní bakterie z rodů *Streptococcus* a *Staphylococcus*. Výsledky vyšetření citlivosti na antimikrobiální látky svědčí o téměř 100% rezistenci k 1. generaci tetracyklinů a ve velké míře i k doxycyklinu., což vylučuje jejich terapeutické použití. Vysoké jsou však i frekvence rezistencí k makrolidům a linkosamidům u izolátů *S. dysgalactiae* a *S. aureus*. Pokud je lékem první volby amoxicilin je malá pravděpodobnost jeho klinického účinku v případě mastitid vyvolaných kmeny *E. coli* a *S. aureus*, kterých je však menšina. Klinicky probíhající akutní mastitidy lze s největší pravděpodobností dávat do souvislosti pouze s kmeny *E. coli*, nikoliv však s gram pozitivy.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 126/2015/FVL

Seznam literatury

1. MARTINEAU G-P., Farmer Ch., Peltoniemi O. Mammary system, p. 270-293 in: Diseases of Swine, 10th ed., Edited by Zimmerman J. J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Published 2012 John Wiley and Sons, Inc., 983 p.
2. KEMPER, N. Dardehle, D., Lehmann, J., Gerjets, I., Looft, H., Preissler, R. 2013. The role of bacterial pathogens in coliform mastitis in sows. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*.2013:126,130 - 136.
3. KEMPER, N. Preissler, R. 2011. Bacterial flora on the mammary gland skin of sows and their colostrum. *Journal of Swine Health and Production*.2011:19, 112-115.
4. ANONYMOUS. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved Standard – Third Edition. CLSI document M31 – A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008
5. GERJETS, I., Traulsen, I., Reiners, K., Kemper, N. 2011. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* isolates from sows with coliform mastitis and healthy sows. *Veterinary Microbiology*.2011:152, 361 - 367.

Metabolický profil a změny vnitřního prostředí u telat narozených císařským řezem a ztíženým porodem

Jana Šmídková, Petra Kišová, Josef Illek,

Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav veterinárního lékařství²

Úvod

V dnešní době se stále často setkáváme s narozením mrtvých a málo životných telat, nebo s úhynem telat v prvních dnech života. Telata se musí přizpůsobovat narušenému metabolismu matky a ne vždy zvládnou stav plně kompenzovat. Stres u telat vyvolaný při porodu, zvláště pokud se jedná o protrahovaný porod, mění hladiny hormonů T3 a T4. Pro homeostázu glukózy u telat před prvním přijetím kolostra je důležitá optimální hladina trijódthyroninu (T3). T3 slouží k odbourávání tuků a cukrů a tím k získání potřebné energie ještě před příjmem a absorpcí živin z kolostra. U neonatálních telat hnědá tuková tkáň slouží jako významný zdroj energie. Pro metabolizaci hnědé tukové tkáně je nezbytná optimální koncentrace hormonů štítné žlázy. Při deficitu jódu u březích krav, nebo při zvýšeném příjmu strumigenních látek, je narušena syntéza hormonů T3 a T4, čímž je negativně ovlivněn i metabolismus plodu. Hormony T3 a T4 se vylučují i kolostrem. Při poruše funkce štítné žlázy je i koncentrace těchto hormonů v kolostru nízká. Narozené tele reaguje na takovou situaci vznikem negativní energetické bilance, rozvíjí se hypoglykémie a vitalita telete je snížena. Tato problematika je v současné době intenzivně studována nejen ve veterinární medicíně, ale i v medicíně humánní.

Materiál a metodika

Byly odebrány vzorky od 20 telat narozených císařským řezem (skupina A). Císařský řez byl proveden na stojícím zvířeti za použití kaudální epidurální anestezie v kombinaci s infiltrační lokální anestézií v místě řezu (line block). Byl použit 2% procain. Řez stěnou břišní byl veden v levé paralumbální fosse ventrálním směrem. Pro správné načasování zákroku byla před očekávaným telením měřena teplota ráno a večer. Pokud teplota klesla ráno, císařský řez byl proveden během odpoledne. Pokud večer, zákrok byl proveden následující den ráno. Vzorky krve byly odebrány od narozených telat 15 – 20 minut po porodu. Vzorky byly odebírány z v. jugularis. Druhou skupinu

tvořila telata rozená přirozeně. Do této skupiny bylo zařazeno 10 telat a vzorky krve byly odebrány opět z v. jugularis a to do 30 minut po porodu. Biochemické vyšetření bylo provedeno v Laboratoři pro velká zvířata na VFU Brno. Celková bílkovina, NEMK, enzymy AST a GMT byly stanoveny na automatickém biochemickém analyzátoru za použití setů firmy BioVendor a Randox. Vitamíny byly stanoveny metodou kapalinové chromatografie. Hormony T3 a T4 byly stanoveny kompetitivní enzymatickou chemiluminiscenční metodou na přístroji IMMULTE – IMMUNOASSAY ANALYZER, DPC Cirrus Inc. Los Angeles. Byly použity komerční kity T3 a T4, chemiluminiscenční substrát, Siemens, promývací roztoky: Probe Wash module, Siemens, Probe Cleaning KIT, Siemens. Sledovány byly následující parametry: Celková bílkovina, albumin, globulin, bilirubin, urea, Mn, ALP, AST, CK, GMT, GPX, Na, K, Ca, P, Cl, ZnS, Cu, Mg, Fe, Se/k, Chol, TGL, VitA, VitE, T3 a T4.

Výsledky

Zatímco u skupiny B až na jeden případ hodnoty T4 nepřesáhly 200 nmol/l, u skupiny A tuto hodnotu přesáhlo 50%. U dvou telat hodnota přesáhla 308 nmol/l.

Tab.č. 1: Srovnání průměrných hodnot T3 a T4

	T3	T4
Skupina A	2,64	194,29
Skupina B	5,86	172,54

Kromě změn v již zmíněných parametrech stojí za povšimnutí i parametry závislé na příjmu kolostra.

Tab.č. 2: Srovnání průměrných hodnot parametrů závislých na příjmu kolostra.

	CB	VitA	VitE	GMT
Skupina A	49,75	0,38	0,35	0,28
Skupina B	43,85	0,35	0,30	0,22

Závěr

Kromě stanovení hladiny T3 a T4 hormonů u neonatálních telat jsme získali i kompletní metabolický profil telat narozených plánovaným císařským řezem. Zajímavé jsou hodnoty GMT, které se dají spolehlivě využít při kontrole příjmu kolostra. Z výsledků výše uvedených je vidět rozdíl mezi hladinami T3 a T4 hormonů. V případě plánovaného císařského řezu jsou oproti skupině B nižší hodnoty T3. Hodnoty T4 jsou naopak vyšší.

Seznam literatury

1. Grünberg W., Steinhardt M., Rath D., Niemann H. Thyroid hormones in Old German Black Pied- and Holstein-Friesian suckling calves. Effects of parturition and postpartum adaptation. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 1998, vol. 26, no. 6, p. 318-25
2. Kirovski, D., Lazaverić M., Stojić V., Šamanc H., Vuajanac I., Nedić O., Masnikosa R., Hormonal status and regulation of glycemia in neonatal calves during the first hours of postnatal life. *Acta veterinaria* 2011 Vol. 61, no. 4, p.: 349-361
3. Surynek J., Illek J., Tomsik F., Levels of some mineral substances in blood-plasma of bovine fetuses and dams in 3rd trimester of gravidity. 1978, *Veterinární medicína*, vol. 23, no. 7, p. 385-390

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 132/2015/FVL.

Acidobazická rovnováha neonatálních telat před a po napití kolostra

Petra Kišová, Josef Illek, Martin Romanský, Barbora Staňková

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

Úvod

V posledním desetiletí byl zkoumán vliv poruch acidobazické rovnováhy a iontových dysbalancí na onemocnění novorozených telat. Jednou z příčin úhynu neonatálních telat jsou poruchy acidobazické rovnováhy, především smíšené acidózy, která vzniká u telat při protrahovaných porodech. Taková telata jsou slabá a nejsou schopna přijmout dostatečné množství kolostra. Byly provedeny různé studie, při kterých byla posuzována acidobazická rovnováha a její jednotlivé parametry jako predispoziční faktory asfyxie, imunosuprese a dalších, především průjmových onemocněních. Podle prováděných studií má hyperkapnie vliv na snížení hladiny imunoglobulinů v krvi mláďat. Jako příčina slabosti, ataxie, inkoordinace, snížení různých reflexů neonatálních telat byla prokázána zvýšená hladina laktátu v krvi. Z toho plynou následně další vážné důsledky jako je celková slabost telat, špatné sání kolostra a zhoršení reaktivity. Snížený palpebrální reflex je pro laktacidémii specifický příznak. Významný problém u novorozených telat představuje hyperkalémie. Podle prováděných studií má hyperkalémie úzkou spojitost s dehydratací zvířete.

Materiál a metodika

Pro projekt byl vybrán chov, který vykazuje zvýšenou míru úhynů telat v neonatálním období. Pro studii bylo vybráno celkem 12 telat. Každému zvířeti byl odebrán vzorek krve a to celkem třikrát v následujících časových rozmezích. První vzorek byl odebrán ihned po narození a ještě před napojením kolostra. Krev byla odebrána z v. jugularis vyšetřena hematologicky i biochemicky a byla provedena analýza acidobazického stavu zvířete. Pro vyšetření acidobazického stavu zvířete byla anaerobně odebrána krev a ihned analyzována. Použit byl přístroj EPOC. Přístroj byl zkorigován na aktuální rektální teplotu. Poté bylo zvíře napojeno minimálně 2 litry kvalitního kolostra. Druhý vzorek byl odebrán hodinu po napití kolostrem. Byly odebrány vzorky na hematologické, biochemické vyšetření a okamžitě byla odebrána a vyšetřena krev na zjištění acidobazického stavu. Třetí vzorek byl odebrán za 6 hodin od odebrání druhého vzorku a byl vyšetřen stejným způsobem.

Byla odebrána krev od matek novorozenců, aby mohla být zjištěna případná korelace s deficitem u mláďat. Vzorek od matek byl odebrán jednou. A to na biochemické vyšetření. Vzorky byly odebírány v prvních hodinách po porodu. Dále byl odebrán vzorek kolostra.

Z parametrů acidobazické rovnováhy byly vyšetřovány následující – pH, pCO₂, pO₂, HCO₃, Base excess, SO₂, AGAP. Dále byl změřen hematokrit, hemoglobin, glukóza, laktát, kreatinin, Na, K, Ca, Cl.

Hematologické a biochemické vyšetření bylo provedeno v Laboratoři pro velká zvířata na VFU Brno. Z biochemických parametrů byly sledovány následující: koncentrace celkového proteinu, albuminu, bilirubinu, urey, Mn, AST, GMT, GPX, Na, K, Ca, P, Cl, Cu, Mn, Fe, Se, vit A, vit E, beta karotenu, imunoglobulinů, T3, T4, inzulinu. Z hematologických parametrů bylo stanovován celkový počet červených krvinek, bílých krvinek (i s rozpočty jednotlivých krevních řad), počet krevních destiček, Ht, Hb.

U dojnic byly vyšetřovány následující parametry : celkový protein, albumin, urea, Mn, GPX, Na, K, Ca, P, Se, BHB, NEMK, beta karoten.

V mléce se vyšetřoval beta karoten, Mn, Cu, Zn, Fe, Mg, GT, Se, CB, albumin, imunoglobuliny.

Výsledky

Výsledky acidobazického vyšetření ukázaly respirační acidózu, která vedla následně ke sníženému pH krve. Respirační porucha byla kompenzovaná metabolickou složkou. Hodnota pH byla snížena a hodnota pCO₂ byla zvýšená. Při druhém odběru se hodnoty změnily jen nepatrně. Třetí odběr (po 6 hodinách od druhého odběru) ukázal zvýšení hodnoty pH téměř na spodní hranici referenčního rozmezí a stejně tak pCO₂ bylo sníženo nad horní hranici referenčního rozmezí. Při prvním odběru byla naměřena hypoglykémie, hladina glukózy se po prvním napití kolostra zvýšila téměř dvojnásobně a poté při třetím odběru opět mírně klesla. Hladina laktátu byla zvýšená po dobu všech tří odběrů. Stejně tak byla při prvním odběru zvýšená hladina kreatininu, která klesla až u třetího odebraného vzorku. U telat byla zjištěna mírná hypokalemie, která se upravila asi 8 hodin po narození. Hladina vápníku byla u všech telat nízká a ani při posledním odběru nedošlo k jejímu zvýšení. Hladina celkového proteinu byla snížena před prvním napitím kolostra, referenčního rozmezí nedosáhla ani za 8 hodin od narození. Hladina albuminu byla v referenčním rozmezí při všech odběrech. Hladina imunoglobulinů byla snížena po dobu prvních dvou odběrů. Naměřena byla zvýšená hladina bilirubinu, která se krátce po narození ještě zvýšila. V průběhu měření došlo k několikanásobnému zvýšení hladiny GMT.

U dojnic byla změřena hypokalcemie a hypofosfatemie a dále zvýšená hladina NEMK.

V kolostru byla naměřena karence celkových proteinů a imunoglobulinů. To mělo za následek snížených hodnotu u mlád'at. Dále byla zjištěna karence vit E, což se opět projevilo poruchou u mlád'at.

Závěr

U telat narozených při nekomplikovaném porodu dochází ihned po narození ke vzniku respirační acidózy. Tuto poruchu dokážou novorozenci korigovat za několik hodin po narození. Tato porucha se neprojevila klinickými příznaky asfyxie. Hyperkapnie a zvýšená hladina laktátu v krvi měla v tomto případě důsledek ve snížení vstřebávání imunoglobulinů, snížení celkového proteinu a predispozici ke snížené imunitní vybavenosti novorozence. Všechna zvířata byla při každém odběru důkladně klinicky vyšetřována. I přes změny vnitřního prostředí ale nebyly patrný významnější klinické odchylky což může vést k maskování mírnějších acidobazických a metabolických poruch.

Literatura

1. J.W. Boyd Relationships between acid-base balance, serum composition and colostrum absorption in newborn calves. *British Veterinary Journal* Volume 145, Issue 3, May–June 1989, Pages 249–256
2. Ingrid Lorenz, Arcangelo Gentile. d-Lactic Acidosis in Neonatal Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* Volume 30, Issue 2, July 2014, Pages 317–331 Fluid and Electrolyte Therapy
3. L. Schwedhelm, D. Kirchner, B. Klaus, L. Bachmann. Experimentally induced hyperchloremic and dl-lactic acidosis in calves: An attempt to study the effects of oral rehydration on acid-base status. *Journal of Dairy Science* Volume 96, Issue 4, April 2013, Pages 2464–2475
4. F.M. Trefz, P.D. Constable, C. Sauter-Louis, A. Lorch, G. Knubben-Schweizer, I. Lorenz. Hyperkalemia in neonatal diarrheic calves depends on the degree of dehydration and the cause of the metabolic acidosis but does not require the presence of acidemia. *Journal of Dairy Science* Volume 96, Issue 11, November 2013, Pages 7234–7244
5. Florian M. Trefza, Annette Lorcha, Melanie Feista, Carola Sauter-Louisa, Ingrid Lorenz. The prevalence and clinical relevance of hyperkalaemia in calves with neonatal diarrhoea. *The Veterinary Journal* Volume 195, Issue 3, March 2013, Pages 350–356

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 135/2015/FVL.

Srovnání spolehlivosti vyvolání chemické ejakulace u hřebců koně (*Equus caballus*) a osla (*Equus asinus*).

Miroslava Mráčková, Kristýna Hodinová², Michal Vyvial¹, Eliška Horáčková¹, Markéta Sedlinská¹

¹ *Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství,*

² *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Odběr ejakulátu oslího hřebce je nezbytný k rozšíření možností využívat kvalitní plemeny při inseminaci oslic. Jeho uplatnění však spatřujeme i v oblasti preventivní diagnostiky pohlavně přenosných onemocnění (kultivace či vyšetření PCR ejakulátu), které se běžně stanovují u koní, např. pro původce *Taylorella equigenitalis* či viru arteritidy koní (EVA). Je obtížné naučit skákat oslí hřebce na fantom, a proto je nutné ke každému pokusu o odběr ejakulátu mít k dispozici oslici v říji, případně klisnu menšího vzrůstu. I na tento způsob odběru je však nutné oslího hřebce poměrně dlouhou dobu navykat, což je časově, personálně i materiálně velmi nákladné.

Jednou z alternativních metod používaných pro odběr semene u hřebců koní je farmakologicky indukovaná ejakulace. Bylo vypracováno několik relativně úspěšných modelů farmakologicky indukované ejakulace. Nejčastěji a s největší úspěšností používané protokoly zahrnují aplikaci buď samotného xylazinu, nebo xylazinu v kombinaci s butorfanolem či imipraminem (McDonnell and Love 1991, McDonnell 2001, Josson and Whitacre 2012, Mráčková et al. 2013 a další).

Úspěšnost farmakologicky indukované ejakulace se u hřebců pohybuje ve velmi širokém rozmezí (15 -84 %) v závislosti na zvoleném protokolu. U oslích hřebců jsou možnosti farmakologicky indukované ejakulace zatím prověřené jen málo a proto jsme se jí v našem projektu věnovali. Pro testování úspěšnosti byly vybrány 2 odlišné protokoly úspěšně ověřených studií provedených na hřebcích koně, a to studie McDonnell (2001) a Josson and Whitacre (2012).

Materiál a metodika

Celkem bylo využito 10 oslích hřebců ve věku 5 až 16 let s různou anamnézou předchozího využití v plemenitbě, všichni chováni u soukromých majitelů. U každého hřebce byly k farmakologickému vyvolání ejakulace použity dva odlišné protokoly, vždy v odstupu minimálně 24 hodin.

První protokol zahrnoval perorální podání imipraminu (Melipramin) v dávce 3 mg/kg a po dvou hodinách intravenózní aplikaci xylazinu (Xylazin Ecuphar 20 mg/ml) v dávce 0,66 mg/kg .

Druhý protokol představoval jednorázovou intravenózní aplikaci směsi xylazinu (Xylazin Ecuphar 20 mg/ml) v dávce 0,33 mg/kg a butorfanolu (Butomidol 10 mg/ml) v dávce 0,02mg/kg.

Bezprostředně po intravenózní aplikaci byla zvířata ponechána v klidu a pozorována, zda u nich dojde či nedojde k ejakulaci.

Výsledky

Pořadové číslo osla	Jméno, věk, odhadovaná váha, reprodukční anamnéza, současný způsob chovu	Protokol č. 1 imipramin a xylazin	Protokol č. 2 butorfanol a xylazin
1	Oskar, 6 let, 250 kg, využíván v plemenitbě, s oslicemi	Negativní (slabá sedace, bez prolapsu)	Negativní (výrazná sedace, prolaps penisu)
2	Relente, 16 let, 300 kg, využíván v plemenitbě, s oslicí	Negativní (výrazná sedace, bez prolapsu)	Negativní (střední sedace, bez prolapsu)
3	Somál, 5 let, 180 kg, využíván v plemenitbě, v boxu	Negativní (slabá sedace, bez prolapsu)	Negativní (výrazná sedace, prolaps penisu)
4	Amoretto, 11 let, 300 kg, využíván v plemenitbě, volné s hřebci	Negativní (výrazná sedace, bez prolapsu)	Negativní (střední sedace, prolaps)
5	Rakous, 7let, 200 kg, využíván v plemenitbě, volné s hřebci	Negativní (výrazná sedace, bez prolapsu)	Negativní (výrazná sedace, částečný prolaps)
6	Marian, 15 let, 250 kg, využíván v plemenitbě, volně s oslicí (bez potomků)	Negativní (výrazná sedace, bez prolapsu)	Negativní (výrazná sedace, prolaps penisu)
7	Aladin, 9 let, 200 kg, nevyžíván v plemenitbě, samostatně v boxe	Negativní (výrazná sedace, částečný prolaps)	Negativní (výrazná sedace, částečný prolaps)

8	Čako, 14 let, 250 kg, využíván v plemenitbě, s oslicemi	Negativní (výrazná sedace, částečný prolaps)	Negativní (výrazná sedace, prolaps penisu)
9	Francoais, 10 let, 300 kg, nevyužíván v plemenitbě, s klisnami	Negativní (výrazná sedace, bez prolapsu)	Negativní (slabá sedace, bez prolapsu)
10	Pepa, 8 let, 250 kg, využíván v plemenitbě, s oslicemi	Negativní (výrazná sedace, částečný prolaps)	Negativní (výrazná sedace, prolaps penisu)

Závěr

Pomocí protokolů vypracovaných a ověřených u hřebců koně (*Equus caballus*) používaných k vyvolání farmakologicky indukované ejakulace, jsme v naší studii na hřebcích osla (*Equus asinus*) dosáhli 0 % úspěšnosti. Pro sestavení metodiky pokusu jsme cíleně zvolili schémata s nejvyšší zaznamenanou úspěšností dosažení farmakologicky indukované ejakulace u hřebců koně (84% úspěšnost ve studii Josson and Whitacre 2012, respektive 68% úspěšnost ve studii McDonnell 2001). Navíc s protokolem obsahujícím xylazin a butorfanol v uvedených dávkách máme u hřebců koní a poníků i velmi dobré praktické zkušenosti, dokonce i s mrazením a přípravou inseminačních dávek z tímto způsobem získaného ejakulátu.

Farmakologicky indukovaná ejakulace podle schémat použitelných pro získávání ejakulátu hřebců koní není v případě oslích hřebců využitelná a je třeba se v dalším bádání zaměřit na mezidruhové rozdíly, které mohou být primárním podnětem k selhávání jinak ověřených protokolů.

Největší komplikací se zdá být skutečnost, že naprostá většina zvířat není navyklá na manipulaci a izolace od jejich společníků a fixace vyvolávají natolik stresovou situaci, že protokoly nebyly zcela účinné. Dalším faktorem, který se může na neúspěchu podílet, se zdá být také rychlejší metabolizování sedativ u hřebců osla v porovnání s hřebci koně. Dle našich pozorování je ústup sedace u oslů výrazně rychlejší, než je tomu u koní, a to při použití stejného protokolu.

Seznam literatury

1. Josson A., Whitacre M.: Does the addition of butorphanol have an effect on pharmacologically induced ejaculation in severely injured stallions? *Journal of Equine Veterinary Science* 2012, **32**, 490.
2. McDonnell S.M.: Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Animal Reproduction Science* 2001, **68**, 153–159.

3. McDonnel S.M., Love C.C.: Xylazine-induced ex-copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 1991, **26**, 73–76.
4. Mráčková M., Bláhová Z., Sedlinská M.: The Reliability of Two Different Protocols for Pharmacologically Induced Ejaculation in Donkeys (*Equus asinus*). *Journal of Equine Veterinary Science* 2013, **33**, 1121-1123.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 137/2015/FVL.

Hodnocení vlivu parazitárních infekcí na gastrointestinální mikrobiotu volně žijících goril nížinných

Barbora Kalousová, Klára Vlčková, David Modrý

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

Úvod

Vliv parazitární infekce na gastrointestinální mikrobiotu (GIM) je stále častěji zkoumaným tématem. Vztahy mezi patogenními mikroorganismy a komensálními bakteriemi jsou klíčové pro správný vývoj a fungování střevního imunitního systému. Bylo zjištěno, že např. přítomnost helmintů může vést ke změnám ve složení GIM a početnosti jednotlivých bakterií (1). Tyto změny mohou, ale nemusí být pro hostitele prospěšné. Wu et al. (2) pozorovali výrazné zvýšení abundancí bakterií rodu *Campylobacter*, způsobující kamylobakteriózu a snížení rodů *Fibrobacter* a *Ruminococcus* s následným narušení fibrolytické aktivity u prasat za přítomnosti *Trichuris suis*. Zatímco u lidí se *T. suis* jeví jako jedna z možností pro léčbu ulcerózní kolitidy (3). Nicméně doposud neexistuje žádná studie zabývající se vlivem parazitární infekce na GI mikrobiotu u lidoopů.

Materiál a metodika

Sběr a fixace vzorků

Zpracováno bylo celkem 64 vzorků trusu goril nížinných patřících do dvou habituovaných (Makumba, Mayele) a dvou nehabituovaných (Finni BH, unhabituated) skupin žijících v chráněných oblastech Dzanga-Sangha ve Středoafričské republice. Vzorky použité pro koprologické analýzy strongylidních hlístic byly fixovány do 4% formaldehydu, pro analýzu GIM byly vzorky fixovány v *RNAlater* (RNA Stabilization Reagent, Qiagen, Germany) a skladovány při teplotě -20°C.

Koprologické analýzy

Všechny vzorky byly nejprve homogenizovány, propláchnuty přes síto a centrifugovány. Získaný sediment byl zvážen a doplněn 4% formaldehydem do 10 ml. Dva ml sedimentu byly vyšetřeny pomocí Sheaterovy flotační metody (4) a modifikované sedimentační metody (5). Nalezená parazitární stádia byla určena s ohledem na jejich charakteristické znaky. Strongylidní hlístice byly kvantifikovány v průběhu modifikované sedimentační metody a jejich množství bylo přepočteno na gram sedimentu (EPG).

Molekulární analýzy

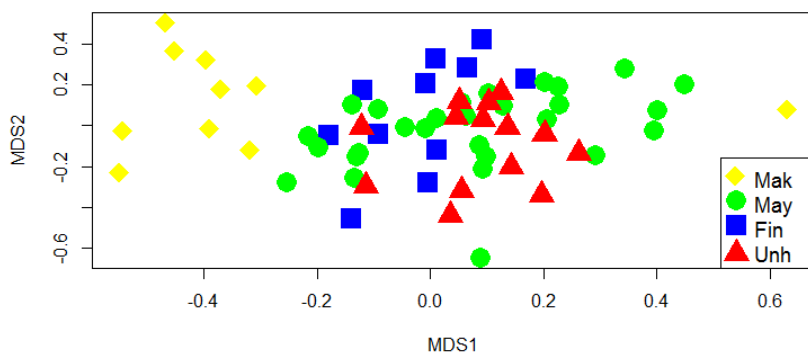
DNA byla ze všech vzorků vyizolována pomocí PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO, USA). Získaná DNA byla dále použita na PCR (25 cyklů: 15s při 98°C, 30s při 65°C, 30s při 72°C), kdy byly namnoženy V3 a V5 regiony 16S rRNA za použití primerů 357f a 926r (značené identifikačními barkódy). Sekvenování produktů PCR bylo provedeno pomocí Illumina Miseq platformy (NGS) a získané sekvence byly analyzovány a zpracovány pomocí programu IM-TORNADO (6). Operační taxonomické jednotky (OTU) byly definovány na základě podobnosti více jak 97 % sekvencí 16S rRNA.

Statistické analýzy

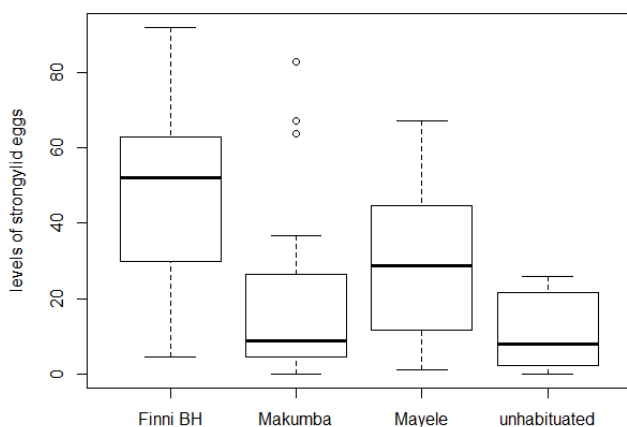
Pro stanovení rozdílnosti/podobnosti mikrobiálních profilů jednotlivých skupin goril byly použity nemetrické mnohorozměrné škálování (NMDS) a permutační test pro analýzu variance (PERMANOVA). Statistické výpočty byly provedeny z relativních abundancí všech OTU na základě Bray-Curtis matic podobností (7). Rozdíly v míře infekce strongylidními hlísticemi mezi skupinami goril byly stanoveny pomocí Kruskal-Walisoiva testu. Komprese mnohorozměrných dat GIM byla provedena pomocí Analýzy hlavních komponent. Vztahy mezi složením GIM (popsána pomocí první komponenty PC1) a mírou infekce strongylidními hlísticemi byly ohodnoceny pomocí Lineární regrese. Veškeré statistické výpočty byly provedeny v softwaru R (8).

Výsledky

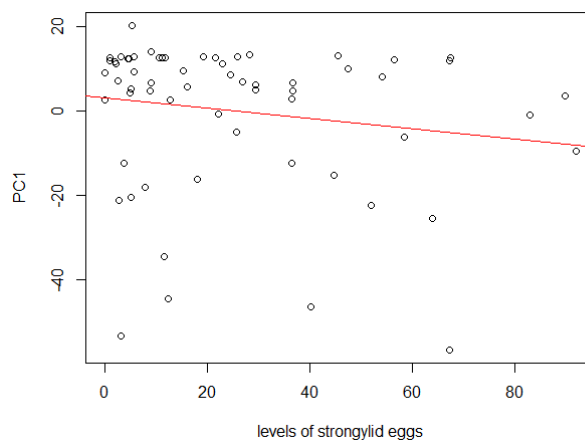
Zjistili jsme, že složení GIM se mezi jednotlivými skupinami goril liší (Graf 1), což bylo statisticky prokázáno pomocí PERMANOVA ($R^2=0,114$, $p=0,001$). Dále jsme zjistili, že existují statisticky významné rozdíly mezi mírou infekce strongylidními hlísticemi u jednotlivých skupin goril (Kruskal-Walis test: $Ch-sq=15,485$, $p=0,001$; Graf 2). Nicméně, vliv infekce strongylidními hlísticemi na složení GIM se nám nepodařilo prokázat (Lineární regrese: $y=-0.122x+3.048$, $R^2=0,03$, $F_{1,61}=1,774$, $p=0,188$; Graf 3).



Graf 1. NMDS graf složení GIM jednotlivých skupin goril nížinných



Graf 2. Krabicový graf míry infekce strongylidními hlísticemi v jednotlivých skupinách goril.



Graf 3. Vztah mezi mírou parazitární infekce strongylidními hlísticemi a PC1 reprezentující složení GIM v jednotlivých vzorcích.

Závěry

Tento projekt je začleněn do našeho dlouhodobého výzkumu zabývajícího se studiem vlivu různých faktorů na GIM volně žijících goril nížinných a navazuje především na dřívější práce pojednávající o vlivu habituace (9) a léčby antibiotiky (10). Z našich výsledků je patrné, že složení GIM mikrobioty se mezi jednotlivými skupinami goril významně liší, stejně jako míra infekce strongylidními hlísticemi. Ovšem přítomnost strongylidních hlístic zmiňované rozdíly v GIM mezi jednotlivými skupinami goril nezpůsobuje. Tyto jsou patrně způsobeny jinými faktory, jako například dieta a geografické rozšíření, což vysvětlujeme v předcházející studii (9). Dalším vysvětlením může být také relativně nízká intenzita parazitární infekce. Nicméně, naše výsledky jsou v souladu s prací Cantacessiho a kol. (11), kde se autoři zabývali vlivem přítomnosti měchovců (*Necator americanus*) na GIM lidí nebo prací Coopera a kol. (12), kde nebyly pozorovány rozdíly ve složení GIM u lidí přirozeně infikovaných tenkohlavcem (*Trichuris trichiura*).

Seznam literatury

1. Berrilli, Federica et al. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. 2012, 2: 141.
2. Wu, Sitao et al. Worm burden-dependent disruption of the porcine colon microbiota by *Trichuris suis* infection. *PLoS ONE*. 2012, 7: e35470.
3. Summers, Robert et al. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2005, 128: 825-832.
4. SHEATHER, A, Leslie. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*. 1923, 36: 266–275.

5. BLAGG, W. et al. 1955. A new concentration technique for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1955, 4: 23–28.
6. JERALDO, Patricio et al. IM-TORNADO: A Tool for Comparison of 16S Reads from Paired-End Libraries. *PLoS ONE*. 2014, 9: e114804.
7. CLARKE, K. Robert. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*. 1993, 18: 117-143.
8. R Development Core Team (2008) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
9. GOMEZ, A. et al. Gut microbiome composition and metabolomic profiles of wild western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) reflect host ecology *Molecular Ecology*. 2015, 24: 2551-2565.
10. VLČKOVÁ, K et al. Effect of antibiotic treatment on the gastrointestinal microbiome of free-ranging western lowland gorillas (*Gorilla g. gorilla*). Odesláno do *Microbial Ecology*.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 138/2015/FVL.

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Detekce aktuálních způsobů falšování medu

Blanka Zábrodská, Sandra Dluhošová, Michaela Králová, Ivana Borkovcová, Lenka Vorlová, Petra Borkovcová, Ines Lačanin

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

Úvod

Med je charakterizován jako potravinu přírodního sacharidového charakteru, do které dle platné legislativy nesmí být přidány, s výjimkou jiného druhu medu, žádné jiné látky ani aditiva (Codex Alimentarius, 2011). Vzhledem k celosvětovému úbytku včel v důsledku nemocí a postupující devastaci životního prostředí se však med stává čím dál žádanější a nedostatkovější komoditou. Problémem tedy nejsou pouze nevyhovující hodnoty fyzikálně-chemických parametrů, ale med je stále častěji falšován. V České republice převládá falšování medu přidáním sacharidových sirupů, vyrobených zejména z bramborového, kukuřičného a pšeničného škrobu, dále sirupů invertovaných a vysokofruktózových. Přídavek těchto sirupů se laboratorně nese snadno detekuje, neboť jejich uhlovodíkový profil lze uměle vytvořit tak, aby byl velmi podobný profilu pravého medu (Mehryar a Esmaili, 2011). Dalším problémem je přikrmování včel takovými roztoky nebo krystalickou sacharózou. Cílem práce byla analýza fyzikálně-chemických parametrů a jejich posouzení zda vyhovují platné legislativě a dále vyvinout novou metodu pro průkaz falšování medu.

Materiál a metodika

Vzorky

Květové a medovicové medy (n = 50) byly nakoupeny v obchodních řetězcích dle dostupnosti na českém trhu v březnu a dubnu 2015. Jako deklarované země původu jsou uvedeny Česká republika, směs medů z ES a mimo ES, směs medů z ES a směs medů mimo ES. Sacharidové sirupy – řepný hydrolyzát a pšeničný sirup byly dodány od RNDr. Švamberka.

Medy byly uchovány ve skleněných nebo plastových prodejních obalech při pokojové teplotě 25 ± 5 °C a analyzovány do sedmi měsíců od nákupu. Sirupy byly skladovány při 5 °C ve skleněných obalech.

Fyzikálně-chemická analýza

Ve vzorcích medů byly stanoveny základní fyzikálně-chemické parametry, tj. obsah vody, elektrická vodivost, kyselost, obsah 5-hydroxymethylfurfuralu (HMF) a aktivita diastázy. Tyto

parametry byly stanoveny dle metod popsanych v Harmonizovaných metodách Evropské komise pro med (Bogdanov, 2009).

FT-NIR analýza

Spektra vzorků byla nasnímána FT-NIR spektrometrem NIR Nicolet Antaris (Thermo Electron Corporation, Madison, USA). Zkrystalizované vzorky medů byly před stanovením homogenizovány temperací ve vodní lázni na teplotu 39,5 °C, důkladně promíchány a následně ochlazený na teplotu 20 °C. Vzorky byly proměřeny ve spektrálním rozsahu 10 000 - 4 000 cm⁻¹, se spektrálním rozlišením 8, se 100 scany. Spektra byla měřena na integrační sféře v režimu reflektance s použitím transflektanční kyvety o tloušťce vrstvy 0,5 mm. Každý vzorek byl proměřen třikrát a pro další zpracování bylo použito průměrné spektrum.

Další fází bylo vytvoření modelových směsí deseti vzorků medu se sacharidovými sirupy v koncentracích 5, 10, 15 a 20 %. Postup měření byl shodný s předchozím.

Naměřená data byla zpracována pomocí programu TQ Analyst verze 6.2.1.509 (ThermoNicolet Corporation, USA). Pomocí metody diskriminační analýzy (DA – Discriminant analysis) byly vytvořeny kalibrační modely pro ověření možnosti falšování medů sacharidovými sirupy. Dále byla použita metoda částečných nejmenších čtverců (PLS - Partial Least Squares) pro vytvoření kalibračního modelu pro obsah vody. Spolehlivost kalibračního modelu pro vodu byla ověřena křížovou validací a výpočtem kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV). Výsledky analýzy byly zpracovány programem Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA).

Výsledky

Tabulka č. 1: Fyzikálně-chemické parametry ve vzorcích medů (základní statistické funkce)

	Obsah vody [%]	Elektrická vodivost [mS/m]	Titrační kyselost [mekv/kg]	HMF [mg/kg]	Aktivita diastázy [stupně Schadeho]
Průměr + SD	17,47 ± 0,96	37,95 ± 29,57	15,48 ± 7,27	21,71 ± 11,69	11,62 ± 3,42
Median	17,6	26,55	13	19,13	11,07
Max	19,8	157,3	36	55,31	21,02
Min	15,4	13,2	4	2,05	5,55

U vzorků medů nedošlo dle Vyhlášky č. 76/2003 Sb. k překročení právních limitů v obsahu vody, elektrické vodivosti a titrační kyselosti, jak je patrné z tabulky č. 1. Ve čtyřech vzorcích (minimální trvanlivost od 9/2016 do 3/2018) došlo k překročení právního limitu 40 mg/kg pro parametr HMF. Povolený právní limit, který stanoví aktivitu diastázy na nejméně 8 stupňů Schadeho, byl překročen u šesti vzorků. Deklarovaná rozmezí minimální doby trvanlivost byla od 9/2015 do 3/2018.

Dalším cílem práce bylo zjistit možnost využití FT-NIR spektrometrie pro detekci falšování medu sacharidovými sirupy. Pro směsi medu se sacharidovými sirupy (řepný hydrolyzát a pšeničný sirup) byly vytvořeny pomocí DA tři kalibrační modely. Pro vytvoření modelů bylo použito 10 *Principal components* a spektra bez matematických úprav. Spektra byla vyhodnocena dle Mahalanobisovy vzdálenosti, což je statistická míra vzdálenosti spektra od průměrného spektra nebo míra vzdálenosti sousedních spekter (Trilčová *et al.*, 2005). Pro modely byla popsána variabilita 99,9 – 100 %. První model byl vytvořen pro med a směsi medů s řepným hydrolyzátem, použit byl region 7602,4 – 4519,8 cm^{-1} , u tohoto modelu bylo špatně klasifikováno 10 standardů, které nebyly zařazeny do správné třídy. Druhý model byl vytvořen pro med a směsi medů s pšeničným sirupem, nejvhodnější region se nacházel v rozsahu 9047,4 – 5435,0 cm^{-1} , špatně bylo zařazeno 5 standardů. Třetí model byl vytvořen pro med a směsi medů s oběma sirupy. Použitý region byl v rozsahu 9047,4 – 4905,1 cm^{-1} . U tohoto modelu bylo špatně klasifikováno 27 standardů. Chybně zařazené standardy byly přiřazeny do vedlejší třídy, která se lišila o 5 %. Spolehlivě se nám podařilo detekovat falšování obou sirupů u 15 a 20% směsí.

Pomocí FT-NIR spektrometrie s využitím algoritmu PLS byl vytvořen kalibrační model pro měření obsahu vody v medu. Diagnostiky *Spectrum Outlier* a *Leverage* byly použity pro identifikaci odlehlých spekter a standardů ($n = 3$). Dále byl zvolen optimální počet PLS faktorů ($n = 6$) pro kalibraci *PRESS* (*Predicted Residual Sum of Squares*) a optimální region v rozmezí 9921,60 - 4061,42 cm^{-1} se základní jednobodovou linií s minimem v rozsahu regionu 7 617,44 - 7 767,86 cm^{-1} . Spolehlivost kalibračního modelu byla ověřena křížovou validací. Přesnost metody byla posouzena na základě korelačních koeficientů (R) a standardních chyb (SEC a $SECV$). Pro sledovaný parametr byly zjištěny pro kalibraci $R = 0,996$ a $SEC = 0,110 \%$ a pro validaci $R = 0,988$ a $SECV = 0,196 \%$. Další posouzení kalibračního modelu bylo provedeno na základě grafu lineární regrese. U obsahu vody bylo dosaženo plného překrytí regresních přímek kalibrace a validace, což ukazuje na použitelnost tohoto kalibračního modelu v praxi. Spolehlivost vytvořeného kalibračního modelu byla posouzena na základě výpočtu kalibračního variačního koeficientu (CCV) a predikčního variačního koeficientu (PCV). Za velmi spolehlivou je považována hodnota CCV pod 5 % a hodnota PCV pod 10 % (Albanell *et al.*, 1999). Pro kalibrační model obsahu vody bylo získáno $CCV = 0,64 \%$ a $PCV = 1,13 \%$.

Závěr

Med je v dnešní době jednou z nejžádanějších komodit, vzhledem k jeho pozitivnímu vlivu na lidské zdraví. Proto je důležité zaobírat se kvalitou medu z tržní sítě jak z hlediska jeho fyzikálně-chemických vlastností, tak z hlediska možného falšování.

Bylo zjištěno, že z padesáti medů nakoupených v tržní síti v roce 2015 neodpovídalo osm vzorků legislativním limitům pro fyzikálně-chemické parametry (6 % snížená aktivita diastázy, 4 % vyšší obsah HMF a 4 % snížená aktivita diastázy v kombinaci s vyšším obsahem HMF). Naše výsledky fyzikálně-chemických parametrů byly porovnány se zjištěným falšováním medů za rok 2015 z portálu Státní zemědělské a potravinářské inspekce, kde z jedenácti medů z tržní sítě byl zjištěn pokles aktivity diastázy u 29 % a současný pokles aktivity diastázy a nárůst HMF u 18 %. Z našich výsledků i hodnot zjištěných z kontrolní činnosti vyplývá, že problémem jsou především parametry čerstvosti medu jako aktivita diastázy a obsah HMF. Vzhledem k deklarovaným dobám minimální trvanlivosti pravděpodobně došlo k tepelnému ošetření či špatnému skladování medu.

Jeden z dalších významných problémů představuje v současné době falšování medu pomocí sacharidových sirupů. Jednou z metod, kterou je možné použít k odhalení falšování medu, je metoda FT-NIR spektrometrie v kombinaci s diskriminační analýzou. Pomocí této metody byly vytvořeny kalibrační modely pro detekci řepného hydrolyzátu, pšeničného sirupu a obou sirupů v medech schopné detekovat 15% falšování. Kelly *et al.* (2004) pomocí FTIR – ATR byli schopni detekovat falšování vzorků medu glukózovým a fruktózovým sirupem na úrovni 14 %. FT-NIR spektrometrie tak představuje rychlou, nedestruktivní analytickou metodu pro detekci sacharidových sirupů u medů z tržní sítě, což je v době nedostatku medu a vysoké míře falšování medu v tržní síti velmi důležité. Dále byl pomocí algoritmu PLS vytvořen vysoce spolehlivý kalibrační model pro stanovení obsahu vody v medu, který je možné uplatnit v praxi.

Seznam literatury:

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

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 209/2015/FVHE. Poděkování patří také RNDr. Václavu Švamberskému, který dodal řepný hydrolyzát a pšeničný sirup pro vytvoření modelových směsí s medem pro kalibraci FT-NIR spektrometru.

Vliv pasteračních teplot na inaktivaci stafylokokových enterotoxinů typu A, B, C v mléce

Lenka Necidová¹, Kateřina Bogdanovičová¹, Bohumíra Janštová¹, Kateřina Bártová¹

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Staphylococcus aureus je významným patogenem člověka i zvířat. Je schopný produkce řady toxických substancí, jako jsou např. stafylokokové enterotoxiny (SEs), způsobující onemocnění z potravin označované jako stafylokoková enterotoxikóza. Onemocnění má rychlý nástup i průběh. První symptomy intoxikace - zvracení, bolest hlavy, břicha a průjem se objevují za 1 - 6 hodin po požití potravin kontaminované SEs (Loir, et al., 2003). *S. aureus* je jedním z hlavních etiologických agens způsobujících mastitidy u mléčného skotu (Rabello et al., 2007). Z tohoto důvodu může mléko a mléčné výrobky představovat zvýšené riziko pro konzumenty. V současnosti je známo 22 typů SEs označovaných písmeny A-V (Argudín et al., 2010). Za rizikové množství koagulázopozitivních stafylokoků, mezi jejichž hlavní zástupce se *S. aureus* řadí, je považován počet více než 10^5 KTJ/ml (g) potravin (Necidová et al., 2012; Nařízení komise (ES) č. 2073/2005). Významnou vlastností stafylokokových enterotoxinů je jejich odolnost k působení vyšších teplot (Bhunja, 2008). Cílem této práce bylo hodnocení termostability stafylokokových enterotoxinů účinkem teplot běžně používaných při tepelném opracování (pasteraci) mléka.

Materiál a metodika

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

Kmeny *S. aureus* použité k pokusům, pocházely ze syrového kravského mléka (37) a z České sbírky mikroorganismů Brno (CCM 5765, CCM 5757, CCM 5971) (3). Celkem bylo použito 40 kmenů *S. aureus* s produkcí enterotoxinů SEA (13), SEB (13), SEC (14). U všech kmenů byla prokázána přítomnost genu kódujících tvorbu SEs: *sea*, *seb* nebo *sec*.

Toxinogenními kmeny bylo zaočkováno pasterované mléko v počtech $1,7 \cdot 10^4 - 1,5 \cdot 10^5$ KTJ.ml⁻¹. Takto zaočkované vzorky byly inkubovány 24 hodin při teplotě 37 °C, aby došlo k pomnožení *S. aureus* a k produkci stafylokokových enterotoxinů. U všech vzorků bylo po 24 hodinové inkubaci provedeno stanovení počtu *S. aureus* dle ČSN EN ISO 6888-1 (1999) a prověřena přítomnost SEs imunofluorescenční metodou (ELFA). Pro stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*S. aureus*) byl určen Baird-Parker agar s vaječnou emulzí a teluričitanem draselným, používaný jako arbitrážní půda. Inokulované plotny byly inkubovány aerobně při 37 °C po dobu 24 – 48

hodin. Následně byly vzorky pasterovány při různých teplotách, které jsou běžně využívány v mlékárenském průmyslu (72 °C, 85 °C a 92 °C), a to po dobu 15 s.

Po tepelném ohřevu došlo ke zchlazení mléka a ke stanovení počtu *S. aureus* a přítomnosti SEs. Průkaz stafylokokových enterotoxinů byl proveden fluorescenční imunologickou metodou ELFA (Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay) přístrojem miniVIDAS[®] (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Tento automatizovaný systém detekuje stafylokokové enterotoxiny typu A-E jako sumu, s detekčním limitem 0,5 ng .g⁻¹ (ml⁻¹) potravin pro SEA a SEB a s detekčním limitem 1,0 ng .g⁻¹ (ml⁻¹) pro SEC - SEE. ELFA metoda výsledky pro detekci SEs prezentuje jako pozitivní nebo negativní, ale současně lze z hodnot TV (Test Value), odpovídajících míře fluorescence, semikvantitativně posoudit množství SEs v testovaném vzorku.

Výsledky

První část výsledků studie zaznamenala vliv pasteračních teplot na přežívání *S. aureus* v mléce. Teploty 72 °C, 85 °C a 92 °C působící 15 s nedokázaly vždy bakterie *S. aureus* zcela inaktivovat. Legislativou požadovaná teplota 72 °C působící po dobu 15 s (nařízení (ES) č. 853/2004), označovaná jako šetrná pasterace, se pro inaktivaci bakterií *S. aureus* dle očekávání ukázala jako nejméně účinná. Jedním z důvodů byly, vzhledem k předchozí záměrné inkubaci vzorků za účelem tvorby SEs, vysoké počty *S. aureus* před pasterací, které se pohybovaly v rozmezí 1,9 – 2,6.10⁹ KTJ.ml⁻¹. Pro syrové kravské mléko je limit celkového počtu mikroorganismů legislativou stanoven v podobě klouzavého geometrického průměru na maximálně 10⁵ bakterií v 1 ml mléka (nařízení (ES) č. 853/2004).

Hlavním cílem studie bylo posoudit vliv pasteračních teplot na možnou inaktivaci SEs typu A, B, C. Jednou ze základních charakteristik SEs je jejich odolnost k vysokým teplotám. Bhunia (2008) uvádí, že SEs jsou termorezistentní a zůstávají aktivní dokonce po 30 minutovém varu, v některých případech i po působení teploty 121°C po dobu 28 minut. Larkin et al. (2009) a Argudín et al. (2010) uvádí, že stafylokokové enterotoxiny jsou odolné vůči podmínkám tepelného zpracování, které běžně ničí bakterie. Podle Claeys et al. (2013) nejsou termorezistentní enterotoxiny vytvořené *S. aureus* zničeny pasterací (např. 71-74 °C/15-40 s), ale sterilace (110-120 °C/10-20 min) nebo UHT (135-140 °C/6-10 s pro nepřímý způsob a 140-150 °C/2-4 s pro přímý způsob) enterotoxiny v mléce ničí. V Japonsku byl příčinou alimentární intoxikace nebývalého rozsahu SEA přítomný v sušeném mléce (Asao et al., 2003). V odstředěném mléce, použitém k výrobě sušeného mléka, které bylo minimálně dvakrát pasterováno při teplotě 130 °C po dobu 4 nebo 2 s, byl enterotoxin SEA částečně inaktivován, ale zachoval si jak imunologickou, tak biologickou aktivitu. Popsané onemocnění z potravin je ukázkou toho, že zatímco stafylokoky mohou být tepelným opracováním

zničeny, stafylokokové enterotoxiny si v potravinách mohou udržet aktivitu a způsobit u konzumentů alimentární intoxikaci.

Naše výsledky ukázaly, že i pasterační teploty do 100 °C mohou SEs inaktivovat. Podstatné ale je, jaké množství enterotoxinu se v mléce nachází. Studie Hilker et al. (1968) prokázala, že přestože SEA byl rezistentní při použití teplot nad 100 °C, úspěšnost inaktivace závisela na koncentraci toxinu ve vzorcích. Výsledky Tabulky 1 ukazují počty testovaných kmenů *S. aureus* a množství vzorků (%), u kterých tepelné opracování toxinu neinaktivovalo. Statistické hodnocení výsledků naší studie s využitím hodnot TV potvrdilo, že množství *S. aureus* před pasterací nemá vliv na množství toxinu ve vzorku. Dále bylo statisticky potvrzeno, že toxin je pasteračními teplotami inaktivován v závislosti na jeho množství ve vzorku (termorezistence je závislá na koncentraci toxinu ve vzorku) a že množství toxinu se ve vzorcích snižuje úměrně s použitou pasterační teplotou.

Kmen <i>S. aureus</i> (počet)	Typ SEs	Průkaz SEs			
		Před pasterací	Pasterace 72°C/15s	Pasterace 85°C/15s	Pasterace 92°C/15s
13	SEA	100 %	100 %	76,9 %	76,9 %
13	SEB	100 %	81,8 %	15,4 %	18,2 %
14	SEC	100 %	85,7 %	64,3 %	42,9 %
Celkem (40)	SEA, SEB, SEC	100 %	87,8 %	52,5 %	45,0 %

Tabulka 1. Počty kmenů *S. aureus* s pozitivním průkazem stafylokokových enterotoxinů ve vzorcích mléka v závislosti na tepelném ošetření

Závěr

Provedená studie ukázala, že i v případě, kdy při mikrobiologickém vyšetření pasterovaného mléka nejsou bakterie *S. aureus* detekovány, případně je stanoven jejich nízký počet, může být potravina příčinou stafylokokové enterotoxikózy z důvodu přítomnosti termostabilních SEs. Dále bylo prokázáno, že pasterační teploty mohou stafylokokové enterotoxiny inaktivovat. Termorezistence stafylokokových enterotoxinů vůči pasteračním teplotám, uváděná odbornou i vědeckou literaturou jako jejich významná vlastnost, tak byla prokázána jen u části vzorků. Nejčastěji byla odolnost k tepelnému záhřevu zaznamenána u SEA, nejméně často u SEB. Odolnost SEs klesala se vzrůstající pasterační teplotou. Přestože pasterace mléka má zásadní vliv na zajištění bezpečnosti této potraviny, hlavním preventivním krokem pro zabránění výskytu stafylokokové enterotoxikózy u

konzumentů pasterovaného mléka zůstává nepřerušeni chladicího řetězce, jak požaduje platná evropská legislativa (nařízení (ES) č. 853/2004).

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno č. 212/2015/FVHE.

Seznam literatury:

1. ARGUDÍN, M. A., MENDOZA, M. C., RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2010, vol. 2, p. 1751–1773.
2. ASAO, T., KUMEDA, Y., KAWAI, T., SHIBATA, T., ODA, H., HARUKI, K., NAKAZAWA, H., KOZAKI, S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiology and Infection*, 2003, vol. 130, p. 33-40.
3. BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens. Mechanisms and pathogenesis. 1st ed. New York, USA: Springer Science+Business Media, LLC. 2008. P. 276. ISBN 978-0-387-74536-7
4. CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G., DE BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K., DE ZUTTER, L., HUYGHEBAERT, A., IMBERECHTS, H., THIANGE, P., VANDENPLAS, Y., HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 2013, vol. 31, p. 251-262.
5. 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.
6. HILKER, J.S., HEILMAN, W.R., TAN, P.L., DENNY, C.B., BOHRER, C.W. Heat Inactivation of Enterotoxin A from *Staphylococcus aureus* in Veronal Buffer. *Applied Microbiology*, 1968, vol. 16, p. 308-310.
7. JANŠTOVÁ, B, jr., NECIDOVÁ, L., SKOČKOVÁ, A., JANŠTOVÁ, B. Staphylococcal enterotoxin production in model samples of milk and fresh cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 2014, vol. 53, p. 389-392.
8. LARKIN, E. A., CARMAN, R. J., KRAKAUER, T., STILES, B. G. *Staphylococcus aureus*: the toxic presence of a pathogen extraordinaire. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, vol. 16, p. 4003–4019.
9. LOIR, Y., BARON, F., GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research*, 2003, vol. 2, p. 63–76.
10. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Úřední věstník 2004; L 139: 55-205.
11. 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.
12. 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.
13. RABELLO, R. F., MOREIRA, B. M., LOPES, R. M., TEIXEIRA, L., M., RILEY, L., W., CASTRO, A., C. Multilocus semence typik of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from cos with mastitis in Brazilian dairy herds. *Journal of Medical Microbiology*, 2007, vol. 56, p. 1505-1511.

Využití lupinových semen v dietách určených pro výkrm brojlerových kuřat

Kateřina Sedláková¹, Eva Straková¹, Pavel Suchý², Jana Krejcarová¹

Ústav výživy zvířat¹, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; Ústav zootechniky a zoohygieny², Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Pěstování lupin je v posledních letech předmětem celosvětového zájmu a stává se zajímavou komoditou. V současné době se v rámci České republiky setkáváme s osevními plochami této perspektivní plodiny. U kulturních odrůd lupinových semen, z výživářského hlediska, pozitivně hodnotíme nízký obsah antinutričních faktorů, např. chinolizidinové alkaloidy nebo antitrypsinový faktor, pro který se např. sójové boby a jejich produkty bez úpravy (např. termické) nedají krmit. Jednotlivé odrůdy kulturních lupin lze rozdělit do tří základních skupin. Jde o skupinu úzkolistých odrůd (*Lupinus angustifolius*), skupinu bílých odrůd (*Lupinus albus*) a skupinu žlutých odrůd (*Lupinus luteus*). V rámci skupin jednotlivých odrůd existují značné rozdíly v živinovém složení. Tyto rozdíly jsou dány především obsahem dusíkatých látek, obsahem tuku, ale i dalších živin. U úzkolistých odrůd je obecně v semenu nižší obsah proteinů, ve srovnání s bílými odrůdami. Nejvyšší obsah proteinu obsahují v semenu žluté odrůdy, kde jejich obsah u některých odrůd dosahuje až 50 %. V podmínkách ČR je pro pěstování pro krmivářské účely nejvhodnější skupina bílých odrůd lupin, a to z důvodu obsahu proteinu, který je srovnatelný s obsahem proteinu v sójových bobech, dokonce některé odrůdy bílých lupin mají i vyšší obsah proteinu, než sójové boby. Navíc bílé odrůdy lze poměrně snadněji pěstovat v půdních a klimatických podmínkách České republiky a jsou odolnější vůči houbovým chorobám. Výhodou, na rozdíl od sóje je i to, že většina odrůd nepatří mezi GMO. Z hlediska krmivářského uplatnění představují lupinová semena proteinové krmivo. V této souvislosti nás zajímá především obsah hrubého proteinu, kde kvalita proteinu je dána obsahem jednotlivých aminokyselin. Cílem experimentální práce bylo zjistit, jak diety s obsahem lupinového šrotu ovlivní chemické složení prsní a stehenní svaloviny brojlerových kuřat se zaměřením na aminokyselinové spektrum.

Materiál a metodika

Diety se lišily tím, že u pokusné skupiny P1 byla 1/3 dusíkatých látek (NL) sojového extrahovaného šrotu nahrazena NL z lupinového šrotu a u skupiny P2 byla provedena náhrada 2/3 NL oproti kontrole. Byla použita odrůda Amiga ze skupiny bílé kvetoucích lupin. Kuřata byla vykrmována na hluboké podestýlce v akreditované experimentální stáji s řízeným světelným, teplotním,

zoohygienickým a krmně technologickým režimem. Podmínky chovu plně respektovaly zásady pro výkrm brojlerů ROSS 308 uváděné v technologickém návodu. Byly vytvořeny 3 skupiny sexovaných kuřat Ross 308, a to skupina kontrolní K 70 kuřat (35 slepiček a 35 kohoutků), skupina pokusná P1 (35 slepiček a 35 kohoutků) a skupina P2 (35 slepiček a 35 kohoutků). Z hlediska zajištění požadované potřeby aminokyselin byly diety s lupinovým šrotem doplněny syntetickými aminokyselinami L-lysinem, L-threoninem a D, L-methioninem.

Svalovina (prs ní, stehenn í) získaná z jatečn ích rozborů byla podrobena chemick ým rozborům. Ve svalovin ě byl stanoven obsah hrub ěho proteinu ($N \times 6.25$). Dusík byl stanoven dle Kjeldahla na analyzátoru Buchi (firma Centec automatika, spol. s.r.o.). Obsah hrub ěho tuku přístrojem ANKOM^{XT10} Fat Analyzer (firma O.K. SERVIS BioPro). Obsah popelovin, byl stanoven vázkově po zpopeln ěn í vzorku při teplot ě 550 °C za předepsan ých podm ínek. Koncentrace vápn íku, fosforu a hořčíku byly stanoveny po zpopeln ěn í vzorku masa. Vápn ík a hořčík byl stanoven v chloridov ěm výluhu chelatometricky (chelaton 3 – di – NA EDTA), fosfor byl stanoven fotometricky při 445 nm. Brutto energie svaloviny byla stanovena kalorimetricky přístrojem AC 500 (firma LECO). Aminokyselinov ě spektrum bylo stanoveno přístrojem AAA 400 (firma INGOS Praha). Chemické hodnoty svaloviny uvedené v práci jsou vyjádřeny v původn í sušin ě vzorku. Dosažen ě výsledky byly zpracovány statistick ým programem Unistat CZ verze 5.6 for Excel, ve kter ěm bylo provedeno vyhodnocen í prům ěrn ých hodnot a jejich rozdílů mnohonásobn ým porovnán ím pomocí testu Turkey-HSD, na hladin ě významnosti $P \leq 0,01$ a $P \leq 0,05$.

Výsledky

Chemické složen í prsn í a stehenn í svaloviny brojlerov ých kuřat 40. den výkrmu v původn í sušin ě vzorku je uveden v tabulce 1 a 2.

Tabulka 1. Chemické složen í prsn í a stehenn í svaloviny u slepiček brojlerov ých kuřat 40. den výkrmu v původn í sušin ě vzorku

Ukazatel (g/kg)	Prsn í svalovina			Stehenn í svalovina		
	K	P1	P2	K	P1	P2
Hrub ý protein	220,47	221,81	219,33	176,41	181,07	175,58
Hrub ý tuk	19,69	14,36	16,12	80,06	84,33	85,50
Popeloviny	11,33	12,11	12,23	10,47	10,95	10,59
Vápn ík	0,474	0,529	0,515	0,401	0,477	0,491
Fosfor	2,28	2,34	2,30	1,99	1,96	2,00
Hořčík	0,365	0,413	0,307	0,343	0,306	0,277
Brutto energie (MJ/kg)	5,94	5,80	5,83	7,42	7,54	7,55

Tabulka 2. Chemické složení prsní a stehenní svaloviny u kohoutků brojlerových kuřat 40. den výkrmu v původní sušině vzorku

Ukazatel (g/kg)	Prsní svalovina			Stehenní svalovina		
	K	P1	P2	K	P1	P2
Hrubý protein	210,97	205,55	211,41	179,57	165,51	177,84
Hrubý tuk	16,15	14,94	17,61	64,47	65,17	76,14
Popeloviny	11,46	11,62	11,65	10,88	10,77	10,12
Vápník	0,516	0,510	0,526	0,405	0,463	0,482
Fosfor	2,25	2,28	2,35	1,95	1,92	2,07
Hořčík	0,357	0,385	0,373	0,304	0,295	0,273
Brutto energie (MJ/kg)	5,65	5,61	5,66	6,76	6,90	7,27

Aminokyselinové složení prsní a stehenní svaloviny u slepiček a kohoutků brojlerových kuřat 40. den výkrmu v původní sušině vzorku uvádí tabulka 3.

Tabulka 3. Aminokyselinové složení prsní a stehenní svaloviny u slepiček a kohoutků brojlerových kuřat 40. den výkrmu v původní sušině vzorku

Aminokyseliny (g/kg)	Slepičky				Kohoutci			
	Prsní svalovina		Stehenní svalovina		Prsní svalovina		Stehenní svalovina	
	K	P 2	K	P 2	K	P 2	K	P 2
Asp	19,53	20,53	16,97	17,86 ^B	18,04	18,86	14,40	17,42 ^A
Thr	9,52	9,36	8,39	7,88	8,41	9,15 ^B	7,46	8,41 ^B
Ser	8,23	7,91	7,33	6,77 ^B	7,25	7,79 ^B	6,46	7,33 ^A
Glu	28,87	31,93 ^A	28,25	30,13 ^A	26,89	30,09	24,85	28,89 ^A
Pro	9,45	9,74	9,39	9,37	8,84	17,14 ^A	7,47	9,36
Gly	9,29	9,67	9,96	8,75 ^A	8,62	9,66 ^A	8,88	10,07 ^A
Ala	12,54	12,95	11,62	9,23 ^A	11,76	12,45	10,43	11,23
Val	10,95	11,58 ^B	9,29	11,08 ^A	10,41	10,66	8,62	9,05
Met	5,91	6,26	5,12	5,38	5,28	6,40 ^A	4,62	5,42 ^A
Ileu	10,40	10,48	8,84	9,03	9,75	9,42	8,05	8,59
Leu	17,15	17,73	14,92	15,10	15,92	17,10 ^B	13,43	15,16 ^A
Tyr	11,35	9,74 ^A	7,71	6,89 ^A	9,60	7,98 ^A	7,43	6,58 ^B
Phe	8,42	8,96	7,03	7,84 ^B	7,99	8,34	6,79	7,13
His	10,29	10,32	7,05	7,07	9,50	9,84	0	0
Lys	20,85	20,43	19,06	16,67 ^A	20,53	20,26	6,41	6,49
Arg	16,54	15,52	15,20	13,78 ^A	14,49	16,17 ^B	13,64	14,53

Vysvětlivky: ^A statisticky vysoce významný rozdíl ($P \leq 0,01$), ^B statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$)

Závěr

Výsledky experimentu jednoznačně potvrdily plnohodnotnost náhrady sojového extrahovaného šrotu šrotem ze semen lupiny odrůdy Amiga. Dosažené výsledky korespondují s výsledky publikovanými autory Sitko a Čermák (1998), kteří rovněž u vykrmovaných kuřat nepozorovali zhoršení užitkovosti ani konverze krmiva při zařazení lupinových semen do krmných směsí.

Experimentální práce potvrdila předpoklad, že lupinové semeno je vhodným zdrojem proteinu pro výkrm brojlerových kuřat, toto tvrzení je v souladu s poznatky Olkowskeho et al. (2001), kteří dokládají, že semena lupin jsou významným zdrojem proteinů pro drůbež. V aminokyselinovém složení prsní svaloviny u slepiček brojlerových kuřat, kterým byly podávány diety s obsahem lupiny bylo pozorováno vysoce významné ($P \leq 0,01$) zvýšení obsahu kyseliny glutamové, ve svalovině stehenní i valinu. Naopak bylo zaznamenáno vysoce významné ($P \leq 0,01$) snížení obsahu tyrosinu u prsní svaloviny slepiček pokusné skupiny P2, v případě stehenní svaloviny této skupiny i lysinu, alaninu a argininu. V prsní svalovině kohoutků experimentálních skupin bylo zjištěno vysoce významné ($P \leq 0.01$) zvýšení obsahu threoninu, serinu, prolinu a glycinu, naopak bylo pozorováno vysoce významné ($P \leq 0.01$) snížení obsahu methioninu, leucinu a argininu. U stehenní svaloviny bylo navíc zaznamenáno vysoce významné ($P \leq 0.01$) zvýšení asparaginu, kyseliny glutamové a methioninu, vysoce významné ($P \leq 0.01$) snížení bylo pozorováno pouze u leucinu. Z dosažených výsledků lze konstatovat, že lupinová semena jsou vhodnou náhradou NL za sójový extrahovaný šrot, za optimální lze považovat náhradu do 1/3 NL sójového šrotu. Při sestavování diet s obsahem lupiny je nutné, vzhledem k vysoké odrůdové rozdílnosti, optimalizovat jednotlivé živiny v dietě, především se zaměřením na jednotlivé aminokyseliny.

Seznam literatury:

- LETTNER, F., ZOLLITSCH, W. 1995: Lupins in broiler feeds. Forderungsdienst, vol. 43, p. 285-288.
- OLKOWSKI, A. A., OLKOWSKI, B.I., AMAROWICZ R., CLASSEN H.L. 2001. Adverse effects of dietary lupine in broiler chickens. Poult Sci, vol. 80, p. 621-625.
- ROTHMAIER, D. A., KIRCHGESSNER, M. 1994 White lupins (*Lupinus albus*, L) as a replacement for soybean meal in diets for fattening chickens. Arch Geflügelkd, 58, p. 111-114.
- SCHAMS-SCHARGH, M., ZOLLITSCH, W., KNAUS, W., LETTNER, F. 1994: Der Einsatz von Lupinen in der Hühnerfütterung. Bodenkultur, vol. 45, p. 163-175.
- SITKO, ČERMÁK, B. 1998: Influence of lupin seed on performance and meat quality of broilers. Sborník Zemědělské Fakulty Jihočeské Univerzity, České Budějovice: Zootechnická řada, vol. 15, p. 3-9.
- TEIXEIRA, A.S., DOS, R. 1995: Replacement of soyabeans by lupins (*Lupinus luteus*) in the feeding of broiler fowls. Rev Portug Ciênc Veter, vol. 90, p. 20-28.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 214/2015/FVHE.

Charakteristika meticilin-rezistentních *Staphylococcus aureus* izolovaných z potravinového řetězce v České republice

Kateřina Barošová^{1,2}, Kateřina Bogdanovičová¹, Ivana Koláčková², Renáta Karpíšková^{1,2}

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

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

Úvod

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) je významným původcem humánních i animálních infekcí po celém světě. Tyto bakterie již byly izolovány z různých částí potravinového řetězce a jeho prostřednictvím došlo také k přenosu MRSA na člověka (van Cleef *et al.*, 2011). Převládající linií u Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA) v Evropě představují kmeny patřící zejména k sekvenčnímu typu (ST) 398 (klonální komplex CC398). Prevalence MRSA se výrazně liší mezi jednotlivými evropskými státy. Cílem této práce bylo studium vlastností MRSA izolovaných z potravin živočišného původu v České republice. Výskyt MRSA byl monitorován na úrovni farem, jatek a tržní sítě.

Materiál a metody

Celkem bylo analyzováno 37 kmenů MRSA (31 izolátů ST398 z prasat a 6 non ST398 ze skotu) (tabulky č. 1, č. 2, č. 3). Kmeny pochází ze sbírky kmenů Výzkumného ústavu veterinárního lékařství a ze sbírky Veterinární a farmaceutické university Brno a byly získány v letech 2012-2015. Detekce MRSA byla provedena na základě rozhodnutí Komise 2008/55/EC. Suspektní kolonie se testovaly polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) detekující *S. aureus* druhově specifický fragment SA442 (Martineau *et al.*, 1998), a *mecA* gen kódující rezistenci k meticilinu (Oliveira and de Lencastre, 2002). Metoda PCR byla také použita pro detekci sekvenčního typu ST398 (van Wamel, 2010). U všech izolátů byly provedeny *spa*-typizace a MLST. Kmeny byly připraveny k sekvenaci pomocí metodiky zpracované sdružením evropských laboratoří (European Network of Laboratories) dostupné na webové stránce SeqNet.org. Vzorky byly zaslány k sekvenaci do Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Diskovou difuzní metodou na Muller-Hinton agaru (Oxoid, UK) byla u kmenů testována citlivost k 10 skupinám antimikrobiálních látek: penicilinům (oxacillin 1 µg), tetracyklinům (tetracyklin 30 µg), makrolidům (erythromycin 15 µg), inhibitorům betelaktamáz (co-trimoxazole 25 µg), aminoglykosidům (gentamicin 10 µg), linkosamidům (clindamycin 2 µg), amfenikolům (chloramphenicol 30 µg), fluorochinolonům (ciprofloxacin 15 µg), glykopeptidům (teicoplanin 30 µg) a ansamycinům (rifampicin 5 µg) (Oxoid, UK). Kmen *S.*

aureus ATCC 25923 byl použit jako kontrola. Na základě velikosti inhibičních zón byly izoláty hodnoceny dle kritérií CLSI (2012). Přítomnost genů virulence *tst* (Mehrotra *et al.*, 2000), *pvl*, *eta*, *etb* (Lina *et al.*, 1999; Hososaka *et al.*, 2007) a genů kódujících enterotoxiny *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* (Monday and Bohach, 1999; Løvseth *et al.*, 2004) byla detekována metodou PCR.

Výsledky a diskuse

Tabulka č. 1: Charakteristika izolátů pocházejících z živých zvířat

Původ izolátů	Farma	MLST typ	<i>spa</i> typ	Počet MRSA izolátů	Profil rezistence
prase	1	ST398	t011	4	OX, TE, E, CN, DA
					OX, TE, E, DA
	2		OX, TE, FOX		
				OX, TE, CN	
	3		OX, TE, E, DA, CIP		
	4			OX, TE	

Zkratky: oxacillin (OX), tetracyklin (TE), erythromycin (E), gentamicin (CN), clindamycin (DA), ciprofloxacin (CIP)

Tabulka č. 2: Charakteristika izolátů pocházejících z jatek

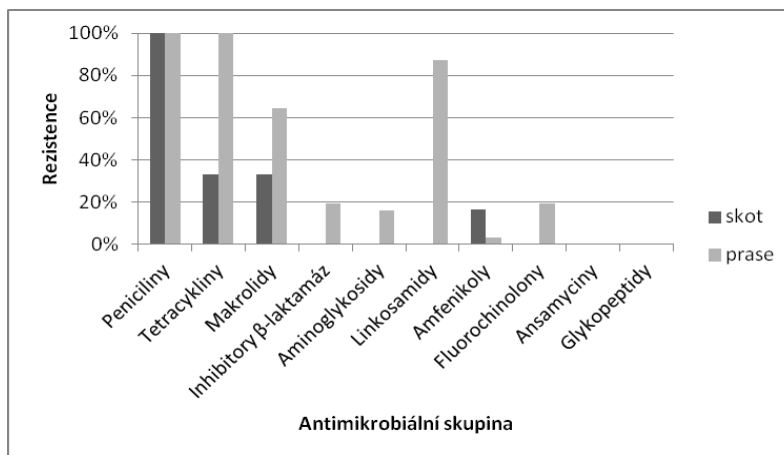
Původ izolátů	Jatka	Farma	MLST typ	<i>spa</i> typ	Počet MRSA izolátů	Profil rezistence	
Stěry z JUT prasat	A	8	ST398	t011	1	OX, TE, E, DA	
				t034	2		
		9		t2346	1	OX, TE, E, CN	
				t011	1	OX, TE, E, DA	
		10		t034	2	OX, TE, DA	
				t011	2	OX, TE, E, DA	
		11		13	t034	6	OX, TE, E, SXT, DA, CIP
							OX, TE, E, DA
		OX, TE, E, SXT, DA					
		OX, TE, E, DA, CIP					
		OX, TE, E, DA					
		OX, TE, DA					
	12	B	5	t011	1	OX, TE, E, CN, DA	
						C	6
	7	D	16	t011	1		
						14	15
15	16	17	ST361	t315	5		
						16	18
					OX, TE, E		

Zkratky: oxacillin (OX), tetracyklin (TE), erythromycin (E), co-trimoxazole (SXT), gentamicin (CN), clindamycin (DA), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), jatečně upravené tělo (JUT)

Tabulka č. 3: Charakteristika izolátů pocházejících z tržní sítě

Původ	Prodejna	MLST typ	<i>spa</i> typ	Počet MRSA izolátů	Rezistenční profil
Vepřové maso a játra	I	ST398	t899	1	OX, TE, E, CN, DA, C, CIP
	II		t034	4	OX, TE, DA
	III				OX, TE, SXT, DA
	IV				OX, TE, E, SXT, DA
	V				

Zkratky: oxacillin (OX), tetracyklin (TE), erythromycin (E), co-trimoxazole (SXT), clindamycin (DA), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP)



Graf č. 1: Srovnání antimikrobiální rezistence MRSA izolátů podle jejich původu

Ve všech úrovních potravinového řetězce (farma – tabulka č. 1, jatka – tabulka č. 2, tržní síť – tabulka č. 3) byly detekovány celkem 3 MLST typy. Všechny izoláty z prasat patřily k sekvenčnímu typu ST398 (CC398), izoláty ze skotu k ST1 (CC1) a ST361 (CC 361). Izoláty sekvenčního typu ST398 byly heterogenní a skládaly se ze čtyřech různých *spa*-typů. Mezi těmito izoláty dominoval *spa*-typ t034 (58%) a t011 (32%) podobně jako uvádí Price, 2012. Další *spa*-typy t2346, t4652 a t899 byly detekovány pouze v jednom případě. Srovnání antibiotické rezistence MRSA uvádí graf č. 1. Rezistence se liší v závislosti na původu vzorků. Izoláty z prasat na rozdíl od izolátů ze skotu vykazují rezistenci k linkosamidům a také k fluorochinolonům. Geny virulence (*tst*, *pvl*, *eta*, *etb*) nebyly detekovány v celém souboru testovaných kmenů. Geny kódující enterotoxiny se nevyskytovaly u kmenů ST398, geny *sei* a *seg* byly detekovány u izolátů ST361 pocházejících ze skotu.

Závěr

Výskyt MRSA byl potvrzen u živých zvířat (prasata a skot), na jatkách a také v tržní síti. Výsledky této studie ukazují dominantní výskyt MRSA patřících k CC398 v produkci prasat stejně, jak je popisováno v dalších Evropských zemích.

Literatura

- Commission Decision of 20 December 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of *Salmonella spp.* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in herds of breeding pigs to be carried out in the Member States. Official Journal of the European Union (notified under document number C (2007) 6579). 2008/55/EC.
- HOSOSAKA, Yasuko, HANAKI, Hideaki, ENDO, Harumi *et. al.* Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2007, **13**(2), 79-86. ISSN 1341-321X.
- LINA, Gerard, PIÉMONT, Yves, GODAIL-GAMOT, Florence, BES, Michèle, PETER, Marie-Odile, GAUDUCHON, Valérie, VANDENESCH, François a ETIENNE, Jerome. Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 1999, **29**(5), 1128-1132. ISSN 1058-4838.
- LØVSETH Astrid, LONCAREVIC, Semir a BERDAL, Knut G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolate. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, **42**(8), 3869-3872. ISSN 0934-9723.
- MARTINEAU, Francis, PICARD François J., ROY, Paul H., OUELLETTE, Marc, BERGERON, Michel G. Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, **36**(3), 618-623. ISSN 0095-1137.
- MEHROTRA, Manisha, WANG, Gehua a JOHNSON Wendy M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, **38**(3), 1032-1035. ISSN 0095-1137.
- MONDAY, Steven R. a BOHACH, Gregory A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, **37**(10), 3411-3414. ISSN 0095-1137.
- OLIVEIRA, Duarte C. a DE LENCASTRE, Hermínia. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002, **46**(7), 2155-2161. ISSN 0066-4804.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- PRICE, Lance B., STEGGER, Marc, HASMAN, Hasman, AZIZ, Maliha, LARSEN, Jesper, ANDERSEN, Paal Skytt, PEARSON, Talima, WATERS, Andrew E., FOSTER, Jeffrey T., SCHUPP, Jaes, GILLECE, John, DRIEBE, Elizabeth, LIU, Cindy M., SPRINGER, Burkhard, ZDOVC, Irena, BATTISTI, Antonio, FRANCO, Alessia, ZMUDZKI, Jacek, SCHWARZ, Stefan, BUTAYE, Patrick, JOUY, Eric, POMBA, Constanca, PORRERO, M. Concepción, RUIMY, Raymond, SMITH, Tara C., ROBINSON, D. Ashley, WEESE, J. Scott, ARRIOLA, Carmen Sofia, YU, Fangyou, LAURENT, Frederic, KEIM, Paul, SKOV, Robert a AARESTRUP, Frank M. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio*. 2012, **3**(1), e00305-11. ISSN 2161-2129.
- Seqnet [online]. European Network of laboratories for sequence based typing of microbial pathogens [cit. 19. 8. 2015]. Dostupné z: <http://www.seqnet.org/downloads.html>
- VAN CLEEF, Brigitte A. G. L., MONNET, Dominique L., VOSS, Andreas, KRZIWANEK, Karina, ALLERBERGER, Franz, STRUELENS, Marc, ZEMLICKOVA, Helena, SKOV, Robert L., VUOPIO-VARKILA, Jaana, CUNY, Christiane, FRIEDRICH, Alexander W., SPILIOPOULOU, Iris, PÁSZTI, Judit, HARDARDOTTIR, Hjordis, ROSSNEY, Angela, PAN, Angelo, PANTOSTI, Annalisa, BORG, Michael, GRUNDMANN, Hajo, MUELLER-PREMUR, Manica, OLSSON-LILJEQUIST, Barbro, WIDMER, Andreas, HARBARTH, Stephan, SCHWEIGER, Alexander, UNAL, Serhat a KLUYTMANS, Jan A. J. W. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Humans, Europe. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, **17**(3), 502-505. ISSN 1080-6040.
- VAN WAMEL, Willem J. B., HANSENOVÁ MAŇÁSKOVÁ, Silvie, FLUIT, A. C., VERBRUGH, Henri, DE NEELING, Albert J., VAN DUIJKEREN, Engeline, VAN BELKUM, Alex. Short term micro evolution and PCR-detection of methicillin -resistant and susceptible *S. aureus* sequence type 398. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010, **29**(1), 119-122. ISSN 0934-9723.

Plazmidově kódovaná rezistence k cefalosporinům a fluorochinolonům u izolátů *Escherichia coli* z vrány americké

Ivana Jamborová¹, Monika Dolejská^{1,2}, Kateřina Kachlíková¹, Ludek Zurek³, Andrea Townsend⁴, Julie C. Ellis⁵, Anne B. Clark⁶, Alois Čížek⁷, Ivan Literák^{1,2}

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno (CEITEC VFU Brno)², Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Kansas State University, Kansas³, Department of Wildlife, Fish, and Conservation Biology, University of California at Davis, California⁴ Cummings School of Veterinary Medicine North Grafton, Tufts University, Massachusetts⁵ Department of Biological Sciences, Binghamton University, New York⁶, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno⁷

Úvod

Cefalosporiny vyšších generací, karbapenemy a fluorochinolony jsou významná antibiotika podávaná při léčbě bakteriálních infekcí v humánní a veterinární medicíně. Celosvětový trend narůstající rezistence vůči těmto látkám má závažné dopady na zdraví lidí, zvířat a kvalitu životního prostředí^{1,2}. Volně žijící zvířata, která nepřichází do přímého kontaktu s antimikrobiálními látkami, jsou nepřímo ovlivněna jejich frekventním využíváním v terapii zvířat a člověka. Zástupci čeledi Corvidae, včetně vrány americké (*Corvus brachyrhynchos*), se často stahují do blízkosti větších měst, kde se přiživují na místech s vysokou incidencí multirezistentních bakterií, jako jsou skládky odpadu či pole hnojená chlévskou mrvou. Touto cestou jsou vystaveny zvýšenému riziku kolonizace multirezistentními bakteriemi^{3,4}. Představují tak vhodné bioindikátory kontaminace životního prostředí a potenciální rezervoáry a vektory multirezistentních bakterií. Významným faktorem ovlivňujícím prevalenci rezistentních bakterií je i rozdílná antibiotická politika lišící se na různých kontinentech, kupříkladu používáním antimikrobiálních látek jako růstových stimulátorů v USA⁵. Cílem studie bylo zdokumentovat prevalenci a epidemiologické charakteristiky *Escherichia coli* s produkcí širokospektrých beta-laktamáz (ESBL), beta-laktamáz typu AmpC, karbapenemáz a plazmidově kódovaných genů rezistence k chinolonům (PMQR) u vrány americké (*Corvus brachyrhynchos*) na čtyřech lokalitách Severní Ameriky. Studie je věnována posouzení významu tohoto synantropního druhu jako rezervoáru a potenciálního vektoru multirezistentních bakterií v prostředí a přináší tak dosud nezmapovaný náhled na obraz antibiotické rezistence u volně žijících zvířat v Severní Americe.

Materiál a metodika

Vyšetřeno bylo celkem 590 vzorků trusu vrány americké ze čtyř lokalit Severní Ameriky: Kansas (Manhattan, $n_{\text{vzorků}}=149$), Massachusetts (Worcester, 200), California (Davis, 198) a New York (Auburn, 43). Vzorky trusu byly pomnoženy v peptonové vodě a následně inokulovány na média suplementovaná cefotaximem (2 mg/l), ciprofloxacinem (0,05 mg/l) nebo meropenemem (0,125 mg/l). Izoláty rezistentní k cefotaximu byly testovány na přítomnost ESBL pomocí double-disc synergy testu. AmpC a ESBL fenotyp byl následně verifikován pomocí MASTDISCS ID AmpC a ESBL test (Mast Diagnostics, Merseyside, UK)⁴. Rezistentní izoláty byly testovány na přítomnost genů kódujících ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV})⁴, AmpC (*bla*_{DHA}, *bla*_{ACC-1}, *bla*_{ACC-2}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX})⁴ a karbapenemázy (*bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OVA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM})⁶, genů rezistence k chinolonům (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB*)⁴, integronů⁷, plazmidů⁷ a fylogenetických skupin⁴ metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Vybrané amplikony genů rezistence byly následně sekvenovány pro zjištění konkrétní varianty. Citlivost k 13 antimikrobiálním látkám byla určena pomocí diskové difuzní metody⁴. Příbuznost izolátů byla stanovena na základě Xbal pulzní gelové elektroforézy (PFGE)⁴, a jednotlivé makrorestrikční profily byly analyzovány pomocí BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gent, Belgie). Zařazení do klonálních linií bylo potvrzeno u vybraných zástupců na základě 100% identity metodou multi-locus sequence typing (MLST)⁴. Horizontální přenos genů rezistence nesených mobilními genetickými elementy do různých druhů recipientních bakterií byl testován metodou konjugace a transformace s cílem stanovit potenciál dalšího šíření rezistence v bakteriálních populacích⁷. Plazmidy přenesené konjugačními a transformačními pokusy byly následně typizovány pomocí plazmid multilocus sequence typing (pMLST)⁷ a přiřazeny k sekvenčnímu typu (ST) s využitím on-line databáze <http://pubmlst.org/plasmid/>.

Výsledky

Izoláty rezistentní k cefotaximu

Získáno bylo 82 (14 %) izolátů *E. coli* rezistentních k cefotaximu. Celkem bylo identifikováno 12 izolátů s produkcí **ESBL** (15 %), jež nesly geny *bla*_{CTX-M-27} (n=5), *bla*_{CTX-M-15} (4), *bla*_{CTX-M-14} (2) nebo *bla*_{CTX-M-1} (1). Izoláty byly zařazeny do fylogenetických skupin D (5), A (4), B2 (2) a B1 (1) a nesly nejčastěji replikony typu FIIA (5), FIB (3) a FIA (n=2). Rezistence k sulfonamidům a tetracyklinu včetně odpovídajících genů rezistence se vyskytovala u izolátů nejčastěji. Na základě MLST a PFGE analýzy byly identifikovány významné sekvenční typy ST69, ST131, ST167 a ST405, přičemž příbuznost těchto izolátů byla velmi malá. Horizontální přenos genů ESBL do

recipientních buněk byl prokázán u osmi izolátů a přenesené plazmidy patřily do různých skupin inkompatibility.

AmpC beta-laktamáza CMY-2 byla identifikována u 54 (66 %) izolátů rezistentních k cefotaximu. Izoláty byly zařazeny do fylogenetických skupin A (23), B1 (22), D (9) a B2 (1) a nesly nejčastěji replikony I1 (18), FIB (17), A/C (15) and FIA (7). Izoláty vykazovaly rezistenci k tetracyklinům, sulfonamidům a streptomycinu a na základě těchto výsledků byly testovány příslušné geny rezistence. Významná klonální příbuznost byla nalezena na dvou lokalitách - Kalifornii a Massachusetts. V Kalifornii byly nalezeny na základě PFGE a MLST analýzy dva významné klastry, představující 73 % všech izolátů, reprezentované sekvenčními typy ST88 (6) a ST336 (5). V případě lokality v Massachusetts spadalo 58 % izolátů do dvou klastrů zahrnujících ST345 (8) a ST48 (3). Na základě konjugačních a transformačních pokusů bylo zjištěno, že gen *bla*_{CMY-2} byl majoritně nesen na replikonech IncI1 (14) náležících ke specifickým sekvenčním typům (ST12, ST20, ST23) a IncA/C (8).

Izoláty se sníženou citlivostí ke karbapenemům

Dvacet dva (4 %) izolátů *E. coli* rostlo na selekční půdě s meropenemem. U žádného izolátu nebyla zjištěna pomocí PCR přítomnost testovaných genů pro produkci karbanemáz.

Výsledky PMQR pozitivních izolátů

Třináct (17 %) izolátů se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu neslo následující PMQR geny: *aac(6′)-Ib-cr* (4), *qnrS1* (2), *qnrA1* (2), *qnrB19* (2), *qnrB2* (1), *qnrB6* (1) nebo *qnrD* (1). Izoláty byly zařazeny do fylogenetické skupiny A (7), D (2), B1 (4). PFGE a MLST analýza ukázala vysokou genetickou diverzitu izolátů. Identifikován byl sekvenční typ ST648, který je spojován se závažnými infekčními onemocněními u lidí i zvířat. PMQR geny byly lokalizovány u šesti izolátů na konjugativních multirezistentních plazmínech, které náležely do různých inkompatibilních skupin.

Závěr

Migrující druhy ptáků mohou hrát významnou roli v distribuci klinicky a epidemiologicky významných druhů bakterií, které mohou šířit na velké vzdálenosti mezi různými geografickými oblastmi a ekologickými nikami. Nález těchto bakterií u volně žijících zvířat pravděpodobně odráží přítomnost takových izolátů v jejich potravě či vodních zdrojích. Geny ESBL/PMQR a klonální linie *E. coli* nalezené u vrány americké byly dříve dokumentovány u lidí a domácích zvířat, což poukazuje na jejich možné zdroje. Na základě MLST databáze (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) bylo zjištěno, že většina izolátů byla v minulosti dokumentována jako významné lidské a zvířecí patogeny a jejich přítomnost v životním prostředí je alarmující. Studie ukazují na vysokou úroveň

kontaminace životního prostředí multirezistentními bakteriemi včetně pandemických virulentních klonů ST131, ST405 nebo ST648 v populacích volně žijících ptáků v USA.

Tato práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno č. 217/2015/FVHE.

Seznam literatury:

1. ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control. *Annual epidemiological report 2013*. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data [online]. European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm: Sweden, 2013. ISBN 978-92-9193-543-7. Dostupné z: http://bookshop.europa.eu/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/EU-Bookshop-Site/en_GB//EUR/ViewPublicationStart?PublicationKey=TQAC14001
2. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARD (BIOHAZ). Scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals [online]. *EFSA Journal*. 2011, 9(8):2322. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/publications/efsajournal.htm>.
3. GUENTHER, S., C. EWERS a L. H. WIELER. Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Frontiers in Microbiology*. 2011, 246(2):1-13.
4. JAMBOROVA, I., M. DOLEJSKA, J. VOJTECH, S. GUENTHER, R. URICARIU, J. DROZDOWSKA, I. PAPOUSEK, K. PASEKOVA, W. MEISSNER, J. HORDOWSKI, A. CIZEK a I. LITERAK. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 81(2):648–657.
5. MARSHALL, B. M a S. B. LEVY. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 24(4): 718-733.
6. ELLINGTON, M. J., J. KISTLER, D. M. LIVERMORE a N. WOODFORD. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, 59(2): 321-322.
7. DOBIASOVA, H., M. DOLEJSKA, I. JAMBOROVA, E. BRHELOVA, L. BLAZKOVA, I. PAPOUSEK, M. KOZLOVA, J. KLIMES, A. CIZEK a I. LITERAK. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2013, 85(3): 604-611.

Zoonotické bakteriální patogeny v klišťatech *Hyalomma aegyptium*

Matej Kautman¹, Pavel Široký¹

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

Úvod

Klišť *Hyalomma aegyptium* patří k hostiteľsky špecifickým druhom klišťov. V dospelom štádiu parazituje takmer výlučne na korytnačkách rodu *Testudo* a to konkrétne na *T. graeca*, *T. horsfieldii*, *T. marginata* a výnimočne aj na *T. hermannii*. Keďže tento druh klišťa v dospelom štádiu nesaje na ľuďoch, dlhú dobu bol jeho význam z hľadiska ľudskej medicíny prehliadaný. Larvy a nymfy *H. aegyptium* však parazitujú aj na ľuďoch (Bursali *et al.* 2010, Kar 2013) a tento fakt prináša na druh nové svetlo ako na možného vektora vážnych zoonotických ochorení. Medzi najnebezpečnejšie patogény zistené v klišťoch *H. aegyptium* patrí vírus krymsko-konžskej hemoragickej horučky (CCHFV), *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis*, *Borrelia turcica* a *Borrelia burgdorferi* (Pastiu *et al.* 2012; Široký *et al.* 2014). Široká paleta patogénov spolu s relatívne veľkým areálom rozšírenia, ktoré siaha od západného pobrežia Maroka, naprieč Severnou Afrikou, prechádza veľkou časťou Balkánskeho polostrova, cez Turecko, Kaukaz, oblasť Levanty a Blízkeho Východu až po Afganistan a Pakistan robí tento druh veľmi zaujímavým prvkom v oblasti ekológie niektorých zoonotických nákaz. Cieľom práce je zistiť škálu a prevalenciu zoonotických patogénov v *H. aegyptium* vďaka bohatej kolekcii materiálu tohto druhu na našom pracovisku z takmer celej oblasti jeho rozšírenia.

Materiál a metodika

Vzorky klišťov (izolácia RNA a DNA)

Analýzovali sme 816 jedincov *H. aegyptium* z 6 krajín (Alžírsko, Gruzínsko, Irán, Tunisko, Turecko a Sýria). DNA bola izolovaná z polovic pozdĺžne delených klišťov kitom NucleoSpin Tissue, Macherey-Nagel, (Germany). Izolovaná DNA bola uchovávaná pri teplote -20°C.

Primery

Prítomnosť *A. phagocytophilum* bola testovaná dvojkrokovou tzv. „nested“ PCR 250 bázovej časti génu 16S rDNA podľa Majláthová *et al.* (2011). Druhy z rodu *Rickettsia* budú zisťované pomocou primerov Rp877p a Rp1258n, ktoré amplifikujú 381bp dlhý úsek citrát syntázy *gltA* (Boretti *et al.* 2009).

PCR

A. phagocytophilum + *Rickettsia* spp.: Vzorky boli diagnostikované porovnávaním dĺžky amplifikovaných fragmentov s pozitívnou kontrolou a veľkostným štandardom. Na amplifikáciu 16S rDNA fragmentu u *A. phagocytophilum* bola použitá nested PCR o celkovom objeme 25 µl: 12,5 µl Combi PPP MAsterMix (Top-Bio, CZ); 1 µl každého primeru; 8,5 µl PCR-H₂O a 2µl DNA. Dvojkroková PCR prebiehala: denat. 95°C – 2min; denat. 94°C – 30s; anneal. 55°C – 30s; ext. 72°C – 1min (40x) a finálna extenzia 72°C – 5min. Na amplifikáciu citrát syntázy *gltA* bola použitá PCR o celkovom objeme 25 µl: 12,5 µl Combi PPP MAsterMix (Top-Bio, CZ); 1 µl každého primeru; 8 µl PCR-H₂O a 2,5 µl DNA. Dvojkroková PCR prebiehala: denat. 95°C – 5min; denat. 95°C – 20s; anneal. 56°C – 30s; ext. 72°C – 1min (40x) a finálna extenzia 72°C – 5min.

Diagnostika a sekvenovanie

Diagnostika *A. phagocytophilum* a *Rickettsia* spp. prebiehala porovnaním dĺžky amplifikovaných fragmentov na 1,5% agarózovom gély s pozitívnou kontrolou. Vybrané vzorky boli poslané na sekvenáciu, do firmy Macrogen (Holandsko). Sekvencie boli spracované Bioedit. Upravené sekvencie boli porovnané s databázou NCBI GenBank metódou BLAST.

Výsledky

Z 816 jedincov *H. aegyptium* bolo vyšetrených 411 jedincov na *A. phagocytophilum* a 710 jedincov na *Rickettsia* spp. Z celkového počtu vyšetrených jedincov bolo 305 jedincov vyšetrených na obidva patogény zároveň, koinfekcia oboma patogénmi bola zistená len u jedného kliešťa z Iránu. Priemerný záchyt infikovaných kliešťov *A. phagocytophilum* bol 12,4% a v prípade *Rickettsia* spp. 8,9%. Detailnejší súhrn testovaných a pozitívnych kliešťov je uvedený v Tab. 1.

Tab. 1.

krajina	n DNA <i>Anaplasma</i>	n poz. <i>A.</i> <i>phagocytophilum</i>	n DNA <i>Rickettsia</i>	n poz. <i>Rickettsia</i> spp.
Turecko	98	9 (9,2%)	221	25 (11,3%)
Sýria	43	19 (44%)	50	-
Irán	169	14 (8,3%)	215	22 (10,2%)
Gruzínsko	72	8 (11,1%)	86	5 (5,8%)
Tunisko	-	-	4	-
Alžírsko	29	1 (3,4%)	134	11 (8,2%)
spolu	411	51 (12,4%)	710	63 (8,9%)

Zoznam literatúry:

BORETTI, F.S., A. PERRETTEN, M. L. MELI, V. CATTORI, B. WILLI, N. WENGI, S. HORNOK, H. HONEGGER, D. HEGGLIN, R. WOELFEL, C. E. REUSCH, H. LUTZ, R. HOFMANN-LEHMANN. Molecular Investigations of *Rickettsia helvetica* Infection in Dogs, Foxes, Humans, and *Ixodes* Ticks. *Applied and environmental mikrobiology*, 2009. Vol: 75, no. 10, pp 3230—3237. doi:10.1128/AEM.00220-09.

BURSALI A.; S. TEKIN, M. ORHAN, A. KESKIN, M. OZKAN. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) infesting humans in Tokat province of Turkey: species diversity and seasonal activity. *Journal of vector ecology*. 2010. Vol. 35, no. 1: 180—186.

KAR, S., E. DERSIS, A. AKM, O. ERGONUL, A. GARLI. Preferences of different tick species for human hosts in Turkey. *Exp. Appl. Acarol.*, 2013, 61: 349—355. DOI: 10.1007/s10493-013-9698-2.

MAJLÁTHOVÁ, V., I. MAJLÁTH, B. VÍCHOVÁ, I. GUL'OVÁ, M. DERDÁKOVÁ, E. SESZTÁKOVÁ a B. PET'KO. Polymerase chain reaction Confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs Suspected of Babesiosis in Slovakia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2011. vol. 11, issue 11, pp. 1447-1451.

PASTIU, A. I., I. A. MATEI, A. D. MIHALICA, G. D'AMICO, M. O. DUMITRACHE, Z. ALMÁR, A. D. SÁNDOR, M. LEFKADITIS, C. M. GHERMAN, V. COZMA. Zoonotic pathogens associated with *Hyalomma aegyptium* in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks? *Parasites and vectors*. 2012. 5: 301. DOI: 10.1186/1756-33055-5-301.

ŠIROKÝ, P., T. BĚLOHLÁVEK, I. PAPOUŠEK, D. JANDZIK, P. MIKULÍČEK, M. KUBELOVÁ, L. ZDRAŽILOVÁ-DUBSKÁ. Hidden threat of tortoise ticks: high prevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks *Hyalomma aegyptium* in the Middle East. *Parasites and Vectors*, 2014. 7: 101. DOI: 10.1186/1756-3305-7-101.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 219/2015/FVHE (IGA 2015).

Vliv léčebných koupelí v roztoku formaldehydu a NaCl na ryby se zaměřením na imunitní systém

Lívia Chmelová¹, Veronika Doubková¹, Iveta Matejová¹, Zdenka Svobodová¹

¹Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Léčebné koupele se využívají k léčbě a tlumení ektoparazitárních, plísňových a bakteriálních onemocnění povrchu těla a žaber ryb (Schnick, 1991 a Rach et al., 1997).

Pro sledování účinku koupelí byl jako modelový organismus vybrán kapr obecný (*Cyprinus carpio*), jako hlavní zástupce hospodářských druhů ryb v České republice.

Koupele v roztoku formaldehydu jsou doporučovány zejména při nálezu druhů rodu *Cryptobia*, *Ichthyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*, *Trichodinella*, *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, *Thaparocleidus* a při povrchovém zaplísnění (Svobodová et al., 2007). Formaldehyd je zařazen mezi karcinogenní látky. Způsobuje metabolickou acidózu, kumuluje se v sítnici, očním nervu a bazálních gangliích mozku, z čehož plynou trvalé poruchy zraku a extrapyramidové projevy. U savců formaldehyd prostupuje do těla inhalačně, kůží i okem. Testy na zvířatech prokázaly možnou neurotoxicitu (Pitten et al., 2000)..

Koupele v roztoku NaCl jsou používány při nálezu druhů rodu *Cryptobia*, *Ichthyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*, *Trichodinella*, s nižší účinností pro rody druhu *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, *Piscicola*, *Argulus* a při povrchovém zaplísnění (Svobodová et al., 2007). Při použití chloridu sodného je terapeutická dávka velice blízká letální dávce, lze tedy předpokládat poškození organismu ryb. Mechanismus účinku spočívá v narušení osmotické rovnováhy. Nadměrné množství NaCl způsobuje extracelulární hyperosmolalitu, která má za následek výraznou intracelulární dehydrataci. Při zvýšení koncentrace NaCl v krvi dochází k degradaci endotelu kapilár a přestupu vody z krve do intersticia a k následné tvorbě edémů mozku a jiných orgánů a tkání (Gupta, 2012).

Cílem studie bylo sledování vlivu léčebných koupelí v roztoku formaldehydu a NaCl na imunitní systém ryb, se zaměřením na histopatologické, hematologické a biochemické vyšetření, včetně vyšetření markerů oxidativního stresu a ukazatelů imunitního stavu ryb.

Materiál a metodika

Před vlastním pokusem byly ryby 14 dnů adaptovány na podmínky zařízení s průtokovým systémem. Ryby byly rozděleny do 16 skupin (12 kusů ryb v každé skupině, celkem 192 kusů). Čtyři skupiny byly umístěny po dobu 60 minut do testovaného roztoku formaldehydu (0,17 ml 38% formaldehydu na litr) a čtyři skupiny na dobu 30 minut do roztoku NaCl (30 g NaCl na litr). Poté byly přesazeny do čisté vody. Vliv koupelí byl sledován ihned po koupeli, další 24 hodin, 48 hodin a 10 dnů po koupeli. Ke každé skupině byla přiřazena kontrola bez vystavení testované látce.

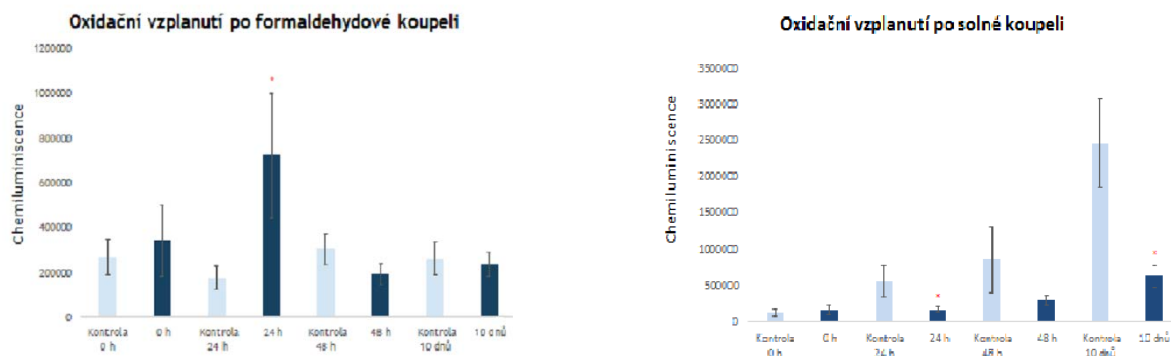
Před usmrcením byl proveden odběr kožního hlenu pro stanovení koncentrace lysozymu a následně odběr krve ke stanovení hematologických (Er, Hb, Hk, MCV, MCH, MCHC, celkový a diferenciální počet leukocytů) a biochemických (celková bílkovina, albuminy, globuliny, glukóza, laktát, AST a ALT) ukazatelů. V získaných vzorcích plasmy byla dále stanovena koncentrace imunoglobulinů IgM a bakteriolytická aktivita komplementu. Pro stanovení aktivity respiračního vzplanutí fagocytů byla použita luminolem zesílená chemiluminiscenční metoda.

Ryby byly po odběru krve usmrceny a byly odebrány vzorky tkání z jater, přední ledviny, žaber, sleziny, kůže a mozku. Odebrané vzorky sloužily k histopatologickému vyšetření, stanovení vybraných markerů oxidativního stresu a molekulárně-biologickým analýzám, kdy pomocí kvantitativní RT-PCR založené na interkalaci SYBRGreen byly stanoveny exprese mRNA pro geny relevantní pro imunitní systém, jako jsou prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny. Pro tyto účely byly adaptovány specifické primery.

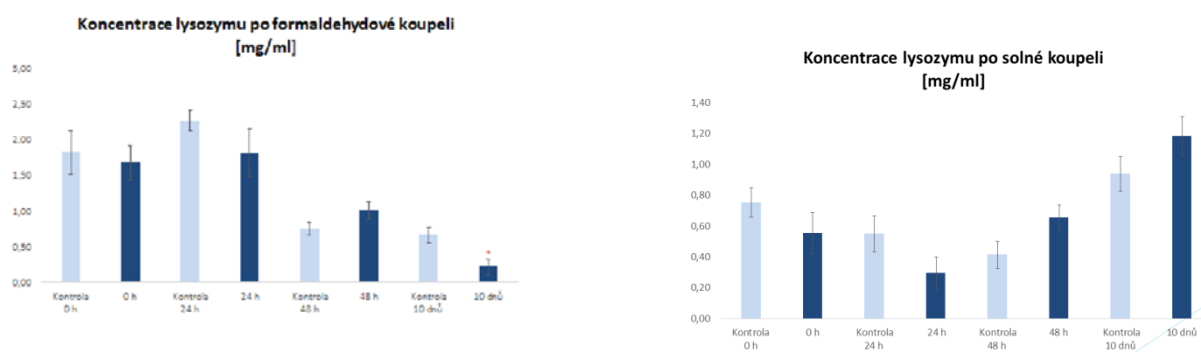
Výsledky

V případě formaldehydových koupelí byla prokázána zvýšená aktivita fagocytů 24 hodin po koupeli (viz. Graf 1) a statisticky významné bylo také snížení exkrece lysozymu po 10 dnech od formaldehydové koupele (viz Graf 2). V případě koupelí v NaCl bylo zjištěno statisticky významné snížení aktivity fagocytů 24 hodin a 10 dnů po solné koupeli (viz. Graf 1). Koncentrace IgM u obou koupelí nebyla významně změněna. Exprese mRNA byla statisticky významně změněna u formaldehydové koupele po 10 dnech pro TGFb/40s u žaber a pro IL-10/40s u ledvin.

Graf 1: Oxidační vzplanutí



Graf 2: Koncentrace lysozymu



Byl prokázán statisticky významný nárůst oxidativního stresu v játrech 10 dní (GPx) a v žábrech 10 dní (GPx) po formaldehydové koupeli. Statisticky významné snížení oxidativního stresu bylo prokázáno v ledvinách 24 hodin po této koupeli (GST a GR).

V případě formaldehydových koupelí byl prokázán statisticky významný nárůst hodnot MCH ihned po koupeli a u hodnot ERY, Hb a PCV 10 dní po koupeli.

Závěr

Po použití léčebných koupelí v roztoku formaldehydu a NaCl, došlo u ryb k ovlivnění imunitního systému, hematologických parametrů a parametrů oxidativního stresu. Zároveň byly zjištěny histopatologické změny na kůži a žábrech. Ovlivnění použitou látkou se projevuje nejen bezprostředně po použití léčebné koupele ale i v 10denním odstupu.

Z toho lze vyvodit nutnost sledování zdravotního stavu ošetřených ryb i po delší dobu od provedení léčebné koupele.

Seznam literatury:

- RACH, Jeff J, George E HOWE, Theresa M SCHREIER. Safety of formalin treatments on warm and cool water fish eggs. *Aquaculture*. 1997, 149: 183–191. doi:10.1016/S0044-8486(96)01447-0.
- SCHNICK, Rosaline, A. Chemicals for worldwide aquaculture, in: ADB/NACA (Ed.), Report on a Regional Study and Workshop on Fish Disease and Fish Health Management, ADB Agriculture Department Report Series, vol. 1, Network of Aquaculture Centres in Asia–Pacific, Bangkok, Thailand (1991), pp. 441–467
- SVOBODOVÁ, Zdeňka. Nemoci sladkovodních a akvarijských ryb, 4. vydání, Informatorium, Praha 2007, 264 stran, ISBN 9788073330514.
- PITTEN, F.-A., A. KRAMER, K. HERRMANN, J. BREMER, S. KOCH: Formaldehyde neurotoxicity in animal experiments. *Pathology - Research and Practice*. 2000, 196(3): 193-198. doi:10.1016/S0344-0338(00)80100-4.
- GUPTA, R.C., Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles, San Diego, California : Elsevier., 2007. 1201 stran. ISBN: 978-0-12-385926-6.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 225/2015/FVHE

Účinky vybraných léčiv kontaminujících povrchové vody na raná vývojová stádia ryb

Pavla Sehonová, Zdeňka Svobodová, Lucie Plhalová, Tereza Nováková, Silvie Matoušková
*Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

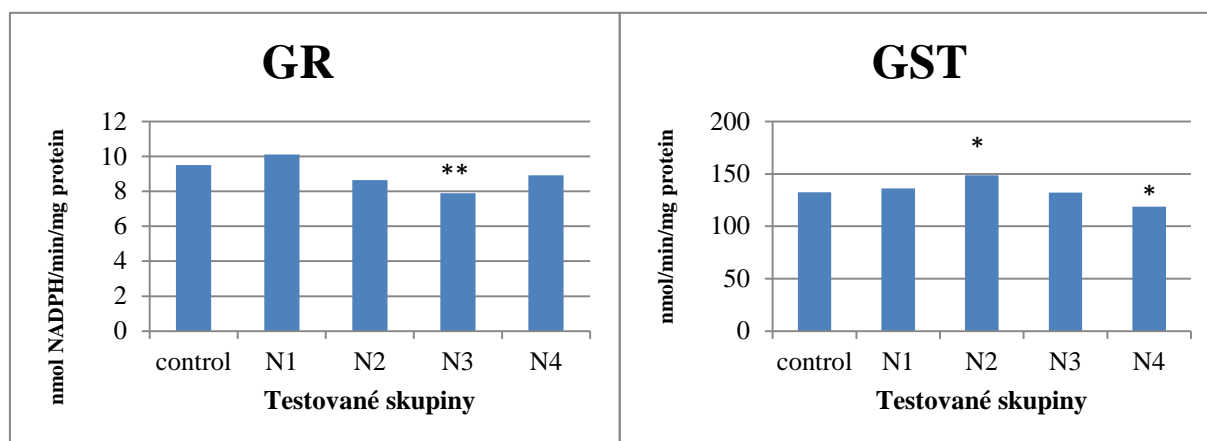
Jedním z nejvýznamnějších kontaminantů vodního prostředí jsou farmaka, jejichž zdrojem v povrchových vodách jsou nedokonale vyčištěné odpadní vody. Naproxen i tramadol patří k hojně využívaným lékům proti bolesti. Naproxen patří do skupiny nesteroidních antiflogistik a řadí se celosvětově k často detekovaným kontaminantům vodního prostředí (Bendz et al., 2005; Verenitch et al., 2006; Verlicchi et al., 2012). Tramadol patří mezi opioidní analgetika a je rovněž v léčbě bolesti hojně využíván. Rezidua tramadolu jsou v povrchových vodách detekována (Loos et al., 2013), ale jeho neurotoxické účinky na necílové organismy nejsou dobře zdokumentovány (Zhuo et al., 2012). Ryby představují vrchol potravního řetězce ve vodním prostředí a jsou nejcitlivější v období embryolarválního vývoje. Cílem této studie bylo posoudit vliv naproxenu, tramadolu a jejich kombinace na raná vývojová stádia ryb prostřednictvím bioindikátorů oxidativního stresu.

Materiál a metodika

Byl proveden 32denní embryolarvální test toxicity dle metodiky OECD 210 – Fish, Early-life Stage Toxicity Test na kapru obecném (*Cyprinus carpio*). Embryolarvální test byl proveden s tramadolem (T) a naproxenem (N) a s kombinací těchto dvou léčiv (TN). Testována byla environmentální koncentrace 10 µg/l a dále odvozená koncentrační řada 50; 100 a 200 µg/l. Koncentrace testovaných léčiv byly průběžně kontrolovány pomocí HPLC. Pro posouzení vlivu testovaných léčiv na raná vývojová stádia kapra obecného byly zvoleny bioindikátory oxidativního stresu, z nichž byly stanoveny v celotělním homogenátu enzymatické parametry glutation reduktáza (GR), glutation-S-transferáza (GST) a glutation peroxidáza (GPx) a ukazatel lipoperoxidace (TBARS). Získané výsledky byly statisticky zpracovány (Unistat 5.6, Česká republika).

Výsledky

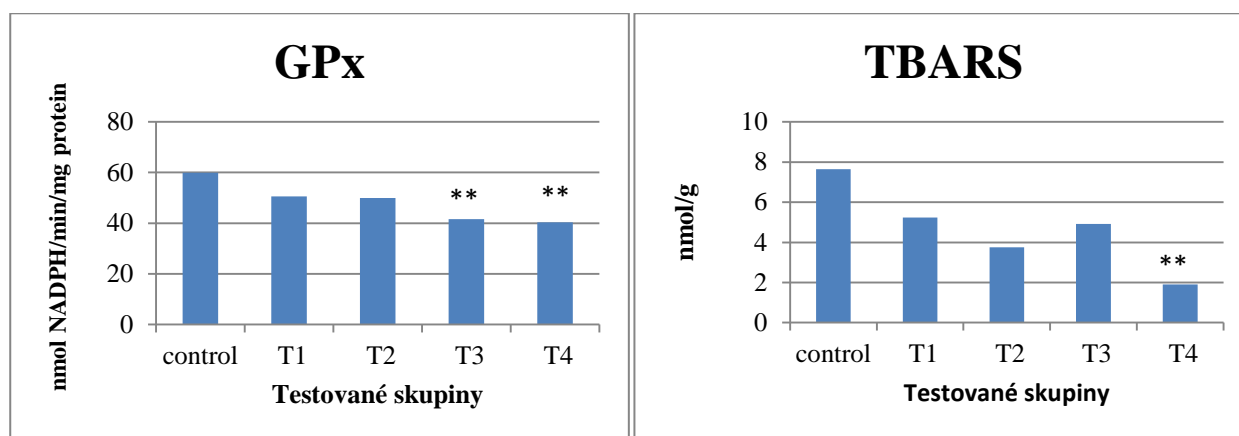
Po subchronickém působení naproxenu na raná vývojová stádia kapra obecného bylo v koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ naproxenu zaznamenáno ve srovnání s kontrolní skupinou snížení aktivity GR ($p < 0,01$) (graf 1). V koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ bylo zaznamenáno zvýšení aktivity GST ($p < 0,05$) a dále snížení aktivity GST v koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$ (graf 2) ve srovnání s kontrolní skupinou.



Graf 1: Aktivita GR po působení naproxenu; ** ($p < 0,01$)

Graf 2: Aktivita GST po působení naproxenu; * ($p < 0,05$)

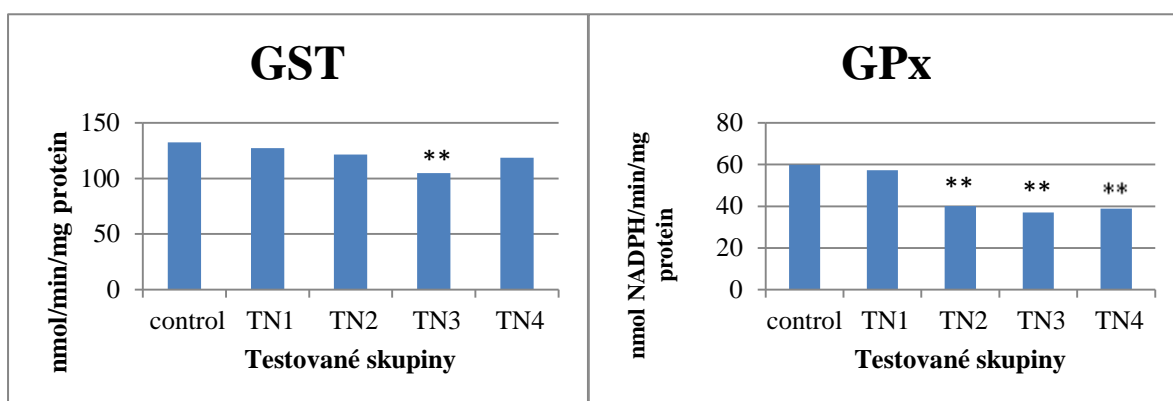
Po působení tramadolu bylo pozorováno snížení aktivity GPx ($p < 0,01$) u testovaných koncentrací 100 a 200 $\mu\text{g/l}$ ve srovnání s kontrolou (graf 3). Hodnota TBARS byla významně nižší ($p < 0,01$) u nejvyšší testované koncentrace (graf 4).



Graf 3: Aktivita GPx po působení tramadolu; ** ($p < 0,01$)

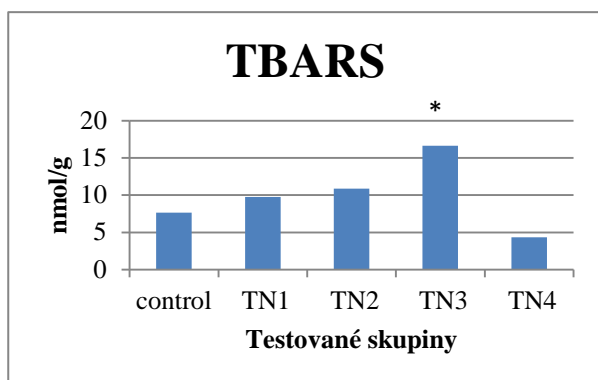
Graf 4: Hodnoty TBARS po působení tramadolu; ** ($p < 0,01$)

Po vzájemném působení tramadolu a naproxenu, obou látek v koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$, bylo zaznamenáno snížení aktivity GST ($p < 0,01$) ve srovnání s kontrolou (graf 5). Z grafu č. 6 je patrné, že došlo rovněž je snížení aktivity GPx v koncentracích 50, 100 a 200 $\mu\text{g/l}$ kombinace tramadolu a naproxenu ($p < 0,01$). V koncentraci 100 $\mu\text{g/l}$ tramadolu a naproxenu došlo ke zvýšení hodnoty TBARS ($p < 0,01$) (graf 7).



Graf 5: Aktivita GST po kombinovaném působení tramadolu a naproxenu; ** ($p < 0,01$)

Graf 6: Aktivita GPx po kombinovaném působení tramadolu a naproxenu; ** ($p < 0,01$)



Graf 7: Hodnoty TBARS po kombinovaném působení tramadolu a naproxenu; ** ($p < 0,01$)

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že testovaná environmentální koncentrace 10 $\mu\text{g/l}$ u žádné ze dvou testovaných skupin látek ani v jejich kombinaci nezpůsobila statisticky prokazatelnou změnu v aktivitě vybraných antioxidačních a detoxikačních enzymů ani změnu hodnot TBARS. Nicméně u vyšších testovaných koncentrací byly již tyto změny statisticky prokazatelné. Je možné proto usuzovat, že i nízké environmentální koncentrace mají na organismy vodního prostředí negativní vliv a je potřeba zabývat se dalšími stanoveními jako jsou například morfologické ukazatele nebo rychlost vývoje.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 226/2015/FVHE.

Seznam literatury:

BENDZ, D., N. A. PAXÉUS, T. R. GINN a F. J. LOGE. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*. 2005, **122**(3): 195-204. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2005.03.012.

LOOS, R., R. CARVALHO, D. C. ANTÓNIO, S. COMERO, G. LOCORO, S. TAVAZZI, B. PARACCHINI, M. GHIANI, T. LETTIERI, et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Water Research*. 2013, **47**(17): 6475-6487. DOI: 10.1016/j.watres.2013.08.024.

VERENITCH, S. S., Ch. J. LOWE, A. MAZUMDER a F.J. LOGE. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry: Höje River in Sweden. *Journal of Chromatography A*. 2006, **1116**(1-2): 193-203. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.005.

VERLICCHI, P., M. AL AUKIDY, A. GALLETI, M. PETROVIC a D. BARCELÓ. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*. 2012, **430**(1-2): 193-203. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.055.

ZHUO, Hui-Qin, L. HUANG, He-Qing HUANG, Z. CAI, G. LOCORO, S. TAVAZZI, B. PARACCHINI, M. GHIANI, T. LETTIERI, et al. Effects of chronic tramadol exposure on the zebrafish brain: A proteomic study. *Journal of Proteomics*. 2012, **75**(11): 3351-3364. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.03.038.

Detekce hrachové bílkoviny v masných výrobcích mikroskopickými metodami

Zdeňka Javůrková, Matej Pospiech, Michaela Petrášová, Marie Bártlová, Jana Škriňová, Eliška

Zichová, Markéta Zelenková

Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin, Fakulta veterinárního hygieny a ekologie,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

V potravinářské výrobě jsou z důvodu snížení ceny jako náhrada masa používány rostlinné bílkoviny (1), z nichž některé jsou alergeny (2, 3). Z toho důvodu je proto snaha o jejich náhradu za jiné rostlinné bílkoviny, neuvedené v seznamu alergenních látek. Mezi nepoužívanější patří hrachová bílkovina (4). Ta ovšem také obsahuje obdobně jako jiné luštěniny zásobní proteiny, které mohou způsobovat alergické reakce zahrnující jak mírné kožní reakce, tak život ohrožující anafylaktické reakce. Proteiny hrachu jsou zejména albuminy a globuliny. Globuliny představují 65 až 80 % a jsou tvořeny leguminem 11S a vicilinem 7S. Pro spotřebitele je proto důležité, aby měl k dispozici pravdivé informace také o obsahu hrachového proteinu s ohledem na křížovou reaktivitu. Z možných detekčních metod se používá analýza polyfenolů charakteristických pro určité luštěniny a metoda HPLC, kterou je možné detekovat až 0,1% přídavek sójové bílkoviny v masném výrobku. Podobně je také možná detekce lupiny, v případě hrachu však nebylo spolehlivé detekce dosaženo (6).

Cílem práce bylo vyvinutí metody pro imunohistochemické, imunofluorescenční stanovení hrachového proteinu v masných výrobcích.

Materiál a metodika

VZORKY

Bylo vyrobeno 13 modelových výrobků s přídavkem hrachového proteinu a 13 modelových výrobků s přídavkem hrachové mouky. Výrobky byly připraveny z mleté prsní svaloviny drůbeže s 0,001; 0,01; 0,10; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50 a 5,00% přídavkem hrachové bílkoviny a hrachové mouky. Takto připravené modelové výrobky byly vařeny při 70 °C po dobu 10 minut. Z každého výrobku byly odebrány 4 bloky (A, B, C a D) o velikosti 1 cm³, které byly následně zmrazeny. Z těchto bloků byly na kryostatru HM 550 (Germany, Microm) krájeny řezy o tloušťce 10 μm.

Dále bylo vyšetřeno 10 výrobků s deklarovaným obsahem hrachové bílkoviny a 10 výrobků z tržní sítě s obsahem hrachové mouky.

METODIKA

Histochemie: byla zvolena barvení Hematoxylin-eozin (HE), PAS Calleja (PC) a toluidinová modř (TM). Analýza probíhala na modelových výrobcích s 2,5% přídavkem bílkoviny a mouky.

Imunohistochemie (IHC) a imunofluorescence (IF): byla zvolena metoda ABC komplexu. Jako primární protilátka byl použit monoklonální legumin (1H9). Stanovení vhodné koncentrace primárních protilátek bylo testováno v rozmezí ředění 1:10 - 1:1000. Křížová reaktivita byla ověřena na sójovém proteinu, pšeničném proteinu a čočce. Mez detekce byla stanovována v koncentrační řadě jako minimální záchyt ve všech blocích na modelových masných výrobcích. V dalším kroku byla metoda ověřena na komerčních masných výrobcích zakoupených z tržní sítě imunofluorescenčně.

Výsledky a diskuse

HISTOCHEMIE

Histochemickými barveními byly v modelových vzorcích s přídavkem mouky prokázány charakteristické struktury, jako jsou palisádové a pohárkové buňky, úlomky děloh se škrobovými zrny a buňky obsahující hrachovou bílkovinu, tak jak jsou popsány v odborné literatuře (7). Pro průkaz přídavku mouky do modelového vzorku bylo jako nejvhodnější histochemické barvení vybráno barvení PAS Calleja. Také při vyšetřování vzorku hrachové bílkoviny (obrázek 1) a vzorku s jejím přídavkem se barvení PAS Calleja ukázalo také vhodnější než barvení Hematoxylin-eozinem a barvení toluidinovou modří. Při zvětšení 100x byly dobře patrné houbovitě příp. kruhovitě částice hrachové bílkoviny. Částice hrachové bílkoviny jsou podobné částicím bílkoviny sójové (8, 9). Tedy ani barvení PAS Calleja neposkytuje specifický výsledek pro průkaz přídavku hrachové bílkoviny. Z tohoto důvodu je nutné vytvořit a standardizovat imunohistochemické barvení, které by poskytlo jednoznačný výsledek.

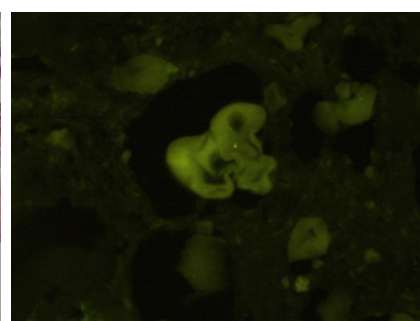
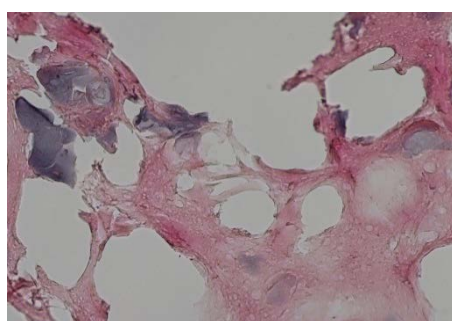
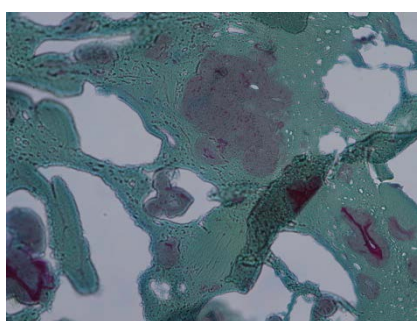
IHC

IHC reakce byla pozitivní v koncentracích ředění protilátek 1:100 až 1:1500. S ohledem na předchozí zkušenosti a zvážení nákladů byla zvolena pro další analýzy koncentrace 1:1000. S ohledem na různý obsah sledovaného proteinu byla zjištěna rozdílná minimální mez detekce pro hrachovou mouku a hrachový protein (obrázek 2). V případě hrachového proteinu docházelo k pozitivní reakci na rozhraní proteinu a škrobových zrn fragmentů hrachové mouky a mez detekce byla stanovena na 0,5 %. U hrachového proteinu byla pozitivní reakce na celém proteinu,

identifikace tak byla snazší a mez detekce byla stanovena na 0,1% přídavku. Výsledek ukazuje také, že dochází jenom k částečné denaturaci proteinu, který je možné dále detekovat, potencionálně se tedy nemění ani jeho alergenní vlastnosti k maximální denaturaci leguminu dochází v závislosti na množství soli od 72-98°C (10).

IF

IF metoda byla ověřena na hrachové mouce a proteinu, kdy hrachový protein patří mezi významné potravinové alergeny (11). Pomocí této metody bylo možné detekovat již 0,1% přídavek hrachové mouky a 0,001% přídavek hrachového proteinu v modelovém masném výrobku. Na základě vyšší citlivosti než IHC byla metoda použita na analýzu masných výrobků z tržní sítě, kde dosáhla 100 % shodu s deklarovaným obsahem.



Obrázek 1. hrachová bílkovina v tepelně opracovaném modelové výrobku, PC Obrázek 2. hrachová bílkovina v tepelně opracovaném modelové vzorku, IHC Obrázek 3. hrachová bílkovina v tepelně opracovaném modelové vzorku, IF

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 228/2015/FVHE.

Závěr

Vyvinutá imunohistochemická a imunofluorescenční metoda se ukázala jako metoda vhodná pro průkaz hrachové mouky a bílkoviny. Oba přídavky se podařilo prokázat jak u modelových výrobků, ale také u výrobků zakoupených z tržní sítě. Výsledek ukazuje také, že dochází jenom k částečné denaturaci proteinu, který je možné dále detekovat i po tepelném opracování. Jak IHC, tak IF má nižší mez detekce pro přídavek hrachového proteinu, kdy metoda IF je citlivější. Mikroskopické vyšetření je vhodné ke vzájemnému rozlišení přídavku mouky a bílkoviny hrachu.

Seznam literatury:

1. Modi, V. K., et al. "Quality of buffalo meat burger containing legume flours as binders." *Meat Science* 66.1 (2004): 143-149.

2. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům, o změně nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1924/2006 a (ES) č. 1925/2006 a o zrušení směrnice Komise 87/250/EHS, směrnice Rady 90/496/EHS, směrnice Komise 1999/10/ES, směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/13/ES, směrnic Komise 2002/67/ES a 2008/5/ES a nařízení Komise (ES) č. 608/2004. In: *Úřední věstník Evropské unie*. 2011, L 304, s. 18-63.
3. VYHLÁŠKA č. 113/2005 sb., o způsobu označování potravin a tabákových výrobků. In *Sbírka zákonů*, 2005, č. 37, s. 1163–1174.
4. Baticz, O. "Isolation and study of the functional properties of pea proteins." *Nahrung/Food* 45.6 (2001): 399-401.
5. Mession, J-L. et al. "Effect of pea proteins extraction and vicilin/legumin fractionation on the phase behavior in admixture with alginate." *Food hydrocolloids* 29.2 (2012): 335-346.
6. Mellenthin, O., and R. Galensa. "Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products." *Journal of agricultural and food chemistry* 47.2 (1999): 594-602.
7. Hohmann, B. *Mikroskopische Untersuchung pflanzlicher Lebensmittel und Futtermittel: Der Gassner*. Hamburg: B.Behr's Verlag GmbH & Co. KG, 2007.
8. Horn, D. Zum Nachweis pflanzlicher Eiweisszubereitungen in Fleischerzeugnissen mit histologischen Untersuchungsverfahren. *Fleischwirtschaft*. 67.5 (1987): 616–618.
9. Tremlová, B. *Histologie potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 1998. 60 s.
10. Kozhevnikov, G. O., et al. "Comparative studies on thermodynamic characteristics of pea legumin and legumin-T thermal denaturation." *International journal of biological macromolecules* 29.4 (2001): 225-236.
11. Sampson, Hugh A. "9. Food allergy." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111.2 (2003): S540-S547.

Aktivace vrozené imunitní odpovědi netopýrů na infekci plísní *Pseudogymnoascus destructans*

Veronika Kováčová, Miroslava Mikšíková, Petr Linhart, Jiří Brichta

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

Úvod

Aktuální problematikou řešenou u netopýrů ve světě je infekce plísní *Pseudogymnoascus destructans*, která způsobuje onemocnění zvané syndrom bílého nosu (WNS) (Blehert *et al.*, 2009, Zukal *et al.*, 2014). Některé druhy severoamerických netopýrů jsou na pokraji vyhynutí a odhaduje se, že tato plíseň způsobila úhyn více než 5 milionů netopýrů (Frick *et al.*, 2010). Na území České republiky je potvrzen výskyt původce i onemocnění u 11 druhů netopýrů (Zukal *et al.*, 2014). Plíseň způsobuje typické kožní erose (tzv. cupping erosions) a je schopna virulentní invaze přes bazální membránu kůže (Meteyer *et al.*, 2009). Rozsah narušení kožní bariéry létací blány je pravděpodobně hlavním patofyziologickým mechanismem, který vede k úhynům zvířat. K faktorům, které podporují rozvoj infekce, patří zejména suprese imunitního systému netopýrů během hibernace a také změny ve fungování imunitního systému netopýrů v období hibernace a při přechodu do euthermie. Ukazuje se také, že roli by mohl hrát extracelulární metabolit plísně – riboflavin, který se hromadí v tkáni hibernujících netopýrů. Riboflavin se rozkládá v přítomnosti světla při vlnových délkách pod 500 nm a vyrábí reaktivní formy kyslíku, jako je singletní kyslík a peroxidové radikály. Předpokládá se, že tyto reaktivní kyslíkové formy, jsou zodpovědné za vznik oxidačního stresu, což může vést k ztrátě homeostázy a ke smrti buněk apoptózou nebo nekrózou. A právě fotosenzitivní vlastnosti riboflavínu by mohly přispět k poškození kůže netopýrů v případě létání za denního světla (Edwards and Silva, 2001; Frati *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1991). S ohledem na přísnou ochranu v kontextu evropské legislativy nepřichází v úvahu studie imunitního systému netopýrů formou experimentální infekce *in vivo*. Vhodnou alternativou i nejmodernějším přístupem jsou *in vitro* modely využívající dostupných buněčných kultur, které jsou derivovány z tkání netopýrů.

Materiál a metodika

Po udělení povolení pro neletální vzorkování netopýrů od Agentury na ochranu přírody a krajiny České republiky (01662/MK/2012S/00775/MK/2012 a 866/JS/2012) jsme odebrali kožní bioptáty a krevní vzorky od netopýrů rodu *Barbastella*, *Myotis*, *Nyctalus*, *Pipistrellus* a *Plecotus*. Z bioptátů

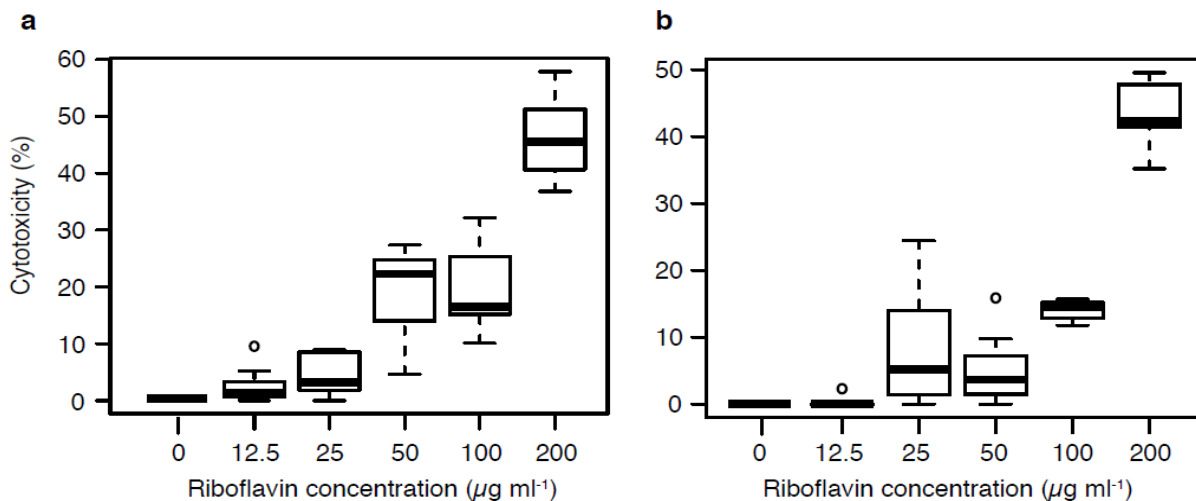
byly získané buněčné kultury fibroblastů. Imunitní buňky z krve netopýrů byly získány metodou gradientové centrifugace. Odebrán byl tzv. buffy coat, kteréhož součástí jsou leukocyty.

Na vybraných buněčných liniích byl experimentálně testován vliv extracelulárního metabolitu plísně *P. destructans* – riboflavin. Primární fibroblasty, při 24 hodinové expozici za tmy v teplotách 37°C a 8 °C, byly vystaveny riboflavinu (Sigma-Aldrich, R9504) v koncentraci 12,5, 25, 50, 100, a 200 µg ml⁻¹ s cílem sledovat cytotoxicitu riboflavinu v *in vitro* modelu. Zvolené teploty měly simulovat torpor a probuzení z torporu, tak jako se to děje u zvířete. Experiment se prováděl v septenplikátu s 15 000 buňkami na replikaci. Stanovení cytotoxicity bylo založeno na konverzi laktátu na pyruvát v přítomnosti laktát dehydrogenázy (LDH) s paralelním snížením NAD. Hladina LDH v buněčných kulturách byla stanovena použitím komerčně dostupného kitu od Roche (Cytotoxicita Detection Kit^{PLUS}, Mannheim, Germany). Test byl vykonán dle protokolu v 96-jamkových destičkách (TPP) při absorpenci 490 nm a zaznamenán za použití čtečky mikrodestiček ELISA (Biotek ELx808; Vermont, USA).

Výsledky

Usuzuje se, že vysoká koncentrace riboflavinu naměřené ve WNS kožních lézích netopýrů způsobuje zvýšenou produkci volných radikálů v kůži. Porucha v rovnováze mezi produkcí volných radikálů a antioxidační obranou má za následek oxidační poškození tkání, a to vede k apoptóze nebo nekróze buněk. Cytotoxicita riboflavinu se ukázala v závislosti na dávce za podmínek, které simulují torpor (tma, 8°C, obr. 1, panel a) a pravidelné probouzení (tma, 37°C, obr. 1, panel b). Z výsledků vyplývá, že vysoká akumulace riboflavinu produkovaného plísní *P. destructans* v tkáni by mohla vést k poškození kůže netopýrů a to následně vyvolat probouzení zvířat, spotřebu tukových zásob a způsobit až smrt zvířat.

Obrázek 1. Cytotoxicita riboflavinu za tmy na primárních netopýřích fibroblastech, napodobení expozice kůže za různých teplotních podmínek během hibernace.



Seznam literatury:

Blehert DS, Hicks AC, Behr M, Meteyer CU, Berlowski-Zier BM, et al. (2009) Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen? *Science* 323: 227–227.

Edwards AM, Silva E, Effect of visible light on selected enzymes, vitamins and amino acids, *J Photochem Photobiol B* 2001 Oct;63(1-3):126-31.

Fрати E, Khatib AM, Front P, Panasyuk A, Aprile F, Mitrovic DR, Degradation of hyaluronic acid by photosensitized riboflavin in vitro. Modulation of the effect by transition metals, radical quenchers, and metal chelators, *Free Radic Biol Med* 1997;22(7):1139–44.

Frick WF, Pollock JF, Hicks AC, Langwig KE, Reynolds DS, et al. (2010) An emerging disease causes regional population collapse of a common North American bat species. *Science* 329: 679–682.

Meteyer CU, Buckles EL, Blehert DS, Hicks AC, Green DE, et al. (2009) Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *J Vet Diagn Invest* 21: 411–414.

Rapin N, Johns K, Martin L, Warnecke L, Turner JM, et al. (2014) Activation of Innate Immune-Response Genes in Little Brown Bats (*Myotis lucifugus*) Infected with the Fungus *Pseudogymnoascus destructans*. *PLoS ONE* 9(11): e112285.

Silva E, Salim-Hanna M, Edwards AM, Becker MI, De Ioannes AE, A light-induced tryptophan-riboflavin binding: biological implications, *Adv Exp Med Biol* 1991;289:33–48.

Zukal J, Bandouchova H, Bartonicka T, Berkova H, Brack V, et al. (2014) White-Nose Syndrome Fungus: A Generalist Pathogen of Hibernating Bats. *PLoS ONE* 9(5): e97224.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 229/2015/FVHE

Vliv kyseliny šťavelové na roztoče *Varroa destructor* a na jeho hostitele včelu medonosnou

Ivana Papežiková, Radka Heumannová, Michael Fronc

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

Úvod

Varroóza je parazitární onemocnění včelího plodu i dospělých včel, způsobené roztočem kleštíkem včelím (*Varroa destructor*). Tento roztoč žije na povrchu těla dospělých včel i včelího plodu a živí se hemolymfou. Bez léčebného zásahu končí varroóza nejpozději ve třetí sezóně úhynem včelstva. K tlumení varroózy jsou nejčastěji využívány syntetické akaricidy, které mají řadu nevýhod, jako je rezistence roztočů k jejich účinku a také schopnost kumulovat se v některých včelích produktech (Sammataro et al., 2005). Varroózu lze však účinně tlumit i některými přírodními látkami. Jednou z těchto látek je kyselina šťavelová. Aplikuje se nejčastěji pokapem (poléváním včel v uličkách mezi plásty) nebo sublimací za pomoci sublimační pánvičky (Rademacher et al., 2006). Velkou výhodou této látky je, že nezanechává rezidua a u roztočů nedochází ke vzniku rezistence. Mechanismus akaricidního účinku kyseliny šťavelové není dosud spolehlivě objasněn. Také existuje jen málo ucelených prací, které se zabývají vlivem kyseliny šťavelové, aplikované sublimací, na zdraví včel. Cílem této práce bylo zjistit, zda kyselina šťavelová nemá negativní vliv na zdraví včel. Dalším cílem bylo přispět k objasnění mechanismu jejího akaricidního účinku.

Materiál a metodika

Vliv kyseliny šťavelové délku života včel, příjem potravy, trávicí trakt a Malpighiho tubuly.

Experiment byl proveden v říjnu/listopadu na zimní generaci včel. Včely, odebrané z pěti neošetřených včelstev, byly rozděleny do tří klíček po 50 včelách. Další tři včelstva byla ošetřena kyselinou šťavelovou formou pokapu (3,5% kyselina šťavelová v 50% roztoku sacharózy, dávka 5 ml roztoku na obsednutou uličku). Poslední tři včelstva byla ošetřena kyselinou šťavelovou, aplikovanou sublimací (1 g na nástavek). Čtyři hodiny po ošetření byly z ošetřených včelstev odebrány včely a rozděleny do klíček po 50 jedincích. Výsledkem byly tři klíčky neošetřených včel, tři klíčky včel, ošetřených pokapem a tři klíčky včel, ošetřených sublimací. Včely byly krmeny 45% roztokem sacharózy ve vodě. Krmivo bylo vyměňováno každé dva dny a krmítka byla pravidelně vážena. Každé dva dny byly počítány a odstraňovány uhynulé včely, nalezené na dně klíček.

Dva dny po začátku pokusu byly z každé klíčky odebrány tři včely na histologické vyšetření trávicího traktu a Malpighiho tubulů a tři včely na stanovení aktivity caspázy 3 v trávicím traktu.

Stanovení aktivity caspázy 3 v trávicím traktu. Aktivita C3 byla měřena fluorimetricky za použití Ac-DEVD-AMC (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-Methylcoumarin) jako substrátu. Výsledná fluorescence byla přepočtena na koncentraci proteinů ve vzorcích. Koncentrace proteinů byla měřena kolorimetricky pomocí Bradfordova činidla.

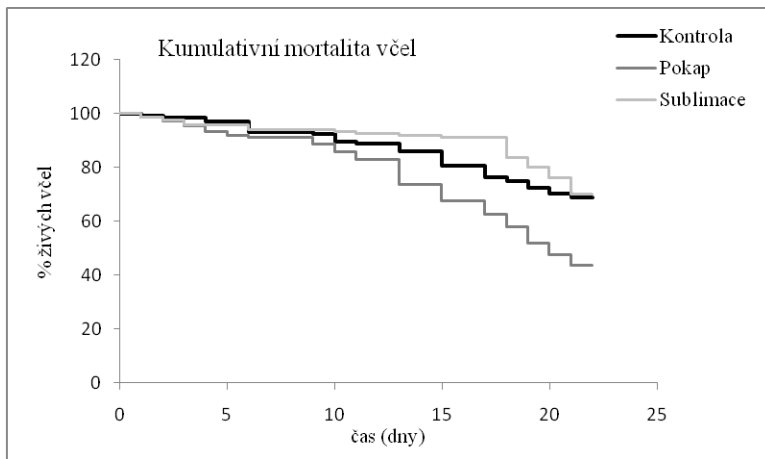
Vliv kyseliny šťavelové na izolované roztoče *Varroa destructor*. Dospělé samičky roztočů byly získány z napadeného včelstva metodou posypu práškovým cukrem. Poté byli roztoči přeneseni na Petriho misky (10 – 12 roztočů/miska, pro každé ošetření 3 misky). Byly vytvořeny tři experimentální skupiny – kontrolní skupina (roztoči na čistých miskách), sublimace (roztoči na miskách, pokrytých krystalky kyseliny šťavelové) a transfer (roztoči byli umístěni na misky, pokryté krystalky kyseliny šťavelové a po 5 minutách byli přeneseni na čisté misky). Byla sledována mortalita roztočů. Uhynulí roztoči byli mikroskopicky vyšetřeni.

Vliv kyseliny šťavelové na roztoče *Varroa destructor* na včelách. Dospělé samičky roztočů byly získány z napadeného včelstva metodou posypu práškovým cukrem. Poté byli roztoči přeneseni na včely (1 roztoč na 1 včelu), kterým byla předtím různými způsoby aplikována kyselina šťavelová. Jednu skupinu tvořily intaktní včely, druhou skupinu včely, ošetřené kyselinou šťavelovou formou pokapu (70 µg/včela), třetí skupinu včely, ošetřené kyselinou šťavelovou formou sublimace (1g/nástavek) a čtvrtou skupinu včely, kterým byla kyselina šťavelová jednorázově podána v krmivu. (70 µg/včela). Včely s roztoči byly sledovány 5 dnů. Byla sledována mortalita včel a byli počítáni roztoči, nalezení mimo včely na dně klíček. Uhynulí roztoči byli mikroskopicky vyšetřeni.

Výsledky

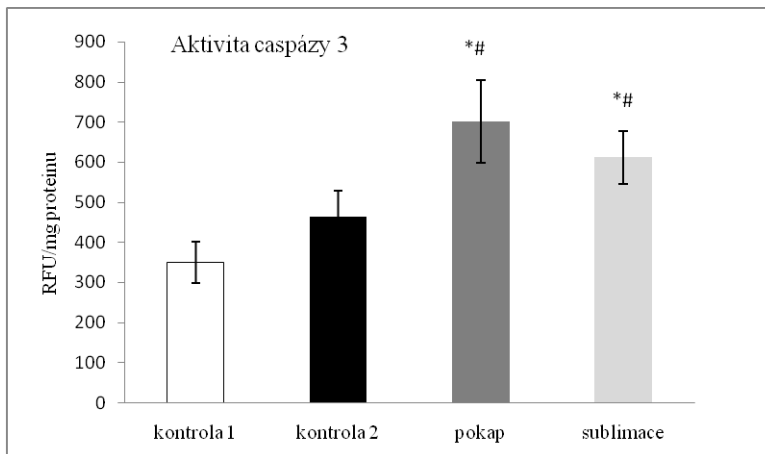
Vliv kyseliny šťavelové na délku života včel, příjem potravy, trávicí trakt a Malpighiho tubuly. U skupiny, ošetřené sublimací, neměla kyselina šťavelová vliv na délku života. U skupiny, ošetřené pokapem, byla mortalita včel významně vyšší než u kontrolní skupiny (Obrázek 1). Ošetření kyselinou šťavelovou nemělo vliv na spotřebu krmiva.

Histologické vyšetření žaludku ukázalo u obou skupin, ošetřených kyselinou šťavelovou, zvýšenou vakuolizaci epiteliálních buněk a zvýšenou sekreční aktivitu. Byla také zjištěna zvýšená exkreční aktivita epiteliálních buněk Malpighiho tubulů.



Obrázek 1. Kumulativní mortalita včel po ošetření kyselinou šťavelovou. Každá křivka představuje průměr ze tří paralel.

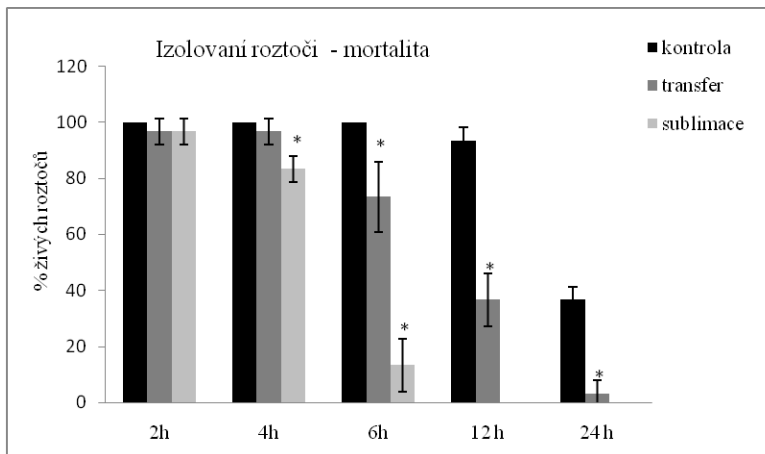
U včel ošetřených kyselinou šťavelovou byla zvýšená aktivita caspázy 3 v žaludku, což svědčí o vyšší míře apoptózy (Obrázek 2).



Obrázek 2. Aktivita caspázy 3 v žaludku včel. Kontrola 1 – neošetřené včely před zaklíckováním, kontrola 2 – neošetřené včely 2 dny po zaklíckování. Průměr ± SEM. Statistická významnost proti kontrole 1 je vyznačena hvězdičkou, významnost proti kontrole 2 je vyznačena křížkem.

vyznačena křížkem.

Vliv kyseliny šťavelové na izolované roztoče *Varroa destructor*. Kyselina šťavelová měla výrazný akaricidní účinek a to i na roztoče, kteří s ní byli v kontaktu jen pět minut (Obrázek 3).



Obrázek 3. Mortalita izolovaných roztočů po kontaktu s kyselinou šťavelovou. Průměr ± SEM. Statistická významnost proti kontrole je označena hvězdičkou.

Pozorování roztočů na miskách pod preparačním mikroskopem odhalilo, že roztočům, kteří přišli do kontaktu s krystalky kyseliny šťavelové, se krystalky trvale přichytily na končetiny, což vedlo k prolongovanému účinku i po krátkodobém kontaktu s povrchem. Mikroskopické vyšetření uhynulých roztočů neodhalilo žádné zevní poškození.

Vliv kyseliny šťavelové na roztoče na včelách. Všechny tři formy aplikace kyseliny šťavelové měly akaricidní účinek (Tabulka 1).

	kontrola	krmení	pokap	sublimace
1 den	100 ± 0	84,7 ± 7,0*	80,0 ± 6,3*	93,3 ± 3,2*
3 dny	97,8 ± 1,8	56,9 ± 7,7*	57,8 ± 6,6*	80,6 ± 8,7*
5 dnů	91,1 ± 3,6	2,0 ± 1,8*	31,1 ± 9,7*	51,1 ± 14,2*

Tabulka 1. Živí roztoči na včelách (%) 1, 3 a 5 dnů po ošetření včel kyselinou šťavelovou. Data představují průměr ± SEM. Statistická významnost proti kontrole je vyznačena hvězdičkou.

Závěry

Vliv kyseliny šťavelové na roztoče *Varroa destructor*. Kyselina šťavelová má výrazný akaricidní účinek. Působí jako kontaktní jed, ale také perorálně – roztoči hynou i tehdy, když se s kyselinou šťavelovou nedostanou do vnějšího kontaktu, ale požijí hemolymfu včel, kterým byla kyselina šťavelová podána v krmivu. U kyseliny šťavelové, aplikované sublimací, stačí k usmrcení roztočů i krátkodobý kontakt roztočů s povrchem, pokrytým krystalickou kyselinou šťavelovou. Vzhledem k tomu, že někteří roztoči, nalezení na dně klíček mimo hostitele, byli dosud živí, dá se předpokládat, že mechanismus účinku kyseliny šťavelové nespočívá jen v usmrcování roztočů, ale že kyselina šťavelová snižuje i schopnost roztočů udržet se na těle včel.

Vliv kyseliny šťavelové na zdraví včel. Ukázalo se, že kyselina šťavelová, aplikovaná pokapem, je pro včely toxičtější, než když je aplikována sublimací. Oba typy ošetření zvyšovaly apoptózu buněk trávicího traktu. Rovněž mikroskopické změny na žaludku byly u obou typů ošetření podobné. Kyselina šťavelová je velmi účinným akaricidem, ale vzhledem k jejím vedlejším účinkům by mělo být pečlivě dodržováno doporučené dávkování a je vhodné upřednostnit aplikaci sublimací před aplikací pokapem.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 231/2015/FVHE.

Literatura

Rademacher E, Harz M (2006) Oxalic acid for the control of varroosis in honey bee colonies: a review. *Apidologie*, Springer Verlag (Germany), 37(1):98-120

Sammataro D, Untalan P, Guerrero F, Finley J (2005) The resistance of *Varroa* mites (Acari: Varroidae) to acaricides and the presence of esterase. *International Journal of Acarology*, 31(1):67-74

Stanovení akutního toxického účinku imidaclopridu a permetrinu pro buněčné linie netopýra velkého *Myotis myotis*

Miroslava Kaňová (Mikšíková), Hana Bandouchová, Jiří Brichta, Petr Linhart

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

Úvod

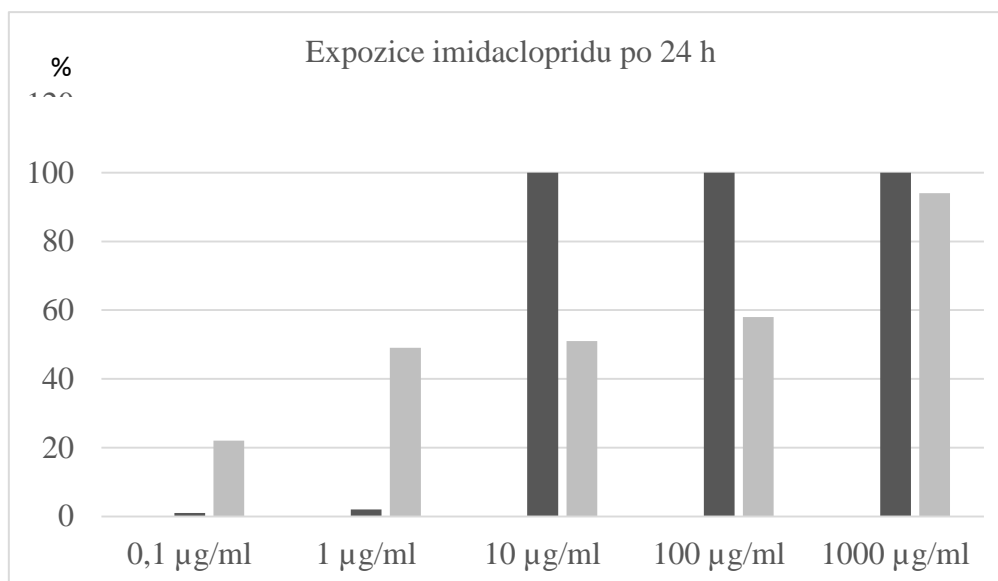
Expozice polutantům, nejčastěji pesticidům, je považována za jednu z významných příčin poklesu velikosti populací netopýrů (Bayat et al., 2014). Jedním z běžně používaných pesticidů je permetrin, který patří do skupiny pyretroidních insekticidů. Pyretroidy jsou využívány jako antiparazitika ve veterinární i humánní medicíně, jako biocidy v domácnostech i jako pesticidy v zemědělství a běžně se tedy dostávají do prostředí, kde mohou působit na necílové organizmy. Dělí se na pyretroidy typu T a typu CS (Modrá et al., 2009). Ve tkáních netopýra hnědavého (*Myotis lucifugus*) v USA byl zjištěn obsah permetrinu v nejvyšší koncentraci 2,5 ppm (McFarland, 1998). Dalším běžným pesticidem je imidacloprid, který je v posledních letech celosvětově hojně využívaným insekticidem na ochranu plodin. Jeho obliba je dána jeho nízkou perzistencí v půdě a také vysokou účinností při nízkých dávkách (Chao a Casida, 1997). Imidacloprid působí jako syntetický analog na nikotinový receptor acetylcholinu (nAChR) u hmyzu (Tomizawa a Casida, 2003). Imidacloprid je oxidován v játrech a vylučován močí a je toxický pro včely. Ovlivňuje postsynaptické nikotinové receptory u hmyzu i obratlovců (Modrá et al., 2009). Netopýři patří k ohroženým živočichům a jsou zákonem chráněni. Buněčné linie tak představují jedinečnou možnost jak posoudit vliv působení polutantů, kterým mohou být hmyzožraví netopýři vystaveni zejména potravou.

Materiál a metodika

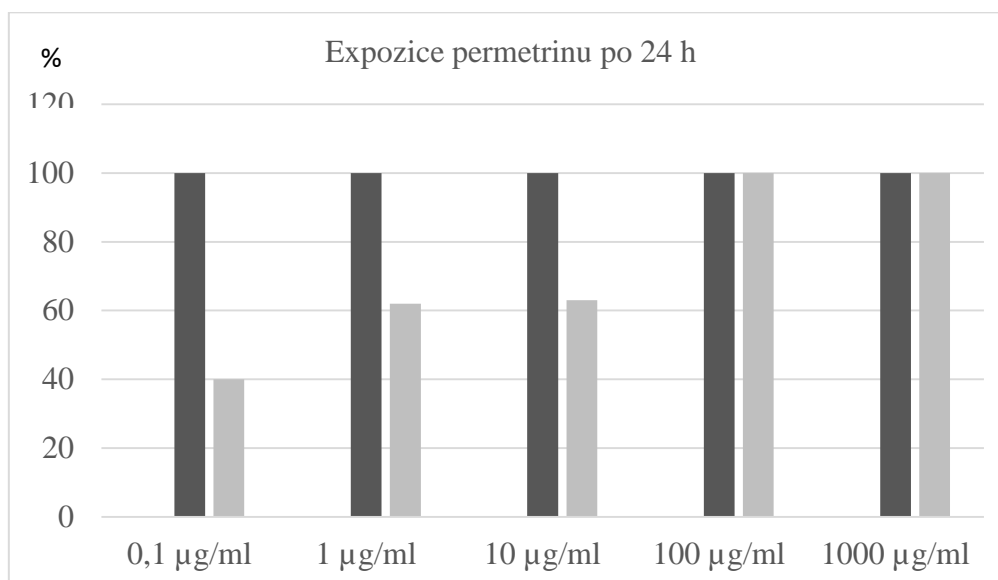
V rámci předchozích projektů se nám podařilo získat několik buněčných linií z netopýra velkého (*Myotis myotis*). Experiment byl konkrétně prováděn na hepatocytech. Tyto buňky byly kultivovány na požadovaný počet, následně vystaveny koncentracím 0,1; 1; 10;100;1000 $\mu\text{g/ml}$ imidaclopridu a permetrinu při teplotách 37 °C a 8 °C po dobu 24 h. Test probíhal triplicitně. Pro průkaz cytotoxicity byl použit komerční LDH Cytotoxicity assay kit. Jedná se o spolehlivý kolorimetrický test pro kvantitativní stanovení laktát dehydrogenázy (LDH) uvolněné do kultivačního média z poškozených buněk jako biomarker buněčné cytotoxicity a lýzy buněk. Množství LDH je dáno enzymatickou reakcí za vzniku červeného formazanu, který je detekován spektrofotometricky

pomocí ELISA readeru. Dále byly z exponovaných buněk za pomoci RNeasy Mini kitu (Qiagen) izolovány vzorky RNA pro následné měření exprese detoxikačních genů pomocí RT PCR.

Výsledky a závěr



Expozice imidaclopridu při teplotě 37 °C po 24 h způsobila v koncentraci 1 µg/ml v 50% buněčnou smrt hepatocytů. V koncentraci 1000 µg/ml byl již 94% cytotoxický účinek. Při teplotě 8 °C v koncentraci 0,1 µg/ml a 1 µg/ml byl pozorován minimální cytotoxický účinek (1-2 %). Maximální byl potom zjištěn od koncentrace 10 µg/ml.



Expozice permetrinu při teplotě 37 °C po 24 h způsobila 62 % buněčnou smrt hepatocytů v koncentraci 1 µg/ml. 100% smrt buněk nastala od koncentrace 100 µg/ml. Při teplotě 8 °C došlo k buněčné smrti ve všech testovaných koncentracích.

Test prokázal vliv rozdílné teploty na cytotoxicitu imidaclopridu a permetrinu v jaterních buňkách netopýra velkého (*Myotis myotis*). Při teplotě 8 °C byl prokázán výrazný cytotoxický účinek ve všech koncentracích daných pesticidů. Test prokázal, že buňky při teplotě 8 °C nejsou metabolicky aktivní a tudíž nejsou schopni odbourávat toxické látky.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 235/2015/FVHE.

Seznam literatury

1. Bayat, S. et al. Organic contaminants in bats: Trends and new issues. *Environment International* 2014;63:40 – 52.
2. McFarland, C.A. Potential agricultural insecticide exposure of Indiana bats (*Myotis sodalis* in Missouri. Columbia, Missouri: University of Missouri, 1998, 256 p.
3. Modrá, H. et al. Speciální veterinární toxikologie. 1. vyd. Brno: Tribun EU s.r.o., 2009. 163 s.
4. Tomizawa, M., Casida J.E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 2003; 48:339–364.
5. Lee Chao, S., Casida, J.E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1997;58:77–88.

Akumulace rtuti ve tkáních kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*)

Král Tomáš, Blahová Jana, Farková Dagmar, Svobodová Zdeňka

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

Úvod

Zdrojem rtuti v prostředí je antropogenní činnost nebo přírodní zdroje. Mezi nejdůležitější znečišťující faktory vodních ekosystémů patří eroze, atmosférické depozice, zemědělské a městské emise, spalování nebo těžba fosilních paliv (Wang et al., 2004). Jedna z důležitých vlastností rtuti je schopnost bioakumulace v půdě, rostlinách, zvířatech i lidech (Houserová et al., 2007). Kormorán velký (*Phalacrocorax carbo*) se řadí mezi dravé piscivorní ptáky vyskytující se na vrcholu potravního řetězce vodního prostředí. Z důvodu geografického rozšíření a dlouhověkosti je kormorán velký v závislosti na schopnosti kumulace rtuti dobrý indikátorový organismus (Skoric et al., 2012). Vrcholový predátor, mezi které patří i kormorán velký, jsou vystaveni kumulaci rtuti v tkáních a orgánech (Houserová et al., 2007). Při prováděných výzkumech v Polsku na kormoránech velkých byl pozorován vyšší obsah rtuti v játrech, ledvinách a svalovině. Byla pozorována signifikantní korelace mezi celkovou rtutí v ledvinách a svalech kormorána velkého (Misztal-Szkudlinska et al., 2011). Mělké rybníční soustavy představují pro kormorána velkého bohaté potravní stanoviště. Ve sladkovodních vodách představuje hlavní zdroj potravy kormorána velkého kapr obecný, candát obecný, štika obecná, okoun říční a další drobné ryby (Skoric et al., 2012). Kormorán velký patřil donedávna u nás mezi vzácné druhy ptáků. Vzhledem k jeho početným stavům v okolních zemích se rozšířil i k nám, zejména na jižní Moravu a do jižních Čech (Třeboňsko). Kormorán patří k nejnebezpečnějším škůdcům ryb, uchvacuje i ryby do hmotnosti

500 g. Závažné hospodářské ztráty způsobuje u rybníčních kaprů a marén (Svobodová et al., 2007).

Cílem předkládané práce bylo posoudit stupeň akumulace rtuti u kormorána velkého, který jako predátor stojí na vrcholu potravního řetězce ve vodním prostředí. Dalším cílem bylo zhodnotit distribuci celkové rtuti v jednotlivých tkáních kormorána velkého.

Materiál a metodika

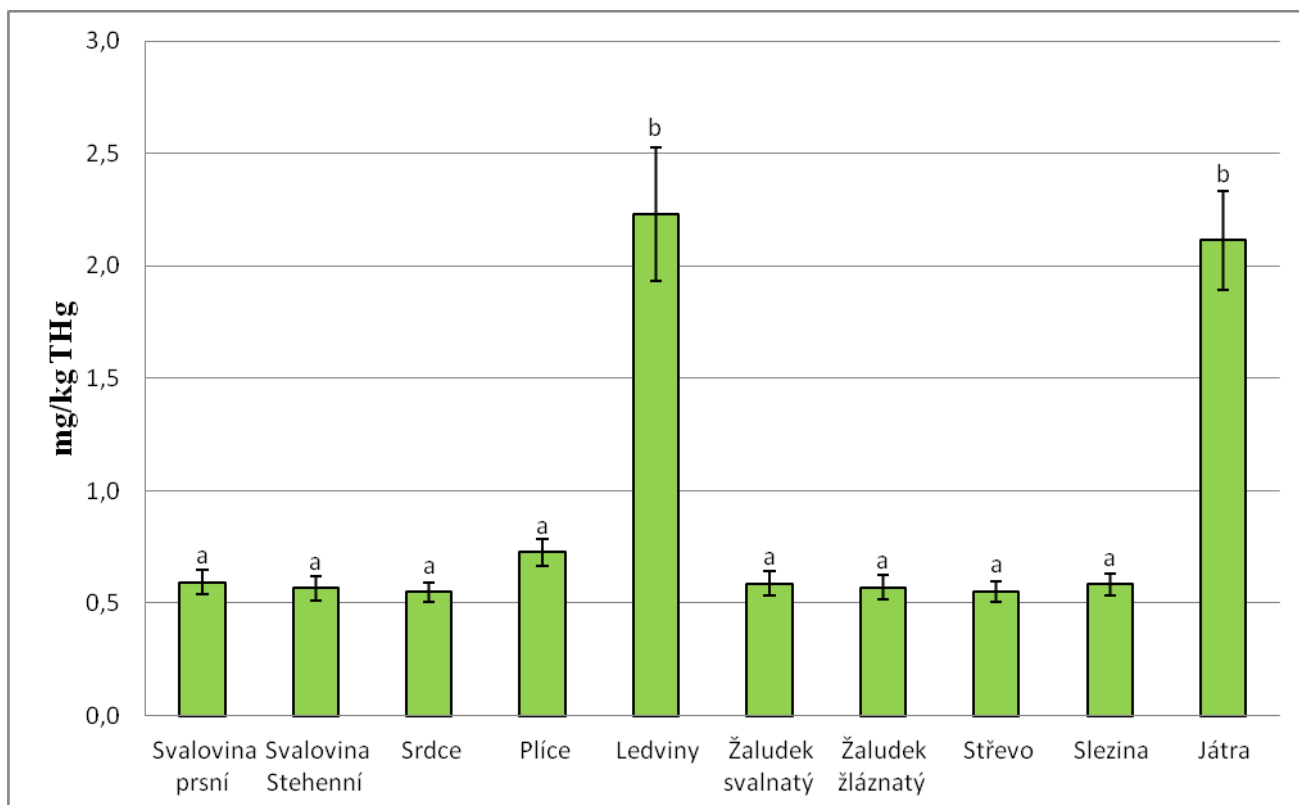
K analýze celkové rtuti bylo na jaře 2015 odebráno 51 těl kormorána velkého o hmotnosti $2\,393,37 \pm 344,60$ g z oblasti Třeboňska (soustava Nadějských rybníků a oblast Chlumecka). Na jaře 2015 byli z těchto rybníků odebráni zakomorovaní kapři. Jedná se o tři rybníky a z každého bylo odebráno 10 kusů jednoletého kapra obecného o hmotnosti $95,00 \pm 23,10$ g. Z každého kusu

kormorána velkého byly odebrány vzorky prsní a stehenní svaloviny, srdce, plíce, ledviny, svalnatý žaludek, žláznatý žaludek, střevo, slezina a játra. Z kaprů byla odebrána hřbetní svalovina. Odebrané vzorky byly následně zamrazeny a dále analyzovány pro obsah celkové rtuti. Obsah celkové rtuti byl měřen na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrofotometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyser), který umožňuje detekci celkové rtuti bez předchozí úpravy vzorku. Statistické zpracování dat bylo prováděno pomocí programu UNISTAT 5.6. for EXCEL.

Výsledky

Naměřené hodnoty obsahu celkové rtuti v tkáních kormoránů velkých jsou uvedeny v tabulce 1. Nejvyšší obsah rtuti byl zjištěn v ledvinách ($2,228 \pm 0,298$ mg/kg) a v játrech ($2,115 \pm 0,220$ mg/kg). Signifikantně nižší hodnoty ($P < 0.01$) byly naměřeny v prsní svalovině ($0,593 \pm 0,056$ mg/kg), stehenní svalovině ($0,566 \pm 0,054$ mg/kg), srdci ($0,549 \pm 0,042$ mg/kg), plících ($0,725 \pm 0,059$ mg/kg), svalnatém žaludku ($0,588 \pm 0,053$ mg/kg), žláznatém žaludku ($0,569 \pm 0,054$ mg/kg), střevě ($0,551 \pm 0,044$ mg/kg) a slezině ($0,584 \pm 0,048$ mg/kg). Ve svalovině kaprů byla naměřena zhruba 50krát nižší hodnota obsahu celkové rtuti ($0,010 \pm 0,004$ mg/kg) ve srovnání s hodnotami ve svalovině kormoránů. Byla prokázána významná kumulace rtuti v kormoránech velkých jako predátorů stojících na vrcholu potravního řetězce ve vodním prostředí. Misztal-Szkudlinska et al. (2011) prováděli výzkum na řece Visle v Polsku, kde sledovali hodnoty celkové rtuti ve tkáních kormorána velkého (ledviny, játra, svalovina) a hodnoty celkové rtuti ve svalovině ryb (lín obecný, plotice obecná, kapr obecný, ježdík obecný a sled' obecný). Podobně jako v naší studii, i oni potvrdili statisticky významné rozdíly mezi obsahem celkové rtuti v ledvinách a svalovině kormorána velkého. Dále také prokázali kumulaci celkové rtuti v potravním řetězci ve vodním prostředí u kormorána velkého v závislosti na jeho přirozené potravě (plotice obecná nebo sled' obecný).

Graf 1: Porovnání obsahu celkové rtuti v tkáních a orgánech kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*). Statisticky významné rozdíly jsou označeny rozdílnými písmeny ($P < 0,01$). Data jsou uvedena jako průměrné hodnoty \pm střední chyba průměru.



Závěr

Byl zjištěn významně vyšší ($P < 0.01$) obsah celkové rtuti v játrech a ledvinách ve srovnání s hodnotami celkové rtuti v ostatních sledovaných orgánech kormorána velkého. Obsah celkové rtuti ve svalovině kormorána velkého byl zhruba 50krát vyšší oproti hodnotám celkové rtuti ve svalovině kapra obecného. V naší terénní studii byla prokázána významná kumulace rtuti u kormorána velkého stojícího na vrcholu potravního řetězce ve vodním prostředí.

Tato studie byla podporována projektem IGA VFU Brno 237/2015/ FVHE.

Seznam literatury

Houserová, P. Kubáň, V., Komar, S., Sitko, J. Total mercury and mercury species in birds and fish in an aquatic ecosystem in the Czech Republic. *Environmental Pollution*. **2007**, *145*, 185-194.

Misztal-Szkudlinska, M., Szefer, P., Konieczka, P., Namiesnik, J. Biomagnification of mercury in trophic relation of great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and fish in the Vistula Lagoon, Poland. *Environmental Monitoring and Assessment*. **2011**, 176, 439-449.

Skoric, S., Visnjic-Jeftic, Z., Jaric, I., Djikanovic, V., Mickovic, B., Nikcevic, M., Lenhardt, M. Accumulation of 20 elements in great cormorant (*Phalacrocorax carbo*) and its main prey, common carp (*Cyprinus carpio*) and Prussian carp (*Carassius gibelio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **2012**, 80, 224-251.

Svobodová, Z., Kolářová, J., Navrátil, S., Veselý, T., Chloupek, P., Tesarčík, J., Čítek, J. Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. *Informatorium Praha*, **2007**, 264 s.

Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D. D., Sorial, G. A., Timberlake, D. Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems - a literature review. *Environmental Pollution*. **2004**, 131, 323-336.

Porovnanie efektivity identifikácie pôvodcu vírusovej hemoragickej septikémie pomocou real-time RT-PCR a RT-PCR na terénnych izolátoch z Českej republiky

Lubomír Pojezdal, Stanislav Navrátil

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

Úvod

Vírus vírusovej hemoragickej septikémie (VHSV) patrí medzi najvýznamnejšie patogény farmovo chovaných a voľne žijúcich lososovitých rýb v Európe a Severnej Amerike. Jeho výskyt, spojený so značnými ekonomickými stratami prevažne v chove pstruha dúhového, má v Českej Republike dlhodobu stúpajúcu tendenciu.¹ V súčasnosti používané metódy diagnostiky prítomnosti patogéna majú nevýhody v podobe časovej- v prípade kultivácie na bunkovej kultúre, alebo technickej- v prípade konvenčnej PCR za použitia reverznej transkriptázy (RT-PCR) s nadväzujúcou Nested PCR, náročnosti.² Cieľom projektu bolo zaviesť metódu real-time RT-PCR pre rýchlu diagnostiku pôvodcu VHS na území ČR a overiť jej citlivosť na širokom spektre izolátov VHSV. Zároveň bolo nutné vylúčiť krížovú reaktivitu metódy s príbuzným vírusom infekčnej hematopoetickej nekrózy (IHNV).

Materiál a metodika

Vzorky

Celkovo bolo použitých 25 izolátov VHSV a 8 izolátov IHNV. Všetky izoláty boli poskytnuté archívom Národí referenční laboratoře pro virové choroby ryb (NRL) vo forme supernatantu z bunkovej kultúry epithelioma papillosum cyprini (EPC). Izoláty pochádzajú z potvrdených ohnísk oboch ochorení na území ČR v rokoch 1996 až 2015.

Kultivácia

Izoláty VHS boli naočkované na bunkovú kultúru rainbow trout gonad (RTG) a výsledný cytopatický efekt (CPE) bol odčítaný po uplynutí siedmich dní. Na bunkovej kultúre RTG bol taktiež stanovený titer troch vybraných izolátov VHS.

Extrakcia RNA

Celková RNA bola zo vzoriek extrahovaná pomocou kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen) v prípade kultivácie na bunkovej kultúre RTG. Pôvodné izoláty z bunkovej kultúry EPC boli spracované pomocou kitu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Quiagen). Extrahovaná RNA bola priamo použitá v

jednotlivých reakciách PCR, ako aj upravená opakovaným desaťnásobným riedením za účelom porovnania citlivosti oboch metód a stanovenia účinnosti amplifikácie real-time RT-PCR.

Primery

Primery pre RT-PCR a Nested PCR boli prevzaté z metodiky NRL a sú cielené na vysoko konzervatívny úsek génu pre glykoproteín G.

Sada primerov pre real-time RT-PCR bola prevzatá od Johnstrup a kol³ a jej cieľom je vysoko konzervatívny úsek génu pre virálny nukleoproteín. Sonda použitá v tejto sade je značená fluorescenčným farbivom 6-FAM.

Johnstrup a kol. tiež upravili sadu primerov a sondy pre detekciu génu pre elongačný faktor 1 α (ELF1) pstruha dúhového, ktorý v spojení so sondou označenou fluorescenčným farbivom HEX slúži ako vnútorná kontrola priebehu real-time RT-PCR reakcie.

Tabuľka 1: Primery PCR reakcií

RT-PCR FW	5'- ATG GAA TGG AAC ACT TTT TTC - 3'
RT-PCR BW	5'- AAC CCC CTC TAT GAA ATC - 3'
Nested PCR FW	5'- TCA TCA TAA AGA GCA CCA CAC C - 3'
Nested PCR BW	5'- ATG GTT TGC CCT CCA AAG AAG C - 3'
Real-time PCR FW	5'- AAA CTC GCA GGA TGT GTG CGT CC - 3'
Real-time PCR BW	5'- TCT GCG ATC TCA GTC AGG ATG AA - 3'
Real-time PCR Probe	5'- 6-FAM TAG AGG GCC TTG GTG ATC TTC TG BHQ-1 - 3'
Real-time PCR ELF1 FW	5'- CCC CTC CAG GAT GTC TAC AAA - 3'
Real-time PCR ELF1 BW	5'- CAC ACG GCC CAC GGG TAC T - 3'
Real-time PCR ELF1 Probe	5'- HEX-ATC GGC GGT ATT GGA AC- BHQ-1 - 3'

(FW – forward primer, BW – backward primer, Probe – sonda)

RT-PCR a Nested PCR

Každá reakcia RT-PCR prebehla v objeme 20 μ l v pufre založenom na kite Titan One Tube RT-PCR System (Sigma Aldrich), zloženého z 4 μ l RT-PCR Reaction Buffer 5x, 0,4 μ l RT-Enzyme mix, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 mM DTT a 0,4 μ M oboch primerov. Reakcia tiež obsahovala 40 U Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega) a 2,4 μ l vzorku v podobe extraktu RNA. Teplotný profil reakcie je popísaný ako RT-PCR (Tabuľka 2.)⁴

1 μ l výsledného produktu bol následne použitý v druhom kole PCR, v Nested PCR reakcií. Objem jednej reakcie založenej na kite GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) bol 20 μ l. Reakcia

obsahovala 4 µl 5xFlexiPCR pufru, 2,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 0,1 µM oboch primerov a 1,25 U GoTaq DNA Polymerase. Teplotný profil reakcie je popísaný ako Nested PCR (Tabuľka 2).

Výsledky konvenčnej PCR boli analyzované elektroforézou PCR produktu v 2% agarózovom gele, za použitia fluorescenčného DNA farbiva GelRed (Biotium).

Real-time RT-PCR

Metodika bola prevzatá od Johnstrup a kol.³ Reakcia bola založená na kite Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen). Objem jednej reakcie bol 25 µl a obsahovala 12.5 µl 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 250 nM koncentráciu každej sondy, 900 nM koncentráciu každého primeru, 0.25 µl QuantiTect RT Mix a 5 µl extraktu RNA. Teplotný profil reakcie je popísaný ako real-time RT-PCR (Tabuľka 2).

Tabuľka 2: Teplotné profily PCR reakcií

RT-PCR	30min 50°C	2,5min 94°C	Cyklus štart 34x	30s 94°C	1min 50°C	1min 68°C	Cyklus koniec	7min 68°C	- 10°C
Nested PCR	Cyklus štart 24x	30s 94°C	30s 60°C	30s 72°C	Cyklus koniec	30s 94°C	30s 60°C	7min 72°C	- 10°C
Real-time RT-PCR	30min 50°C	15min 95°C	Cyklus štart 40x	15s 94°C	40s 60°C	Zber dát	20s 72°C	Cyklus koniec	- 10°C

Výsledky

Konvenčnou RT-PCR, vrátane Nested-PCR, bol vírus VHS detekovaný v 24 z 25 vyšetovaných vzoriek supernatantu z bunkovej línie EPC. Rovnaký záchyt (24 pozitívnych vzoriek) dosiahla táto metóda aj pri analýze infikovaných bunkových kultúr RTG po sedemdnňovej kultivácii.

Pri testovaní desaťnásobnej titrácie extrahovanej RNA dvoch vybraných izolátov VHSV bol vírus preukázaný v riedení 10⁻³ a 10⁻⁴ v prípade RT-PCR a v riedení 10⁻⁴ a 10⁻⁵ v následnej Nested-PCR.

Pomocou real-Time PCR bol vírus detekovaný vo všetkých 25 izolátoch v prípade EPC supernatantu a v 24 z 25 izolátov v prípade bunkovej kultúry RTG. Hodnoty prahového cyklu (Ct) sa pre jednotlivé izoláty pohybovali v rozpätí 17,3 až 25,8 cyklu s výnimkou izolátu číslo 22 s hodnotou Ct 33,3.

Analýza desaťnásobnej titrácie RNA dvoch izolátov preukázala prítomnosť vírusu pri riedení 10⁻⁶ (Ct 32,7) a 10⁻⁷ (Ct 32,2). Účinnosť amplifikácie PCR bola stanovená na 105% a 108%.

U RT-PCR, Nested PCR ani real-time RT-PCR nebola preukázaná krížová reaktivita s analyzovanými izolátmi IHNV.

Titrácia troch izolátov vírusu na bunkovej línii RTG preukázala titre vírusu 1,9x10⁴, 1,9x10⁵ a 4x10⁵. Týmto hodnotám odpovedajú výsledné Ct z real-time RT-PCR: 23,5, 20,56 a 19,4.

Záver a diskusia

Metóda real-time PCR bola zavedená a otestovaná pre použitie v diagnostike vírusu VHS. Analýza spektra izolátov preukázala citlivosť metódy na všetky dostupné izoláty patogéna zachytené na území ČR. Rozdiel v hodnotách Ct pre jednotlivé izoláty je pravdepodobne dôsledkom rozličného titru vírusu v analyzovaných vzorkách, čomu nasvedčujú hodnoty Ct stanovené pre izoláty so známym titrom vírusu. Napriek vysokej konzervatívnosti úseku génu pre nukleoproteín, ktorý je cieľom primerov použitých pre real-time RT PCR³ nie je možné vylúčiť vplyv rozdielnej genetickej štruktúry analyzovaných izolátov. Túto skutočnosť bude však nutné potvrdiť sekvenáciou daných izolátov.

Real-time PCR všeobecne zistila prítomnosť vírusu v reakciách s vyšším stupňom riedenia ako konvenčná RT-PCR. Okrem desaťnásobného riedenia extraktu RNA na túto skutočnosť poukazuje aj fakt, že bola schopná preukázať prítomnosť malého množstva vírusu v prípade izolátu č. 22, ktorý RT-PCR, ako aj kultivácia na bunkovej línii, označili za negatívny. U tejto vzorky došlo pravdepodobne k degradácii vírusu v dôsledku dlhodobého skladovania.

Tato práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 238/2015/FVHE

Riešenie projektu prebehlo vo Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně v priestoroch Národní referenční laboratoře pro virové choroby ryb.

Zoznam literatúry

¹ Reschová S, Pokorová D, Veselý T: Virová hemoragická septikémie lososovitých ryb v ČR; Veterinářství, 2012, 62 (12): 760-762

² OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2014

<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online> (cit. 10.11.2015)

³ Jonstrup S P, Kahns S, Skall H F, Boutrup T S, Olesen N J: Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus; Journal of Fish Diseases, 2013, 36 (1): 9-23

⁴ Snow M, Bain N, Black J, Taupin V, Cunningham C O, King J A, Skall H F, Raynard R S: Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV); Dis. Aquat. Org., 2004, 61: 11–21.

Referenční hodnoty biochemických a hematologických parametrů krve u netopýra velkého (*Myotis myotis*)

Hana Bandouchová, Petr Linhart, Jiří Brichta, Miroslava Mikšíková

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

Úvod

Všechny druhy netopýrů vyskytující se na území ČR patří mezi chráněné živočichy. Pokud jsou tedy netopýři přijímáni do záchranných center pro hendikepované živočichy, je prioritou jejich zpětné vypuštění do volné přírody. Pro zvýšení šancí na jejich přežití je důležité správně vyhodnotit jejich aktuální zdravotní stav. K efektivnímu zhodnocení zdravotního stavu je třeba mít k dispozici porovnávací data od klinicky zdravých zvířat. Hodnoty biochemických a hematologických parametrů krve klinicky zdravých hmyzožravých netopýrů však nejsou k dispozici.

Mimo to jsou netopýři rezervoárem velkého množství patogenů, ať už to jsou viry, bakterie, paraziti nebo plísňe. Rovněž jsou v prostředí vystaveni působení celé řady toxických látek (např. těžkých kovů, pesticidů). Znalost referenčních hodnot umožní hodnocení vlivu těchto stresorů na tuto specifickou skupinu savců (Calisher et al., 2006; Zukal et al., 2012).

V současné době velmi aktuálním tématem je syndrom bílého nosu, což je onemocnění způsobované plísní *Pseudogymnoascus destructans*, které v severní Americe způsobuje masivní pokles početnosti populací zde žijících netopýrů. Přesný mechanismus působení *P. destructans* není doposud známý. Warnecke et al. (2013) považují za hlavní patomechanismus poškození kožní bariéry a následné narušení metabolismu vody a iontů. Pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy však chybí právě referenční hodnoty od nepostížených zvířat.

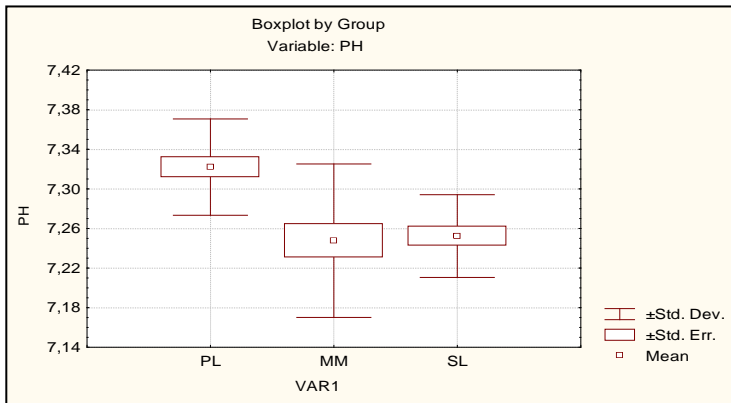
Z výše zmíněného jasně vyplývá potřeba získání referenčních hodnot, které najdou široké uplatnění jak mezi veterinárními lékaři a pracovníky záchranných center, tak mezi chiropterology, zabývajícími se fyziologií netopýrů, epizootologií, toxikologií atd.

Materiál a metodika

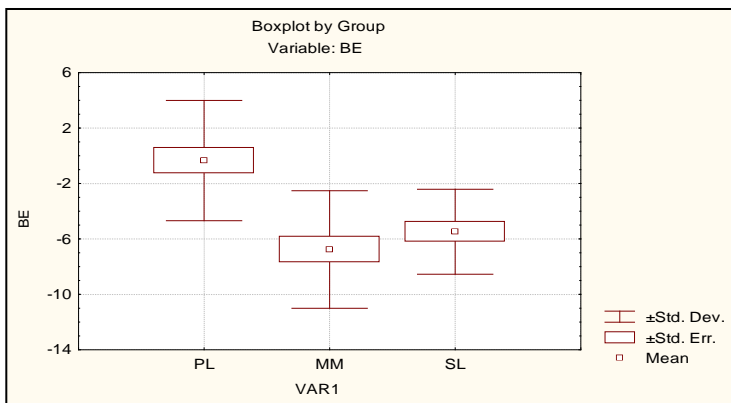
V rámci projektu byly na třech odlišných lokalitách (Malá Morávka a Sloupsko-šošůvské jeskyně ČR a Nietoperek, Polsko) odebrány a zpracovány vzorky krve netopýrů druhu *Myotis myotis*, kteří byli odchyceni v rámci plánovaných odchytů prováděných pracovníky Ústavu biologie obratlovců AV ČR (povolení AOPK ČR č.j. 01662/MK/2012 S/00775/MK/2012, č.j. 866/JS/2012). Netopýrům byl odebrán vzorek krve z v. saphena, místo odběru bylo ošetřeno tkáňovým lepidlem, aby nedošlo ke ztrátám krve. Před vypuštěním byly netopýrům doplněny tekutiny a energie perorální aplikací roztoku glukózy. Biochemické parametry krve byly zpracovány přímo v terénu mobilním biochemickým analyzátozem VetScan iSTAT 1 (Abaxis, USA). Byly změřeny následující parametry: Na⁺, K⁺, Cl⁻, TCO₂, pCO₂, HCO₃⁻, pH, BE, močovina, glukóza, hemoglobin a hematokrit. Rovněž byly zhotoveny krevní nátěry a vyhodnocen diferenciální rozpočet leukocytů. V rámci druhé části projektu byly v létě a na začátku podzimu odebrány vzorky krve a získány hodnoty výše zmíněných parametrů od 60 aktivních jedinců. Ze získaných dat byly stanoveny referenční hodnoty pro dané parametry u netopýra velkého v aktivní fázi života.

Výsledky

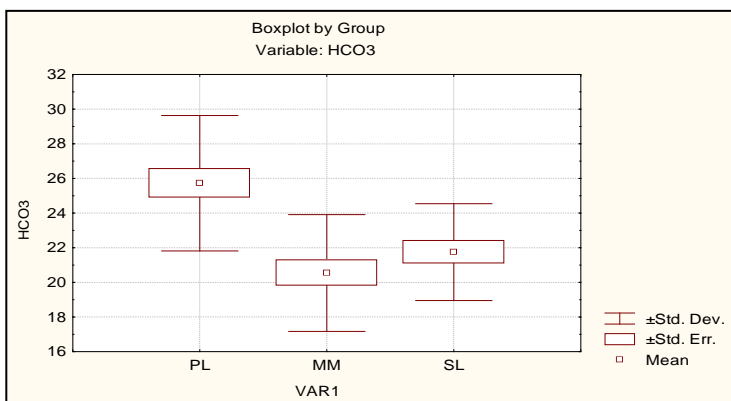
Netopýři přečkávají období, kdy nemají k dispozici potravu, ve stavu hibernace. Tento stav je charakteristický výraznými metabolickými změnami, které mají vliv na fyziologické funkce. V rámci projektu byl sledován vliv mikroklimatických podmínek a míry postižení létací blány WNS lézemi na vybrané parametry krve. Vzorky byly odebrány celkem od 59 netopýrů velkých na konci hibernace (29 samic a 30 samců). V rámci srovnání získaných výsledků byly zjištěny rozdíly zejména u parametrů acidobazické rovnováhy. Zatímco při zohlednění míry postižení létací blány se měřené parametry nelišily, mezi lokalitami byly zjištěny rozdíly v pH, HCO₃ a BE. Hodnoty těchto parametrů se mezi lokalitami Malá Morávka a Sloupsko-šošůvská jeskyně statisticky nelišily, nicméně hodnoty získané od zvířat ze štoly u Malé Morávky byly vysoce statisticky průkazně nižší než z lokality Nietoperek. Toto snížení již odpovídá metabolické acidóze. U vzorků získaných od aktivních zvířat byly zjištěny ve srovnání s jinými savci obdobné velikosti vysoké hodnoty močoviny, které zřejmě souvisí s vysokoproteinovou dietou a specifickým metabolismem netopýrů.



Graf 1: Srovnání hodnot pH u netopýra velkého (*Myotis myotis*) na třech sledovaných lokalitách: Nietoperek (PL), Malá Morávka (MM) a Sloupsko-šošůvská jeskyně (SL).



Graf 2: Srovnání hodnot BE u netopýra velkého (*Myotis myotis*) na třech sledovaných lokalitách: Nietoperek (PL), Malá Morávka (MM) a Sloupsko-šošůvská jeskyně (SL).



Graf 3: Srovnání hodnot HCO₃ u netopýra velkého (*Myotis myotis*) na třech sledovaných lokalitách: Nietoperek (PL), Malá Morávka (MM) a Sloupsko-šošůvská jeskyně (SL).

Závěr

Hibernace představuje z hlediska fyziologie pro živočichy hraniční stav, který může být ovlivněn vnějšími podmínkami nebo vnitřními faktory (např. infekčním procesem). V rámci projektu byly zjištěny rozdíly v hodnotách parametrů acidobazické rovnováhy hibernujících netopýrů souvisejících především s mikroklimatickými podmínkami hibernakula. Nejvýraznější metabolická acidóza byla zjištěna u jedinců hibernujících ve štole v Malé Morávce, kde jsou z hlediska mikroklimatického nejextrémnější podmínky (nižší teplota oproti ostatním dvěma lokalitám, vysoká vlhkost, delší hibernace). Oproti předpokladům nebyly zjištěny rozdíly v hodnotách hematologických a biochemických parametrů v souvislosti s mírou postižení létací blány WNS. Zatímco u těžce postižených severoamerických netopýrů je popisována alterace acidobazické rovnováhy, u našich netopýrů zřejmě mírnější postižení nevede k výraznému narušení zdravotního stavu a počet WNS lézí nekoreloval s žádným ze sledovaných parametrů.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 239/2015/FVHE.

Seznam literatury

1. CALISHER, C. H., J. E. CHILDS, H. E. FIELD, K. V. HOLMES a T. SCHOUNTZ. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, vol. 19, issue 3, p. 531-545.
2. WARNECKE, L., J. M. TURNER, T. K. BOLLINGER, V. MISRA, P. M. CRYAN, D. S. BLEHERT, G. WIBBELT a C. K. R. WILLIS. Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. *Biology Letters*. 2013, vol. 9, issue 4, p. 20130177-20130177.
3. ZUKAL, J., PIKULA, J., BANDOUCHOVA, H. Bats and toxic pollutants. In: Flaquer, C. & Puig-Montserrat, X. eds. Proceedings of the International Symposium on the Importance of Bats as Bioindicators. Museum of Natural Sciences Edicions, Granollers. Published by Granollers Museum of Natural Sciences. 2012, p. 75-79.

Diverzita a evoluce plazmidů u bakterií produkujících karbapenemázy z racků australských

Hana Dobiášová¹, Kateřina Řeháková¹, Zuzana Klíčová¹, Monika Dolejská^{1,2}

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno; ²Středoevropský technologický institut (CEITEC), Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Karbapenemy patří mezi rezervní beta-laktamová antibiotika využívaná k léčbě nejzávažnějších onemocnění vyvolaných multirezistentními gramnegativními bakteriemi. Rozšiřování bakterií a mobilních genetických elementů nesoucích geny karbapenemáz, které hydrolyzují kromě karbapenemů také většinu dalších beta-laktamových antibiotik, je jedním z nejzávažnějších problémů současné medicíny (Nordmann et al., 2012).

V Austrálii je prevalence bakterií s produkcí karbapenemáz z humánního klinického materiálu dlouhodobě na nízké úrovni a mezi nejčastěji detekované karbapenemázy patří metalo-beta-laktamáza IMP-4 (AGAR, cit. dne 6.1. 2015). V naší recentní studii byla zjištěna vysoká prevalence enterobakterií produkujících tuto karbapenemázu a její jednolokusové varianty u racků australských (*Chroicocephalus novaehollandiae*) v hnízdní lokalitě Five Islands (Nový Jižní Wales, Austrálie). Vzhledem ke značné genetické diverzitě těchto izolátů hrál horizontální přenos plazmidů pravděpodobně důležitou roli při rozšiřování této karbapenemázy (Dolejska et al., 2015). Testováním schopnosti konjugativního přenosu bylo získáno celkem 53 transkonjugantů *Escherichia coli* MT102 a transformantů *E. coli* DH5a s 1 plazmidem nesoucím *bla*_{IMP-4,-26,-38}.

Cílem tohoto projektu bylo zmapovat diverzitu plazmidů nesoucí *bla*_{IMP}, identifikovat pravděpodobné zdroje těchto plazmidů za základě porovnání genetického okolí genu *bla*_{IMP} u námi získaných plazmidů a sekvencí dostupných v databázi GenBank a zhodnotit význam vybraných kontaminantů na udržování těchto plazmidů.

Materiál a metody

Plazmidy 53 transkonjugantů *E. coli* MT102 a transformantů *E. coli* DH5a byly zařazeny do skupiny inkompatibility (Inc) pomocí PCR (Carattoli et al., 2005) a jejich velikost byla stanovena pomocí štěpení S1-nukleázou a pulzní gelovou elektroforézou. Příbuznost plazmidů v rámci jednotlivých skupin inkompatibilit byla studována pomocí restriční analýzy. Příbuznost IncI1, IncHI2 a IncN plazmidů byla studována pomocí metod „plasmid multilocus sequence typing“ (pMLST) a „double locus sequence typing“ (DLST) (Garcia-Fernandez and Carattoli, 2010; Dobiášová et al., 2013). Geny rezistence k dalším skupinám antibiotik byly testovány pomocí PCR

(Dobiasova et al., 2013). Genetický kontext genu *bla*_{IMP} byl testován pomocí několika sad PCR, které byly navrženy na základě kontextů tohoto genu nesených humánními klinickými izoláty enterobakterií (Espedido et al., 2008). Z homologických skupin plazmidů byly vybrány reprezentativní plazmidy, u kterých byla stanovena primární struktura pomocí nové generace sekvenování metodou 454 (GS Junior, Roche). Sekvence plazmidů byly sestaveny pomocí PCR a Sangerova sekvenování, vyhodnoceny pomocí software Geneious 7.1.9. (Biomatters Ltd., Nový Zéland) a anotovány pomocí bioinformatických nástrojů a volně dostupných databází (GenBank, Geneious, RAST, IS Finder aj.).

Výsledky

Plazmidy nesoucí *bla*_{IMP-4,-26,-38} byly zařazeny do skupin inkompatibilit A/C (7), A/C-Y (2), HI2 (8), HI2-N (20), I1 (3), L/M (4). Devět plazmidů bylo použitou metodou netypovatelných.

IncA/C a IncA/C-Y plazmidy (160 až 220 kb) neměly příbuzné restriční profily. Z celkem 7 IncA/C plazmidů byly na třech plazmidech detekovány alely *bla*_{IMP-38} (2 plazmidy) a *bla*_{IMP-26} (1). Genové kazety *bla*_{IMP-4,-26} byly na 5 IncA/C a IncA/C-Y detekovány v integronu třídy 1 s identickou strukturou *bla*_{IMP-4/-26-qacG-aacA4-catB3} jako v referenční sekvenci IncL/M plazmidu pE11573 (JX101693.1) izolovaného z humánního klinického izolátu *Enterobacter cloacae* v Sydney (Obrázek 1). Geny *bla*_{IMP-4,-38} byly na 3 IncA/C plazmidech detekovány ve struktuře *bla*_{IMP-4/-38}-intron skupiny II-*qacG-aacA4-catB3*. U všech IncA/C a IncA/C-Y plazmidů byl detekován Tn1696 v oblasti před integronem třídy 1 jako u referenční sekvence IncA/C plazmidu izolovaného z humánního klinického izolátu *E. coli* Ec158 v Melbourne. Téměř u všech těchto plazmidů byla detekována IS5075, IS6100 a makrolidový operon jako u pE11573 (Obrázek 1). Navíc byl na těchto plazmidech detekován *mer* operon zajišťující rezistenci ke rtuti, gen rezistence k sulfonamidům a chloramfenikolu.

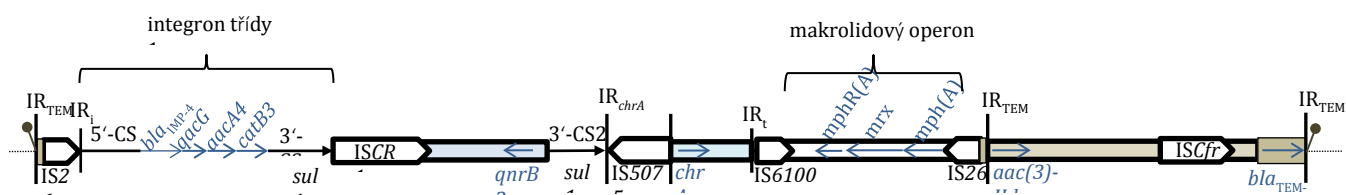
V průběhu konjugativního přenosu byla pozorována změna velikostí IncHI2 a IncHI2-N plazmidů. Vzhledem ke vzniku fúzních replikonů nebylo možné u některých plazmidů určit sekvenční typ, ale pouze některé geny analyzované v pMLST nebo DLST. Celkem 8 transkonjugantů s IncHI2 plazmidem (150-350 kb, ST1 nebo alela *smr0018_3*) bylo získáno z 5 původních izolátů. Genová kazeta *bla*_{IMP-4} byla detekována ve struktuře integronu tř. 1 odpovídající pE11573 u 6 transkonjugantů. Na žádném z těchto plazmidů nebyl detekován gen *qnrB2* (Obrázek 1). Celkem 20 transkonjugantů s fúzním replikonem IncHI2-N (140-400 kb) bylo získáno z 12 původních izolátů. V rámci těchto mozaikových IncHI2-N replikonů bylo sedm konzervativních oblastí odpovídající IncHI2 plazmidům zařazeno do ST3 a v 11 konzervativních oblastech

odpovídajících IncN plazmidům byla detekována alela *repN_1*. U šesti plazmidů byla zjištěna struktura integronu tř. 1 stejná jako u pE11573 a u zbylých plazmidů se pomocí PCR mapování genetický kontext genu *bla_{IMP-4}* nepodařilo zjistit (Obrázek 1). Oblast multirezistence byla u těchto mozaikových plazmidů variabilní, nicméně všechny tyto plazmidy nesly gen *tetA*.

Tři IncII plazmidy (ST136, 100-140 kb) měly identické nebo příbuzné restriční profily. Gen *bla_{IMP-4}* se u všech těchto plazmidů vyskytoval ve struktuře integronu třídy 1: *bla_{IMP-4}-qacG-aacA4-catB3*. Oblast multirezistence na sekvenovaném IncII plazmidu (1720e TF) za integronem tř. 1 obsahovala *ISCR1*, *qnrB2*, 3'-CS2, *IS5075*, přerušovaný transpozon s *chrA* potenciálně kódujícím rezistenci ke chromanům, *IS6100*, *mph(A)-mrx-mphR(A)* operon kódující rezistenci k makrolidům, *IS26* a odpovídala struktuře referenční sekvence pE11573.

Čtyři L/M plazmidy (80 kb) měly identické nebo příbuzné restriční profily, gen *bla_{IMP-4}* se u všech těchto plazmidů vyskytoval ve struktuře integronu třídy 1: *bla_{IMP-4}-qacG-aacA4-catB3*. U všech IncL/M plazmidů byla detekována *IS26* před integronem tř. 1, oblast *IS6100*, makrolidový operon, *aac(3)II-d* a *ISCFr1*. Konzervativní oblast sekvenovaného reprezentativního plazmidu (1631m1 TC1) byla 100% identická k referenční sekvenci pE11573, oblast multirezistence s výjimkou oblasti mezi *ISCR1* a *IS6100* byla 100% identická k referenční sekvenci pE11573 (Obrázek 1).

Devět plazmidů s *bla_{IMP-4}* (50-490 kb) bylo netypovatelných z hlediska skupiny inkompatibility a kromě dvou plazmidů měly nepřibuzné restriční profily. U šesti plazmidů byla struktura integronu tř. 1 stejná jako u reference pE11573 a u třech se pomocí PCR mapování genetický kontext genu *bla_{IMP-4}* nepodařilo zjistit. Tyto plazmidy měly společnou přítomnost *IS6100* a makrolidového operonu v oblasti multirezistence (Obrázek 1).



Obrázek 1. Struktura oblasti multirezistence u pE11573 (JX101693.1). Inzerční sekvence (IS) jsou vyznačeny plnými šipkami, konzervativní oblasti integronu třídy 1 (5'-CS, 3'CS, 3'CS2) jsou vyznačeny geny tlustými černými linkami, geny rezistence jsou vyznačeny modrými a černými šipkami. Obrácené repetice (IR) jsou označeny příčnými linkami, přímé repetice (TTATT) jsou vyznačeny krátkými černými oválnými šipkami.

Závěr

Výsledky této studie poukazují na značnou diverzitu plazmidů nesoucí *bla*_{IMP-4,-26,-38}, které doposud nebyly zdokumentovány. IncA/C, IncL/M a IncHI2 nesoucí *bla*_{IMP-4} byly detekovány u různých druhů enterobakterií z humánního klinického materiálu v Sydney, Melbourne a Brisbane v letech 2002-2013 (Espedido et al., 2008, Sidjabat et al., 2014), což může poukazovat na humánní zdroj těchto plazmidů. Na plazmidech skupiny inkompatibility A/C byly detekovány geny kódující rezistenci k těžkým kovům, které by se mohly potenciálně podílet na udržování těchto plazmidů v prostředí zatíženém těmito kontaminanty. Velká variabilita IncHI2 a IncHI2-N plazmidů poukazuje na plasticitu a řadu evolučních změn těchto molekul. Výsledky této studie dokumentují široké rozšíření plazmidů s *bla*_{IMP}, výskyt genu *bla*_{IMP} na plazmidech různých skupin inkompatibilit a na přestavby oblastí multirezistence na těchto plazmidech.

Poděkování

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno (242/2015/FVHE).

Literatura

- (AGAR), Australian Group on Antimicrobial Resistance. *The evolution of carbapenemases in Enterobacteriaceae in Australia*. URL: http://www.agargroup.org/files/AGAR_Carbapenemase_evolution%20Final.pdf, cit. dne 6.1.2015
- CARATTOLI, Alessandra, BERTINI, Alessia, VILLA, Laura, FALBO, Vincenzo, HOPKINS, Katie L. a THRELFALL, E. John. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, **63**(3), s. 219-228. ISSN 0167-7012.
- DOBIASOVA, Hana, DOLEJSKA, Monika, JAMBOROVA, Ivana, BRHELOVA, Eva, BLAZKOVA, Lucie, PAPOUSEK, Ivo, KOZLOVA, Marketa, KLIMES, Jiri, CIZEK, Alois a LITERAK, Ivan. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2013, **85**(3), s. 604-611. ISSN 0168-6496.
- DOLEJSKA, Monika, MASARIKOVA, Martina, DOBIASOVA, Hana, JAMBOROVA, Ivana, KARPISKOVA, Renata, HAVLICEK, Martin, CARLILE, Nicholas, PRIDDEL, David, CIZEK, Alois a LITERAK, Ivan. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing *Enterobacteriaceae* in the silver gull on Five Islands, Australia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015. pii: dkv306.
- ESPEDIDO, Bjoern A., PARTRIDGE, Sally R. a IREDELL, Jonathan R. *bla*(IMP-4) in different genetic contexts in *Enterobacteriaceae* isolates from Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008, **52**(8), s. 2984-2987. ISSN 0066-4804.
- GARCIA-FERNANDEZ, Aurora a CARATTOLI, Alessandra. Plasmid double locus sequence typing for IncHI2 plasmids, a subtyping scheme for the characterization of IncHI2 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamase and quinolone resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010. **65**(6), s. 1155-1161. ISSN 0305-7453.
- NORDMANN, Patrice, DORTET, Laurent a POIREL, Laurent. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*. 2012, **18**(5), s. 263-272. ISSN 1471-4914
- SIDJABAT, Hanna E., HENEY, Clare, GEORGE, Narelle M., NIMMO, Graeme R. a PATERSON, David L. Interspecies transfer of *bla*(IMP-4) in a patient with prolonged colonization by IMP-4-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014. **52**(10), s. 3816-3818. ISSN 0095-1137.

Sledování vývoje proliferativního onemocnění ledvin v podmínkách intenzivního chovu lososovitých ryb s využitím imunohistochemické diagnostiky

Zdeňka Marková¹, Miroslava Palíková¹, Ivana Papežíková¹

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

Úvod

Proliferativní onemocnění ledvin (PKD) je způsobeno původcem *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malakosporea). Hlavním cílovým orgánem původce jsou ledviny, které se následkem infekce až enormně zvětšují, zbudělé ledviny mají mramorovitý vzhled s přítomností šedavých ložisek. Dochází k proliferaci intersticiální tkáně ledvin a k mizení ledvinných kanálků. Podobné změny mohou být i ve slezině. Nejvíce vnímaví k tomuto onemocnění je právě pstruh duhový, u něhož při uplatnění sekundárních infekcí může mortalita dosáhnout až 95% (Clifton-Hadley a kol., 1984). PKD se vyznačuje výraznou sezónností spojenou s teplotou vody. Klinické příznaky onemocnění a zvýšená mortalita se objevuje při teplotě nad 15°C. Vyskytuje se nejčastěji u jednoletých ryb v měsíci červenci – říjnu což je spojeno s uvolňováním infekčních spor z mechovek a rovněž proliferací parazitů v hostiteli – rybě. Výsledné zvýšení intenzity infekce může poté vést k teplotně závislému zvýšení mortality ryb (Bettge a kol., 2009). Po prodělané infekci bývají ryby imunní vůči reinfekci (Foott a Hedrick, 1987). Smith-Posthaus a kol. (2012) uvádí schopnost pstruha kompletně regenerovat ledvinnou tkáň a eliminovat většinu parazitů. Pro diagnostiku původce ve své práci uvádí právě použití imunohistochemického vyšetření histologických preparátů.

Cílem studie bylo využití metody specifické imunohistochemie pro diagnostiku původce *Tetracapsuloides bryosalmonae* a srovnání klasické histologie a imunohistochemie, dále vyhodnocení hematologických a imunologických parametrů a posouzení vývoje onemocnění a schopnosti regenerace organismu ryb.

Metodika

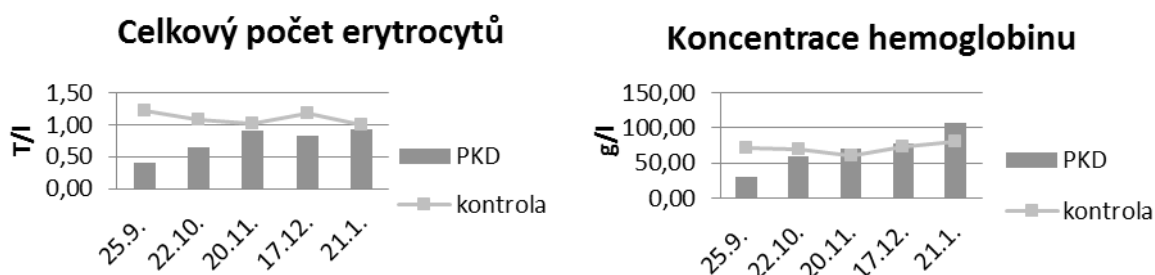
Na základě zjištění zdravotních problémů v chovu lososovitých ryb byly v pěti termínech odebrány ryby vykazující příznaky onemocnění a ryby zdravé jiného původu jako ryby kontrolní. Celkem bylo vyšetřeno 60 ks ryb nemocných a 40 ks ryb zdravých. Rybám byla odebrána krev z ocasních cév, poté byly ryby usmrceny a podrobeny pato-anatomickému vyšetření. Ode všech ryb byly odebírány vzorky ledvin, jater a sleziny pro histologické vyšetření. V krvi byl stanoven celkový počet erytrocytů, hematokritová hodnota, koncentrace hemoglobinu a hodnoty výpočtové:

MCV, MCH a MCHC, dále celkový počet leukocytů a oxidativní vzplanutí fagocytů. Byly zhotoveny krevní nátěry pro stanovení diferenciálních rozpočtů leukocytů. Vzorky krve byly rovněž odstředěny a plasma zamražena. Po rozmražení byla použita pro stanovení dalších imunologických parametrů: koncentrace celkových imunoglobulinů v plasmě a bakteriolytická aktivita komplementu v plasmě. Stanovení IgM z rybí plasmy bylo provedeno pomocí ELISA metody, bakteriolytická aktivita komplementu v plasmě ryb byla stanovena chemiluminiscenčně. Vzorky na histologické vyšetření byly bezprostředně fixovány v 10% formaldehydu a dále zpracovány standardním způsobem. Řezy byly barveny klasicky hematoxylin-eosinem (H-E) a imunohistochemicky (IHC) za použití monoklonální protilátky Aqua MAb-P01 (Aquatic Diagnostics, Stirling, UK). Index záchyty původce byl počítán z deseti zorných polí při zvětšení 200x a vyhodnocen pomocí analýzy obrazu. U každé ryby byly takto vyšetřeny vzorky ledvin, jater a slezin. Stejným postupem byly vyšetřeny i tkáně barvené H-E. Teplota vody ve sledovaném období byla při odběru T1 - 14°C, T2 - 12,5°C, T3 - 8°C, T4 - 4°C, T5 - 3°C. Všechny zjištěné ukazatele byly statisticky vyhodnoceny.

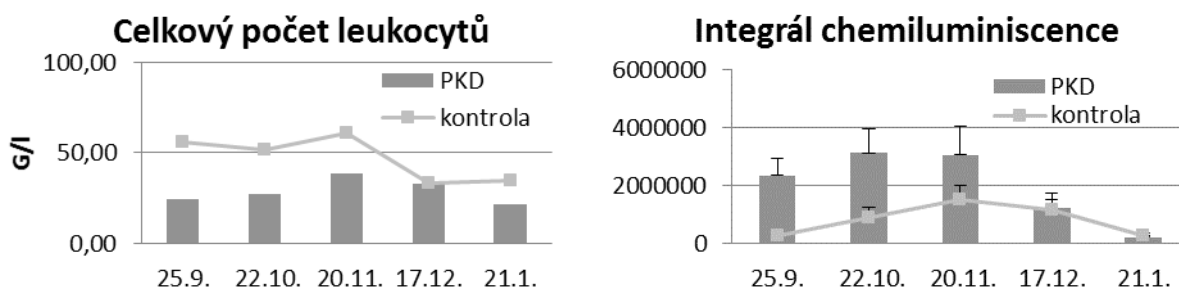
Výsledky

Pato-anatomický nálezn zahrnoval zvětšenou dutinu tělní, exoftalmus, anemii žaber, petechiální krváceniny v kůži, tekutinu v dutině tělní, zduřelé ledviny zejména v kaudální části se změněnou konzistencí a barvou a zvětšenou slezinu. P-A nálezn se již od druhého odběru postupně upravoval. Podobný trend vykazoval i histologický nálezn. Při prvním odběru byl červený krevní obraz charakteristický velice nízkým počtem erytrocytů, nízkou hematokritovou hodnotou a nízkou koncentrací hemoglobinu, což se odrazilo i ve výpočtových hodnotách. Zvýšený objem erytrocytů svědčí o stresovém působení patogenního činitele na organismus. V tomto období docházelo k hynutí ryb. Markantní změny byly rovněž patrné v rámci bílého krevního obrazu. Infekce způsobila rapidní úbytek leukocytů lymfocytární i myeloidní řady, ačkoliv nemocné ryby nadále vykazovaly lymfocytární charakter krve. Fagocyty se vyznačovaly výrazně vyššími hodnotami oxidativního vzplanutí, což je patrné zejména po přepočtu na určitý počet, kdy byla jejich schopnost uvolňovat kyslíkové radikály až 15x vyšší než u zdravých ryb. Rovněž aktivita komplementu a koncentrace celkových imunoglobulinů dosahovala u nemocných ryb vyšších hodnot. Z výsledků je patrné, že původce výrazně stimuloval imunitní odezvu jak v oblasti buněčné nespecifické imunity, tak v oblasti humorální specifické i nespecifické imunity. U PKD je známo, že stimuluje imunitní odpověď organismu. Intenzita a typ této odpovědi mohou být ovlivněny teplotou prostředí (Bettge a kol., 2009). Při druhém odběru hematologické vyšetření prokázalo statisticky významné snížení erytrocytů, leukocytů a hematokritové hodnoty, avšak byl již patrný trend k normalizaci

sledovaných ukazatelů. Zvýšená fagocytární aktivita nadále přetrvávala. V dalších odběrech došlo rychleji k vyrovnání červeného krevního obrazu než u bílého krevního obrazu. Hodnoty hemoglobinu se srovnaly již při druhém odběru, celkový počet erytrocytů ve třetím odběru. Celkové počty leukocytů se vyrovnaly až ve čtvrtém odběru, což korespondovalo i s upravením fagocytární aktivity, která se v tomto odběru snížila na hodnotu kontrolní skupiny. Vybrané hematologické a imunitní parametry jsou znázorněny na grafech č. 1-4. Histologicky a imunohistochemicky jsme v ledvinách, slezině a játrech detekovali původce *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Prevalence výskytu původců v jednotlivých orgánech a termínech je znázorněna v tabulce č. 1. Na rozdíl od klasické histologie bylo možno díky imunohistochemii počet původců u každé ryby a v každé tkáni přesně detekovat a také kvantifikovat. Z výsledků je patrný výrazný rozdíl při použití obou typů barvení. I přesto, že byly tkáně masivně promořeny (stovky infekčních stádií v jednom zorném poli - IHC), byl spolehlivý záchyt původce klasickou histologií možný pouze v počátečním odběru (jednotky až desítky infekčních stádií v jednom zorném poli – H-E).



Graf č. 1 a 2. Vybrané ukazatele červeného krevního obrazu.



Graf č. 3 a 4. Vybrané imunitní ukazatele u ryb.

	IHC			H-E		
	Ledviny	Slezina	Játra	Ledviny	Slezina	Játra
T1 (14°C)	100	100	100	80	50	10
T2 (12,5°C)	40	30	-	40	20	-
T3 (8°C)	20	20	-	-	-	-
T4 (4°C)	-	20	-	-	-	-
T5 (3°C)	-	20	10	-	-	-

Tabulka č. 1.: Prevalence výskytu původců *Tetracapsuloides bryosalmonae* [%]

Závěr

Z hlediska daného chovu je důležité, že u ryb i v souvislosti se snižující se teplotou vody ustala mortalita, vymizely klinické příznaky onemocnění a pato-anatomické změny a došlo k úpravě laboratorních hodnot sledovaných ukazatelů. Ryby jsou schopny regenerovat parenchym postižené tkáně a mohou být odolné vůči reinfekci. Z hlediska diagnostiky a potvrzení původce se nám podařilo na našem pracovišti prověřit a optimalizovat metodu imunohistochemie pro cílenou a přesnou diagnostiku PKD.

Poděkování: Studie byla finančně podpořena grantem IGA VFU Brno č. 246/2015/FVHE.

Seznam literatury

BETTGE, K., SEGNER, H., BURKI, R., SCHMIDT-POSTHAUS, H., WAHLI, T. (2009): Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time-related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology* 136: 615-625

CLIFTON-HADLEY, R.S., BUCKE, D., RICHARDS, R.H. (1984): Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *J Fish Dis* 4: 363-377

FOOTT, J.S., HEDRICK, R.P. (1987): Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *J Fish Biol* 30:477-483

SCHMIDT-POSTHAUS, H., BETTGE, K., FORSTER, U., SEGNER, H., WAHLI, T. (2012): Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Dis Aquat Org* 97: 207-218

Hodnocení účinků tonalidu na vybrané druhy ryb s důrazem na posouzení endokrinní disrupce

Vladimíra Enevová¹, Jana Blahová¹, Lucie Plhalová¹, Veronika Doubková¹, Petr Maršálek¹, Aleš Franc², Emma Fiorino³, Caterina Faggio³, Zdeňka Svobodová¹

¹*Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

²*Ústav technologie léků, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

³*Department of Biological and Environmental Sciences, University of Messina, Itálie*

Úvod

Musk sloučeniny (tzv. syntetické analogy pižma) se řadí do skupiny relativně nových syntetických perzistentních organických polutantů. Uvedené sloučeniny se rozšířeně využívají jako vonné složky v přípravcích pro osobní potřebu nebo různých čistících a pracích prostředcích. Jejich produkce se celosvětově neustále zvyšuje a v současnosti se pohybuje okolo 10 000 tun ročně. Vstup syntetických musk sloučenin do vodního prostředí je spojen pouze s antropogenní činností. Hlavním zdrojem kontaminace je především masivní používání výrobků pro osobní péči a různých detergentů. Musk sloučeniny lze detekovat jak ve vodě, tak i v sedimentu a odtud mohou dále vstupovat do potravního řetězce a kumulovat se v tkáních vodních organismů. Podle chemické struktury je můžeme rozdělit do čtyř základních skupin: nitromusk, polycyklické, makrocyclické a lineární musk sloučeniny. Mezi nejvíce využívané řadíme polycyklické musk sloučeniny, které nacházejí své uplatnění ve všech produktech určených pro osobní péči. Ve srovnání s dříve často využívanými nitromusk sloučeninami mají větší stabilitu a odolnost vůči vnějším vlivům. V průmyslu nejpoužívanější polycyklické musk sloučeniny jsou Galaxolid[®] (HHCB) a Tonalid[®] (AHTN), které tvoří okolo 95 % z celkového množství vyráběných polycyklických musk sloučenin (Vávrová et al. 2010).

Musk sloučeniny vykazují obecně relativně nízkou akutní toxicitu pro vodní organizmy. Riziko představuje především dlouhodobá expozice environmentálními koncentracím. V dlouhodobých toxikologických studiích prováděných na vodních organizmech bylo potvrzeno, že musk sloučeniny mohou fungovat jako potencionální endokrinní disruptory. U vybraných druhů ryb byly zaznamenány histopatologické změny na gonádách a zároveň byla potvrzena indukce syntézy vitellogeninu v játrech samců (Yamauchi et al. 2008). Mimo jiné bylo zjištěno, že musk sloučeniny mohou u ryb podpořit tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů a následně indukovat oxidativní stres. Změny antioxidačního ochranného systému pak mohou vést k porušení struktury důležitých

biomolekul (např. proteiny, lipidy, DNA), způsobovat poruchy vývoje nebo zpomalení růstu (Fernandes et al. 2013).

Materiál a metodika

Hodnocení účinků tonalidu bylo realizováno zpracováním vzorků získaných v rámci dvou subchronických testů toxicity, ve kterých byl testován účinek tonalidu aplikovaného ve vodě a v krmivu.

V první fázi byly zpracovány vzorky získané v rámci subchronického testu toxicity, který probíhal v průtočném systému. V uvedeném testu byly po dobu 28 dní exponovány juvenilní stádia dáňia pruhovaného (*Danio rerio*) účinkům tonalidu. Testovány byly 4 různé koncentrace tonalidu aplikovaného ve vodě v rozmezí 50 – 50 000 ng/l. Po ukončení testu byly odebrány vzorky ryb pro histologické vyšetření a pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu (glutathion reduktáza – GR, glutathion peroxidáza – GPx, glutathion S-transferáza – GST, lipidní peroxidace stanovená pomocí kyseliny thiobarbiturové – TBARS a kataláza – CAT). Koncentrace testované látky ve vodě byla ověřena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

V druhé fázi projektu byl realizován 6-týdenní test toxicity na adultním stádiu pstruha duhového. V uvedeném testu toxicity byl testován účinek tonalidu aplikovaného v krmivu. Testovány byly 2 různé koncentrace v krmivu (854 ng/g a 8 699 ng/g). Kontrolní skupina byla krmena komerčním krmivem bez přídavku tonalidu. Krmné pelety s přídavkem tonalidu byly připraveny smícháním krmiva s rozpuštěnou testovanou látkou a kopolymerem Eudragit E, který umožňuje ukotvit a stabilizovat povrch pelet s adherovanou látkou. Ryby byly umístěny v recirkulačním systému a krmeny 2x denně v dávce 1% celkové hmotnosti ryb. Po ukončení experimentu byl proveden odběr krve a následně bylo v plazmě provedeno kvantitativní stanovení obsahu vitelogeninu (VTG) s využitím ELISA kitu. Uvedená analýza byla provedena u samců. Pro kontrolu byly analyzovány vzorky plazmy i od samic ze všech testovaných skupin. Pohlaví ryb bylo určeno makroskopicky při pitvě. Ve vybraných tkáních pak byla provedena analýza ukazatelů oxidativního stresu (GR, GPx, GST, CAT, TBARS). Stanovení ukazatelů oxidativního stresu bylo provedeno pomocí spektrofotometrických metod. Dále byla v krevní plazmě provedena analýza základních biochemických ukazatelů jako je glukóza, celkový protein, albumin, ALT, AST, ALP, LDH, vápník, triacylglyceridy, fosfor, laktát a amoniak. Koncentrace testované látky v krmivu byla ověřena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Statistické zpracování získaných výsledků bylo provedeno pomocí statistického programu Unistat 5.6. Data byla v první fázi nejprve testována pomocí Shapiro-Wilk testu pro ověření normality. Pro data jež splňovala podmínku normality, byla následně využita metoda analýzy

rozptýly a rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou byly hodnoceny pomocí Dunnett testu. Pro data, která nesplňovala podmínku normality, byl následně použit neparametrický test Kruskal-Wallis. Data byla testována na hladině významnosti $p < 0,05$ a $p < 0,01$.

Výsledky a diskuze

Hodnocení účinků tonalidu na dání pruhované. Výsledky markerů oxidačního stresu (GPx, GR, CAT, TBARS) a aktivita detoxikačního enzymu (GST) ve vzorcích homogenátu dání pruhovaného jsou uvedeny v tabulce 1. Ze získaných výsledků je zřejmé, tonalid v testovaných koncentracích je schopen indukovat oxidační stres u dání pruhovaného. Statisticky významné zvýšení aktivity bylo zaznamenáno v případě enzymů katalázy a glutathion S-transferázy, a to v environmentálních koncentracích 500 – 50 000 ng/l.

Tabulka 1: Výsledky oxidativního stresu ve vzorcích homogenátu dání pruhovaného po 28-denním působení tonalidu. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm střední chyba průměru.

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,05^{**}$; GPx – glutathion peroxidáza v nmol/NADPH/min/mg protein; GR – glutathion reductáza v nmol/NADPH/min/mg protein; GST – glutathion S-transferáza v nmol/min/mg protein; CAT – kataláza v μ mol/min/mg protein; TBARS – lipidní peroxidace v nmol/g)

Ukazatel	Skupiny				
	Kontrola	50 ng/l	500 ng/l	5000 ng/l	50 000 ng/l
GPx	99,96 \pm 21,20	88,51 \pm 19,11	44,15 \pm 9,72	71,02 \pm 16,55	108,64 \pm 12,59
GR	15,57 \pm 0,65	13,69 \pm 0,45	14,55 \pm 0,53	15,53 \pm 0,59	14,80 \pm 0,71
GST	180,28 \pm 5,17	197,77 \pm 4,48	184,86 \pm 4,29	215,62\pm5,65^{**}	238,94\pm9,39^{**}
CAT	69,42 \pm 2,89	86,80 \pm 4,77	90,66\pm5,69^{**}	115,42\pm5,12^{**}	104,55\pm7,85^{**}
TBARS	12,99 \pm 0,93	15,58 \pm 1,28	13,62 \pm 1,04	14,47 \pm 2,74	17,54 \pm 0,71

Hodnocení účinků tonalidu na pstruha duhového. Při analýze biochemických ukazatelů v krevní plazmě nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi kontrolní a pokusnou skupinou. Žádné statisticky významné rozdíly také nebyly zaznamenány při analýze ukazatelů oxidativního stresu, který byl analyzován ve vzorcích tkání jater a ledvin. Výsledky stanovení obsahu vitellogeninu v plazmě pstruha duhového jsou uvedeny v tabulce 2. V tabulce jsou uvedeny procenta pozitivních vzorků a rozmezí detekovaných koncentrací. Z uvedených výsledků je zřejmé, že v uvedených testovaných podmínkách nevykazuje tonalid endokrinní disrupci, tak jak je uváděno v některých vědeckých studiích (Yamauchi et al. 2008). Překvapivě byly zjištěny pozitivní nálezy obsahu vitellogeninu i

v kontrolní skupině. Při analýze vzorků plazmy samic, které sloužily jako kontrola, byl ve všech vzorcích detekován vitellogenin. Zjištěné koncentrace se pohybovaly v rozmezí 41 200,2 až 5 741 303,6 ng/ml.

Tabulka 2: Obsah vitellogeninu (VTG) v plazmě pstruha duhového (LC – pokusná skupina s koncentrací tonalidu 854 ng/g, HC – pokusná skupina s koncentrací tonalidu 8 699 ng/g).

Skupina	počet pozitivních vzorků	% pozitivních vzorků	Rozmezí zjištěných koncentrací VTG (ng/ml)
Kontrola (n = 20)	4	20	303,2 – 985,9
LC (n = 20)	5	25	173,1 – 945,0
HC (n = 20)	3	15	361,9 – 609,8

Ze získaných výsledků je patrné, že významnější změny byly zaznamenány v případě testu toxicity na dániu pruhovaném, kde expozice tonalidu způsobila indukci antioxidantních a detoxikačních enzymů. Námi zjištěné výsledky se shodují se závěry uváděnými v literatuře, které potvrzují, že tonalid aktivuje detoxikační mechanismy v organismu a je schopen dále indukovat oxidativní stres.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory IGA 248/2015/FVHE.

Seznam literatury

Fernandes, D., Dimastrogiovanni, G., Blázquez, M., Porte, C. Metabolism of the polycyclic musk galaxolide and its interference with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Environmental Pollution*. 2013, 174, 214–221.

Vávrová, M., Kubíčková, K., Zouhar, L., Mravcová, L., Čáslavský, J. Syntetické vonné látky a jejich stanovení ve vodním prostředí. *Chemické Listy*. 2010, 104, 618–622.

Yamauchi, R., Ishibashi, H., Hirano, M., Mori, T., Kim, J.W., Arizono, K. Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the liver of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 2008, 90, 261–268.

Vyhodnocení vlivu fluorochinolonu enrofloxacinu na genovou expresi a na parametry oxidativního stresu u dania pruhovaného (*Danio rerio*)

Nina Charvátová¹, Gabriela Želinská¹, Radka Dobšíková¹, Zuzana Šírková¹, Veronika Tykačová²,
Rostislav Gončár²

Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Enrofloxacin je chemoterapeutikum patřící do skupiny fluorovaných chinolonů, které jsou využívány ve veterinárním lékařství. Jeho rezidua jsou dlouhodobě nacházena v povrchových vodách. Jejich původem jsou obvykle nedostatečně přečištěné odpadní vody z chovů hospodářských zvířat, především drůbeže. Kontinuální vstup léčiv do vodního prostředí i v nízkých koncentracích může představovat potenciální dlouhodobé riziko pro vodní a suchozemské organismy (Klavarioti et al., 2009).

Naším cílem bylo zhodnocení vlivu působení enrofloxacinu na změny parametrů oxidativního stresu u juvenilních stadií dania pruhovaného (*Danio rerio*). Pro stanovení účinku enrofloxacinu byly měřeny parametry oxidačního stresu glutathion reductáza (GR), glutathion-S-transferáza (GST), glutathion peroxidáza (GPx) a marker lipidní peroxidace (TBARS). Pro zjišťování míry exprese cílových genů u ryb vystavených působení léčiv je využívána metoda kvantitativní „real-time“ PCR (qRT-PCR), která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktů v reálném čase, tj. v průběhu reakce (Šmarda a kol., 2005). Tato metoda je velmi citlivá, amplifikací vybraného úseku RNA můžeme zacílit na specifické geny.

Materiál a metodika

Tříměsíční jedinci dania pruhovaného (*Danio rerio*) byli umístěni do dvanácti 30l testovacích akvárií po 30 kusech. Kontrolní skupiny a koncentrace enrofloxacinu (5 µg/l, 10 µg/l a 500 µg/l) byly testovány v triplikacích. Pro špatnou rozpustnost ve vodě bylo jak u pokusných, tak u kontrolních skupin použito rozpouštědlo (dimethylsulfoxid, DMSO) v koncentraci 0,05%. Test toxicity byl proveden průtočnou metodou s pravidelnou výměnou lázně po 12 hodinách. Délka trvání testu činila 14 dní. V testovacích nádobách byla každodenně kontrolována kvalita vody (pH, obsah kyslíku a teplota). Třetí a sedmý den pokusu bylo odebráno 9 kusů ryb a na konci pokusu (14. den) 15 kusů ryb pro stanovení somatických ukazatelů a parametrů oxidativního stresu. Test

byl ukončen usmrcením ryb předávkováním anestetikem (MS 222). Po ukončení pokusu byly ryby změřeny a zmrazeny (na teplotu $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$) pro následné stanovení parametrů oxidativního stresu. Od některých randomně vybraných ryb byly odebrány vzorky jater a střev, které byly uloženy do RNAlateru pro následné stanovení genové exprese. Pro histologické vyšetření byly ryby zafixovány roztokem formaldehydu.

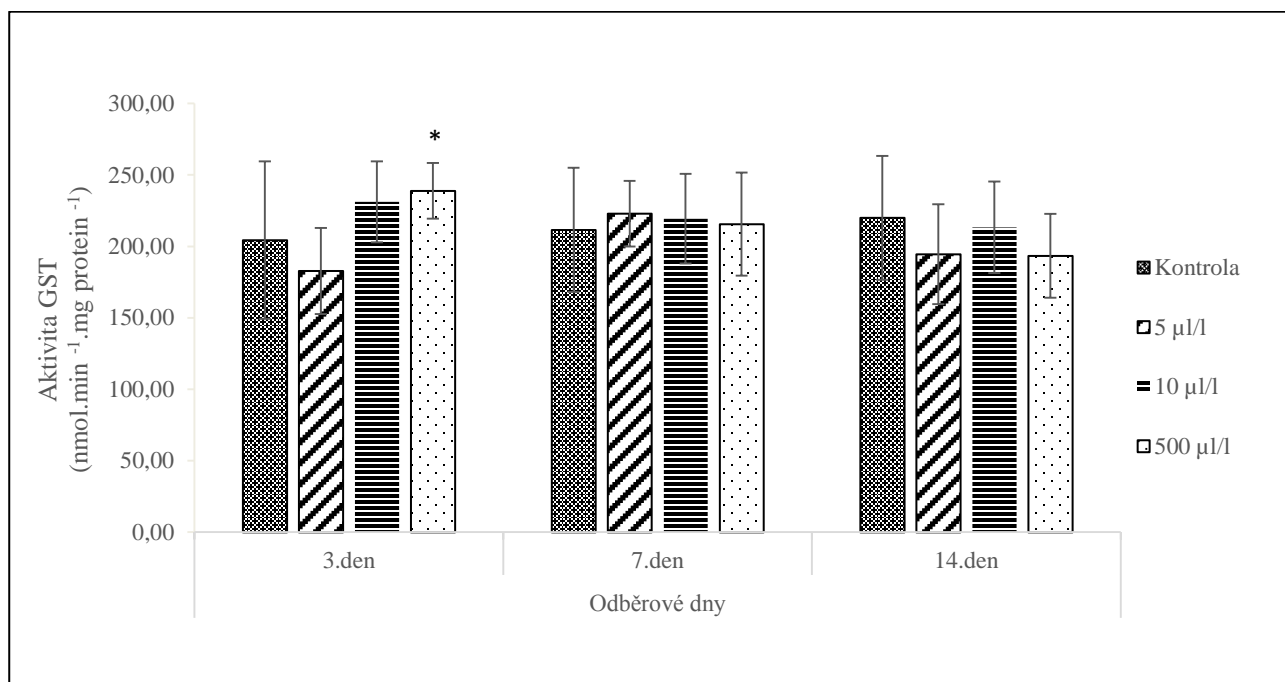
Stanovení jednotlivých parametrů oxidativního stresu bylo provedeno v celotělním homogenátu (homogenizace ve fosfátovém pufru). Katalytická koncentrace GST je stanovena spektrofotometricky na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukováným glutathionem a substrátem 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem (Habig et al., 1974) při 340 nm. Metody měření aktivity GPx a GR jsou založeny na katalýze přeměny oxidovaného glutathionu (GSSG) na glutathion redukováný (GSH) za spotřeby NADPH, úbytek NADPH se měří spektrofotometricky při 340 nm (Carlberg and Mannervik 1975; Flohe and Gunzler 1984). Pro stanovení lipidní peroxidace se využívá TBARS test (thiobarbituric acid reactive substances – látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Metoda je založená na stanovení barevných adduktů, vznikajících reakcí produktů lipidní peroxidace s kyselinou thiobarbiturovou, které jsou měřeny spektrofotometricky (Livingstone et al., 1990).

K vyhodnocení genové exprese bude využita metoda qRT-PCR. Ze vzorků bude izolována a kvantifikována RNA, následně bude mediátorová RNA (mRNA) převedena metodou reverzní transkripce na komplementární DNA (cDNA). K cDNA bude přidán master mix obsahující specifické primery a následně proběhne qRT-PCR reakce umožňující relativní kvantifikaci a následné porovnání míry genové exprese vybraných genů zájmu (CYP1A a CYP3C4) u ryb experimentálních a kontrolních.

Výsledky

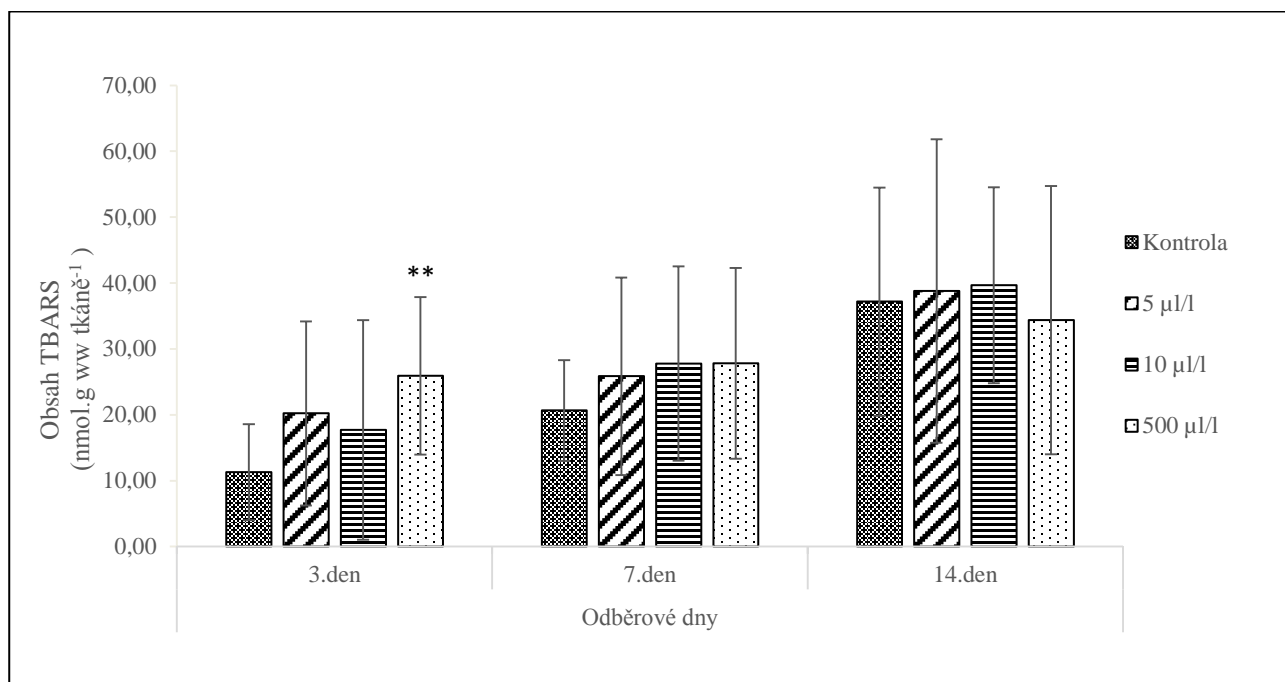
Výsledky hodnocení biomarkerů oxidativního stresu při prvním odběru (3. den pokusu) prokázaly statisticky vyšší ($p < 0,05$) aktivitu enzymu GST ve srovnání s kontrolou ve skupině s koncentrací enrofloxacinu $500\text{ }\mu\text{g/l}$ a statisticky vyšší aktivitu enzymu ($p < 0,01$) TBARS v koncentraci $500\text{ }\mu\text{g/l}$. Dále byla prokázána statisticky nižší aktivita enzymu GPx ($p < 0,05$) ve skupině s koncentrací enrofloxacinu $10\text{ }\mu\text{g/l}$ v porovnání s kontrolou. Ke statisticky významnému zvýšení ($p < 0,05$) aktivity GPx ve srovnání s kontrolou došlo ve skupině vystavené působení enrofloxacinu v koncentraci $10\text{ }\mu\text{g/l}$ při 2. odběru (7. den pokusu). U ostatních parametrů nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna aktivity vybraných enzymů ve 2. ani v 3. odběru. Signifikantní změny parametrů jsou uvedeny v grafu č. 1-3. Výsledky genové exprese a histologického vyšetření nejsou momentálně zpracované, budou doplněny.

Graf 1. Aktivita glutathion S-transferázy (GST) u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystaveného účinkům enrofloxacinu



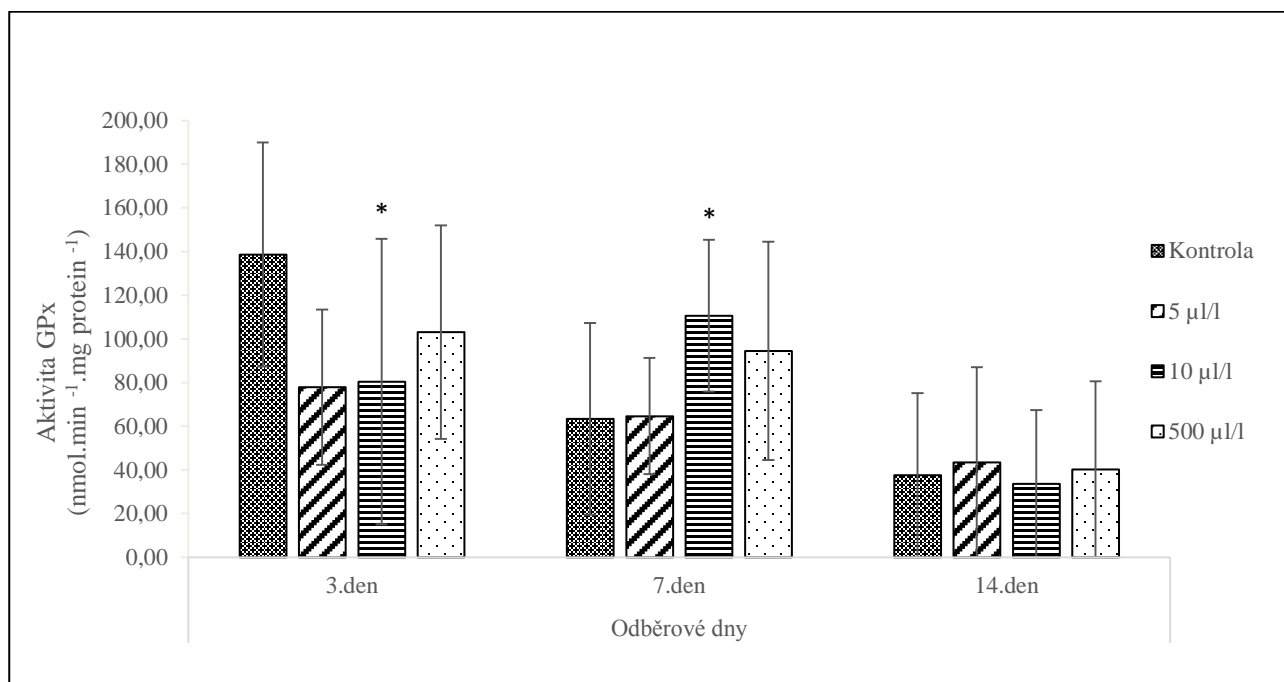
* statistická významnost na hladině ($p < 0.05$)

Graf 2. Obsah TBARS u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystaveného účinkům enrofloxacinu



** statistická významnost na hladině ($p < 0.01$)

Graf 3. Aktivita glutathion peroxidázy (GPx) u dánia pruhovaného (*Danio rerio*) vystaveného účinkům enrofloxacinu



* statistická významnost na hladině ($p < 0.05$)

Seznam literatury:

- CARLBERG, Incer; MANNERVIK, Bengt. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250.14: 5475-5480.
- FLOHÉ, Land; GÜNZLER, Wolfgang A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*, 1984, 105: 114.
- HABIG, William H.; PABST, Michael J.; JAKOBY, William B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 1974, 249.22: 7130-7139.
- KLAVARIOTI, Maria; MANTZAVINOS, Dionissios; KASSINOS, Despo. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*, 2009, 35.2: 402-417.
- LIVINGSTONE, D. R., et al. Oxyl radical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology*, 1990, 415-424.
- ŠMARDA, Jan, et al. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 249/2015/FVHE.

Příspěvky
Farmaceutické fakulty

Účinek nanočástic oxidu zinočnatého na modelové halofyty rodu *Salicornia*

Ľudmila Ballová^{1,2}, Petr Babula¹

Ústav přírodních léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika¹

Katedra farmakognózie a botaniky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Slovensko²

Úvod

Nanočastice (nanoparticles, NPs) sa definujú ako častice s minimálne jedným rozmerom do 100 nm. Vďaka svojim nanorozmerom vykazujú jedinečné vlastnosti a nachádzajú široké uplatnenie v rôznych odvetviach (chemický, stavebný, elektrotechnický priemysel, medicína aj farmácia). Nanočastice oxidu zinočnatého (ZnO NPs) sú druhé najpoužívanéjšie nanočastice z oxidov. Vyskytujú sa v širokej škále komerčných prípravkov, ktoré nás každodenne obklopujú (kozmetické prípravky, opaľovacie krémy, transparentné UV ochranné filmy, elektronické zariadenia, sklo, keramika, stavebné materiály, atď.) (Lao et al., 2002).

S nárastom používania nanočastíc sa zvyšuje aj ich uvoľňovanie do prostredia, čo môže mať aj potenciálne negatívne následky v environmentálnej oblasti aj na zdravie ľudstva. Vedecké štúdie odhalili toxické vplyvy ZnO NPs na modelové organizmy ako napríklad baktérie, bunkové kultúry, riasy aj živočíchy (Gardea-Torresdey et al., 2014). Fytonanotoxikológia sa zaoberá mechanizmom toxicity, absorpcie, transportu, akumulácie nanočastíc v rastlinách a tým aj v potravinovom reťazci. Nanešťastie táto oblasť je stále nedostatočne preskúmaná. Úplne chýbajú poznatky o pôsobení NPs na slanomilné rastliny - halofyty, u ktorých sa kvôli ich schopnosti prežívať v extrémne slanom prostredí predpokladá aj ich zvýšená rezistencia voči negatívnym účinkom nanočastíc.

Materiál a metodika

Kultivácia

Vysterilizované semená rastliny *Salicornia persica* Akhani. boli vložené na Petriho misky s ½ MS médiom (Duchefa) obsahujúcim 1% Plant agar (Duchefa) a 1% sacharózy a následne umiestené v kultivačnom boxe s teplotou 22 °C, relatívnou vlhkosťou 75-85 % a svetelným režimom 12 hod. svetlo/12 hod. tma. Desiatdňové semenáčky boli za sterilných podmienok premiestnené do Erlenmayerových baniek s kultivačným médiom s prídavkom ZnO NPs (<50 nm,

Sigma-Aldrich, USA) v koncentráciách 0, 100 a 1000 mg/L. Zber materiálu bol uskutočnený na 14 deň kultivácie v médiu s ZnO NPs.

Rastová analýza

Pre stanovenie vplyvu ZnO NPs na rastové funkcie podzemnej a nadzemnej časti rastlín *Salicornia* boli použité nasledovné metódy: gravimetrické stanovenie čerstvej hmotnosti koreňovej sústavy a nadzemnej časti, dĺžka primárnych koreňov a nadzemnej časti.

Stanovenie aktivity enzýmov

Aktivita nasledovných enzýmov superoxid dismutáza (SOD), askorbát peroxidáza (APER), peroxidáza (PER) bola stanovená metódou in-gel assay. Po separácii proteínov na polyakrylovom gély (4°C, 120 V, 90 min.) sa gél premýval v 10 % roztoku Triton X-100 v PBS a následne sa gély vložili do príslušných vyvíjacích roztokov. Pre stanovenie aktivity SOD boli použité roztoky MTT a PMS. Pre vizualizáciu PER bol gél inkubovaný bez prístupu žiarenia 45 min. v roztoku DAB a potom bol pridaný peroxid vodíka. Aktivita APER sa stanovovala na gély, ktorý bol najprv umiestnený v roztoku s kyselinou askorbovou a peroxidom vodíka po dobu 30 min. Po inkubácii bol premiestnený do farbiaceho roztoku s TEMED a MTT. Všetky gély boli fotograficky dokumentované a aktivita izoenzýmov bola meraná denzitometricky softvérom ImageJ 1.48.

Fluorescenčná mikroskopia

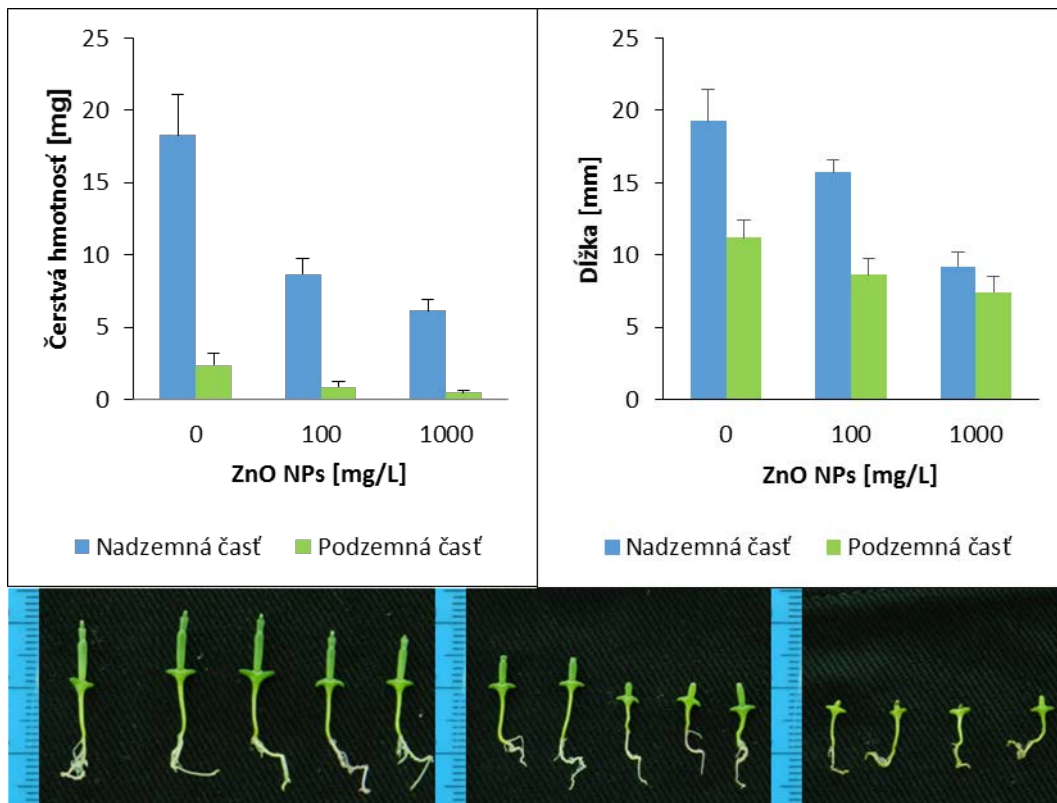
Viabilita buniek, reaktívne formy kyslíka a dusíka, prítomnosť iónov boli stanovené za použitia príslušných fluorescenčných látok a fluorescenčného mikroskopu (Olympus AX 70, Nemecko). Boli použité nasledovné kombinácie fluorescenčných značiek: fluoresceín diacetát (FDA) pre živé bunky a propídium jodid (PI) pre mŕtve a apoptické bunky; DiOC6(3) na stanovenie membránového potenciálu mitochondrií a PI, CellROX a 4,5-diaminofluoresceín diacetát (DAF-DA) pre ROS a RNS; Fluo5F-AM pre detekciu Ca²⁺ a Amplex UltraRED pre peroxid vodíka; NewportGreen DCF-DA pre Zn²⁺ a MitoRed pre mitochondrie; H2DCF-DA pre ROS.

Výsledky a diskusia

V našej práci sme sledovali vplyv ZnO NPs na rast, viabilitu buniek, funkciu organel rastlín rodu *Salicornia*, prítomnosť ROS, respektíve RNS a aktivitu enzýmov zapojených do obrany rastlín voči oxidačnému stresu.

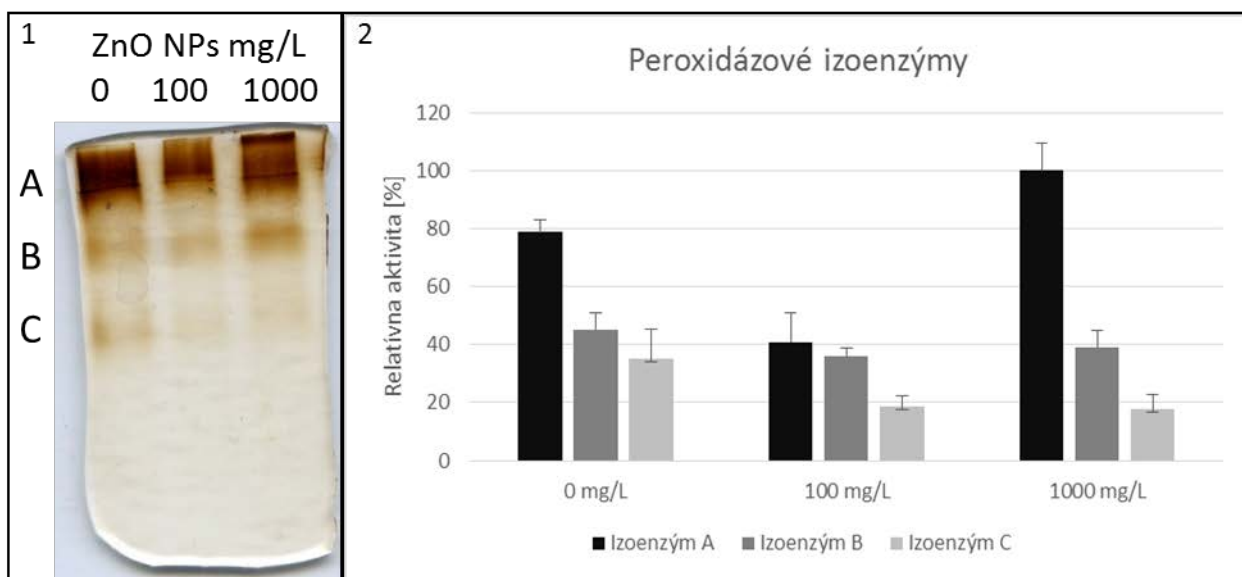
Výsledky rastovej analýzy poukazujú na spomalenie rastu nadzemnej aj podzemnej časti (obr. 1), čo sa prejavilo redukciou dĺžky aj hmotnosti rastlín kultivovaných v médiu s ZnO NPs.

Dĺžka rastlín u vzorky s 1000 mg/L ZnO NPs bola zredukována o $53\% \pm 6\%$ v prípade nadzemnej časti a o $44\% \pm 8\%$ v prípade podzemnej časti. Výsledky poukazujú na negatívny efekt ZnO NPs na rast halofytu *Salicornia* v závislosti na ich koncentráciách.



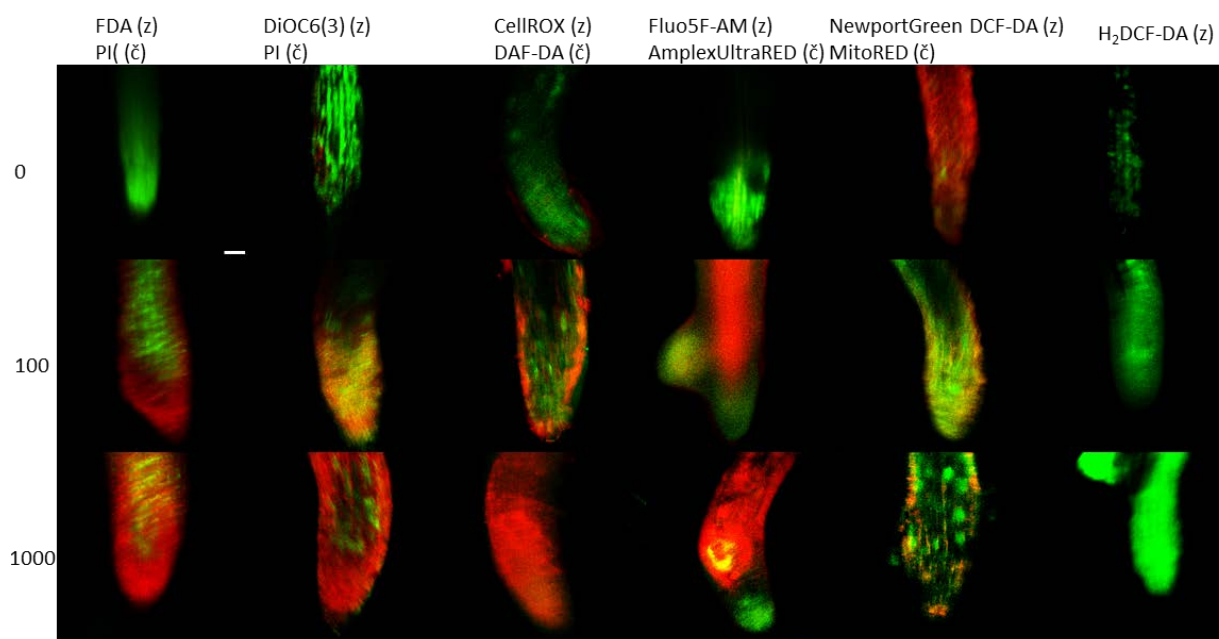
Obrázok 1. Graf znázorňujúci vplyv ZnO NPs v koncentráciách 0, 100 a 1000 mg/L na rastové parametre rastliny *Salicornia* – čerstvá hmotnosť a dĺžka nadzemnej a podzemnej časti.

Metódou in-gel assay bola stanovená aktivita enzýmov APER, PER a SOD, ktoré sú súčasťou enzymatickej obrany bunky voči ROS. Pri nadbytku ROS alebo nedostatočnosti antioxidantného systému môže dochádzať k peroxidácii a poškodeniu štruktúry proteínov, sacharidov aj DNA (Mittler, 2004). Aktivita enzýmu SOD a dvoch odlišných izoenzýmov APER bola znížená v závislosti na stúpajúcej koncentrácii v porovnaní s kontrolnou vzorkou. V prípade troch izoenzýmov PER bol pozorovaný podobný jav (obr. 2). Najvýraznejší pokles aktivity antioxidantne pôsobiacich enzýmov bol detekovaný pri izoenzýme B a C vo vzorkách kultivovaných na médiu s najvyššou sledovanou koncentráciou ZnO NPs (1000 mg/L). Avšak v rovnakom prípade bola aktivita izoenzýmu A najvyššia. Zníženie aktivity týchto enzýmov sa vysvetľuje ako vyčerpanie enzýmov pri nadbytku ROS (Mittler, 2004).



Obrázok 2: Aktivita peroxidázových izoenzýmov (izoenzým A, izoenzým B, izoenzým C) v halofyte *Salicornia* po kultivácií s 0, 100 a 1000 mg/L ZnO NPs znázornená na gély (1) a vyjadrená grafom (2).

Fluorescenčnou mikroskopiou bol detekovaný nárast ROS a RNS v závislosti na stúpajúcej koncentrácií ZnO NPs. Procesy sprevádzajúce apoptózu (zmeny v mitochondriálnom potenciály, zmeny v koncentrácií intracelulárneho vápnika, zvýšené množstvo apoptických buniek) boli pozorované vo vysokej miere u vzoriek s 1000 mg/L ZnO NPs a taktiež u vzoriek s 100 mg/L ZnO NPs. Nárast množstva zinočnatých iónov zo ZnO NPs bol nameraný v rastlinách v závislosti od množstva NPs v kultivačnom médiu (obr. 3).



Obrázok 3: Fluorescenčná mikroskopia halofytu *Salicornia* po kultivácií s 0, 100 a 1000 mg/L ZnO NPs. Mierka predstavuje 75 μm . (z- zelená fluorescencia, č – červená fluorescencia)

Záver

Výsledky našej práce ukazujú, že nanočastice oxidu zinočnatého v tuhom kultivačnom médiu negatívne ovplyvňujú rast a iniciujú apoptózu u halofytu *Salicornia* v koncentráciách 1000 mg/L aj 100 mg/L. Tento jav bol posúdený vizuálne na základe zmien v raste nadzemnej aj podzemnej časti rastliny a symptómov sprevádzajúcich poškodenie (chloróza, redukcia chlorofylu, strata turgoru, atď.). Z našich výsledkov vyplýva, že pravdepodobnou príčinou negatívneho účinku ZnO NPs je porušenie zinkovej homeostázy, produkcia reaktívnych foriem kyslíka a nedostatočná aktivita antioxidantne pôsobiacich enzýmov. Nanočastice sú stredobodom záujmu vďaka svojim unikátnym vlastnostiam, avšak je potrebné mať na zreteli aj ich environmentálne dopady.

Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 321/2015/FaF.

Zoznam literatúry:

GARDEA-TORRESDEY, Jorge et al.: Trophic transfer, transformation, and impact of engineered nanomaterials in terrestrial environments. In *Environmental Science & Technology*, v. 48, 2014, p. 2526-2540.

LAO, Jing Yu et al.: Hierarchical ZnO nanostructures. In *Nano Letters*, v. 2, 2002, p. 1287-1291.

MITTLER, Ron et al.: Reactive oxygen gene network of plants. In *Trends in Plant Science*, v. 9, 2004, p. 490-498.

Hodnocení derivátů alaptidu jako potencionálních modifikátorů transdermální penetrace

Aneta Černíková, Pavel Bobál, Josef Jampílek

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

Úvod

Jedním ze způsobů podání léčiva do organismu je transdermální aplikace, jejíž využití se v současnosti nebývá rozvíjí. Vnější vrstva kůže (*stratum corneum*) chrání tělo proti průniku cizorodých látek včetně léčiv. Byly však nalezeny různé způsoby překonání této bariéry. Jednou z možností je využití chemických permeačních enhancerů (CPE). Přesný mechanismus účinku CPE není znám¹⁻³, ale CPE ovlivňují penetraci/permeaci léčiv určených jak pro lokální působení, tak pro systémový účinek. Náš výzkumný tým začal studovat alaptid jako potenciální modifikátor transdermální permeace před několika lety⁴⁻⁹. Alaptid, (*S*)-8-methyl-6,9-diazaspiro[4.5]dekan-7,10-dion, cyklický dipeptid schopný interagovat s komponenty kůže byl vytvořen skupinou vědců kolem Dr. E. Kasafírka v 80. letech 20. století¹⁰⁻¹².

Cílem této studie bylo zhodnotit vliv analogů alaptidu na prostup vybraných modelových léčiv přes kůži prasečího ucha za použití Franzových difúzních cel z fyziologického pufru (pH 7,4), z prostředí propylenglykolu:vody (1:1) a dalších polotuhých formulací. Analoga alaptidu (viz tabulka 1) byla syntetizována^{10,12} a charakterizována Dr. P. Bobálem na Ústavu chemických léčiv FaF VFU Brno.

Materiál a metodika

Přístroje a materiál

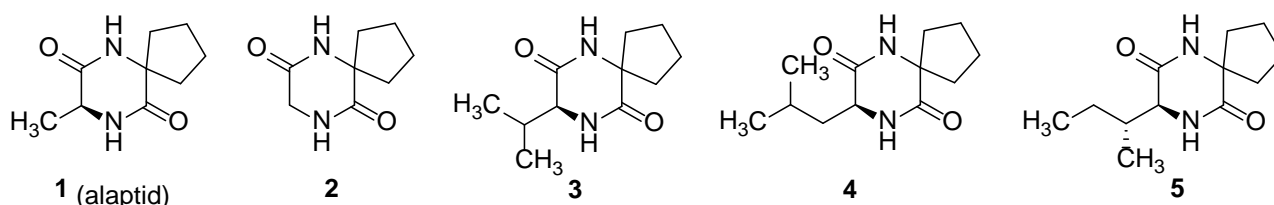
Franzovy difúzní cely (SES Analysesysteme), termostat (Lauda), HPLC systém s UV-VIS DAD detektorem (Agilent Technologies), digitální analytické váhy (Mettler Toledo), ultrazvuková lázeň (Kraintek), pH-metr (Hanna Instruments). Metanol Chromasolv, acetonitril Chromasolv, voda pro HPLC Chromasolv (Sigma-Aldrich), kyselina mravenčí, mravenčan amonný (Fluka), chlorid draselný p.a., chlorid sodný p.a., hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. (LachNer), dihydrogenfosforečnan draselný p.a., propylenglykol p.a. (Lachema), theofylin (Kulich).

Metodika

Měření transdermální permeace za použití vertikálních Franzových difúzních cel a plné kůže z prasečího ucha (*Sus scrofa f. domestica*) bylo provedeno dle směrnice OECD¹³. Analog alaptidu (1 mg) byl přidán k 10 mg modelového léčiva, látky byly rozpuštěny v 1 ml rozpouštědla. Analýza vzorků odebraných z Franzových cel byla provedena pomocí HPLC.

Výsledky

Struktury studovaných potenciálních chemických enhancerů transdermální permeace jsou znázorněny na obrázku 1. Ačkoli byla sledována permeace theofylinu, ibuprofenu a dalších léčiv z různých prostředí, z důvodu omezeného prostoru jsou v rámci tohoto příspěvku diskutovány pouze výsledky získané z experimentů s theofylinem jako modelovou substancí z pufru (pH 7,4) jako prostředí nepodporujícího transdermální permeaci.

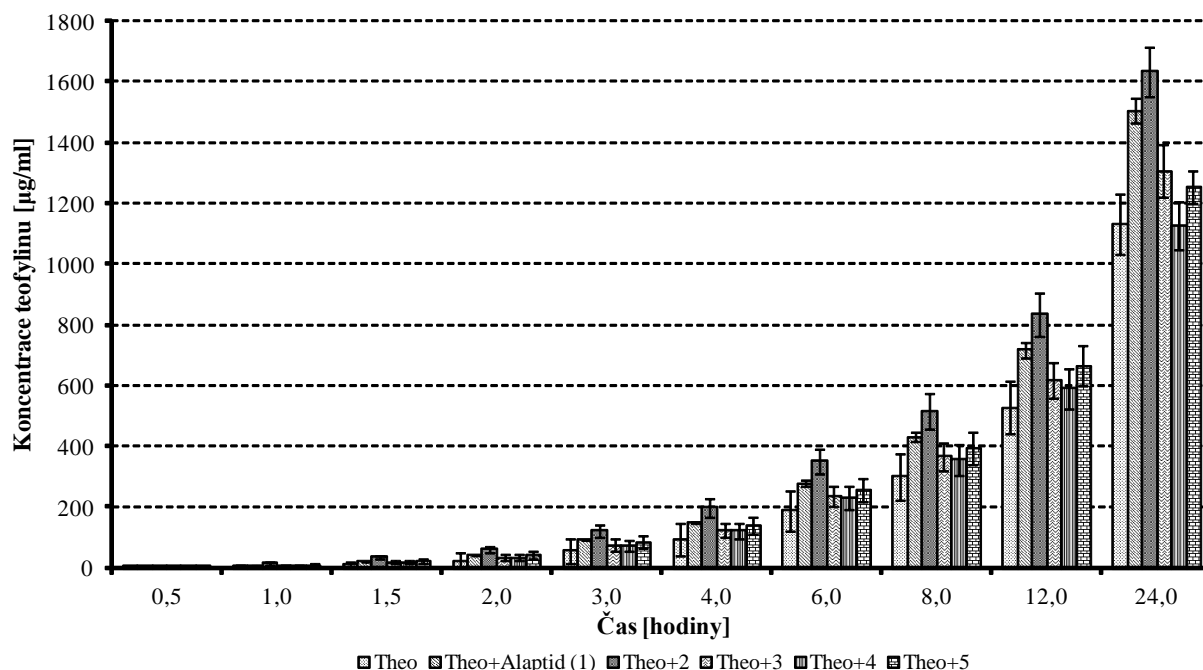


Obrázek 1. Struktura alaptidu (1) a dalších jeho studovaných analogů 2–5.

Výsledky jsou shrnuté v tabulce 1 a znázorněné na obrázku 2. Na základě vypočítaných parametrů, především tzv. zesilovacího poměru ER (enhancement ratio) v ustáleném stavu permeabilita theofylinu z pufru byla zvýšena všemi hodnocenými látkami kromě sloučeniny 4 (isobutylový derivát). Nejvýrazněji, dle ER hodnot, se permeace theofylinu zvýšila přidavkem nesubstituovaného derivátu 2 (přibližně 1,4×) a přidavkem alaptidu (1, přibližně 1,3×). Ostatní měřená analoga alaptidu 3 (isopropylový derivát) a 5 (sek. butylový derivát) vykazovala zvýšení permeace theofylinu, které již nebylo tak výrazné jako u výše zmíněných sloučenin.

	J [$\mu\text{g}/\text{cm}^2 \times \text{h}$]	lag t [h]	$K \times 10^3$ [cm/h]	ER
THEO samotný	89,19 ± 1,49	2,70 ± 0,10	8,92 ± 0,15	1,00
1	114,62 ± 3,68	2,15 ± 0,02	11,46 ± 0,37	1,29 ± 0,04
2	123,92 ± 14,79	1,75 ± 0,51	12,39 ± 1,48	1,39 ± 0,17
3	99,43 ± 13,82	2,30 ± 0,36	9,94 ± 1,38	1,12 ± 0,16
4	94,40 ± 15,37	2,24 ± 0,52	9,44 ± 1,54	1,06 ± 0,17
5	106,95 ± 6,98	2,24 ± 0,35	10,70 ± 0,70	1,20 ± 0,08

Tabulka 1. Vypočítané charakteristiky *in vitro* permeability theofylinu přes kůži z pufru (pH 7,4). Výsledky jsou vyjádřeny se směrodatnou odchylkou ± SD (n = 5 experimentů). Zkratky: J = flux v ustáleném stavu, lag t = lag time, K = konstanta permeability, ER = zesilovací poměr



Obrázek 2. Srovnání koncentrace *in vitro* permeace theofylinu přes kůži [µg/ml] z fyziologického pufru (pH 7,4) s/bez potenciálních CPE v čase. Permeované množství theofylinu je vyjádřeno se směrodatnou odchylkou ± SD (n = 5 experimentů).

Závěr

Při permeaci theofylinu lze na základě vypočtených charakteristik (kumulativní množství permeovaných léčiv, fluxy v ustáleném stavu a zesilovací poměry) shrnout, že alaptid a jeho některá analoga specificky zvyšovala pronikání theofylinu přes kůži. Při konkrétních podmínkách byly nejvýraznější výsledky zjištěny u glycinového analogu alaptidu **2**, který vykázal vyšší účinek než samotný alaptid (**1**). Testováním bylo dokázáno, že strukturální změny molekuly alaptidu mohou mít zvýšený i snížený vliv na permeaci theofylinu.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 302/2015/FaF.

Seznam literatury:

1. Jampílek, J.; Brychtová K. Azone analogues: Classification, design, and transdermal penetration principles. *Med. Res. Rev.* **2012**, *32*, 907-947.
2. Jampílek, J. Transdermal application of drugs and techniques affecting skin barrier. *J. Bioequiv. Availab.* **2013**, *5*, 233-235.
3. Černíková, A.; Jampílek, J. Strukturální modifikace léčiv ovlivňující biodostupnost a terapeutický účinek. *Chem. Listy* **2014**, *108*, 7-16.

4. Jampílek, J.; Opatřilová, R.; Coufalová, L.; Černíková, A.; Dohnal, J. Utilization of alaptide as transdermal penetration modifier in pharmaceutical compositions for human and veterinary applications containing anti-inflammatory drugs and/or antimicrobial chemotherapeutics. *WO/2013/020527 A1*, 2013.
5. Opatřilová, R.; Černíková, A.; Coufalová, L.; Dohnal, J.; Jampílek, J. In vitro permeation of micronized and nanonized alaptide from semisolid formulations. *Sci. World J.* **2013**, 2013, Article ID 787283 (8 pages).
6. Opatřilová, R.; Jampílek, J. Rapid screening of mupirocin skin permeation modification by micronized and nanonized alaptide. *ADMET* **2014**, 2, 56–62.
7. Černíková, A.; Opatřilová, R.; Jampílek, J. Rapid informative screening of nano-alaptide as potential transdermal permeation enhancer of acetylsalicylic acid and paracetamol. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2014**, 83, 34-39.
8. Jampílek, J.; Opatřilová, R.; Dvořáková, L.; Brychtová, K.; Dohnal, J. Využití alaptidu jako modifikátoru transdermální penetrace ve farmaceutických kompozicích pro humánní a veterinární aplikace obsahující nesteroidní antiflogistika a/nebo antipyretika-analgetika. *CZ 304915 B6*, 2014.
9. Černíková, A.; Opatřilová, R.; Bobál, P.; Jampílek, J. Rapid screening of permeation of rutin through skin using alaptide enantiomers. *ADMET* **2014**, 2, 248-253.
10. Kasářík, E.; Vanžura, J.; Krejčí, I.; Křepelka, J.; Dlabáč, A.; Valchář, M. 2,5-Piperazinedione derivs. *Belg.* 897843, 1984 & *CS* 231227, 1986.
11. Rádl, S.; Kasářík, E.; Krejčí, I. Alaptide. *Drug. Future* **1990**, 15, 445-447.
12. Kasářík, E.; Rybák, I.; Krejčí, M.; Šturs, E.; Křepela, E.; Šedo, A. *Life Sci.* **1992**, 50, 187-193.
13. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method, OECD Publishing, Paris, 2004, <http://dx.doi.org/10.1787/9789264071087-en>.

Využití vícerozměrné analýzy dat ve farmaceutické technologii

Petr Doležel, Aleš Franc, Nikola Holcová, Petra Kocová

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

Úvod

Nedávno se ve farmaceutickém průmyslu začal prosazovat koncept plánování kvality, tzv. Quality by Design, QbD (FDA 2004a), který nabádá k zavádění plánovaných, vědecky vedených postupů k pochopení závislosti mezi kvalitou produktu a výrobními parametry. Vedle toho koncept procesní analytické technologie PAT (FDA 2004b) zavádí inovativní prostředky k plánování, analýze a kontrole farmaceutických procesů (Hinz 2006), které zahrnují širokou škálu matematických postupů v plánování experimentu, metodologii responsních povrchů, zjišťování závislostí a simulace procesů. Aplikace těchto metod umožňuje identifikovat, hodnotit a nastavovat procesní a formulační parametry, které jsou rozhodující pro kvalitu produktu a mohou pomoci odhalit potencionální kritické body a kvantifikovat jejich vliv ve výrobě (Wu 2011, Mennini 2012). Tento projekt zkoumá vztah parametrů tabletoviny a výsledných tablet při procesu přímého lisování tablet.

Materiál a metodika

Byly zde použity dvě různé tabletoviny: tabletovina „A“ s proměnlivou velikostí částic plniva sorbitolu (celkem 9 směsí; tabulka 1.) a tabletovina „B“ s různou koncentrací antiplastické látky oxidu křemičitého v kombinaci s proměnlivou velikostí částic drcených plodů Dřínu lékařského (celkem 7 směsí; tabulka 2.). U obou tabletovin byly lékopisnými metodami zjišťovány: sypný a setřesný objem (a z nich vyplývající veličiny jako se Hausnerovo číslo a Carrův index stlačitelnosti), rychlost vytékání otvorem, síťová analýza, mikroskopická analýza distribuce velikosti částic. U směsi „A“ byl navíc měřen elektrostatický náboj metodou „in house“. U směsi „B“ byl ještě lékopisně stanoven sypný úhel a porosita (směs B). Z obou směsí byly nalisovány tablety při dvou lisovacích silách (7 a 14 kN), které byly testovány na pevnost, oděr a rozpad. U tablet směsi „B“ byla navíc hodnocena antioxidační aktivita. K návrhu designu experimentů a hodnocení dat se využil software Unscrambler X.

Pro PAT analýzu u směsi „A“ se použil NIR spektroskop Nicolet Antaris umožňující nedestruktivní měření jak práškových směsí, tak vyrobených tablet. Data z referenčních metod se srovnávala s naměřenými NIR spektry, tj. cílem bylo predikovat parametry prášků a tablet z naměřených NIR spekter (tzv. PAT technologie). Pro měření antioxidační aktivity u směsi „B“ se použila modifikovaná pádlová metoda disoluce. Čas činil 45 minut, otáčky byly 50 rpm, médium bylo

1 000 ml 37°C vody. Aktivita odebraných vzorků byla stanovena spektrofotometricky metodou redukce roztoku manganistanu draselného.

Směs A

Šarže	Kód	Frakce částic		
		nad 0,5 μm	0,25-0,5 μm	pod 0,25 μm
Blend1	1	152.5	47.5	0.0
Blend2	2	152.5	19.2	28.3
Blend3	3	124.2	47.5	28.3
cp01	4a	143.1	38.1	18.9
cp02	4b	143.1	38.1	18.9
cp03	4c	143.1	38.1	18.9
Pure1	5	180.8	19.2	0.0
Pure2	6	124.2	75.8	0.0
Pure3	7	124.2	19.2	56.6

Tab. 1 Složení frakcí sorbitolu v práškových směsích A. Šedě je zvýrazněn opakovací experiment.

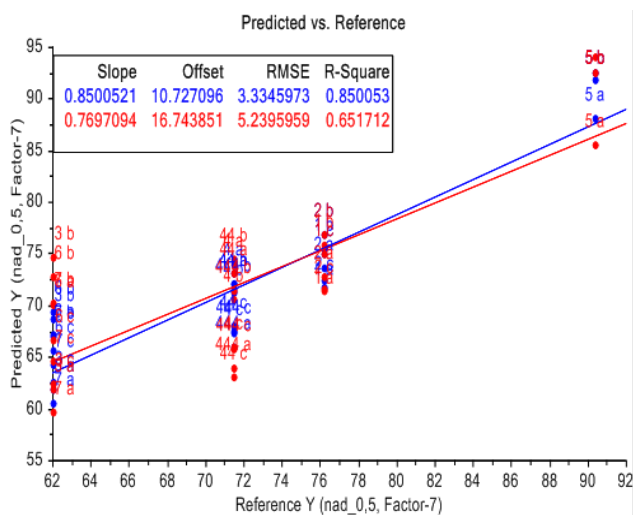
Směs B

Šarže	Kód	Frakce částic	Množství	Množství
			SiO ₂	drceného plodu
SiO ₂ -1%-PS1	1	do 800 μm	1 %	45,5 %
SiO ₂ -1%-PS3	2	nad 800 μm	1 %	45,5 %
SiO ₂ -3%-PS2a	3a	směs	3 %	43,5 %
SiO ₂ -3%-PS2b	3b	směs	3 %	43,5 %
SiO ₂ -3%-PS2c	3c	směs	3 %	43,5 %
SiO ₂ -5%-PS1	4	do 800 μm	1 %	41,5 %
SiO ₂ -5%-PS3	5	nad 800 μm	1 %	41,5 %

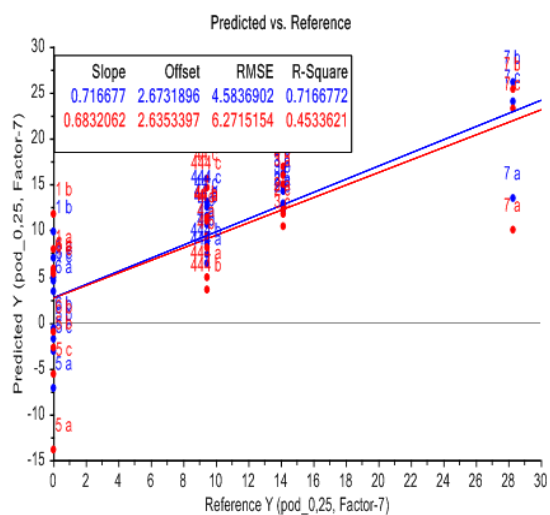
Tab. 2 Složení jednotlivých tabletovin. U každé šarže je pak shodně 50 % mikrokrytalické celulózy, 2,5 % kroskarmelózy a 1 % stearanu hořečnatého. Šedě je zvýrazněn opakovací experiment.

Výsledky

U směsi A se zjišťovala možnost využití NIR spektroskopie pro predikci obsahu frakcí sorbitolu (dle hrubosti) v práškové směsi. Z výsledků PLS modelu (obr. 1 a 2), který představuje vztah mezi hodnotami obsahu frakce sorbitolu ve směsi a naměřenými NIR spektry, je patrná schopnost predikce obsahu částic sorbitolu velikosti (nad 0,5 mikronu a pod 0,25 mikronu) ve směsi. Je třeba zmínit, že obsah sorbitolu ve směsi je pouze 30% a rozdíl mezi frakcemi činí max. 30 %. Lze předpokládat, že v případě většího podílu sorbitolu ve směsi a rozdílu mezi frakcemi by se dosahovalo lepších výsledků. Výsledky napovídají, že NIR spektroskopii by bylo možné využít k mezioperační kontrole procesů, kde je sledovaným parametrem velikost částic, což můžou být i jiné technologické procesy jako např. granulace aj.

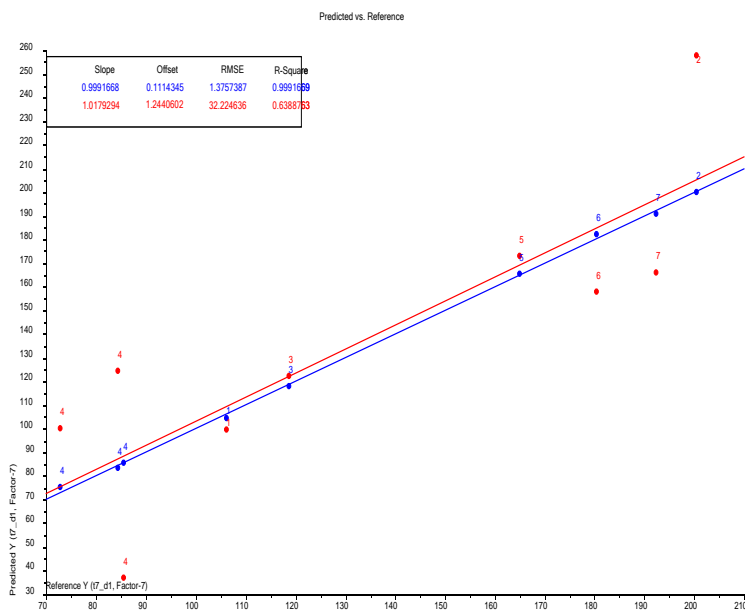


Obr. 1 Predikční schopnost modelu pro stanovení obsahu částic modelu nad 0,5 mikronů



Obr. 2 Predikční schopnost modelu pro stanovení obsahu částic modelu pod 0,25 mikronů

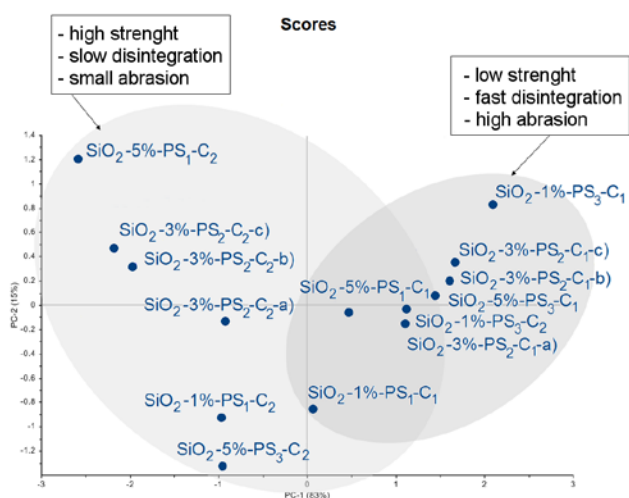
Dále se studovala možnost využití NIR spektroskopie k predikci pevnosti tablet. Výsledky potvrzují, viz obr. 3, že NIR spektroskopie má dobré předpoklady jako rychlá a nedestruktivní metoda k měření pevnosti tablet.



Obr. 3 Predikční schopnost modelu pro stanovení pevnosti tablet lisovaných tlakem 7kN. Tablety byly identického složení, lišící se hrubostí plniva sorbitolu.

U směsi B se zjišťovala souvislost mezi vlastnostmi tabletoviny a tablet v závislosti na antioxidační aktivitě. Jako příklad je uvedena PCA analýza (analýza hlavních komponent) dat tabletování s výstupem v obr. 4. Z výsledků plyne, že dominantním procesním parametrem majícím vliv na

vlastnosti tablet je lisovací síla, ačkoliv i formulační parametry je možné využít k modifikaci vlastností tablet. Bylo rovněž shledáno, že vyšší antioxidační aktivita stoupá s množstvím oxidu křemičitého ve spojení se zvětšující se velikostí drcených částic sušeného plodu.



Obr. 4 PCA graf komponentních skóre. Z rozložení vzorků (tablet) v prostoru prvních dvou komponent je možné odečíst vhodné nastavení procesně-formulačních parametrů.

Seznam literatury:

FDA, 2004a: Pharmaceutical CGMPs for the 21st century – a risk based approach. Final report. U.S. Department of Health and Human Services. U.S. Food and Drug Administration. 2004, staženo z www.fda.gov 12. 1. 2014.

FDA, 2004b: Guidance for industry. PAT– a framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. Center for Drug Evaluation and Research, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA. 2004, staženo z www.fda.gov 12. 1. 2014.

Hinz, D.C.: Process analytical technologies in the pharmaceutical industry: the FDA’s PAT initiative. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384, 1036–1042.

Mennini, N., Furlanetto, S., Cirri, M., Mura, P.: Quality by design approach for developing chitosan-Ca-alginate microspheres for colon delivery of celecoxib-hydroxypropyl-β-cyclodextrin-PVP complex. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012, 80, 1, 67-75.

Wu, H., White, M., Khan, M.A.: Quality-by-Design (QbD): An integrated process analytical technology (PAT) approach for a dynamic pharmaceutical co-precipitation process characterization and process design space development. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 405, 1–2, 63-78.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 314/2015/FaF.

Syntéza a studium karbamátových derivátů naftalenkarboxanilidů

Josef Stráník¹, Tomáš Gonč¹

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Vzrůstající rezistence invazivních patogenů vůči klinicky užívané antimikrobiální léčbě je stále častějším jevem. Na následky tuberkulózy (TBC) v současnosti umírá dva milióny lidí ročně a celá jedna třetina světové populace je nakažena její latentní formou. Samotné onemocnění vyvolané bakteriemi rodu *Mycobacterium* tak představuje globální hrozbu. Zvláště pro rychle rostoucí počet multirezistentních (MDR) kmenů, latentních forem TBC, mykobakteriálních infekcí způsobených atypických kmeny mykobakterií nebo smrtelných kombinací HIV s mykobakteriálními infekcemi je nutné hledat nové léky a nové racionální terapeutické postupy. Léčba jedním preparátem již dlouho díky vzniku mnohačetných lékových rezistencí nestačí. Proto se v současné době využívá čtyřkombinace léčiv.¹

V poslední době byly na ÚCHL syntetizovány série hydroxynaftalenkarboxanilidů, z nichž některé sloučeniny vykázaly slibnou biologickou aktivitu^{2,3,4}. U sérií vzorových salicylanilidů došlo k výraznému nárůstu antimykobakteriální aktivity substitucí hydroxyly alkylykarmamátovým uskupením⁵.

Metodika

Syntéza byla projektována ve dvou krocích: V prvním kroku reaguje příslušná kyselina a substituovaný anilin v přítomnosti chloridu fosforitého v prostředí chlorbenzenu za působení mikrovlnného záření za vzniku příslušného hydroxynaftalen karboxanilidu (Schéma 1.) Jedná se o metodu na ÚCHL úspěšně zavedenou^{2,3,4}. Ve druhém kroku se aduje hydroxynaftalenkarboxanilid na příslušný isokyanát za katalýzy triethylaminem. Reakce probíhá při laboratorní teplotě v prostředí acetonitrilu.

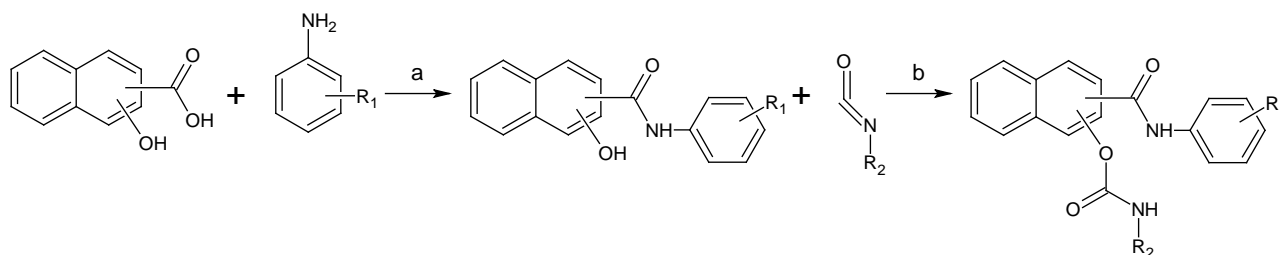


Schéma 1. Reakční podmínky: a) PCl_3 , chlorbenzen, MW b) TEA, ACN, rt. R_1 : 2-Cl, 2- NO_2 ; R_2 : ethyl – oktyl, isopropyl.

Výsledky

Byla optimalizována syntéza a dosaženo uspokojivých výtěžků:

Kyselina 2-hydroxynaftalen-1-karboxylová (53 mmol), substituovaný anilin (53 mmol) a PCl_3 (27 mmol) byly suspendovány v 200 ml bezvodého chlorbenzenu a reagovaly 15 min v mikrovlnném reaktoru při teplotě 130°C. Po odpaření rozpouštědla byl surový produkt promyt 2M HCl a rekrystalizován ze zředěného ethanolu. Příslušný 2-hydroxynaftalen 1-karboxanilid (1 mmol) a triethylamin (1 mmol) byly rozpuštěny v 10 ml sušeného acetonitrilu. Roztok příslušného alkyliisokyanátu (1.2mmol) v 5 ml acetonitrilu byl přidán ve čtyřech částech během 2 hodin. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt promyt methanolem a ethylacetátem. Následovalo přečištění sloupcovou chromatografií (mobilní fáze). Struktura látek byla ověřena spektrálními metodami (NMR, IR, HRMS) a jejich čistota chromatograficky - TLC, HPLC.

Přehled pilotní série 16 nově syntetizovaných sloučenin je uveden v Tabulce 1. Na partnerských pracovištích je v současné době prováděno testování biologické aktivity. Předběžné výsledky ukázaly, že látky vykazují střední až slabou inhibici fotosyntézy u izolovaných chloroplastů špenátu, střední nebo žádnou aktivitu proti *Staphylococcus aureus*. Výsledky aktivity proti různým druhům rodu *Mycobacterium* zatím nemáme k dispozici ani předběžné.

Kód	R_1	R_2	výtěžek [%]	t.t. [°C]
CP14a	Cl	Et	33	137-139
CP14b	Cl	Pr	26	132-134
CP14c	Cl	Bu	55	156-159
CP14d	Cl	Pen	36	137-138
CP14e	Cl	Hex	50	103-106
CP14f	Cl	Hep	66	89-90
CP14g	Cl	Oct	52	115-116
CP14h	Cl	iPr	39	167-169
CP23a	NO_2	Et	40	157-159
CP23b	NO_2	Pr	75	153-155
CP23c	NO_2	Bu	82	171-174
CP23d	NO_2	Pen	70	141-143

CP23e	NO ₂	Hex	58	122-123
CP23f	NO ₂	Hep	46	101-102
CP23g	NO ₂	Oct	37	92-94
CP23h	NO ₂	iPr	69	172-176

Tabulka 1. Přehled nově syntetizovaných látek a jejich biologická aktivita.

Seznam literatury:

1. WHO – Tuberculosis. <http://www.who.int/tb/en/> (13.1.2015).
2. Goněc, T. et al. *Molecules* 18, 2013, 9397-9419
3. Kos, J. et al *Molecules* 18, 2013, 7977-7999
4. Goněc, T. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 2013, 6531-6541
5. Ferriz, J.M. et al. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 2010, 1054-1064

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 320/2015/FAF.

Syntéza 1,3,5-triazinů s novými piperazinovými strukturními motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „Zelené chemie“.

Eva Havránková¹, Jozef Csöllei¹, Pavel Pazdera²

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická Fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno²

Úvod

V několika posledních letech se analoga 1,3,5-triazinů (*s*-triazinů) stávají předmětem zájmu řady výzkumných týmů. Deriváty *s*-triazinu vykazují široké spektrum biologických aktivit, přičemž v současné době jsou v popředí zájmu zejména jejich antibakteriální, antituberkulózní, protinádorové a další vlastnosti. [1] U těchto derivátů se pak často vyskytují strukturní motivy typu substituovaných piperazinových, substituovaných pyridinových a dalších dusíkatých heterocyklických kruhů. [2] Při syntéze *s*-triazinových derivátů a jejich prekurzorů je však v minimální míře využíváno metod „Zelené chemie“, jako jsou organokatalýza, metalokatalýza a kombinace obou, katalýza s imobilizovanými katalyzátory, různé typy couplingových reakcí, atd. [3]

Při současném vývoji chemického průmyslu, a to nejen farmaceutického, a tlaku na začleňování principů Zelené chemie do chemických výrob, je využití těchto principů již při plánování syntézy nové účinné látky značnou výhodou na poli vývoje takovýchto látek. Vezmeme-li v úvahu také široké spektrum biologických aktivit analogů *s*-triazinů a jejich potenciál, spolu s mezerami v současném stavu jejich studia, získáváme velmi slibný a zajímavý předmět výzkumu.

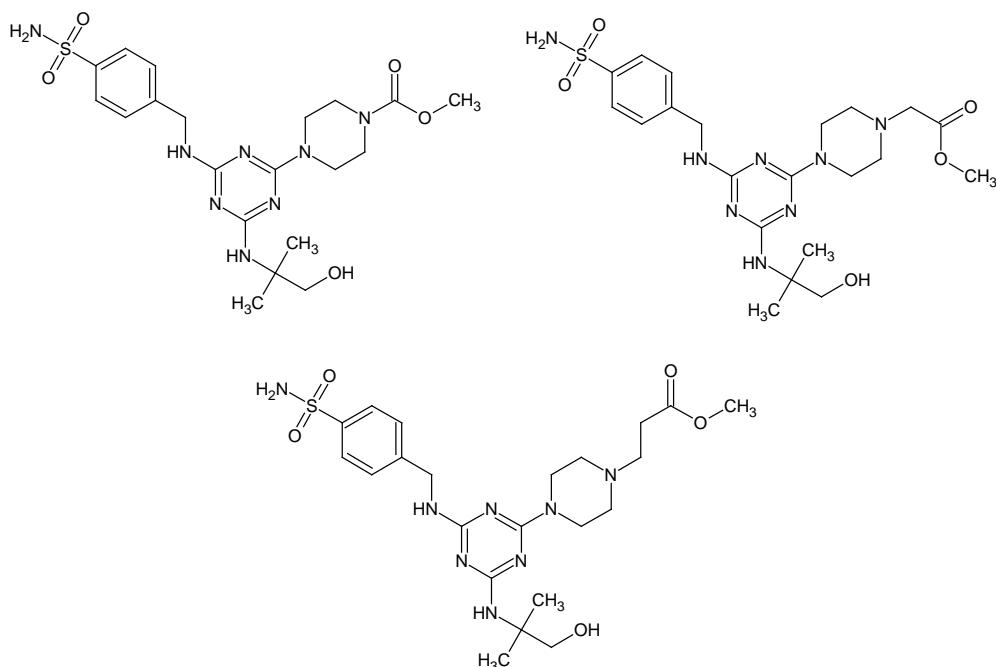
Výsledky a diskuse

K predikci struktur vybraných piperazinových derivátů obsahujících *s*-triazinový skelet s potenciální biologickou aktivitou proti isozymu karboanhydrázy hCAIX (spojeného s nádorovým bujením) byly použity Dopředné umělé neuronové sítě (Forwarded Artificial Neural Networks – FANNs). [4, 5]

K vytvoření optimální architektury ANNs použité k predikci vztahu mezi strukturou různě substituovaných *s*-triazinů a jejich biologickou aktivitou (dána selektivitou $K_I(\text{hCAII})/K_I(\text{hCAIX})$) bylo nejprve potřeba vytvořit vhodnou soustavu deskriptorů pro popis struktury dané sloučeniny, případně dalších parametrů postihujících její vlastnosti a chemické chování. Pro zakódování těchto struktur byla po několika pokusech zvolena jako nejvhodnější jednoduchá soustava 16 deskriptorů. Deskriptory 1-14 využívají k popisu struktury číslice 0 až 53, každé číslici je přiřazena určitá strukturní vlastnost. Pro zpřesnění výsledků predikce byla jako deskriptor 15 zvolena hodnota

polarizovatelnosti α [10^{-24} cm³] a jako deskriptor *I6* hodnota dekadického logaritmu rozdělovacího koeficientu log P daných sloučenin (obě tyto hodnoty byly předpovězeny pomocí programu ChemSketch 12, ACD/Labs). Pro konstrukci optimální architektury sítě bylo z literatury vybráno 80 sloučenin obsahujících *s*-triazinový skelet a vykazujících selektivitu $K_1(\text{hCAII})/K_1(\text{hCAIX})$ (hodnoty selektivity byly získány experimentálně) v širokém intervalu hodnot. S využitím ANN pak byl hledán model popisující vztahy mezi uvedenými deskriptory a selektivitou. Současně byly na základě literární rešerše zvoleny vhodné substituenty pro pozice 2, 4 a 6 na *s*-triazinovém skeletu, které by mohly na základě analogií vykazovat signifikantní hodnoty selektivity $K_1(\text{hCAII})/K_1(\text{hCAIX})$. Struktury zahrnující všechny možné kombinace těchto substituentů (celkem 483 možných kombinací) byly zakódovány pomocí výše uvedených deskriptorů a pomocí dříve vytvořené sítě ANN byla předpovězena jejich selektivita. Pro ověření správnosti ANN modelu byla také stejná datová sada struktur podrobena predikci/dockingu selektivity $K_1(\text{hCAII})/K_1(\text{hCAIX})$ pomocí softwarového balíku Schrödinger a výsledky budou po kompletním dokončení ANNs studie porovnány.

S ohledem na dílčí výsledky predikce bylo navrženo několik modelových struktur těchto derivátů zahrnujících mimo jiné nové piperazinové strukturní motivy (viz níže) a navržen syntetický design pro syntézu těchto struktur.



Obrázek 1. Příklady vybraných modelových struktur substituovaných *s*-triazinů.

Cílové piperazinové a další uvedené strukturní motivy byly zaváděny na *s*-triazinový skelet *per partes* přes atom dusíku alifatické primární nebo sekundární amino skupiny a to substitucí jednotlivých atomů chloru v komerčně dostupném kyanurchloridu (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu). Zjistili jsme, že substituci prvního atomu chloru (nejreaktivnější) v kyanurchloridu lze provést buď cestou nukleofilní aromatické substituce nebo výhodněji procesem katalyzovaným novým imobilizovaným Cu(I) komplexem (přípraveným dle [6]). To je cestou oxidativní adice - heterolytické adice - reduktivní eliminace. Substituce druhého a třetího atomu chloru pak byla prováděna výhradně cestou oxidativní adice - heterogenní adice - reduktivní eliminace. Ve své podstatě se jedná o aplikaci Buchwaldova-Hartwigova C-N-couplingu, respektive Ullmannovy syntézy, které v našem případě byly katalyzovány novým stabilním recyklovatelným katalyzátorem, tj. ionty Cu(I) imobilizovanými na slabě kyselém makroporézním katexu polyakrylátového typu. Všechny tři substituční stupně byly prováděny za kontrolovaného teplotního režimu, s gradací teploty od prvního ke třetímu stupni z důvodu poklesu reaktivity po zavedení příslušného dusíkatého substituentu. Pořadí zavedení substituentů bylo prováděno s ohledem na reaktivitu aminových prekurzorů tak, aby nejméně reaktivní reagoval v prvním, nejvíce reaktivním syntetickém stupni a naopak nejvíce reaktivní amin pak v posledním, nejméně reaktivním syntetickém stupni.

Závěr

K predikci *s*-triazinových derivátů obsahujících piperazinový a další strukturní motivy vykazujících potenciální biologickou aktivitu proti hCAIX byly použity dopředné ANNs. S ohledem na dílčí výsledky predikce bylo provedeno několik modelových syntéz různě substituovaných *s*-triazinů zahrnujících v molekule piperazinový strukturní motiv. Design všech syntéz uvedených modelových struktur byl navržen s ohledem na cíle a principy Zelené chemie. Výsledkem řešení je one-pot syntetický proces realizovaný v DMF (dimethylformamidu) jako rozpouštědle, kdy jsou dosahovány vyšší výtěžky při kratších reakčních časech, než jsou obvyklé. Tyto optimalizované syntetické postupy mohou být aplikovány při přípravě všech *s*-triazinových derivátů s drobnými obměnami s ohledem na chemii jednotlivých substituentů. Dalším krokem našeho týmu je testování biologické aktivity již připravených derivátů.

Seznam literatury:

[1] Kumar, R.; Singh, A. D.; Singh, J.; Singh, H.; Roy, R. K.; Chaudhary, A.; 1,2,3-Triazine Scaffold as a Potent Biologically Active Moiety: A Mini Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2014, **14**, 72-83.

- [2] Shah, D. R.; Modh, R. P.; Chikhaliya, K. H.; Privileged *s*-triazines: Structure and Pharmacological Applications. *Future Med. Chem.*, 2014, **6** (4), 463-477.
- [3] Havránková, E.; Pospíšil, P.; Pazdera, P.; Synergism of Metal and Organocatalysis in Condensation Reactions of Aromatic Aldehydes with Anilines Affording Imines: Effect of Catalysts on the Base of a Supported Cerium(III) and Proline. *Science Journal of Chemistry, Special Issue, Green Chemistry: Synthesis and Its Uses*, 2014, **2** (1), 1-8.
- [4] Gurney, K.; An introduction to neural networks. London: UCL Press, 1997, xi, 234 p. ISBN 18-572-8503-4.
- [5] Zelinka, K.; Šimbera, J.; Ševčík, R.; Havel, J.; Pazdera, P.; New Supported Catalytic Binary System for the Green and Sustainable Production of Cyanogen Fumigant Optimization Using Artificial Neural Network. *Journal of Chemical Engineering and Chemistry Research*, 2014, **1** (5), 302-313.
- [6] Pazdera, P.; Zberovská, B.; Němečková, D.; Datinská, V.; Šimbera, J.; Catalyst for Chemical Syntheses Based on Metal Complex and Process for Preparing thereof, No: CZ 305277 (B6) 20150603, Year: 06/2015.

Děkuji Vladimíru Garajovi za predikci selektivity $K_I(hCAII)/K_I(hCAIX)$ daného datasetu struktur pomocí softwarového balíku Schrödinger (Katedra farmaceutické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského Bratislava, Odbojárov 10, 831 04 Bratislava, garaj1@uniba.sk).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 324/2015/FaF.

Protiinvazivní aktivita nových antimikrobiálních chemoterapeutik

Josef Jampílek¹, Iveta Zadražilová², Dobromila Mikošková², Denisa Glósová², Andrea Čechová²

Ústav chemických léčiv¹, Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie²,

Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Rezistence mikroorganismů k současně dostupným antimikrobiálním látkám se stala celosvětovým problémem. V klinické praxi jsou tak běžné infekce způsobené multirezistentními kmeny bakterií, jako je např. *Staphylococcus aureus* rezistentní k methicilinu (MRSA), enterokoky rezistentní k vankomycinu (VRE), multirezistentní mykobakteria a další. Jedním z řešení tohoto problému může být syntéza potenciálních antimikrobiálních látek, která se neobejde bez následného zhodnocení biologické aktivity látek, zejména schopnosti inhibovat růst mikrobiálních kultur.

V předchozích dvou letech byl proveden screening antimikrobiální aktivity 230 sloučenin (jednalo se především o karbamáty a estery salicylanilidů, látky ze skupiny substituovaných hydroxynaftalenkarboxanilidů) a získané výsledky byly publikovány v impaktovaných vědeckých časopisech¹⁻⁶ a prezentovány na prestižních mezinárodních konferencích. V návaznosti na tyto výsledky byly v rámci předkládaného projektu u nejúčinnějších již dříve ověřených látek dále posouzeny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou. V rámci projektu byla rovněž hodnocena biologická aktivita 123 nově syntetizovaných látek, zejména derivátů azanaftalenů, připravených na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno.

Materiál a metodika

Materiál

Bylo provedeno hodnocení antimikrobiální aktivity nově syntetizovaných na anilidovém kruhu substituovaných alkoxy skupinou, resp. disubstituovaných hydroxy(aza)naftalenkarboxanilidů. V případě dříve ověřených *N*-alkylkarbamátů a esterů salicylanilidů byly provedeny pokročilé mikrobiologické experimenty. Aktivita látek byla hodnocena proti souboru referenčních sbírkových kmenů (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922) a tří multirezistentních klinických izolátů MRSA (VFU Brno, SZÚ Praha) a VRE (VFU Brno). Jako modelové druhy k ověření účinku potenciálních antimykobakteriálních léčiv bylo použito *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084, *M. kansasii* DSM 44162 a *M. marinum* CAMP 5644. Antifungální účinek byl testován na kulturách *Candida albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258 a *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Metodika

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a dále bylo postupováno podle standardních metodik CLSI (www.clsi.org). Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita bujonová diluční metoda. Dvojnásobným ředěním roztoků testovaných látek v mikrotitrační destičce byla získána požadovaná koncentrace v jednotlivých jamkách (koncentrační řada 256–0,008 $\mu\text{g/ml}$), které byly zaočkovány bakteriálním/fungálním inokulem. Jako referenční antibakteriální látky byly použity ampicilin a ciprofloxacín, jako referenční antifungální látky amfotericin B a flucytosin, jako referenční antimykobakteriální látky byly použity izoniazid, rifamipicin a pyrazinamid.

Po odečtení MIC byla provedena subkultivace alikvotů ze stanovení MIC na agar a tímto způsobem byla stanovena minimální baktericidní/fungicidní koncentrace (MBC/MFC).

Pro antimikrobiálně aktivní látky již dříve ověřené v rámci předchozího screeningu byly pomocí standardních přístupů užívaných v projektování léčiv vyhodnoceny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou SAR, hodnoty fyzikálně-chemických parametrů byly vypočítány pomocí ACD/Percepta ver. 2012, resp. ChemBioDraw ver. 13.

Výsledky

Testované látky u všech testovaných kmenů ve většině případů nevykázaly antifungální aktivitu ($\text{MIC} > 128 \mu\text{g/ml}$), rovněž tak žádný z nově připravených substituovaných hydroxy(aza)naftalenkarboxanilidů ($n = 123$) neinhiboval růst *E. coli* ($\text{MIC} > 256 \mu\text{g/ml}$), avšak zajímavá aktivita v závislosti na substituci byla pozorována proti *S. aureus*, stejně tak jako proti klinickým izolátům MRSA. Hodnoty MIC u 28 látek se pro MRSA pohybovaly v rozmezí 2–32 $\mu\text{g/ml}$, z toho MIC 12 látek nabývaly hodnot 0,063–2 $\mu\text{g/ml}$. Hodnoty MIC a MBC pro MRSA byly navíc srovnatelné, případně nižší než hodnoty MIC a MBC daných látek pro referenční kmen *S. aureus*. Přibližně třetina těchto látek ($n = 34$) vykazovala rovněž i středně silnou antimykobakteriální aktivitu ($\text{MIC} = 2\text{--}32 \mu\text{g/ml}$). Antibakteriální účinek substituovaných hydroxy(aza)naftalenkarboxanilidů byl převážně baktericidní. Zajímavé výsledky SAR byly pozorovány zejména v rámci alkoxy derivátů testovaných látek, kde antibakteriální účinek látek souvisel s *ortho*-substitucí anilinového jádra, vyšší lipofilitou, vzrůstající povrchovou aktivitou látek a vzrůstající objemností/molárním objemem alkoxylového řetězce. Lipofilita byla ovlivněna délkou a větvením alkoxylového řetězce.

N-Alkylkarbamáty salicylanilidů vykázaly v předchozím screeningu MIC od $\leq 0,008$ do 4 $\mu\text{g/ml}$ proti *S. aureus* a proti klinickým izolátům MRSA. Proto byly podrobeny komplexnímu hodnocení, na jehož základě může být konstatováno, že většina uvedených sloučenin vykazuje

bakteriostatický účinek proti výše uvedeným patogenům. Bakteriostatická aktivita je ovlivněna především lipofilitou sloučenin. Baktericidní účinek těchto membránových disruptorů vykazuje korelaci s jejich povrchovou aktivitou. Lze tak předpokládat, že hydrofobní řetězec je důležitý pro poškození membrány, molekula následně penetruje přes bakteriální stěnu do buňky, kde působí antiproliferativně inhibicí bakteriálních enzymatických systémů.

Závěr

Z výsledků projektu je patrné, že hodnocené substituované hydroxy(aza)naftalenkarboxanilidy mohou představovat slibné kandidáty antibakteriálních látek účinných i proti multirezistentním mikroorganismům. Na základě získaných dat budou, pomocí standardních přístupů užívaných v projektování léčiv, dále vyhodnoceny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou SAR/QSAR, což je nezbytný předpoklad pro směrování dalšího výzkumu Ústavu chemických léčiv v oblasti syntézy potenciálních antimikrobiálních chemoterapeutik.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 304/2015/FaF.

Seznam literatury:

- [1] Kos, J.; Zdražilová, I.; Peško, M.; et al. Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* **2013**, *18* (7), 7977-7997.
- [2] Goněc, T.; Kos, J.; Zdražilová, I.; et al. Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 2-hydroxynaphthalene-1-carboxanilides. *Molecules* **2013**, *18* (8), 9397-9419.
- [3] Otevřel, J.; Bobál, P.; Zdražilová, I.; et al. Antimycobacterial and photosynthetic electron transport inhibiting activity of ring-substituted 4-arylamino-7-chloroquinolinium chlorides. *Molecules* **2013**, *18* (9), 10648-10670.
- [4] Goněc, T.; Kos, J.; Zdražilová, I.; et al. Antimycobacterial and herbicidal activity of ring-substituted 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6531-6541.
- [5] Pauk, K.; Zdražilová, I.; Imramovský, A.; et al. New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (21), 6574-6581.
- [6] Zdražilová, I.; Pospíšilová, Š.; Pauk, K.; et al. *In vitro* bactericidal activity of 4- and 5-chloro-2-hydroxy-*N*-[1-oxo-1-(phenylamino)alkan-2-yl]benzamides against MRSA. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, Article ID 349534 (8 pages).

Závislost *per os* dávky tacrolimu na genotypu příjemce štěpu srdečního transplantátu.

Milan Juhás, Michal Kolorz, Zuzana Plavcová, Jiří Vítovec

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

Úvod

Život pacienta po transplantácii srdca (HTx) je úzko spojený s podávaním selektívnych imunosupresív, ktorých režimy sú založené na inhibítoroch kalcineurínu (cyklosporin A, tacrolimus). V tomto projekte je stredom záujmu makrolid tacrolimus, ktorý sa dostáva do popredia v našom transplantačnom centre. Vlastný mechanizmus imunosupresívnej aktivity spočíva v inhibícii syntézy pro-zápalovo pôsobiacich cytokinov (IL-2) u T-lymfocytov¹. Tacrolimus sa vyznačuje úzkym terapeutickým oknom a zo svojej povahy cytotoxického liečiva, vyžaduje kontoly plazmatických hladín a terapeutické monitorovanie (TDM). Nízka plazmatická hladina je spojená s rizikom rejekcie, pričom vysoká hladina reprezentuje riziko oportúnnych atypických infekcií a jednak toxicity², z ktorej je najvýraznejšia nefrotoxicita³. Titrácia dávky v časnom pooperačnom období a aj v neskoršom živote pacienta je do značnej miery empirická. Štandardné dávkovacie schéma a TDM sú sice zavedenou metódou, avšak sú zaťažené interindividuálnymi rozdielmi spôsobenými variabilitou vo vstrebávaní aktivitou p-glykoproteínovej effluxnej pumpy (ABCB1) a metabolickom obrate v pečeni (cytochrómoxidáza P450 CYP3A4, P450 CYP3A5). Predpokladáme, že genetická variabilita v týchto biotransformačných proteínoch ovplyvňuje ich fenotyp (enzymatickú aktivitu a kvantitu expresie), čo vedie k nepriamému ovplyvneniu plazmatických hladín liečiva.

Prínosom pre klinickú prax je určenie parametrov, na základe ktorých bude možné predikovať vhodnú dávku tacrolimu tak, aby nedochádzalo k rejekčným procesom, prejavom dávkovo závislej toxicity. Z toho plynie výhoda skrátenia času nutného k vytitrovaniu patričnej dávky. Interindividuálne rozdiely v biologickej dostupnosti sú spôsobené práve genetickou variabilitou^{4,5}. Vymedzenie genotypu pacienta, vzťah medzi ním a fenotypovým prejavom (nameraná hladina v krvi) je predpokladom k možnej predikcii *per os* dávky tacrolimu v snahe individualizácie farmakoterapie.

Materiál a metodika

Do experimentu boli zaradení pacienti (n=18) po ortotopickej transplantácii srdca, ktorí boli v posttransplantačnom období sledovaní na I. internej kardioangiologickej klinike, liečení režimom založeným na tacrolimu. Konkrétne sa jedná o 4 ženy a 14 mužov, priemerný vek pacientov bol 56

rokov. Po zisku súhlasného vyjadrenia Etickej komisie FN u sv. Anny v Brně (č.j. 2G/2014) bol zahájený nábor pacientov, ktorému predchádzal podpis informovaného súhlasu a pohovor informujúceho k zodpovedaniu prípadných otázok. Následne bol odobraný biologický materiál – vzorka (bukálny ster). Odber biologického materiálu bol realizovaný v rámci rutinných bioptických kontrol. Hodnotiacím kritériom je *per ós* dávka tacrolimu (mg/kg váhy pacienta a pomer koncentrácia/dávka) nutná k dosiahnutiu požadovanej plazmatickej koncentrácie. Retrospektívne bola zhodnotená plazmatická koncentrácia, dávka a pomer koncentrácia/dávka na kg hmotnosti (C/D) po dobu od nastolenia steady state koncentrácie v krvi do 12. resp. 18. mesiaca po HTx. TDM prevádza spoluriešiteľské pracovisko (I.Interní kardioangiologická klinika FN u sv. Anny v Brně). Riešiteľské pracovisko (Laboratorium farmakogenomiky ÚHFT FaF VFU Brno) vypracovalo metodiky pre stanovenie polymorfismov **CYP3A5 (CYP3A5*3, G6986A, rs776746), CYP3A4 (CYP3A4*1B, G-392A, rs2740574), POR (POR*28, C1508T, rs1057868) a ABCB1 (C3435T, rs1045642; C1236T, rs1128503; G2677T, rs2032582)** a spracovalo genetickú analýzu založenú na izolácii genómovej DNA, stanovenie genotypu metódami PCR-REA a sekvenovaním. Následne bola uskutočnená analýza dát a vzťahu genotyp-plazmatická koncentrácia/dávka. Výsledky boli štatisticky vyhodnotené Fischerovým testom, **non-parametric analysis of variance test (ANOVA)**, a Mann-Whitney testom.

Výsledky

Denné dávky pacientov s genotypom ABCB 1236TT boli nesignifikantne nižšie v porovnaní s pacientmi - nositeľmi genotypu 1236CC alebo 1236CT (P=0,27). Pacienti, nositelia genotypu ABCB 1236TT priemerne vyšší pomer C/D v porovnaní s pacientami, ktorých genotyp bol 1236CC alebo 1236CT (P=0,017). Pacienti z genotypom CC majú nižší C/D v porovnaní s pacientami TT (P<0,05), podobne pacienti s genotypom CT majú nižší C/D v porovnaní s pacientami s genotypom TT (P<0,05). Pacienti s genotypom ABCB 2677TT/AA užívali priemerne nižšie dávky v porovnaní s pacientami s genotypom 2677GG alebo 2677GG/TA (P=0,22). Pacienti, nositelia genotypu ABCB 2677TT/AA mali vyšší pomer C/D v porovnaní s pacientami, ktorých genotyp bol 2677GG alebo 2677GT/A (P=0,008). Pacienti s genotypom GG majú štatisticky nižší C/D v porovnaní s pacientami s genotypom TT/AA (P<0,01). Pacienti s genotypom ABCB 3435TT užívali priemerne nižšie dávky v porovnaní s pacientami s genotypom 3435CC alebo 3435CT (P=0,25). Pomer C/D u pacientov s genotypom 3435TT bol priemerne vyšší v porovnaní s C/D u pacientov s genotypom 3435CC alebo 3435CT (P>0,05). Pacienti, nositelia genotypu POR 1505TT užívali priemerne vyšší dávky v porovnaní s pacientami s genotypom 1505CC alebo 1505CT (P=0,25). Pacienti s genotypom POR 1505CC mali priemerne vyšší C/D v porovnaní s pacientami s

genotypem 1505CT nebo 1505TT (P=0,43). Neboli nájdené rozdiely u pacientov stratifikovaných na základe genotypu CYP3A5*3 a CYP3A4*1B.

Diskusia a záver

Tacrolimus sa vyznačuje úzkym terapeutickým oknom a zo svojej povahy cytotoxického liečiva, vyžaduje kontoly plazmatických hladín a terapeutické monitorovanie (TDM). Titrácia dávky v časnom pooperačnom období a aj v neskoršom živote pacienta je do značnej miery empirická. Variabilitou vo vstrebávaní zapríčinená aktivitou p-glykoproteínovej effluxnej pumpy (ABCB1) a metabolickom obrate v pečeni (cytochrómoxidáza P450 CYP3A4, P450 CYP3A5). Predpokladá sa, že genetická variabilita v týchto biotransformačných proteínoch môže u pacienta ovplyvniť ich fenotyp (enzymatickú aktivitu a kvantitu exprese), čo vedie k nepriamému ovplyvneniu plazmatických hladín liečiva a veľkosti efektívnej dávky. Z našich výsledkov vyplýva, že pacienti s genotypom ABCB1 1236TT majú štatisticky vyšší pomer C/D v porovnaní s pacientami s ostatnými genotypami v tomto polymorfizme (P=0,017). Takisto genotyp ABCB1 2677TT/AA je asociovaný s vyšším pomerom C/D v porovnaní s ostatnými pacientami (P=0,008). V námi testovanom súbore sme nenašli vzťah medzi výskytom alel ovplyvňujúcich cytochrómové komplexy 3A4 a 3A5 a sledovanými parametrami. U pacientov, ktorí majú vyššie uvedené polymorfizmy v géne pre ABCB1 je možné predpokladať ovplyvnenie fenotypovej funkcie effluxnej pumpy ABCB1 a je možné u nich predpokladať vysoké, potenciálne toxické plazmatické hladiny po podaní štandardnej dávky tacrolimu.

Zoznam literatúry

- [1] STAATZ, C.E., TETT S.E.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004; 43: 623-653.
- [2] D`ADDIO F., MARGONATO D., PENSATO U., BORGESE L., POTENA L., FIORINA P.: Novel therapeutic and diagnostic management of heart transplant patients. *Heart Lung Vessel.* 2015; 7: 198-207.
- [3] HELMSCHROTT M., RIVINIUS R., RUHPARWAR A., SCHMACK B., ERBEL C., GLEISSNER C.A., AKHAVANPOOR M., FRANKENSTEIN L., EHLERMANN P., BRUCKNER T., KATUS H.A., DOESCH A.O.: Advantageous effects of immunosuppression with tacrolimus in comparison with cyclosporine A regarding renal function in patients after heart transplantation. *Drug Des Devel Ther.* 2015; 9: 1217-24.

- [4] STAATZ C.E., GOODMAN L.K., TETT S.E.: Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet.* 2010; 49 (4):207-21.
- [5] TAVIRA B., DÍAZ-CORTE C., CORONEL D., ORTEGA F., COTO E.: Pharmacogenetics of tacrolimus: from bench to bedside ? *Nefrologia.* 2014; 34(1): 11-7.

Tato práce bola financovaná grantom IGA VFU Brno 305/2015/FaF.

***In vitro* analýza antiproliferačních účinků nových inhibitorů tyrozinkinázy se zaměřením na buněčný cyklus**

Tereza Kauerová, Peter Kollár

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

Úvod

Využití cílené léčby nádorových onemocnění je jednou z aktuálních strategií jejich terapie, jejíž záměrem je zlepšovat terapeutickou odpověď na léčbu a zároveň snižovat její toxicitu vůči zdravým buňkám organismu. Oproti konvenční terapii je cílem tzv. *target therapy* zasahovat přímo do mechanismů kancerogeneze na úrovni buňky a regulovat tak specifický buněčný proces za účelem poškození především buňky nádoru. Spektrum těchto zásahů je široké, příkladem může být ovlivnění signalizačních kaskád a následná inhibice progresu buněčného cyklu, indukce apoptózy nebo diferenciaci buňky, inaktivace onkogenů atd. Do této skupiny léčiv spadají tzv. malé molekuly, které většinou ovlivňují funkci regulačních enzymů a ke kterým jsou řazeny také látky ze skupiny inhibitorů tyrozinkináz (TKI) [1,2].

Na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno byla nově syntetizována řada substituovaných hydroxynaftanilidů, jejichž struktura byla odvozena od salicylanilidových a chinolinových derivátů. U obou těchto skupin bylo potvrzeno široké spektrum biologických účinků. Vedle antibakteriálního a antimykobakteriálního účinku je v současné době předmětem studia účinek protizánětlivý a především protinádorový, kde je popsán mechanismem účinku salicylanilidových derivátů blokace receptorových tyrozinkináz epidermálního růstového faktoru (EGFR-RTK) [3,4]. EGFR představuje vhodný cíl moderní protinádorové terapie. Jeho zvýšená exprese byla prokázána u mnoha buněčných nádorových typů stejně jako zapojení signální dráhy EGFR do jejich vývoje. Signální dráhy receptorových tyrozinkináz regulují širokou škálu buněčných procesů jako je proliferace, apoptóza, buněčná diferenciaci atd. [2,5] Cílem tohoto projektu bylo ověřit vliv nově syntetizovaných hydroxynaftanilidů na buněčnou proliferaci a následně na buněčný cyklus nádorových buněk *in vitro* a zhodnotit tak jejich možné využití v rámci dalšího výzkumu potenciálních cytostatických látek.

Materiál a metodika

Jako experimentální modely byly v tomto projektu použity nádorové linie lidských monocytárních

leukemických buněk THP-1, buněk karcinomu prsu MCF-7 a nenádorová linie myších embryonálních fibroblastů 3T3-L1. Testovanými látkami byly deriváty ze skupiny 3-hydroxynaftalen-2-karboxanilidů (JK-23; JK-24; JK-25) [6], 2-hydroxynaftalen-1-karboxanilidů (CP-23; CP-24; CP-25) [7] a 1-hydroxynaftalen-2-karboxanilidů (NM-17; NM-18; NM-19; NM-20; NM-21; NM-22) [3]. Pro experimenty bylo zvoleno rozmezí testovaných koncentrací 1 – 20 μM . Rozpouštědlem testovaných látek byl dimethylsulfoxid (DMSO), jehož výsledná koncentrace v rámci experimentů nepřesáhla 0,1 %.

Antiproliferační efekt testovaných látek byl stanoven pomocí WST-1 analýzy s použitím WST-1 kitu (Roche Applied Science, Německo), hodnocení cytotoxicity testovaných látek bylo provedeno metodou barvení buněk erytrosinem B a následným stanovením poměru živých a mrtvých buněk za použití hemocytometru.

Pro analýzu procentuálního zastoupení buněk v jednotlivých fázích cyklu podle obsahu DNA byly buňky značeny propidium jodidem (PI), měření proběhlo pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, USA). Při analýze buněčného cyklu byla také stanovována přítomnost subdiploidní populace. Získaná data byla vyhodnocena pomocí software MultiCycle AV (Phoenix Flow System, USA) a Kaluza Analysis software 1.2 (Beckman Coulter, USA). Na základě získaných výsledků byly provedeny pilotní analýzy ovlivnění příslušných regulátorů buněčného cyklu pomocí westernového přenosu a následné denzitometrické analýzy.

Uvedené experimenty byly provedeny ve třech nezávislých opakováních. Z výsledných dat byl vyhodnocen aritmetický průměr a směrodatná odchylka (SD), dále pak byla data hodnocena pomocí neparametrického one-way ANOVA testu v kombinaci s Dunnettovým testem (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Výsledky

WST-1 analýza provedená po 24hodinové inkubaci prokázala pouze u některých testovaných látek z trojic polohových izomerů schopnost efektivně inhibovat buněčnou proliferaci nádorových buněčných linií THP-1 a MCF-7 v rozmezí použitých koncentrací 1 – 20 μM . Pozorovaný antiproliferační efekt byl koncentračně-dependentního charakteru. Výsledné hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Hodnoty IC₅₀ testovaných látek. Uvedené hodnoty byly stanoveny WST-1 analýzou s využitím THP-1 a MCF-7 buněčných linií; jsou průměrem tří nezávislých měření ± SD.

	JK-23	JK-24	JK-25	CP-23	CP-24	CP-25
	IC₅₀ (μM)					
THP-1	> 20	3,06 ± 0,206	1,05 ± 0,199	> 20	> 20	5,80 ± 0,370
MCF-7	> 20	4,61 ± 0,068	1,65 ± 0,938	> 20	> 20	5,23 ± 0,802
	NM-17	NM-18	NM-19	NM-20	NM-21	NM-22
	IC₅₀ (μM)					
THP-1	> 20	9,36 ± 0,116	8,06 ± 0,611	> 20	7,12 ± 1,360	6,62 ± 0,217
MCF-7	> 20	4,89 ± 1,950	4,92 ± 0,651	> 20	3,18 ± 1,513	2,50 ± 0,910

U látek účinně inhibujících proliferaci nádorových buněčných linií byl tento efekt analyzován také na nenádorovou buněčnou linii 3T3-L1. Výsledné inhibiční koncentrace IC₅₀ byly vyšší než nejvyšší použitá koncentrace látek v rámci experimentů 20 μM, tudíž jejich přesné hodnoty nebyly stanoveny. Následně byla provedena analýza cytotoxického efektu látek vůči buněčným liniím THP-1 a MCF-7 pomocí hemocytometru. Na základě získaných dat byly pro další fáze testování vybrány látky (JK-24; CP-25; NM-18; NM-19; NM-21; NM-22) vyvolávající inhibici buněčného růstu bez výrazného poklesu viability buněk ve vzorku.

Analýza buněčného cyklu u těchto testovaných látek prokázala po 24hodinové inkubaci již v netoxických koncentracích schopnost signifikantní kumulace buněk v G0/G1 fázi ($p < 0,001$), což bylo doprovázeno poklesem jejich přechodu do syntetické fáze. Procentuální zastoupení buněk v G2/M fázi nebylo ovlivněno. Tento efekt koncentračně-dependentního charakteru se projevil u obou buněčných linií THP-1 a MCF-7. Uvedené výsledky byly podpořeny pilotními analýzami hladin zvolených regulátorů buněčného cyklu, byl pozorován pokles hladiny cyklinu E1, zatímco hladina cyklinu B1 zůstala po působení testovaných látek v koncentracích ovlivňujících průběh buněčného cyklu nezměněna.

Signifikantní nárůst sub-G1 píku ($p < 0,001$) se ve srovnání s negativní kontrolou projevil pouze po inkubaci THP-1 linie s látkou JK-24 v koncentraci 5 μM, což poukazuje na možnou indukci apoptózy touto látkou. Tento efekt ovšem nebyl srovnatelný s účinkem referenční látky, cisplatinu (10 μg/ml).

Závěr

Získané výsledky potvrzují, že vybrané hydroxynaftanilidové deriváty jsou vhodné pro další testování v rámci identifikace nových protinádorových léčiv, bližší specifikace ovlivnění průběhu buněčného cyklu si však vyžaduje další analýzy na molekulární úrovni.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 323/2015/FaF.

Seznam literatury:

1. Gerber, D. E.: Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *Am Fam Physician*. 2008; 77 (3): 311-319.
2. Chetan, Y. et al.: Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: A review of trends and strategies. *Biomaterials*. 2013; 34 (34): 8690–8707.
3. Goněc, T. et al.: Antimycobacterial and herbicidal activity of ring-substituted 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013; 21 (21): 6531-6541.
4. Ding, N. et al.: Synthesis and biological evaluation of a series of novel salicylanilides as inhibitors of EGFR protein tyrosine kinases. *Chinese Chemical Letters*. 2012; 23 (5): 529-532.
5. Carrasco-García, E. et al.: Small tyrosine kinase inhibitors interrupt EGFR signaling by interacting with erbB3 and erbB4 in glioblastoma cell lines. *Experimental Cell Research*. 2011; 317 (10): 1476-1489.
6. Kos J. et al.: Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules*. 2013; 18 (7): 7977-7997.
7. Goněc T. et al.: Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 2-hydroxynaphthalene-1-carboxanilides. *Molecules*. 2013; 18 (8): 9397-9419.

Syntéza a studium biologických vlastností polysubstituovaných hydroxynaftanilidů

Jiří Kos¹, Adéla Hálková¹, Alena Zimolová¹

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Vzhledem ke stále vzrůstající rezistenci invazivních patogenů vůči stávajícím antimikrobiálním léčivům je nutné hledat nové látky s potenciální antimikrobiální aktivitou¹. Základní strategií při vývoji nových antimikrobiálních léčiv je příprava analogů již používaných látek, u kterých by na základě studia vztahů mezi strukturou a aktivitou došlo ke zlepšení terapeutického indexu, zvýšení aktivity vůči rezistentním kmenům, zlepšení biologické dostupnosti či nalezení nového mechanismu účinku. Amidová (-NHCO-) skupina je díky svým elektronovým vlastnostem schopna interagovat a vázat se na množství enzymů a receptorů a prostřednictvím těchto cílových míst indukovat biologickou odpověď^{2,3}. Vlastnosti amidové skupiny mohou být snadno modifikovány substitucí, proto lze amidovou skupinu často nalézt v moderních léčivech i dalších jiných biologicky aktivních sloučeninách⁴. V rámci této studie byla připravena pomocí mikrovlnné syntézy série 54 polysubstituovaných anilidů kyseliny 3-hydroxynaftalen-2-karboxylové jako potenciálních antimikrobiálních sloučenin. Charakterizované látky byly předány na antimykobakteriální a antibakteriální, a doplňkově na schopnost inhibovat fotosyntézu. Lze předpokládat, že modifikace anilinové části molekuly bude korespondovat s odezvou antimikrobiální aktivity.

Metodika

Syntéza anilidů 3-hydroxy-2-naftoové kyseliny probíhá v jednom kroku (Schéma 1), kdy je vytvořen hydroxynaftanilid z příslušné kyseliny a odpovídajícího anilinu v prostředí chlorbenzenu a chloridu fosforitého. Reakce probíhá v mikrovlnném zařízení. Jde o ověřenou metodu z naší předchozí studie (IGA 96/2012). Reakční čas se touto cestou podařilo zkrátit z hodin na minuty při zachování maximálních výtěžků.

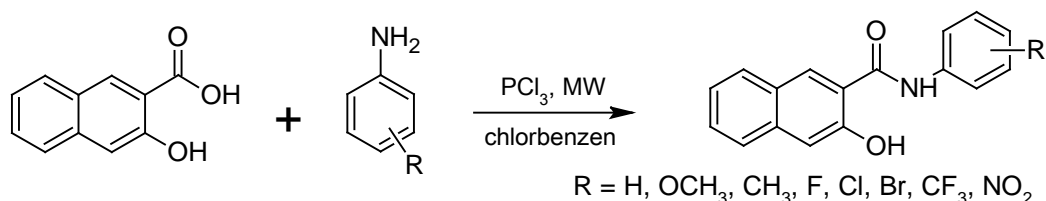


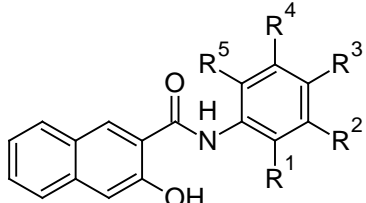
Schéma 1. Obecné schéma syntézy

Použité chemikálie byly pořízeny od firem Aldrich, Merck a Lach:NER. Pro syntézu byl využit mikrovlnný reaktor StartSYNTH, Microwave synthesis labstation (Milestone s.r.l., Itálie). Sušení jednotlivých látek bylo prováděno v exsikátoru při tlaku 10 mm Hg (membránová pumpa Büchi V-710) při laboratorní teplotě. Průběh syntézy a čistota produktů byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelových deskách (60 F254, Merck, Německo) s detekcí UV zářením (UV-lampa Camag, Švýcarsko, $\lambda = 254$ nm). Teploty tání byly stanovené na Koflerově bloku (HMK Franz Kustner Nacht KG, Německo). Infračervená spektra byla získána na FT-IR spektrometru Nicolet™ Impact 410 Smart MIRacle™ ATR ZnSe (Thermo Electron Corporation, USA). Spektra byla pořízena snímáním 256 scanů v rozsahu vlnových délek 4000–600 cm^{-1} . Veškerá ^1H a ^{13}C NMR spektra byla pořízena na přístroji VNMRS 600 MHz (Agilent Technologies, USA) vybaveným trojitou rezonanční HCN sondou při teplotě 25 °C v DMSO- d_6 . ^1H a ^{13}C chemické posuny a ^{13}C - ^{19}F interakční konstanty byly stanoveny ze standardu ^1H a ^{13}C spektra s digitálním rozlišením 0,3 Hz nebo lepším. Chemické posuny (δ) jsou udávány v ppm. Pokud to bylo nutné, byly provedené další experimenty: ^{13}C -APT (Attached Proton Test) pro rozlišení mezi CH a kvarterními uhlíky; DQF COSY, HSQC a HMBC pro jednovazebné ^1H - ^1H a vícevazebné ^1H - ^{13}C korelace. Hmotnostní spektra byla naměřena na spektrometru LTQ Orbitrap Hybrid Mass (Thermo Elektron Corporation, USA) s přímým vstřikováním do APCI zdroje (400°C) v negativním módu.

Výsledky

Celkem bylo připraveno 54 krystalických anilidů kyseliny 3-hydroxynaftalen-2-karboxylové (tabulka 1). Syntéza byla optimalizována do jednoho kroku, kdy byla vytvořena reakční směs ze 3-hydroxynaftalen-2-karboxylové kyseliny, příslušného substituovaného anilinu a aktivátoru karboxylové skupiny chloridu fosforitého. Jako rozpouštědlo byl vybrán chlorbenzen, který je inertní vůči všem třem základním složkám reakční směsi a má optimální vlastnosti pro ohřev v mikrovlnném zařízení. Reakce proběhla při teplotě 130 °C, v již zmíněném mikrovlnném reaktoru při maximálním výkonu 500 W. Reakční doba dosahovala 25 minut, což je značná časová úspora oproti metodám, které využívají konvenční postupy ohřevu (topná hnízda, olejové lázně). Výtěžky reakcí se pohybovaly v průměru kolem 70 %. U látek byla určena teplota tání a dále byly všechny produkty charakterizovány pomocí dostupných spektrálních metod (^1H NMR, ^{13}C NMR, IR a MS spektroskopie). Charakterizované látky byly předány na antimykobakteriální, antibakteriální, antifungální hodnocení a doplňkově na schopnost inhibovat fotosyntézu.

Tabulka 1. Přehled získaných produktů

											
Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Kód látky	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
JK26	Cl	H	H	Cl	H	JK59	Cl	H	Cl	H	Cl
JK27	Cl	H	H	H	Cl	JK60	H	Cl	Cl	Cl	H
JK29	H	Cl	H	Cl	H	JK61	Br	H	Br	H	H
JK30	F	H	H	H	F	JK62	Br	H	H	Br	H
JK31	H	F	H	F	H	JK63	Br	H	Br	H	Br
JK32	Br	H	H	H	Br	JK64	CF ₃	H	CF ₃	H	H
JK33	H	CF ₃	H	CF ₃	H	JK65	CF ₃	H	H	CF ₃	H
JK34	Cl	H	H	CF ₃	H	JK75	Cl	H	H	MeO	H
JK35	Me	H	H	Me	H	JK78	F	Cl	H	H	H
JK36	Me	H	H	H	Me	JK79	H	Cl	F	H	H
JK37	H	Me	H	Me	H	JK80	F	H	Cl	H	H
JK38	MeO	H	H	MeO	H	JK81	F	H	H	Cl	H
JK40	H	MeO	H	MeO	H	JK83	F	H	Br	H	H
JK41	H	F	H	MeO	H	JK84	H	F	Br	H	H
JK42	F	H	H	H	MeO	JK85	F	H	H	Br	H
JK43	MeO	H	H	F	H	JK86	H	Cl	Br	H	H
JK47	F	H	F	H	H	JK87	Br	H	Cl	H	H
JK48	H	F	F	H	H	JK88	Cl	H	Br	H	H
JK49	F	H	H	F	H	JK89	Cl	H	H	Br	H
JK50	F	H	F	H	F	JK96	H	F	CF ₃	H	H
JK51	F	F	F	H	H	JK97	H	F	H	CF ₃	H
JK52	F	H	F	F	H	JK98	CF ₃	H	F	H	H
JK53	H	F	F	F	H	JK99	H	CF ₃	F	H	H
JK54	F	F	H	F	F	JK100	F	CF ₃	H	H	H
JK55	F	F	F	F	F	JK101	F	H	H	CF ₃	
JK57	Cl	H	Cl	H	H	JK107	Br	H	CF ₃	H	H
JK58	Cl	H	Cl	Cl	H	JK111	H	CF ₃	Me	H	H

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 322/2015/FAF.

Literatura:

- 1, Baquero, F.; Coque, T.M.; de la Cruz, F. Ecology and evolution as targets: the need for novel eco-evo drugs and strategies to fight antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3649–3660.
- 2, Laursen, J.S.; Engel-Andreasen, J.; Fristrup, P.; Harris, P.; Olsen, C.A. Cis-trans amide bond rotamers in β -peptoids and peptoids: Evaluation of stereoelectronic effects in backbone and side chains. *Journal of the American Chemical Society.* **2013**, *135*, 2835–2844.

- 3, Pattabiraman, V.R.; Bode, J.W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature*. **2011**, *480*, 471–479.
- 4, Kos, J.; Nevin, E.; Šoral, M.; Kushkevych, I.; Goněc, T.; Bobál, P.; and Kollár, P.; Coffey, A.; O'Mahony, J.; Liptaj, T.; Kráľová, K.; Jampílek, J. Synthesis and antimycobacterial properties of ring-substituted 6-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, vol. 23, no. 9, 2035-2043

Biologické hodnocení vlivu modifikovaných karboxymethylcelulóзовých materiálů na hojení ran u laboratorních potkanů s navozeným *diabetes mellitus*

Alžběta Kružicová, Jakub Jeřábek, Vojtěch Ondra

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

Úvod

Celulóza je nejrozšířenější přírodní polysacharid, který našel uplatnění v mnoha směrech. Jedním z nich je i ošetřování ran – zde se používají chemicky modifikované celulózy, např. karboxymethylcelulóza(1). Její polymery tvoří ve vodě koloidní roztoky - mluvíme o tzv. hydrokoloidním krytí(2), které umožňuje vlhké hojení rány. Vlhkost rány je nezbytná pro dobrou granulaci a epitelizaci rány. Této výhodné vlastnosti lze využít zejména u komplikovaných a nehojících se ran, např. u pacientů s *diabetes mellitus*, kde důsledkem zvýšené glykémie dochází jak k poškození nervů (neuropatie), tak i cév(3) s následnou hypoxií tkáně, vedoucí až k nekróze. Cílem tohoto projektu bylo ověřit u nově syntetizovaných přípravků vliv na hojení ran a zhodnotit dynamiku tkáňové reakce v různých fázích hojení.

Materiál a metodika

In vivo model

Experiment byl proveden na 75 laboratorních potkanech kmene Wistar (3 skupiny po 25 kusech), kterým byl i.p. aplikací 50 mg/kg streptozotocinu vyvolán *diabetes mellitus*. Po dvou měsících jim byla v celkové anestezii provedena kruhová excize (o průměru cca 1,5 cm) všech vrstev kůže v oblasti nad lopatkami. U zvířat pokusné skupiny byl na ránu aplikován nově vyvíjený přípravek na bázi karboxymethylcelulózy (Hcel® HT), v referenční skupině pak klinicky používaný přípravek (Aquacel Ag®) a v kontrolní skupině byla rána ponechána bez primárního krytí. Po 2, 7, 14 a 30 dnech od provedení zákroku byla vždy čtvrtina experimentálních zvířat utracena a odebrána kůže pro molekulárně biologická vyšetření.

Příprava vzorků

Za pomoci homogenizátoru bylo přibližně 0,1g tkáně homogenizováno v lyzačním pufru [50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1 mM orthovanadát sodný, 50 mM fluorid sodný, 5 mM pyrofosfát sodný, 0,27 M sacharóza], centrifugováno při 9000 rpm po dobu 15 min při 4 °C a byl odebrán supernatant. Poté se změnila celková koncentrace proteinů pomocí kitu Roti-quant Universal (Carl Roth, Německo).

Westernový přenos

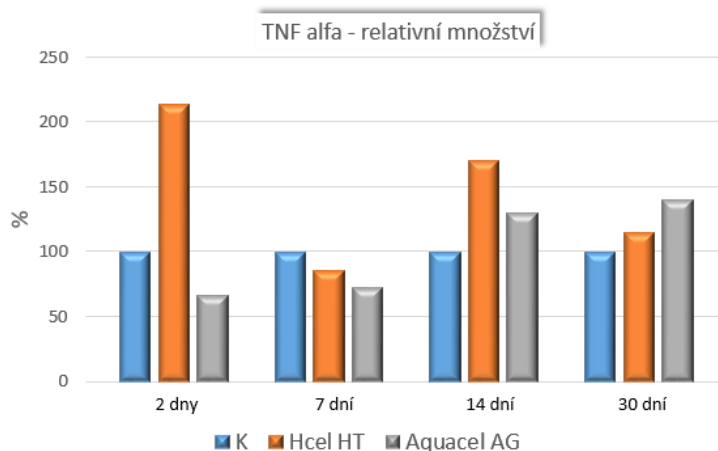
Proteinové vzorky byly denaturovány v přítomnosti β -merkptoethanolu a SDS při 90 °C po dobu 5 min. 50 μ g celkového proteinu bylo naneseno na 12% SDS-polyakrylamidový gel. Po elektroforéze (140 V, 400 mA, 90 min) byly vzorky přeneseny na membránu (0,2 μ m, Bio-Rad, Hercules, USA), která se blokovala v 5% BSA (Sigma-Aldrich, Německo) v TBST pufru 1 h. Dále byla membrána inkubována s protilátkami anti-TNF- α , anti-TGF- β 1 a anti-VEGF (Abcam, Velká Británie) v ředění 1:2000 při 4 °C přes noc. Poté byla membrána promývána v TBST pufru a inkubována 1 h v sekundární protilátce (anti-mouse IgG; anti-rabbit IgG, Sigma-Aldrich, Německo) v ředění 1:2000. Sekundární protilátka byla detekována pomocí Opti-CNTMSubstrateKit (Bio-Rad, Velká Británie) a intenzita proteinových bandů byla měřena pomocí Image StudioTM Lite (**LI-COR Biotechnology**, USA).

Zymografie

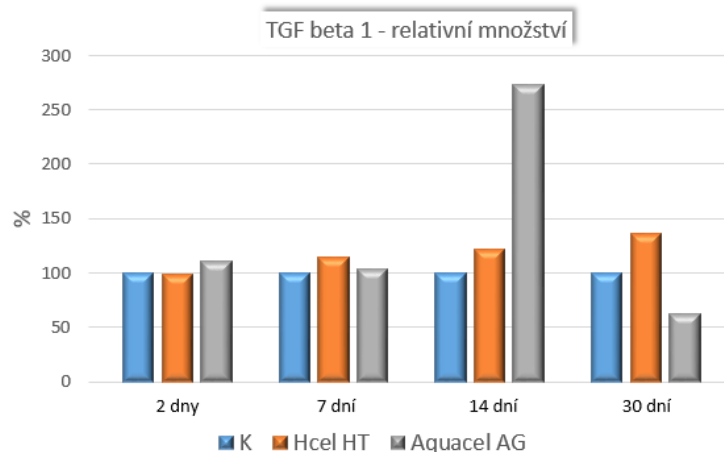
Aktivita MMP 2 a MMP 9 byla měřena želatinovou zymografií. 5 μ g celkového proteinu bylo naneseno na 10% SDS-polyakrylamidový gel s 0,1% želatinou. Po elektroforéze (140 V, 400 mA, 90 min) byl gel dvakrát promýván po dobu 15 min v 2,5% (v/v) Triton X-100. Gel byl inkubován přes noc při 37 °C ve vyvíjecím pufru [50 mM Tris-HCl (pH 8,8), 5 mM chlorid vápenatý, 3 mM azid sodný, 0,5% (v/v) Triton X-100]. Poté byl gel barven coomassie modří 2 h a odbarvován, dokud nebyly bandy jasně viditelné. Jejich intenzita byla měřena pomocí Image StudioTM Lite (**LI-COR Biotechnology**, USA).

Výsledky

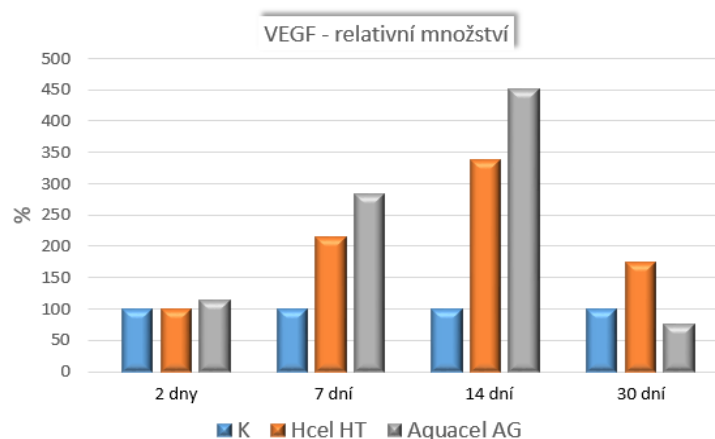
Výsledky westernového přenosu jsou znázorněny v grafech 1 až 3, které ukazují hladiny jednotlivých proteinů ve zvolených časových intervalech (2, 7, 14 a 30 dní). Kontrolní skupina (bylo aplikováno pouze sekundární krytí) je vždy považována za 100 %.



Graf č. 1: Relativní množství cytokinu TNFalfa v kontrolní skupině (K) a v testovaných skupinách (Hcel® HT a Aquacel Ag®).



Graf č. 2: Relativní množství růstového faktoru TGFbeta 1 v kontrolní skupině (K) a v testovaných skupinách (Hcel® HT a Aquacel Ag®).

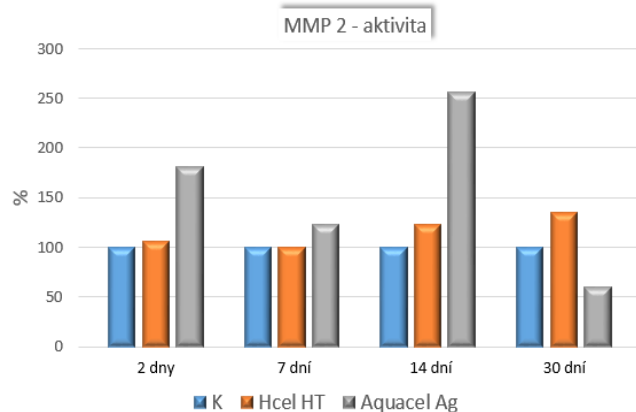


Graf č. 3: Relativní množství růstového faktoru VEGF v kontrolní skupině (K) a v testovaných skupinách (Hcel® HT a Aquacel Ag®).

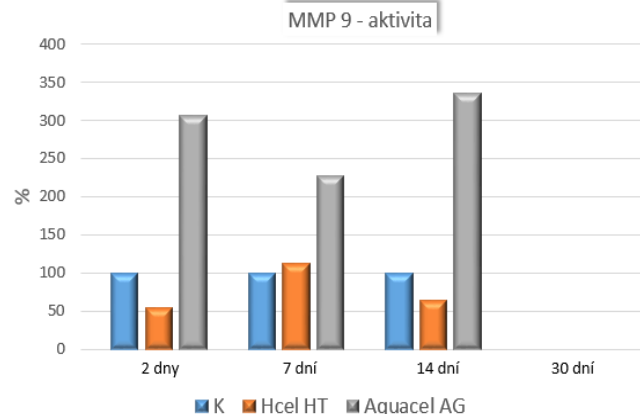
Ze získaných výsledků je patrné, že ke zvýšení TNF alfa dochází oproti kontrolní skupině u látky Hcel® HT po 2, 14 a 30 dnech, kdežto u látky Aquacel Ag® až po 14 a 30 dnech. Jejich odlišný efekt na hladiny vybraných proteinů lze pozorovat i u TGF beta 1 – k výraznému zvýšení došlo u Aquacelu Ag® po 14 dnech. Tento faktor souvisí s granulační tkání, pro jejíž tvorbu je klíčový. U růstového faktoru cévního endotelu (VEGF) pozorujeme nárůst po 7 a 14 dnech u obou testovaných látek, u Hcel® HT i po 30 dnech. To si lze vysvětlit tím, že právě v této době je v ráně stimulováno vytváření nových cév.

Výsledky želatinové zymografie jsou znázorněny v grafu 4, který ukazuje aktivitu MMP 2 (4A) a MMP 9 (4B) ve zvolených časových intervalech (2, 7, 14 a 30 dní). Kontrolní skupina (bylo aplikováno pouze sekundární krytí) je vždy považována za 100 %.

4A



4B



Graf č. 4: Aktivita matrixových metaloproteináz MMP 2 (4A) a MMP 9 (4B) v kontrolní skupině (K) a v testovaných skupinách (Hcel® HT a Aquacel Ag®).

Na aktivitu MMP 2 měla vliv více látka Aquacel Ag®, která ji zvyšovala po 2, 7 i 14 dnech. Stejný efekt je patrný u látky Hcel® HT po 14 a 30 dnech. Kytí Aquacel Ag® ovlivňovalo více i aktivitu MMP 9, jak je patrné z grafu 4B. Rozdíl v jejich vlivu na matrixové metaloproteinázy může být vysvětlen například odlišným chemickým složením (přítomností stříbra u Aquacelu Ag®). Po 30 dnech od chirurgického zákroku se nám nepodařilo stanovit aktivitu MMP 9, která byla příliš nízká. Testované látky tedy ovlivňovaly nejen aktivitu matrixových metaloproteináz, ale i hladiny vybraných cytokinů a růstových faktorů, jejichž souhra (časová i místní) je pro úspěšný proces hojení rány nezbytná.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 326/2015/FaF.

Seznam literatury:

1. Sopuch, T., Drahovzalová, R., Rýdl, J., Bureš, I., Milichovský, M., Vytrasová, J., Motřková, P., Švorčík, V., Podlaha, J., Horáková, M., Masteiková, R., Vinklárková, L., Suchý, P.: Celulózní materiály v ošetřování ran. Hojení ran 2013; 1, 24-25
2. Queen, D.: Technology update: UnderstandingHydrofiber® Technology. WoundsIntern. 2010; 1, 5. <http://www.woundsinternational.com/product-reviews/technology-update-understanding-hydrofiber-technology>
3. Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., Hadden, D., Turner, R. C., Holman, R. R.: Associationofglycaemiawithmacrovascular and microvascularcomplicationsof type 2 diabetes (UKPDS 35): prospectiveobservational study. BMJ 2000; 321, 405-412.

Imobilizace homochirálních bis(thiomočoviny) organokatalyzátorů a jejich aplikace u asymetrické Henryho reakce.

Jan Otevřel, Lucie Brunclíková, Jakub Karas

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

Úvod

V organické syntéze hrají klíčovou roli zejména reakce vedoucí ke tvorbě C–C vazeb. Jednou z nich je i Henryho (nitroaldolová) reakce, jejímiž produkty jsou chirální β -nitroalkoholy,^[1] které představují výchozí látky při přípravě celé řady farmaceuticky významných organických molekul. Enancioselektivní Henryho reakce díky možnosti přípravy opticky obohacených β -nitroalkoholů přitahuje pozornost organických chemiků a stala se předmětem jejich intenzivního studia.^[2] Jednou z vysoce efektivních možností asymetrického vedení Henryho reakce je použití homochirálních bis(thiomočoviny) organokatalyzátorů.^[3] Organokatalyzátory tohoto typu mají celou řadu výhod mezi něž patří benignost pro životní prostředí, nízká cena, snadná příprava, vysoká katalytická efektivita, necitlivost vůči atmosférickým podmínkám a vodě a řada dalších. Prakticky všechny vysoce aktivní thiomočoviny organokatalyzátory popsané v literatuře obsahují 3,5-bis(trifluormethyl)fenylový fragment, který má u thiomočoviny katalyzátorů výjimečné postavení.^[4] Obecným problémem homogenních organokatalyzátorů je obtížná recyklovatelnost, kdy je po každém katalytickém experimentu nezbytné provádět chromatografickou separaci katalyzátoru a reakčních produktů, což omezuje jejich praktickou aplikovatelnost a potenciální průmyslové využití. Tuto nevýhodu lze překonat ukotvením organokatalyzátoru na vhodný (např. polymerní) nosič, čímž je umožněno nejen snadné zpracování reakční směsi a recyklovatelnost použitého katalyzátoru (filtrací nebo centrifugací a promytím), ale často se také zvyšuje katalytická aktivita, a tím se sníží množství organokatalyzátoru potřebného pro danou chemickou transformaci.^[5]

Materiál a metodika

V první fázi projektu proběhla modifikace komerčně dostupné Merrifieldovy pryskyřice za účelem přípravy polymeru vhodného k imobilizaci organokatalyzátoru obsahujícího bis(trifluormethyl)-

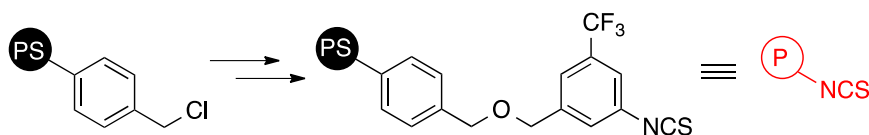


Schéma 1. Příprava polymeru pro ukotvení katalyzátoru.

fenylthiomočoviny fragment (schéma 1). Druhou fází projektu byla imobilizace homochirálního bis(thiomočoviny) organokatalyzátoru připraveného v rámci projektu 50/2014/FaF (schéma 2).

Cílem třetí fáze projektu bylo nalezení a optimalizace reakčních podmínek asymetrické Henryho reakce pro testování připraveného imobilizovaného organokatalyzátoru. V rámci této fáze projektu

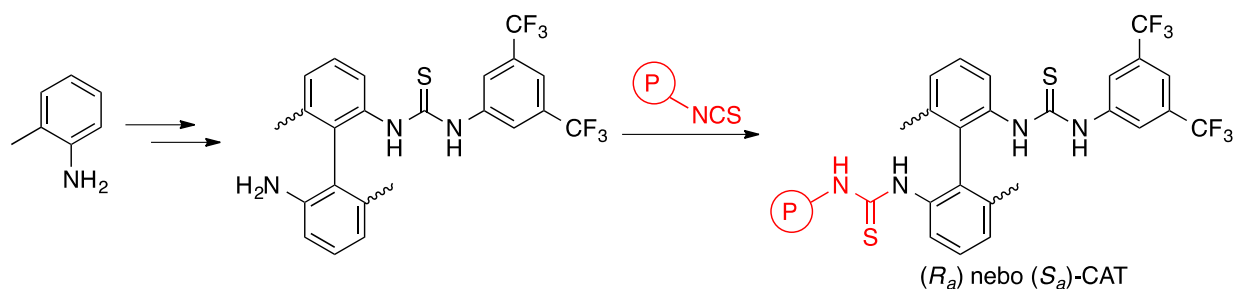


Schéma 2. Ukotvení katalyzátoru na polymerní nosič.

se testovala také substrátová specifita katalyzátoru, enancioselektivita a diastereoselektivita reakce se měřila pomocí polarimetrie, HPLC s chirální stacionární fází a ¹H-NMR. Reakční produkty byly strukturně charakterizované pomocí ¹H-NMR, ¹³C-NMR a popř. ¹⁹F-NMR spekter a výsledky byly porovnány s dostupnými literárními hodnotami (sekce výsledků).

Výsledky

Následující **schéma 3** a **tabulka 1** ukazují optimalizované podmínky organokatalyzované Henryho adice a shrnují dosažené výsledky stanovení enancio- a diastereoselektivity reakce. Z naměřených hodnot enantiomerního přebytku (ee) a diastereomerního poměru (dr) je patrné, že

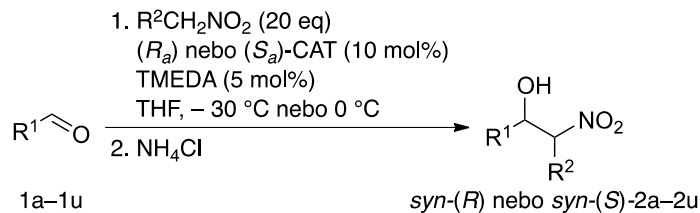


Schéma 3. Optimalizované podmínky Henryho reakce.

organokatalyzovaná reakce jeví vysokou míru enancioselektivity dosahující až 97 % ee a diastereoselektivity v poměru až 7:1 ve prospěch *syn*-aduktu. Připravený organokatalyzátor v řadě výsledků překonal literární reference a disponuje značným potenciálem pro následné syntetické využití při přípravě řady zajímavých biologicky aktivních sloučenin.

Tabulka 1. Výsledky HPLC a ¹H-NMR měření enancio- a diastereoselektivity

substr.	R ¹	R ²	kat. [10 mol%]	tepl. [°C]	čas [h]	konv. [%]	dr (syn/anti)	ee [%]
1a	Ph-	H-	(R _a)-CAT	-30	120	98	–	78 (S)
1b	1-naftyl-	H-	(R _a)-CAT	-30	120	98	–	78 (S)
1c	2-NO ₂ Ph-	H-	(S _a)-CAT	-30	12	>99	–	92 (R)
1d	2-ClPh-	H-	(S _a)-CAT	-30	12	>99	–	94 (R)
1e	3-MePh-	H-	(R _a)-CAT	-30	72	95	–	78 (S)
1f	3-FPh-	H-	(R _a)-CAT	-30	24	97	–	85 (S)
1g	3-NO ₂ Ph-	H-	(R _a)-CAT	-30	12	>99	–	86 (S)
1h	4-MeOPh-	H-	(R _a)-CAT	0	36	90	–	69 (S)
1i	4-ClPh-	H-	(R _a)-CAT	-30	48	92	–	82 (S)
1j	4-BrPh-	H-	(R _a)-CAT	-30	48	95	–	81 (S)
1k	4-NO ₂ Ph-	H-	(S _a)-CAT	-30	12	>99	–	86 (R)
1l	4-CF ₃ Ph-	H-	(R _a)-CAT	-30	48	>99	–	82 (S)
1m	2-thienyl-	H-	(R _a)-CAT	-30	120	88	–	62 (S)
1n	3-pyridyl-	H-	(R _a)-CAT	-30	12	>99	–	87 (S)
1o	5-benzodioxolyl-	H-	(S _a)-CAT	0	96	95	–	71 (R)
1p	styryl-	H-	(R _a)-CAT	0	48	90	–	68 (S)
1q	fenethyl-	H-	(S _a)-CAT	-30	24	>99	–	43 (R)
1r	2-ClPh-	Me-	(S _a)-CAT	-30	12	>99	87:13	97:20 (R)
1s	3-FPh-	Me-	(R _a)-CAT	-30	24	>99	71:29	90:35 (S)
1t	4-ClPh-	Me-	(S _a)-CAT	-30	48	>99	76:24	92:36 (R)
1u	4-BrPh-	Et-	(R _a)-CAT	-30	48	>99	82:18	89:53 (S)

Legenda: Et = ethyl-, Me = methyl, Ph = fenyl, substr. = substrát, kat. = katalyzátor, tepl. = reakční teplota, konv. = konverze, dr = diastereomerní poměr, ee = enantiomerní přebytek.

Tato práce vznikla díky finanční podpoře IGA VFU Brno č. 307/2015/FaF.

Seznam literatury

- [1] Henry, L. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 1895, 120, 1265–1268.
- [2] Alvarez-Casao, Y. et al. *Symmetry*. 2011, 3, 220–245.
- [3] Scheffler, U.; Mahrwald, R. *Chem. Eur. J.* 2013, 19, 14346–14396.
- [4] Lippert, K. M. et al. *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 5919–5927.
- [5] Kristensen, T. E.; Hansen, T. *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 3179–3204.

Příprava a hodnocení heteroarylkarbonyloxyaminopropanolů a jejich kvarterních amoniových derivátů - látek s potenciální biologickou aktivitou.

Tereza Padrtová, Markéta Dalecká

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

Úvod

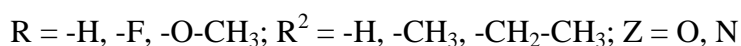
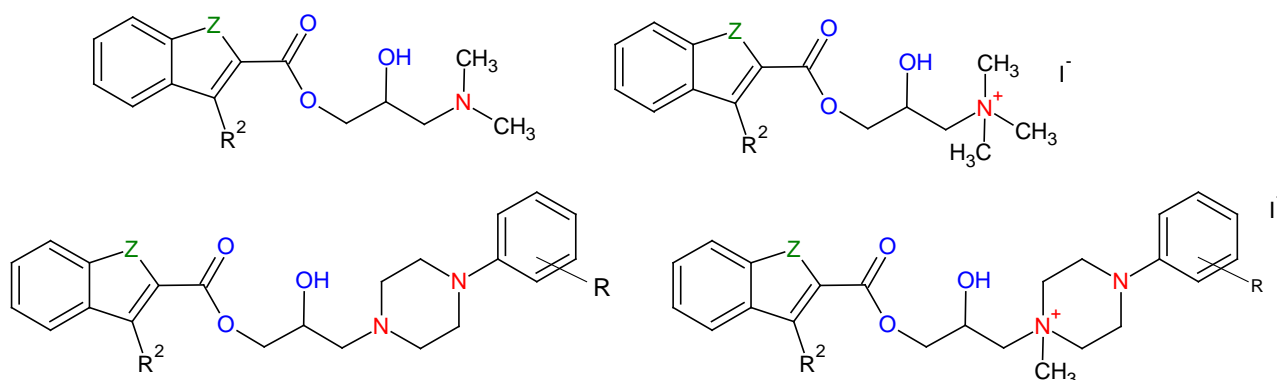
Poslední dokument Světové zdravotnické organizace (WHO) týkající se Světové zdravotnické statistiky 2014 ukazuje, že přibližně 33,3% světové populace trpí nemocemi spojenými s kardiovaskulárním systémem. K nejčastějším kardiovaskulárním onemocněním patří vysoký krevní tlak, ischemická choroba srdeční, srdeční selhání, dysrytmie a další. (1) Látky blokující β -adrenoreceptory (β -blokátory) patří mezi léčiva první volby při terapii těchto onemocnění (sotalol, metoprolol, labetalol, betaxolol a další). Bohužel tato léčiva s sebou nesou i nežádoucí účinky spojené s blokací β_2 -receptorů, projevující se např. bronchokonstrikcí, hypotenzí a bradykardií, což je důvod, proč jsou při výskytu těchto příznaků, kontraindikovány. Využití derivátů s krátkým biologickým poločasem (např. esmolol) spočívá v terapii akutních poruch srdečního rytmu, ischemie a u nemocných s kontraindikací β -blokátorů, kde jejich podání formou infuze zajišťuje kontrolu pacientova zdravotního stavu se zpětnou vazbou nepřesahující několik minut. (2, 3) Cílem této práce byla syntéza, analýza a hodnocení fyzikálně-chemických vlastností terciárních aminů a kvarterních amoniových solí (heteroarylkarbonyloxy)aminopropanolů a (heteroarylkarbonyloxy)phenylpiperazinopropanolů.

Materiál a metodika

Chloridy příslušných kyselin (benzofurankarboxylová kyselina; indolkarboxylová kyselina) byly podrobeny reakci s oxiran-2-ylmethanolem, popř. draselné soli těchto kyselin reagovaly s glycidyltosylátem. Výsledkem těchto reakcí byly oxiran-2-ylmethyl 4-(alkyloxykarbonylamino)deriváty. Následně došlo k otevření oxiranového kruhu reakcí s dialkylaminem popř. se substituovanými fenylpiperaziny, což vedlo k vytvoření příslušných terciárních aminů. Finální kvarterní amoniové soli byly připraveny skrze tzv. Menshutkinovu reakci terciárního aminu s příslušným alkyljodidem (viz obr. 1).

Alkylace v posledním kroku reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru Start SYNTH Microwave Synthesis Labstation. Čistota výsledných sloučenin byla ověřena pomocí HPLC Thermo Fisher Scientific Dionex 3000. IR spektra byla měřena na přístroji Nicolet Impact 410, 1D a 2D-NMR spektra byla získána měřením na přístroji NMR Bruker Avance Ascend 700 MHz Bio.

Obr. 1: chemické struktury výsledných sloučenin



Stanovení lipofility

RP-HPLC představuje rychlou, účinnou a nenáročnou metodu hodnocení koeficientu lipofility stanovovaných sloučenin. Lipofilita byla vyjádřena jako logaritmus kapacitního faktoru $\log k_w$, jehož hodnoty korelovaly s vypočítanými hodnotami rozdělovacího koeficientu $\log P$ pomocí programu Marvin Sketch (ChemAxon) (4). Jako stacionární fáze byla použita kolona Zorbax-Extend C-18, jako mobilní fáze byl použit methanol : voda v následujících poměrech 50 : 50, 40 : 60, 30 : 70, 20 : 80, 10 : 90. Vodná fáze byla pufrována 4-morfolinopropasulfonovou kyselinou (MOPS) a NH_4OH na fyziologickou hodnotu pH (7,4). Ke zlepšení vlastností píků stanovovaných analytů byl k vodné fázi přidán decylamin. Kapacitní faktor $\log k$ byl vypočítán dle následující rovnice:

$$\log k = \log \left(\frac{t_r - t_0}{t_0} \right)$$

kde: t_r = retenční čas zkoumaného analytu

t_0 = retenční čas nezadržovaného analytu (KI)

Hodnoty kapacitního faktoru $\log k$ byly vypočítány pro každou látku při různých koncentracích organické fáze, byla sestavena kalibrační křivka a hodnoty $\log k_w$, vztahující se k 100% vodné fázi, byly z jejich hodnot aproximovány a následně dány do korelace s hodnotami $\log P$ vypočtenými komerčně dostupným programem.

Stanovení hodnot disociační konstanty pKa

Hodnoty disociační konstanty pKa terciárních aminů byly měřeny na přístroji kapilární zónová elektroforéza (Agilent 3D CE), přičemž u této metody měření spočívá v tzv. elektroforetické

pohyblivosti analytů jako funkce pH separačního elektrolytu. Vznikne závislost, která je následně aproximována sigmoidální křivkou (Program Sigma Plot v. 10.0), přičemž pKa je hodnotou pH v inflexním bodě získané sigmoidy. (5) Elektroforetické měření látek bylo uskutečněné v systému několika tlumivých roztoků v určitém rozmezí pH. Na základě migrace studovaných látek a markeru osmotického toku byly vypočítány efektivní elektroforetické mobility μ_{eff} . Závislost těchto hodnot na pH byla vnesena do grafu a vyhodnocena programem Sigma Plot.

Měření povrchového napětí

Stanovení povrchové aktivity kvarterních amoniových derivátů probíhalo pomocí stalagmometrické metody, která vychází z úměry mezi povrchovým napětím kapaliny a hmotností kapek, které „odkapávají“ ze stalagmometru. Měření spočívalo ve stanovování hmotnosti 20 kapek referenční kapaliny, což byla v našem případě voda a ve stanovování hmotnosti 20 kapek zkoumané látky ($C = 0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $T = 21 \text{ }^\circ\text{C}$).

Povrchové napětí σ ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$) bylo vypočteno dle následující rovnice:

$$\sigma = \sigma_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \frac{m}{m_{\text{H}_2\text{O}}}$$

kde: $\sigma_{\text{H}_2\text{O}} = 0,07259 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$ při $21 \text{ }^\circ\text{C}$; m = hmotnost 20 kapek zkoumané látky; $m_{\text{H}_2\text{O}}$ = hmotnost 20 kapek vody. Výsledné hodnoty ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$) udávají, o kolik procent (%) daná látka snižuje povrchové napětí vody při koncentraci $C = 0,001 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Výsledky

Bylo připraveno 16 látek a to derivátů terciárních aminů (heteroarylkarbonyl)oxyaminopropanolů a (heteroarylkarbonyloxy)phenylpiperazinopropanolů, které byly převedeny na příslušnou sůl (hydrochloridy; soli kys. fumarové). Báze výsledných terciárních aminů byly methylovací převedeny na kvarterní amoniové soli. Výsledné sloučeniny byly přečištěny rekrystalizací anebo sloupcovou chromatografií.

Struktura finálních látek byla především určena pomocí metody 1D a 2D (HSQC, HMBC, COSY, TOCSY...) NMR na přístroji Bruker Avance Ascend 700 MHz Bio.

Látky byly charakterizovány pomocí měření fyzikálně-chemických metod a to stanovením lipofility, disociační konstanty a povrchového napětí.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 315/2015/FaF.

Seznam literatury:

- 1) World health organization, World health statistics 2014, Geneva.
http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/en/
- 2) TENGLER, J. Synthesis of New (Arylcarbonyloxy)aminopropanol Derivatives and the Determination of Their Physico-Chemical Properties. *Cent. Eur. J. Chem.* 2013, 11, 1757-1767
- 3) TENGLER, J. Synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-[(2-aryloxyethyl)amino]propyl 4-[(alkoxycarbonyl)amino]benzoates. *The Scientific World Journal*, 2013
- 4) LOMBARDO, F. Physicochemical and Biological Profiling in Drug Research. ElogD 7.4 20,000 Compounds Later: Refinements, Observations, and Applications. *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research*, 2006
- 5) KAPUSTÍKOVÁ, I. Stanovenie acidobázických disociačných konštánt vybraných β -blokátorov pomocou kapilárnej zónovej elektroforézy, RP-HPLC a $^1\text{H-NMR}$. *Chemické listy*, 2014, 108, 1073-1079

Příprava mukoadhezivních částic na bázi biokompatibilních polymerů s biologickým účinkem proti vaginálním patogenům

Miroslava Pavelková, Kateřina Kubová, Jakub Vysloužil, Martina Kejdušová, Martina Kaletová,
Karel Hanzal, Radim Pešek

Ústav technologie léků, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Lékové mikroformy patří mezi rychle se rozvíjející oblasti farmaceutické technologie se širokým potenciálem využití. Přípravují se nejrůznějšími často poměrně složitými technologickými postupy. Jednou z metod přípravy mikročástic je vnější iontová gelace, která je založena na schopnosti polyelektrolytů vytvářet v přítomnosti opačně nabitých vícemocných iontů (např. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) gelové částice (1). Projekt navazuje na výzkum Ústavu technologie léků v oblasti přípravy a hodnocení polymerních mikročástic připravených zesíťováním vhodných polymerů pomocí Cu^{2+} iontů, u kterých byla prokázána a publikována antimikrobiální aktivita proti základním vaginálním patogenům (2).

Materiál a metodika

Příprava a hodnocení mikročástic

Homogenní disperze natrium-alginátu (3 %, 4 %) byla protlačována přes jehlu o průměru 0,4 mm, rychlostí 2.0 ml/min do vodného roztoku CuCl_2 (0,5M nebo 1M). Vzniklé částice byly ponechány 1 hodinu ve tvrdícím roztoku a následně třikrát promyty destilovanou vodou. Sušení probíhalo v sušárně při 25 °C po dobu 24 hodin. Kvalitativní parametry částic (ekvivalentní průměr a sfericita) byly hodnoceny pomocí stereoskopického mikroskopu (Nikon, Tokyo, Japonsko). Obsahy Cu^{2+} iontů v pevných i kapalných vzorcích byly stanoveny atomovou absorpční spektroskopií (Analytik Jena, Německo). Uvolňování Cu^{2+} iontů v čase 1, 6 a 12 hodin probíhalo ve fosfátovém tlumivém roztoku pH 6,0 (5 ml) při 37 °C (simulace zánětlivého vaginálního prostředí). Vzorek s největším obsahem Cu^{2+} iontů byl následně použit ke stanovení buněčné toxicity a antivirového účinku.

Buněčná toxicita

Cytotoxicita částic s obsahem Cu^{2+} iontů byla testována na buněčných liniích Vero. Vero buňky (10^5 /ml) s růstovým médiem (DMEM) byly vysazeny (100 μl) do 96 jamek mikrotitrační destičky (Nunc 96) a 24 hodin inkubovány. Následně byly přidány desítkově naředěné vzorky s obsahem Cu^{2+} iontů (100 μl) od koncentrace 1198,00 mg/l. Každé ředění bylo titrováno vždy do 5 jamek.

Ředění, které způsobilo cytopatický efekt minimálně ve třech jamkách v čase 1, 2, 3 dnů bylo považováno za cytotoxické.

Antimikrobiální aktivita – Stanovení MIC

Ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) byla použita bakterie *Escherichia coli* (CCM4517), suspendována v LB médiu (Luria broth), a kvasinka *Candida albicans* (CCM 8186), suspendovaná v YNB (Yeast Nitrogen base with Ammonium Sulfate) médiu. Bakterie se nechaly růst do zákalu OD₆₀₀ 0.5 při 37 °C na třepačce (250 za min). Výluhy mědi (10%) v LB nebo YNB médiu byly ve dvojkovém ředění titrovány na mikrotitrační destičku v množství 100 µl do jamky, vždy ve třech řadách. Následně byly přidány kultury *E. coli* a *C. albicans* v množství 10e6 do každé jamky a inkubovány při 37 °C. Po 20 hodinách inkubace byla spektrofotometricky měřena optická hustota (OD₆₀₀), ukazatel buněčného růstu. Hodnota MIC byla stanovena jako koncentrace mědi v jamce, která vykazovala minimálně čtyřikrát menší absorbanci ve srovnání s jamkou následující.

Antivirová aktivita – Stanovení počtu plaků

Plakredukčním testem bylo stanoveno množství vzniklých plaků (tzn. množství životaschopných částic viru, HSV-2, *Herpes Simplex Virus*, genus HHV-1), po expozici měďnatým kationtům. Vzorky z disoluce s obsahem Cu²⁺ iontů (0,546 mg/ml a 546 mg/ml) se spolu HSV-2 (12.5 and 12500 ID₅₀) ve dvojkovém ředění inkubovaly při 37 °C 1 hodinu. Poté byla směs titrována na Vero buňky (10e5/ml) do 24 jamkové mikrotitrační destičky. K zabránění šíření virových částic mezi sousedními buňkami byl do každé jamky přidán 0.2% roztok agarosy. Po třech dnech byly buňky fixovány 10% formaldehydem a barveny 10% krystalovou violetí. Bylo porovnáno množství vzniklých plaků v jednotlivých řadách.

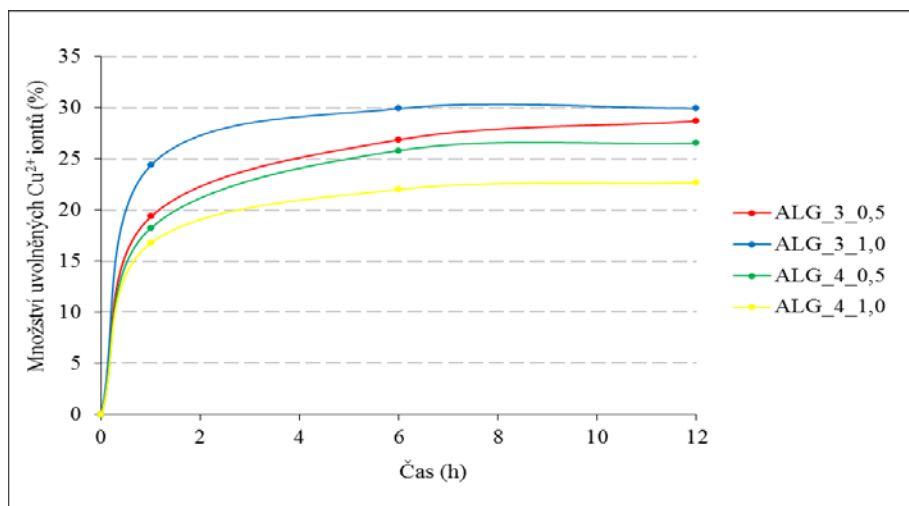
Výsledky

Výsledky kvalitativního hodnocení částic jsou znázorněny v tabulce 2. Velikost částic byla závislá především na koncentraci polymeru, 3% disperze natrium-alginátu tvořila menší částice než 4% disperze. Faktor sfericity byl u všech vzorků vyhovující, tzn. vyšší než 0,8 (což je limitní hodnota pro hodnocení sfericity u pelet). Obsah Cu²⁺ iontů byl vyšší u vzorků, které byly zesíťované 1M tvrdícím roztokem CuCl₂, vliv koncentrace natrium-alginátu prokázán nebyl. Uvolňování Cu²⁺ iontů v čase je znázorněno na obrázku 2. Nejrychleji a v největším množství se Cu²⁺ ionty uvolnily ze vzorku ALG_3_1,0. 3% šarže zesíťovaná 0,5M roztokem CuCl₂ uvolňovala měď pomaleji. V obou případech šlo o vzorky připravené z natrium-alginátu o nižší koncentraci. Tyto vzorky též

vykazovaly menší velikost částic oproti částicím připraveným z 4% polymeru. Nejméně a nejpomaleji se naopak Cu^{2+} ionty uvolňovaly ze vzorku ALG_4_1,0, tzn. ze vzorku s vyšším obsahem natrium-alginátu i Cu^{2+} iontů.

Vzorek	Ekvivalentní průměr (μm)	Faktor sfericity	Obsah Cu^{2+} iontů (g/kg)
ALG_3_0,5	$1200,7 \pm 66,1$	$0,89 \pm 0,08$	$223,10 \pm 17,85$
ALG_3_1,0	$1160,5 \pm 52,9$	$0,92 \pm 0,05$	$238,85 \pm 16,43$
ALG_4_0,5	$1339,4 \pm 63,6$	$0,94 \pm 0,03$	$229,50 \pm 11,87$
ALG_4_1,0	$1353,4 \pm 56,6$	$0,95 \pm 0,02$	$240,80 \pm 10,75$

Tabulka 2. Kvalitativní parametry částic



Obrázek 2. Uvolňování Cu^{2+} iontů v čase

Cytotoxický efekt Cu^{2+} iontů na Vero buňkách byl pozorován po dobu 4 dnů. Od 1. dne byla jako cytotoxická označena koncentrace 119,80 mg/l. Od 4. dne byl pozorován cytopatický efekt buněk při koncentraci mědi 11,98 mg/l.

Antimikrobiální účinek Cu^{2+} iontů byl popsán pomocí MIC (minimální inhibiční koncentrace). MIC vyjadřuje nejmenší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů (3). Pro *E. coli*, byla MIC po 20 hodinách inkubace mezi 0,448 – 0,471 mg/ml a pro *C. albicans* byla 1,100 – 1,861 mg/ml. Vyšší hodnota MIC pro *C. albicans* ve srovnání s MIC pro *E. coli* můžeme vysvětlit větší rezistencí kvasinek vůči antimikrobiálnímu účinku mědi (4).

Anti-HSV-2 účinek Cu^{2+} iontů byl prokázán v koncentraci 546 mg/ml, kdy se během plak redukčního testu nevytvořil žádný plak. V koncentraci 0,546 mg/ml se v každém ředění vytvořilo přibližně stejné množství plaků jako v ředěních samotného viru.

Závěr

Byly připraveny alginátové částice zesíťované Cu^{2+} ionty potenciálně vhodné k vaginálnímu podání, byl prokázán účinek proti nejčastěji se vyskytujícím vaginálním patogenům (*Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Herpes simplex*). Současně byl potvrzen toxický účinek mědi na buněčné úrovni, ovšem k jeho plnému rozvinutí dochází až čtvrtý den. Proto předpokládáme, že při potenciálním jednorázovém podání mikročástic s obsahem Cu^{2+} iontů by ovlivnění vaginálního epitelu na buněčné úrovni, bylo minimální.

Seznam literatury

1. OUWERX, C.; VELINGS, N.; MESTDAGH, M. M.; AXELOS, M. A. V. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 1998, 6, 393–408.
2. KEJDUŠOVÁ, M.; VYSLOUŽIL, J.; KUBOVÁ, K.; CELER, V.; KRÁSNÁ, M.; PECHOVÁ, A.; VYSKOČILOVÁ, V.; KOŠTÁL, V. Antimicrobial properties of microparticles based on carmellose cross-linked by Cu^{2+} ions. *BioMed Research International* 2014, <http://www.hindawi.com/journals/bmri/aa/790720/>.
3. MAGAÑA, S. M.; QUINTANA, P.; AGUILAR, D. H. et al. Antibacterial activity of montmorillonites modified with silver. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 2008, 281, 192–199.
4. WEISSMAN, Z.; BERDICEVSKY, I.; CAVARI B-Z.; KORNITZER, D. The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000, 97, 3520–3525.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 306/2015/FaF.

Izolace prenylovaných sloučenin s potenciální antiflogistickou aktivitou z kůry kořene *Morus alba*.

Marie Pokorná, Karel Šmejkal

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

Úvod

Morus alba L. je středně velký opadavý strom z čeledi Moraceae, jehož původní domovinou je centrální a severní Čína. Kůra kořene se v tradiční čínské medicíně uplatňuje jako antiflogistikum, diuretikum, antitusikum, expektorans nebo jako antipyretikum. [1] Předěšlé studie ukázaly, že z hlediska obsahových látek je bohatá na látky fenolické povahy, a to především prenylované flavonoidy, které vykazují zajímavou biologickou aktivitu, např. antibakteriální, cytotoxickou, protizánětlivou nebo neuroprotektivní. [3,4,5]

Materiál a metodika

Rostlinným materiálem byla kůra kořene *M. alba* získaná v areálu Veterinární a farmaceutické univerzity Brno v dubnu 2011. Identifikaci rostliny provedl PharmDr. Karel Šmejkal, Ph.D. (Ústav přírodních léčiv, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno). Vzorek kořene *M. alba* je uložen v herbáriu Ústavu přírodních léčiv (FaF VFU Brno).

K izolaci obsahových látek byla použita frakce MA2-III získána z chloroformové frakce ethanolickeho extraktu kůry kořene (zpracováno v rámci diplomové práce Separace přírodních látek pomocí různých chromatografických metod I).

Zpracování materiálu proběhlo pomocí různých chromatografických metod. Pro sloupcovou chromatografii byly použity kolony o rozměrech 7,6 × 93,2 cm a silikagel o velikosti zrn 40–63 μm. Chromatografie na tenké vrstvě byla provedena za použití desek Silikagel 60 F₂₅₄, 0,20 mm, vysokoúčinná kapalinová chromatografie přístrojem Agilent 1100 Series s DAD UV/Vis za použití analytických kolon Hypersil™ BDS C18 150 mm × 4,6 mm, velikost částic 5 μm a Ascentis® Express RP-Amide 150 mm × 4,6 mm, velikost částic 2,7 μm. Preparativní HPLC byla provedena pomocí Dionex Ultimate 3000 UHPLC se sběračem frakcí. Byly použity semipreparativní kolony Ascentis® RP-Amide 250 mm × 10 mm, velikost částic 5 μm, s RP-Amide předkolonou a Ascentis® C18 250 mm × 10 mm, velikost částic 5 μm, s předkolonou. UV spektra látek byla zaznamenána pomocí UV-Vis spektrometru Lambda 25 PerkinElmer Instruments, IČ spektra pomocí ATR metody na Nicolet Impact 400D FT-IR spektrometru. 1D a 2D spektra byla změřena 700 MHz NMR spektrometrem Bruker Avance III HD s kryosondou.

Frakce MA2-III (28,69 g) byla nejdříve rozdělena sloupcovou chromatografií. Byla použita mobilní fáze složená z benzenu, chloroformu a methanolu v poměru 6:3:1 (v/v/v). Jednotlivé frakce ze sloupce byly sbírány přibližně po 125 ml a bylo získáno 79 podílů, které byly analyzovány pomocí TLC a HPLC a na základě podobnosti spojeny do výsledných 11. Z frakce MA2-III byl pro další zpracování vybrán podíl s označením MA2-III-C a ten zpracován taktéž sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fáze byl použitý chloroform, benzen a methanol v poměru 48:45:7 (v/v/v). Získaných 74 podílů bylo vyhodnoceno pomocí TLC a HPLC a pospojováno do výsledných 11. Pro další zpracování byla vybrána frakce MA2-III-C-9-32 (23,62 g).

Frakce MA2-III-C-9-32 byla zpracována pomocí preparativní HPLC za zisku 6 frakcí, které byly opakovaně přečištěny taktéž preparativní HPLC. Složení mobilní fáze pro jednotlivé frakce udává Tabulka 1. Parametry metody: průtok 5 mL/min, objem nástřiku 20 μ L, detekce při 254 a 280 nm, teplota kolony 40°C.

Tabulka 2. Složení mobilních fází pro preparativní HPLC.

Čas (min)	MA2-III-C-9-32		MA2-III-C-9-32-1		MA2-III-C-9-32-6	
	MeCN	HCOOH 0,2%	MeOH	HCOOH 0,2%	MeCN	HCOOH 0,2%
0	80.0	20.0	45.0	55.0	85.0	15.0
36	100.0	0	100.0	0	100.0	0

Výsledky

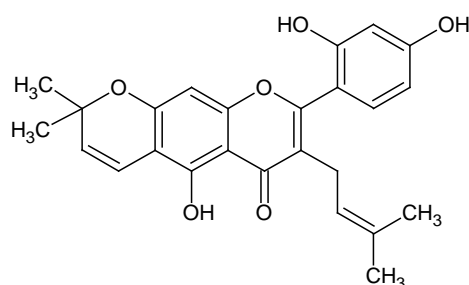
K izolaci obsahových látek byla použita chloroformová frakce ethanolického extraktu kůry kořene *M. alba*. Frakce byla pomocí TLC a sloupcové chromatografie rozdělena na směsi jednodušších látek, z nich byly za použití preparativní HPLC izolovány obsahové látky.

Podíly MA2-III a MA2-III-C byly postupně podrobeny sloupcové chromatografii, jednotlivé frakce porovnány pomocí TLC a HPLC a na základě podobnosti pospojovány. Pro izolaci čistých látek byla vybrána frakce MA2-III-C-9-32 a ta byla zpracována preparativní HPLC. Doposud byly z frakce MA2-III-C-9-32 získány 4 čisté látky. U každé látky bylo změřeno UV a IČ spektrum, 1D a 2D NMR.

Frakce MA2-III-C-9-32-4 byla získána jako téměř čistá látka (čistota 98,773 %, hodnoceno při 254 nm) a následně charakterizována pomocí HPLC, UV a IČ spektroskopie. Konečná struktura byla určena porovnáním se spektroskopickými daty uvedenými v předchozích pracích. Látka byla identifikována jako cudraflavon B (Obrázek 1).

Cudraflavon B, původně izolovaný z rostliny *Cudrania tricuspidata* (Moraceae), [2] byl již dříve izolován z *M. alba* a v provedených studiích vykázal zajímavou biologickou aktivitu. Byl dokázán jeho antiproliferativní, [3, 4] cytotoxický, [5] hepatoprotektivní, [6] neuroprotektivní [7] a protizánětlivý efekt. [4, 8]

Při zpracování frakce MA2-III-C bylo izolováno dostatečné množství cudraflavonu B (2000,92 mg) a ve spolupráci s Ústavem molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie byla látka testována na modelu chemicky indukovaného střevního zánětu vyvolaného kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou. Cudraflavon B redukoval tkáňové poškození makroskopicky i mikroskopicky. Dále byl cudraflavon B otestován *ex vivo* na izolovaném myším ileu. Ve studii vykázal na dávce závislý inhibiční účinek na střevní kontraktilitu (EC_{50} 32 μ M).



Obrázek 1: Cudraflavon B.

Frakce MA2-III-C-9-32-1 o hmotnosti 6,36 mg byla izolována o čistotě 96,481 % (hodnoceno při 280 nm). Naměřené UV spektrum vykazuje absorpční maxima při 210 nm, 233 nm a 286 nm, což by mohlo značit přítomnost flavanonu. [9] Frakce MA2-III-C-9-32-6-4 o hmotnosti 6,98 mg byla získána o čistotě 100 % (hodnoceno při 254 nm). Změřené UV spektrum látky vykazuje absorpční maxima při 202 nm, 238 nm a 270 nm. Dle UV spektra by se mohlo jednat o látku flavonové struktury. [9] Frakce MA2-III-C-9-32-6-6 byla získána jako čistá látka o hmotnosti 11,95 mg (hodnoceno při 280 nm). Látka vykazuje absorpční maxima při 207 nm, 267 nm a 337nm, což by mohlo poukazovat taktéž na přítomnost flavonoidního skeletu. [9] U všech tří látek probíhá v současné době identifikace naměřených NMR spekter, která umožní určit jejich konečnou strukturu.

Seznam literatury:

- [1] NOMURA, T. et al. Chemistry and biosynthesis of isoprenylated flavonoids from Japanese mulberry tree. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009, **85**, 391-408.
- [2] FUJIMOTO, T. et al. Components of root bark of *Cudrania tricuspidata*. 2. Structures of two new isoprenylated flavones, cudraflavones A and B. *Planta Medica*. 1984, **50**(2), 161–163.

- [3] LEE, H.-J. et al. Growth inhibition and apoptosis-inducing effects of cudraflavone B in human oral cancer cells via MAPK, NF- κ B, and SIRT1 signaling pathway. *Planta Medica*. 2013, **79**(14), 1298–1306.
- [4] KOLLÁR, P. et al. Prenylated Flavonoids from *Morus alba* L. Cause Inhibition of G1/S Transition in THP-1 Human Leukemia Cells and Prevent the Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013, 2013, 350519.
- [5] ARUNG, E. T. et al. Isoprenoid-substituted flavonoids from wood of *Artocarpus heterophyllus* on B16 melanoma cells: Cytotoxicity and structural criteria. *Fitoterapia*. 2010, **81**(2), 120–123.
- [6] OH, H. et al. Hepatoprotective and Free Radical Scavenging Activities of Prenylflavonoids, Coumarin, and Stilbene from *Morus alba*. *Planta Medica*. 2002, **68**(10), 932–934.
- [7] LEE, D.-S. et al. Cudarflavone B provides neuroprotection against glutamate-induced mouse hippocampal HT22 cell damage through the Nrf2 and PI3K/Akt signaling pathways. *Molecules*. 2014, **19**(8), 10818–10831.
- [8] HOŠEK, J. et al. Natural compound cudraflavone B shows promising anti-inflammatory properties in vitro. *Journal of Natural Products*. 2011, **74**(4), 614–619.
- [9] DE RIJKE, E. et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. 2006, **1112**(1–2), 31–63.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 313/2015/FaF.

Zlepšovanie predikcie biodostupnosti pomocou biorelevantnej disolúcie a *in vitro* – *in vivo* korelácií.

Ivan Stupák, Jakub Vysloužil, Jiří Dohnal, Martin Čulen
Fakulta farmácie, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Výroba generických liekov predstavuje dominantnú časť farmaceutického trhu, čo vedie k pochopiteľnému záujmu v témy ako vývoj generických formulácií či bioekvivalenčné štúdie. Za týmto účelom sa náš tím zameriava na inovatívnu *in vitro* disolúciu využitím dynamického biorelevantného disolučného zariadenia – Golem, ktorý fyziologicky simuluje disolúciu lieku v ľudskom trakte. Nová verzia tohto prístroja predstavuje vylepšenia v zmene tvaru kompartmentov a tiež kontrolovanej simulácie peristaltiky. Cieľom práce boli optimalizačné merania pre výber vhodného tvaru kompartmentov použitím liekovej formulácie s okamžitým uvoľňovaním a porovnaním s USP 2 metódou, ktorá sa považuje za zlatý štandard disolúcie.

Materiál a metodika

Tablety

K prvotnému skúšaniam boli vybrané tablety Acifein (Herbacos) s obsahom kyseliny acetysalicylovej (250 mg), paracetamolu (500 mg) a kofeínu (50 mg). K ďalšiemu a podrobnejšiemu skúšaniam boli použité kofeínové tablety vyrobené Ústavom technológie liečiv VFU Brno. Tablety s hmotnosťou $157,5 \pm 2,5$ mg obsahovali 18,6 mg kofeínu,

Podmienky skúšky disolúcie pre USP-2 a Golem v2

K skúškam disolúcie boli použité média ako destilovaná voda, FaSSGF (fasted state simulated gastric fluid) a fosfátový pufer o pH 6,8.

Disolúcia USP 2 metódou prebiehala na zariadení SOTAX (AT 7 Donau Lab, Switzerland) pri objeme média 500 ml, s využitím pádiel pri 50 ot./min, teplote $37,0 \pm 5$ °C a vzorky boli odoberané podľa nami zvolenej metódy každých 5 minút v intervale 3. – 62. min, prefiltrované (22 µm filter) a následne analyzované HPLC metódou (v prípade tabliet Acifein-u) alebo spektrofotometricky zmerané po 3, 8, 12, 17, 22, 27, 33 a 40 minútach v prípade vyrobených tabliet kofeínu. Každý disolučný profil pozostával z min. 5 meraných tabliet a každá odoberaná vzorka bola analyzovaná 3 krát a štatisticky vyhodnotená v MS Excel.

Disolúcia na prístroji Golem v2 (AVČR, Česká Republika) prebiehala v 250 ml média, pri nastavení miešania pádlami 7 ot./min, teplote $37,0 \pm 5$ °C, pričom vzorky boli odoberané po 3, 8,

12, 17, 22, 27, 33, 40, 50 a 60 minútach, filtrované cez 22 µm filter a následne podrobené HPLC analýze. Každý disolučný profil pozostával z min. 2 meraní.

Nastavenie HPLC analýzy

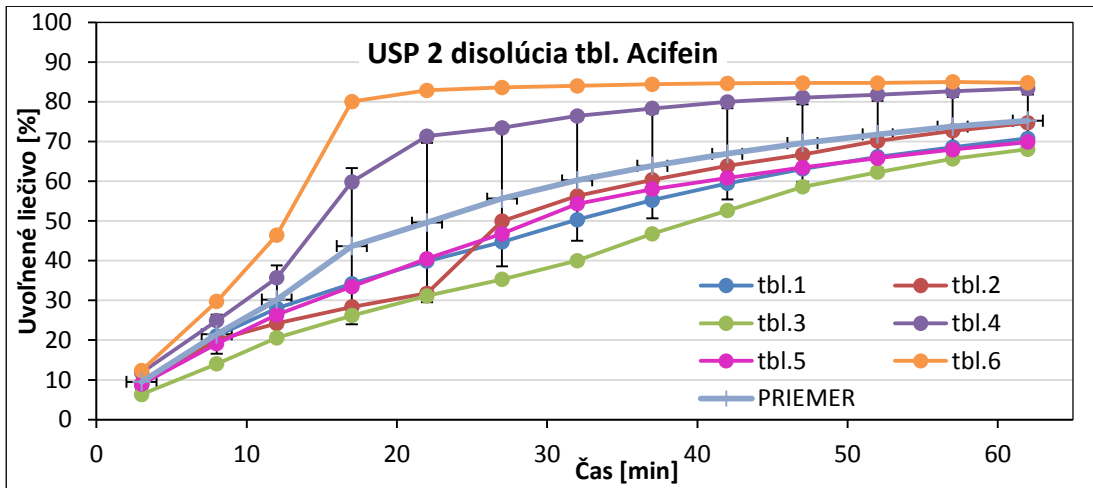
HPLC analýza prebiehala na sústave Agilent Technologies 1260 Infinity na kolóne s reverznou fázou Supercosil ABZ+Plus (15 cm x 4,6 mm, 3 µm). Ako metóda bola vyvinutá izokratická elúcia so složením mobilnej fázy 50 mM octanu amónneho adjustovaného na pH 4 (80%) a metanolu (20%), pri prietoku kolónou 1,5 ml/min, teplote 40 °C s objemom nástreku 10 µl a pri detekcii 294 nm. Metóda je rýchla a celkový čas nepresahuje 4 min, variabilita meraní je menšia ako 0,1% (RSD, n=6) a rozsah kalibrácie pre stanovenie kofeínu je 3-300 µg/ml (R=0,996).

Výsledky

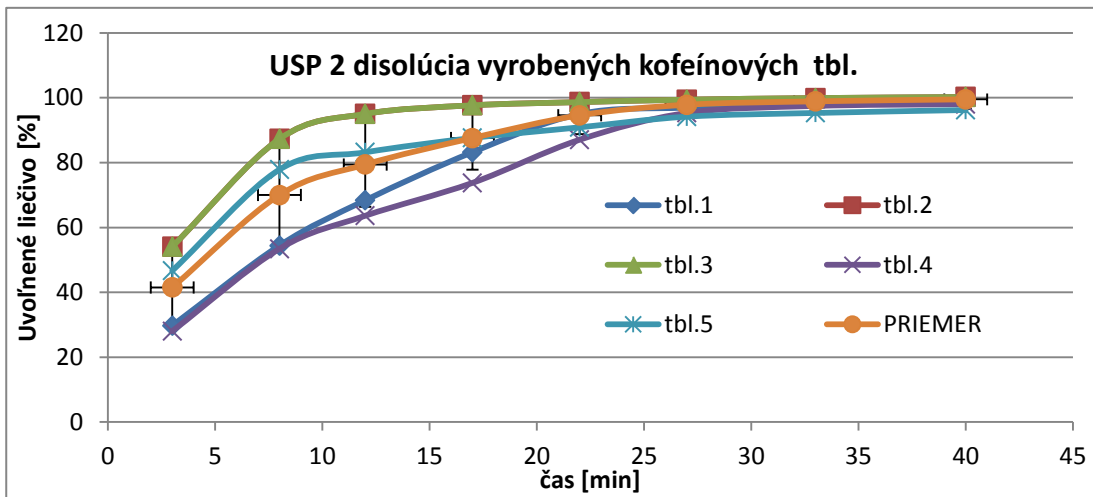
Za účelom analyzovania tabliet Acifein-u bola vyvinutá a optimalizovaná metóda HPLC k rýchlemu, lineárnemu a reprodukovateľnému analyzovaniu vzoriek. Úvodné merania tabliet Acifein-u na prístroji Golem boli za účelom rozlíšenia a optimalizovania kompartmentov (Obr.1), ktoré by poskytovali rýchlu disolúciu a reprodukovateľné výsledky. Výsledky disolúcie USP 2 metódy mali byť referenčnými, avšak odhalili veľkú variabilitu tabliet Acifein-u (Graf č.1), čím zpochybnili vyhodnotenie všetkých výsledkov disolúcií týchto tabliet na prístroji Golem. To iniciovalo výrobu kofeínových tabliet. Taktiež z väčšieho počtu pôvodných kompartmentov sa vyseletovali preč tie, ktoré veľkostne mali hraničný objem s 250 ml alebo mali tendenciu pretekať kvôli nestabilným zvarom. K ďalšiemu a citlivejšiemu porovnaniu použitím kofeínových tabliet boli podrobené kompartmenty s označením A,B,C a D (Obr.2), ktoré boli navrhnuté na základe predchádzajúcich selektívnych kritérií. Výsledky disolúcie kofeínových tabliet metódou USP 2 sú zhrnuté v grafe č.2 a z disolučného zariadenia Golem v grafe č.3. Z výsledkov je patrné, že práve typ kompartmentu C sa v tomto podstatne líši nízkou variabilitou a najrýchlejšou disolúciou.



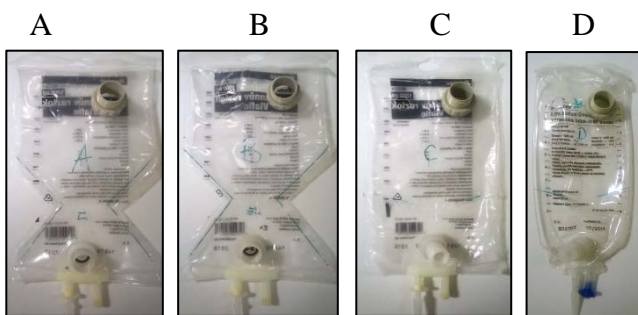
Obr.1: Rozdielne tvarované kompartmenty (V,Y,U,I,Z,K a X) testované na prístroji Golem.



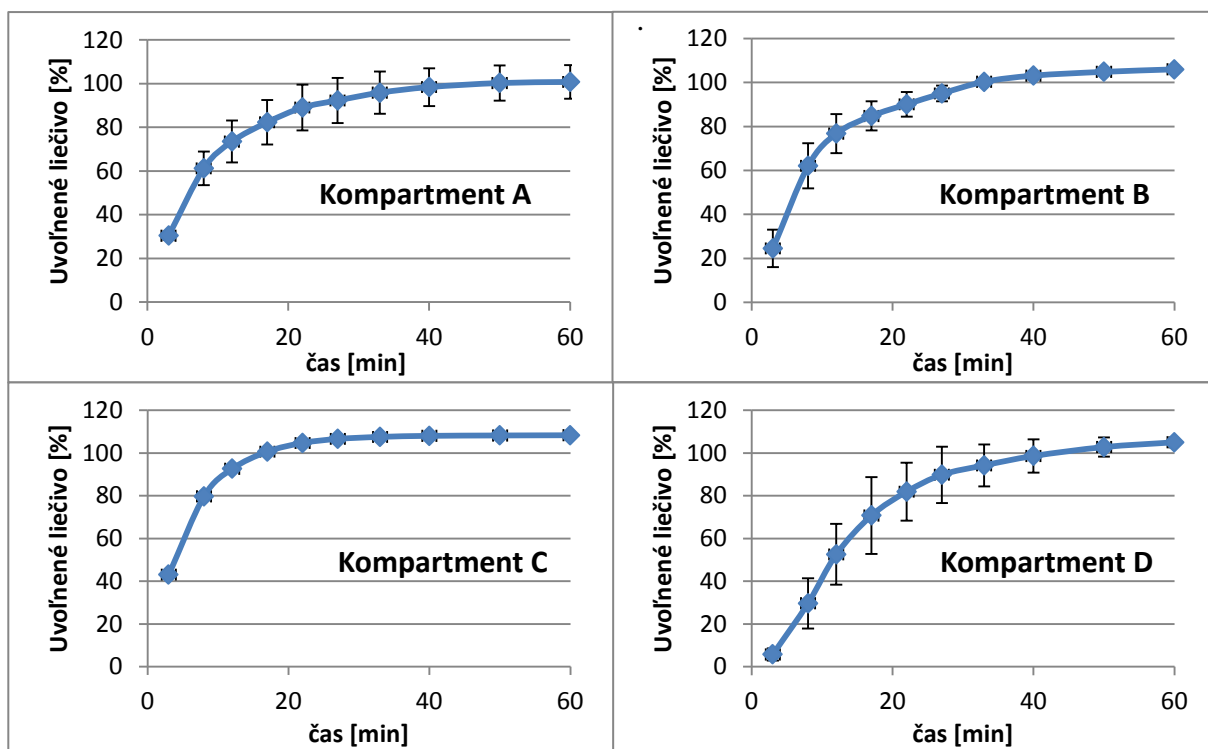
Graf 1: Disolučný profil 6 tabliet Acifein-u v médiu FaSSFG metódou USP 2.



Graf 2: Disolučný profil 5 kofeínových tbl. vo fosfátovom pufrý s pH 6,8 metódou USP 2.



Obr.2: Nové kompartmenty s označením A-D podrobené disolúcií s kofeínovými tabletami.



Graf 3: Porovnanie disolučného profilu kofeínových tbl. v kompartmentoch A-D vo fosfátovom pufry s pH 6,8 v prístroji Golem.

Záver

V rámci optimalizácie prístroji Golem v2 sa skúmali nové kompartmenty na základe disolúcií najprv tabliet Acifeín-u a neskôr vyrobených tabliet s kofeínom, ktoré sa porovnávali so štandardnou disolúciou USP 2. Všimli sme si predovšetkým schopnosť reprodukovateľnosti a najnižšej variability s možnosťou získania čo najrýchlejšej disolúcie pre vytvorenie čím väčšieho pracovného rozsahu. Zo skúmaných kompartmentov najlepšie obstal kompartment C.

Práca bola financovaná v rámci projektu IGA 318/2015/FaF.

Zoznam literatúry:

- [1] Culen M., Rezacova A., Jampilek J., Dohnal J. Designing a dynamic dissolution method: a review of instrumental options and corresponding physiology of stomach and small intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013;102(9):2995–3017. doi: 10.1002/jps.23494.
- [2] Culen M, Tuszyński PK, Polak S, Jachowicz R, Mendyk A, Dohnal J. Development of *In Vitro-In Vivo* Correlation/Relationship Modeling Approaches for Immediate Release Formulations Using Compartmental Dynamic Dissolution Data from “Golem”: A Novel Apparatus. *BioMed Research International*. 2015;2015:328628. doi:10.1155/2015/328628.

Vliv cudraflavonu B na expresi a aktivitu zánětlivých markerů

u experimentálního modelu kolitidy potkana

Zora Vochyánová, Dominik Rotrekl, Jan Hošek

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

Úvod

Flavonoidy jsou skupinou sekundárních rostlinných metabolitů s širokým spektrem biologických aktivit. Mezi nejvíce prostudované patří jejich antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Ty by se mohly uplatnit v terapii chronických zánětlivých onemocnění, jakou jsou nespecifické střevní záněty (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida) nebo revmatoidní artritida. Prenylované flavonoidy mají základní skelet substituovaný isoprenooidními řetězci. Lipofilní substituce může urychlit jejich absorpci, snížit efflux z buňky a zvýšit afinitu k biologickým membránám, tudíž i bioaktivitu. Cudraflavon B je flavon modifikovaný dvěma prenylovými jednotkami, které výrazně zvyšují jeho lipofilitu. Předchozí *in vitro* studie potvrdily jeho cytoprotektivní (1) a potenciální protizánětlivé účinky (2), ale zároveň poukazují na jeho možný pro-oxidační efekt (3). Cílem této práce bylo otestovat jeho aktivitu na modelu kolitidy indukované kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou (TNBS) v závislosti na dávce a porovnat ji s konvenčně používaným léčivem.

Materiál a metodika

Uspořádání experimentu

K pokusu byli použiti potkani kmene Wistar samčího pohlaví (180–220 g; Chovné a uživatelské zařízení laboratorních zvířat, Masarykova univerzita, Brno). Během experimentu byly dodrženy standardní podmínky chovu stanovené vyhláškou č. 419/2012 Sb. Metodika pokusu byla schválena Odbornou komisí pro zajišťování dobrých životních podmínek pokusných zvířat VFU Brno (projekt č. 19-2015).

Zvířata byla rozdělena do šesti skupin. Kolitida byla indukovaná jednorázovou rektální aplikací 50 mg/kg ethanolického roztoku TNBS (50% v/v) v celkové inhalační anestezii. Intaktní skupině byl podán fyziologický roztok. 24 hodin po indukci kolitidy byla zahájena terapie cudraflavonem B v dávkách 12,5, 25 a 50 mg/kg a sulfasalazinem (50 mg/kg). Testované látky byly suspendovány v 10% PVP K30 (polyvinylpyrrolidon K30) a byly aplikovány každých 24 hodin gastrickou sondou po dobu pěti dní. Zvířatům v intaktní a neléčené skupině bylo podáváno pouze vehikulum.

V průběhu experimentu byla sledována hmotnost zvířat a symptomy kolitidy. Sedmý den experimentu byla zvířata usmrcena injekční aplikací přípravku T61. Tlusté střevo bylo vyjmuto, očištěno fyziologickým roztokem, změřeno a zváženo. Následně byly odebrány vzorky pro histologické hodnocení a zbytek střevní tkáně byl uchován při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro analýzu exprese a aktivity proteinů.

Makroskopické a mikroskopické skóre

Makroskopické poškození bylo hodnoceno následovně: 0 = bez ulcerací, 1 = hyperemie, 2 = mírný edém sliznice, 3 = středně závažný edém s erozemi, 4 = ulcerace $< 0,5\text{ cm}$, 5 = ulcerace $> 0,5\text{ cm}$. Vzorky pro histologickou analýzu byly obarveny hematoxylin-eosinem a byla sledována intenzita zánětu a míra infiltrace imunokompetentními buňkami (0–3 body), rozsah zánětu (0–3 body) a poškození krypt (0–4 body) (4).

Analýza Western blot

1 g střevní tkáně byl homogenizován v lyzačním roztoku s přidavkem inhibitorů proteáz. Lyzát střevní tkáně byl použit pro analýzu exprese enzymů spojených s antioxidační aktivitou [superoxid dismutáza 2 (SOD2), kataláza (CAT)], zánětlivým procesem [interleukin 1β (IL- 1β), transformující růstový faktor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), cyklooxygenáza 2 (COX-2)] a degradací tkáně [matrix-metaloproteináza 2 (MMP2)]. 120 μg proteinu bylo rozděleno na denaturujícím SDS-polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a následně přeneseno na PVDF membránu. Po blokaci membrány v 5% roztoku BSA v TBST byla membrána inkubována přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ s primární protilátkou a následně po 1 hodinu při laboratorní teplotě se sekundární protilátkou značenou peroxidázou. Chemiluminiscenční signál byl detekován zobrazovacím systémem PXi Syngene a následně vyhodnocen denzitometricky (Gene Tools Software 4.03).

Zymografie

Lyzát střevní tkáně byl použit ke stanovení aktivity matrix-metaloproteináz (MMP) 2 a 9. 20 μg proteinu bylo rozděleno na SDS-PAGE s 0,1% želatinou, promyto v 2,5% Tritonu X-100 a inkubováno ve vyvíjecím pufru po dobu 15 minut při laboratorní teplotě a následně přes noc při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté byl gel obarven Coomasie blue a lytické zóny byly analyzovány denzitometricky (Gene Tools Software 4.03).

Statistická analýza

Pro statistické vyhodnocení byla použita jednosměrná analýza rozptylu s Tukeyovým *post hoc* testem (GraphPad Prism 5.01). Za statisticky významné byly považovány hodnoty $p < 0,05$.

Výsledky

Model kolitidy indukovaný TNBS představuje akutní střevní zánět, který svými rysy připomíná Crohnovu chorobu. Jednorázová rektální aplikace TNBS vyvolala makroskopicky viditelné poškození sliznice tlustého střeva se ztluštěním a překrvením střevní stěny a ulceracemi do velikosti 10 mm. Poškození zahrnovalo všechny vrstvy střevní stěny, u některých pokusných zvířat byly zároveň patrné adheze k ostatním orgánům v břišní dutině. Makroskopické skóre poškození bylo statisticky významně sníženo u skupin léčených cudraflavonem B v dávce 12,5 mg/kg o 41 % ($p < 0,05$) a 25 mg/kg ($p < 0,01$) o 50 %. U skupiny zvířat s nejvyšší dávkou cudraflavonu B (50 mg/kg) byla patrná značná variabilita poškození tkáně, celkové skóre skupiny se však nelišilo od neléčených zvířat. Terapie sulfasalazinem snížila skóre nesignifikantně o 36 %. Poměr váhy a délky střeva se u jednotlivých skupin nelišil.

Histologické hodnocení prokázalo u neléčené skupiny středně závažný až závažný zánět postihující mukózu, submukózu nebo všechny vrstvy střevní stěny, vyšší stupeň infiltrace imunokompetentními buňkami a výrazné poškození krypt. Cudraflavon B redukoval rozsah zánětu, infiltraci i poškození krypt v závislosti na dávce, v některých případech byla patrná regenerace krypt. Signifikantní snížení mikroskopického skóre bylo dosaženo při dávce 25 mg/kg ($p < 0,05$), srovnatelně se sulfasalazinem. Stejně jako u makroskopického hodnocení, u skupiny léčené dávkou 50 mg/kg se postižení tkáně výrazně lišilo u jednotlivých vzorků.

Do patogeneze nespecifických střevních zánětů (IBD) je zapojena řada imunokompetentních buněk produkující zánětlivé cytokiny, mediátory a reaktivní kyslíkové částice. V této práci jsme analyzovali expresi a aktivitu proteinů spojených se zánětlivou reakcí, jejichž up-regulace byla potvrzena u pacientů s IBD. Jedná se o IL-1 β , jehož zvýšená exprese je charakteristická pro období akutního vzplanutí nespecifických střevních zánětů, COX-2, enzymu zapojeného do produkce zánětlivých mediátorů, TGF β 1, cytokinu regulujícího střevní zánět a fibrotizaci, MMP 2 a 9, enzymů zapojených do destrukce a remodelace tkáně, a antioxidačních enzymů CAT a SOD2. Výsledky jsou zobrazeny v tabulce č. 1 a 2.

Tabulka č. 1: Exprese enzymů.

	IL-1 β	COX-2	TGF β 1	CAT	SOD2
intaktní	1,00 \pm 0,15	1,00 \pm 0,29	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,14	1,00 \pm 0,13
TNBS (neléčená)	2,46 \pm 0,64	0,71 \pm 0,17	1,25 \pm 0,13	2,73 \pm 0,51 ^{###}	2,30 \pm 0,37
cudraflavon B 12,5 mg/kg	0,92 \pm 0,08	0,83 \pm 0,25	0,78 \pm 0,09*	1,38 \pm 0,13	1,24 \pm 0,13
cudraflavon B 25 mg/kg	4,74 \pm 1,05	2,50 \pm 0,71*	0,84 \pm 0,09	3,33 \pm 0,52	2,91 \pm 0,69
cudraflavon B 50 mg/kg	4,56 \pm 0,74	0,71 \pm 0,25	0,63 \pm 0,06 ^{***}	1,81 \pm 0,29	1,67 \pm 0,19
sulfasalazin 50 mg/kg	3,62 \pm 0,18	1,25 \pm 0,29	0,63 \pm 0,09 ^{***}	0,94 \pm 0,16 ^{**}	1,93 \pm 0,21

Množství proteinu intaktní skupiny byla přiřazena hodnota 1. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (vztaženo k intaktní skupině). TNBS vs. léčené skupiny: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. TNBS vs. intaktní skupina: ## $p < 0,01$.

Tabulka č. 2: Aktivita matrix metaloproteináz 2 a 9.

	MMP9	MMP2	pro-MMP2	akt. MMP2	pro-/MMP2
intaktní	1,00 ± 0,11	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,12	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,18
TNBS (neléčená)	1,65 ± 0,13 ^{##}	1,36 ± 0,05 ^{###}	1,80 ± 0,11 ^{####}	0,88 ± 0,06	1,93 ± 0,19
cudraflavon B 12,5 mg/kg	0,53 ± 0,13 ^{****}	0,83 ± 0,08 ^{****}	1,11 ± 0,05 ^{****}	0,53 ± 0,17	4,37 ± 1,59
cudraflavon B 25 mg/kg	0,70 ± 0,12 ^{****}	0,68 ± 0,04 ^{****}	1,14 ± 0,06 ^{****}	0,14 ± 0,01 ^{***}	7,54 ± 1,18
cudraflavon B 50 mg/kg	0,51 ± 0,06 ^{****}	0,60 ± 0,01 ^{****}	1,07 ± 0,02 ^{****}	0,08 ± 0,01 ^{****}	11,49 ± 2,19 ^{**}
sulfasalazin 50 mg/kg	0,47 ± 0,10 ^{****}	0,71 ± 0,05 ^{****}	1,09 ± 0,04 ^{****}	0,28 ± 0,11 ^{**}	8,69 ± 2,20 [*]

Množství proteinu intaktní skupiny byla přiřazena hodnota 1. Data jsou vyjádřena jako průměr ± SEM (vztaženo k intaktní skupině). TNBS vs. léčené skupiny: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$. TNBS vs. intaktní skupina: ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, #### $p < 0,0001$.

Závěr

Cudraflavon B prokázal svůj terapeutický účinek v *in vivo* podmínkách na modelu kolitidy indukované kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou. Makroskopické i mikroskopické skóre poškození se snižovalo s rostoucí dávkou flavonu (12,5 a 25 mg/kg), nicméně použití vysokých dávek (50 mg/kg) nemusí být efektivní kvůli jeho možným pro-oxidačním vlastnostem. Zajímavým mechanismem účinku je inhibice aktivity matrix metaloproteináz. MMP9 je významným mediátorem tkáňového poškození a soustředí se na ni řada studií jako na nový terapeutický cíl u onkologických a chronických zánětlivých stavů. Následující výzkum by se měl zaměřit na hodnocení efektu dlouhodobé terapie cudraflavonem B v nízkých dávkách.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 310/2015/FaF.

Seznam literatury:

- 1) LEE, D. S., KO, W., KIM, D. Ch., KIM, Y. Ch., JEONG, G. S.: Cudraflavone B Provides Neuroprotection against Glutamate-Induced Mouse Hippocampal HT22 Cell Damage through the Nrf2 and PI3K/Akt Signaling Pathways. *Molecules*. 2014, 19, 10818–10831.
- 2) ZELOVÁ, H., HANÁKOVÁ, Z., ČERMÁKOVÁ, Z., ŠMEJKAL, K., DALL'ACQUA, S., BABULA, P., CVAČKA, J., HOŠEK, J.: Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Prenylated Substances Isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. *Journal of Natural Products*. 2014, 77, 1297–1303.
- 3) HOŠEK, J., TONIOLO, A., NEUWIRTH, O., BOLEGO, Ch.: Prenylated and Geranylated Flavonoids Increase Production of Reactive Oxygen Species in Mouse Macrophages but Inhibit the Inflammatory Response. *Journal of Natural Products*. 2013, 76, 1586–1591.

- 4) MINAIYAN, M., GHANNADI, A., ASADI, M., ETARNAD, M., MAHZOUNI, P.: Anti-inflammatory effect of *Prunus armeniaca* L. (Apricot) extracts ameliorates TNBS-induced ulcerative colitis in rats. *Research in Pharmaceutical Sciences*. 2014, 9, 225–231.

Příprava a hodnocení matricových orálních filmů jako potenciálních nosičů léčiv

Veronika Walicová, Jan Gajdziok, David Vetchý, Markéta Gajdošová, Adéla Kulhánková,
Michaela Fabíková

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

Úvod

Orální filmy (konkrétně mukoadhezivní a orodispergovatelné filmy) lze zařadit mezi moderní pevné lékové formy pro orální podání léčiv, kdy v závislosti na designu lékové formy může být dosaženo jak lokálního, tak i systémového účinku¹⁾. Mukoadhezivní filmy (MAF) představují jednovrstvé nebo vícevrstvé „plátky“, jejichž hlavními konstitutivními pomocnými látkami jsou hydrofilní mukoadhezivní polymery, které po zvlhčení slinami vytvoří hydrogel, jenž přilne ke sliznici dutiny ústní²⁾. Orodispergovatelné filmy (ODF) se po aplikaci do dutiny ústní velmi rychle rozpadají a uvolňují léčivou látku během několika sekund¹⁾.

Orální filmy vynikají řadou výhodných vlastností, především se jedná o vysoký aplikační komfort, flexibilitu lékové formy, přesné dávkování a možnost snadného přerušování terapie. Orální filmy rovněž představují perspektivní lékovou formu pro pacienty s polykacími obtížemi, jako jsou děti, geriatrictí pacienti a duševně nemocní. Dále jsou vhodné v případě potřeby rychlého nástupu účinku¹⁾. Orální filmy jsou již na farmaceutickém trhu dostupnou lékovou formou. V ČR je registrovaný např. bukalní film Breakyl s obsahem fentanylu, indikovaný k léčbě pronikavé bolesti u dospělých s nádorovým onemocněním nebo ODF určený k léčbě závislosti na tabáku NiQuitin Mint s obsahem nikotinu³⁾.

Cílem projektu byla formulace a hodnocení fyzikálně-mechanických vlastností orálních matricových filmů použitelných jako nosiče léčiva pro mukoadhezivní nebo orodispergovatelné přípravky do dutiny ústní.

Materiál

Orální mukoadhezivní filmy

Pro přípravu matrice orálních MAF se použil hyaluronát sodný (HS – HySilk, Contipro Pharma, CZ) s Mr 0,260 MDa a s Mr 0,383 MDa jako mukoadhezivní polymer s přepokládaným pozitivním účinkem na hojení lézí sliznice dutiny ústní. Druhým mukoadhezivním polymerem byla karmelosa sodná sůl (NaCMC – Blanose typ 7LF-Ph, Ashland Aqualon Functional Ingredients, USA) s Mr 0,091 MDa. Pro zvýšení flexibility a snížení křehkosti filmů se přidával do všech odlévacích

disperzí plastifikátor glycerol (Dr. Kulich Pharma, CZ) v koncentraci 3 % (w/w). Použitým rozpouštědlem byla čištěná voda.

Orodispergovatelné filmy

Základem matrice ODF byly maltodextriny Glucidex 6 (dextrosový ekvivalent 5 – 8) a Glucidex 9 (dextrosový ekvivalent 8 – 10) (Roquette, F). Za účelem snížení lepivosti se do všech filmů přidávalo plnivo mikrokrystalická celulóza Avicel PH-101 (MCC, FMC BioPolymer, USA). Ve funkci plastifikátoru se použily polyoly - glycerol v koncentraci 3 % (w/w), nebo sorbitol, respektive xylitol, v koncentraci 7 % (w/w) (Dr. Kulich Pharma, CZ). Do filmů s obsahem plastifikátoru glycerolu se navíc přidával tenzid Tween 80 (AppliChem, SRN), který omezil shlukování MCC ve filmu. Použitým rozpouštědlem byla čištěná voda.

Metodika

Příprava filmů metodou odpařování rozpouštědla

Metodou odpařování rozpouštědla se připravily jak MAF s obsahem HS, tak také ODF z maltodextrinů.

V případě jednovrstvých MAF se nejdříve připravila odlévací disperze nabobtnáním mukoadhezivních polymerů v roztoku glycerolu a čištěné vody. Celková koncentrace mukoadhezivních polymerů v disperzi byla vždy 2,5 % (w/w) – NaCMC a HS samostatně nebo v kombinaci NaCMC s HS. Po homogenizaci disperzí přístrojem Ultra-turrax[®] (IKA[®] Werke, SRN) a odstranění vzduchových bublin ultrazvukem (Sonorex RK52H, Bandelin, SRN) se do plastových kruhových forem o průměru 63 mm automatickou pipetou (Brand, VB) odebralo 18 ml příslušné disperze. Po částečném odpaření vody se po 48 h doplnilo do každé formy dalších 9 ml příslušné disperze. Po 14 dnech sušení při pokojové teplotě se u připravených filmů provedlo hodnocení mechanické odolnosti a dalších kvalitativních parametrů.

Disperze pro odlévání ODF se připravila rozpouštěním maltodextrinů na vodní lázni (80 °C) v roztoku plastifikátoru v čištěné vodě. Koncentrace maltodextrinu v odlévací disperzi byla vždy 15 % (w/w). Po úplném rozpuštění maltodextrinů, ochlazení a doplnění odpařené vody se do každé disperze přidala MCC za neustálého míchání hřídelovým míchadlem (RZR 2021, Heidolph Instruments, SRN) při rychlosti otáčení 300 rpm tak, aby koncentrace MCC v odlévací disperzi byla 3 % (w/w). V případě disperzí s obsahem glycerolu se před přidáním MCC zapracoval tenzid, jehož koncentrace v odlévací disperzi byla 0,5 % (w/w). Během procesu odlévání se disperze umístila na magnetickou míchačku (MR Hel-Mix S, Heidolph Instruments, SRN), aby se zabránilo

sedimentaci MCC. Pomocí automatické pipety (Brand, VB) se do kruhových plastových forem o průměru 63 mm nadávkovalo 10 ml disperze s obsahem plastifikátoru glycerolu nebo 8 ml disperze s plastifikátorem sorbitolem, respektive xylitolem. Sušení filmů probíhalo v horkovzdušné sušárně při teplotě 30 °C po dobu 24 h a následně se u připravených filmů provedlo hodnocení mechanických vlastností.

Metoda „sušení gelu“

Inovativní metoda „sušení gelu“ se využila paralelně k metodě odpařování rozpouštědla při přípravě ODF z maltodextrinů. V třence se smísil maltodextrin s roztokem čištěné vody s glycerolem a MCC v poměru 2:1:0,5. Koncentrace glycerolu ve směsi byla 3 % (w/w). Vzniklou směsí se naplnila injekční stříkačka o objemu 20 ml. Po 24 h uchování v chladničce se vzniklý váleček nakrájel kráječem (Graef vivo V20, SRN) na plátky o průměru 20 mm a tloušťce 2 mm. Sušení filmů probíhalo po dobu 24 h při pokojové teplotě.

Použité metody hodnocení

U všech filmů připravených metodou odpařování rozpouštědla se provedlo měření mechanické odolnosti pomocí analyzátoru textury Texture Analyzer CT3 (Brookfield Engineering, USA). Hodnotila se odolnost filmů proti protržení (síla potřebná k protržení filmu) a roztržení (pevnost filmu v tahu). Z důvodu možnosti vzájemné porovnatelnosti výsledků jsou výsledné hodnoty vztaženy na film o tloušťce 100 μm. Tloušťka připravených filmů se měřila pomocí optického mikroskopu SMZ 1500 (Nikon, JAP).

Výsledky

Důležitým parametrem mechanické odolnosti orálních filmů je hodnocení síly potřebné k protržení filmu a hodnota pevnosti v tahu. Se zvyšující se koncentrací HS ve formulaci se snižovala síla potřebná k protržení filmu i pevnost filmu v tahu; větší snížení mechanické odolnosti je patrné u vzorků s HS o vyšší Mr (Tab. 1). U ODF se mechanická odolnost filmu odvíjela od hodnoty dextrosového ekvivalentu maltodextrinu a od typu použitého plastifikátoru (Tab. 2). S nárůstem hodnoty dextrosového ekvivalentu se snížila mechanická odolnost filmů. Nejnížší mechanická odolnost se zaznamenala u vzorků s obsahem glycerolu.

Tab. 1: Mechanická odolnost MAF

Vzorek	Síla protržení [N]	Pevnost v tahu [N·cm ⁻²]	
2,5% NaCMC	4,14	568,51	
HS 0,260 MDa	2% NaCMC - 0,5% HS	3,14	457,56
	1,5% NaCMC - 1% HS	1,83	450,69
	1% NaCMC - 1,5% HS	0,67	75,05
	0,5% NaCMC - 2% HS	0,34	22,35
	2,5% HS	0,25	19,79
	HS 0,383 MDa	2% NaCMC 0,5% HS	0,88
1,5% NaCMC 1% HS		0,31	207,04
1% NaCMC 1,5% HS		0,11	31,73
0,5% NaCMC 2% HS		0,09	18,55
2,5% HS		0,10	17,42

Tab. 2: Mechanická odolnost ODF

Vzorek	Síla protržení [N]	Pevnost v tahu [N·cm ⁻²]	
Glucidex 6	Glycerol	2,21	381,08
	Sorbitol	3,08	439,27
	Xylitol	2,68	334,00
Glucidex 9	Glycerol	0,39	-
	Sorbitol	1,40	406,66
	Xylitol	0,88	265,69

Závěr

V rámci řešení projektu se připravily a zhodnotily matricové mukoadhezivní filmy určené k urychlení hojení lézí sliznice dutiny ústní a orodispergovatelné filmy vhodné pro zpracování široké palety léčiv. Připravené filmy musí být dostatečně mechanické odolné, aby byla zajištěna snadná manipulace s lékovou formou. Na základě provedených hodnocení vyplývá, že pro orální podání na sliznici dutiny ústní jsou nejvhodnější filmy s nízkým obsahem hyaluronátu sodného o nižší Mr. Mechanicky odolnější orodispergovatelné filmy s obsahem sorbitolu a xylitolu budou použity jako matrice pro zpracování léčiva.

Seznam literatury:

1) PREIS, M., CH. WOERTZ, P. KLEINEBUDE a J. BREITKREUTZ. Oromucosal film preparations: classification and characterization methods. *Expert Opinion Drug Delivery*. 2013, **10** (9), 1303 – 1317.

2) *Český lékopis 2009 – Doplněk 2013*. Praha: Grada, 2013.

3) Databáze léků. SÚKL [online]. 2015 [cit. 2015-11-18].

Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno č. 308/2015/FaF.

Editovali:	Doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D. Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. Prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D. Prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc. Doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	208
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2015

ISBN 978-80-7305-766-4