

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

BRNO 2014

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2014

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2014 financovaných z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2014

Editovali:

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

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D.

prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2014

ISBN 978-80-7305-756-5

Vážené kolegyně/Vážení kolegové

Sborník, který právě otvíráte, je výstupem konference Interní grantové agentury Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Právě konference, na které řešitelé z Fakulty veterinární medicíny, Fakulty veterinární hygieny a ekologie a Farmaceutické fakulty prezentovali své příspěvky k projektům, které řešili v rámci specifického výzkumu, podporuje možnost a způsob, jak navzájem spolupracovat při svém různorodém odborném zaměření.

Je důležité, že díky této aktivitě je posilována podpora vědy, výzkumu a zesíleny možnosti inovací v oblasti veterinárních, veterinárně-hygienických, potravinářských a farmaceutických věd.

Děkuji všem

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

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

předsedkyně IGA komise VFU

OBSAH

Příspěvky FVL

Funkce kaspázy-3 v osteogenezi.....	2
Studium mechanizmů omezujících vývoj náhradních generací zubů.....	5
Vliv nedostatku železa a chladového stresu na produkci thyroïdních hormonů a termoregulaci selat.....	9
Ověření biomechanických vlastností a cytotoxicity nového resorbovatelného polymerního gelu vyvinutého k výplni kostních defektů.....	12
Úloha ježků v koloběhu zoonóz v urbánních ekosystémech a v lidské péči.....	16
Dynamika změn koncentrací imunoaktivních látek v kolostru.....	19
Studium sezónní myopatie u koní v České republice.....	22
Vliv infekcí strongylidními hlísticemi na výskyt malárie u lidoopů a lidí.....	25
Význam infekce a aktivity EHV2 při vzniku klinického onemocnění herpesvirovou keratitidou u koní.....	28
Charakteristika multirezistentních izolátů salmonel z odpadních vod a racků metodami molekulární biologie.....	30
Genetická a fylogenetická analýza trusem vylučovaných parvovirů afrických primátů.....	34
Metoda Next Generation Sequencing jako nový nástroj k diagnostice diverzity protozoárních patogenů kmene v klíšťatech ze psů.....	37
Vliv neuromuskulární blokády na respirační a kardiovaskulární parametry při laparoskopii u psů.....	40
Korelace morfologického hodnocení retikulocytů s jejich kvantifikací na základě fluorescenční průtokové cytometrie v periferní krvi u anemických psů a koček.....	44
Základní charakteristiky mechanického testování in vitro na modelu krční páteře psa.....	47
Dynamika kolonizace střeva telat Escherichia coli tvořící ESBL v podmínkách mléčné farmy.....	50
Vylučování kmenů Escherichia coli produkující ESBL ve výkalech prasnic a jejich selat na velkokapacitní farmě.....	54

Příspěvky FVHE

Efekt platinových kovů na reprodukci roupice druhu <i>Enchytraeus crypticus</i>	59
Monitoring výskytu vztekliny a reziduí těžkých kovů u středoevropských netopýrů.....	63
Průkaz mléčné bílkoviny a karagenanů v masných výrobcích.....	66
Využití rakytníkových výlisků v dietě užitkových nosnic.....	69
Optimalizace metod pro stanovení methylrtuti ve vodním ekosystému.....	72
Účinky ciprofloxacinu na ryby se zaměřením na vybrané markery oxidačního stresu.....	75
Kolostrum jako zdroj významných biomolekul a jejich dynamika v průběhu laktace.....	78
Možnosti terapie nematodózy lososovitých ryb chovaných v recirkulačním systému dánského typu.....	81
Rozšíření a diverzita IncX plazmidů nesoucích geny rezistence ke klinicky významným antibiotikům u <i>Enterobacteriaceae</i>	84
Skrytá hrozba želvích klíšťat? Virus krymsko-konžské hemoragické horečky v klíšťatech <i>Hyalomma aegyptium</i>	87
<i>Escherichia coli</i> ST131: molekulárně-biologické srovnání epidemiologicky významného, multirezistentního klonu z různých zdrojů.....	90
Využití metody RT-PCR při vyhodnocení vlivu vybraných léčiv na genovou expresi u dania pruhovaného (<i>Danio rerio</i>).....	93
Distribuce a biodiverzita babesií v klíštěti obecném (<i>Ixodes ricinus</i>) na jižní Moravě.....	96
Biodiverzita a fylogenetické vztahy krevních parazitů u sladkovodních želv jihovýchodní a východní Asie.....	99
Epidemiologická příbuznost klinicky významných enterokoků rezistentních k vankomycinu získaných z nemocnice, z čističky odpadních vod a z vodního ptactva.....	102
Využití spektrofotometrické metody pro stanovení metalothioneinů jako indikátorů znečištění vodního prostředí ryb.....	105
Vliv T-2 toxinu na parametry oxidačního stresu u pstruhů duhových (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	108

Příspěvky FaF

Vztah mezi funkcí rodiny p53 a 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosinem.....	112
Hodnocení potenciální antiradikálové aktivity měďnatých komplexů u alloxanového modelu diabetu na myších.....	116
Protizánětlivá aktivita obsahových látek <i>Eucalyptus globulus</i>	119
Časné a chronické účinky olanzapinu na sérové hladiny adipokinů.....	123
Antiureázová aktivita <i>Rhus typhina</i>	126
Syntéza amidů kyseliny kynureninové jako biologicky aktivních látek.....	129
Syntéza potenciálních léčiv s vlivem na CNS s fragmentem omega-laktamu a <i>in-vitro</i> hodnocení.....	132
Hodnotenie antiproliferačných účinkov novo substituovaných chinazolínových derivátov na ľudských nádorových buňkách.....	134
Polymorfismy exonové oblasti genu pro TNFRSF1B, jejich asociace s efektivitou biologické léčby infliximabem.....	137
Tvorba biorelevantní disoluční metody pro kontrolu kvality tablet s obsahem warfarinu.....	141
Syntéza a ověření katalytické aktivity chirálních bifunkčních thiomocovinových (CBTU) a selenomocovinových organokatalyzátorů u asymetrické Henryho adice.....	144
Separace izomerů inositolu pomocí HPLC v módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) s detektorem ELSD.....	147
Vývoj pH závislé disoluční metody pro kontrolu uvolňování glukosy z pelet s řízeným uvolňováním pro prevenci hypoglykémie.....	150
Izolace obsahových látek <i>Nasa triphylla</i> a stanovení jejich antiflogistické aktivity.....	153
Polymerní filmy s obsahem nesteroidního antiflogistika pro lokální terapii bolesti v ráně.....	157
Studium antimikrobiálních vlastností nově syntetizovaných potenciálních chemoterapeutik.....	161

Příspěvky
Fakulty veterinárního lékařství

Funkce kaspázy-3 v osteogenezi

Eva Adamová¹, Eva Janečková², Eva Matalová^{1,2}

¹*Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

²*Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České Republiky, v.v.i.*

Úvod

Osteogeneze představuje komplexní mechanismus vzniku a vývoje kostí. Osteoblasty se podílejí na tvorbě kostní tkáně, osteoklasty kost odbourávají. Těchto procesů se účastní řada molekulárních faktorů, mezi které se v současnosti řadí i kaspázy. Kaspázy jsou známy především jako molekuly, které zprostředkovávají programovanou smrt buněk, a to i při remodelaci kosti. Aktivní kaspáza-3 však byla pozorována i v neapoptotických chondrocytech, osteoblastech a osteoklastech, což naznačuje její úlohu v procesu diferenciaci. Většina výsledků je známa z endochondrální osifikace (Krajewska *et al.* 1997; Szymczyk *et al.* 2006; De Valck *et al.* 2001), údaje k intramembranózním kostem jsou sporadické. Cílem projektu bylo bližší objasnění zapojení aktivní kaspázy-3 v prenatálním i postnatálním vývoji kostí u modelu myších končetin (endochondrální osifikace) a alveolární kosti (intramembranózní osifikace). Pozornost byla zaměřena na vztah kaspázy-3 k apoptóze a k markerům diferenciaci buněk.

Materiál a metodika

1. Histologické řezy

Pro analýzu vzorků s využitím imunohistochemie a biochemických analýz byly použity sériové histologické řezy v parafínu fixovaných vzorků předních myších končetin a hlavové části (frontální řezy) o tloušťce 4 μm . Studovaná stádia zahrnovala embryonální den 15 (E15), perinatální období (P0) a postnatální stádia P5 a P10. Před analýzou byly histologické řezy odparafinovány a zavodněny sestupnou alkoholovou řadou.

2. Imunohistochemie

Pro imunohistochemii byl použit detekční kit (Vectastain). Byla aplikována primární protilátka proti kaspáze-3 (Cell Signaling, 9664, 1:50) a osteokalcinu (Abcam, ab93876, 1:100) přes noc (4 °C). Druhý den byla aplikována biotinylovaná sekundární protilátka (30 min/RT) a streptavidin-peroxidázový komplex (30 min/RT). Vizualizace pozitivních buněk bylo dosaženo pomocí chromogenního substrátu peroxidázy (POD), 3,3'-diaminobenzidin tetrachloridu (DAB). Protibarvení pozitivních jader (hnědých) bylo provedeno hematoxylinem (modrá negativní jádra).

3. TUNEL

Pro detekci apoptotických zlomů DNA byl použit kit (Millipore, S7100). Reakční směs byla aplikována 1 h/37 °C/vlhká komůrka, poté byl přidán streptavidin-peroxidázový komplex (30 min/RT). Vizualizace pozitivních jader byla zprostředkována reakcí POD-DAB, barvení negativních jader hematoxylinem.

4. TRAP

Detekce tartrát pozitivní kyselé fosfatázy (TRAP) byl využit kit (Sigma-Aldrich, 387A). Vzorky byly inkubovány 2 h/37 °C s reakčním mixem. TRAP pozitivní buňky vykazovaly růžovo-fialové zbarvení cytoplasmy. Dobarvení negativních buněk bylo provedeno metylenovou zelení.

5. Mikromasové kultury

Mikromasové kultury byly připraveny z končetinových pupenů stádia E12 dle dříve etablovaného protokolu (Chlastáková *et al.* 2012). Kaspáza-3 byla inhibována pomocí fluormethylketonového inhibitoru FMK004 (R&D Systems, Minneapolis, MN), který byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO) a aplikován v koncentraci 100 μ M přímo do média (viz. Chlastakova *et al.* 2012; Kudelova *et al.* 2012). Simultánně byl obdobně aplikován inhibitor všech kaspáz. Kultivovány byly čtyři skupiny mikromasových kultur: kontrola kultivace (pouze médium), kontrola DMSO (rozpouštědlo inhibitoru), experimentální skupina s inhibitorem kaspázy-3 a experimentální skupina s obecným inhibitorem.

6. PCR Arrays, qPCR

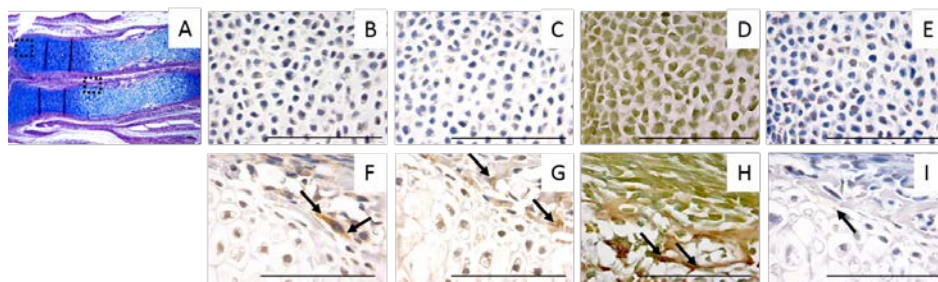
Pro izolaci RNA byl použit RNeasy FFPE Kit (Qiagen). Získaná celková mRNA byla přepsána do cDNA a následně provedena analýza 84 genů pomocí PCR Array (SA Biosciences, PAMM-026A-24). Pro qPCR byly použity specifické primery actin a Sox9 (Life Technologies).

Výsledky

Lokalizace aktivní kaspázy-3 ve vývoji endochondrální kosti

Aktivní kaspáza-3 byla detekována během endochondrální osifikace, ve vývoji vřetenní a loketní kosti. Exprese kaspázy-3 byla pozorována ve stádiu ED15,0 v cytoplazmě buněk perichondria lemující hypertrofické chondrocyty (Obr. 1 F), kdežto chondrocyty v klidové zóně chrupavky byly negativní (Obr. 1 B.). Stejně lokalizovaná byla i exprese osteokalcinu (Obr. 1 G). Aktivní kaspáza-3 mimo apoptotické buňky (Obr. 1 I) byla nalezena také v aktivních osteoklastech (Obr. 1 H). Klidová zóna chrupavky byla negativní pro osteokalcin (Obr. 1 C), osteoklasty (Obr. 1 D) i apoptotické buňky (Obr. 1 E). V perinatálním stádiu P0 a postnatálních stádiích P5 a P10 byly chondrocyty klidové zóny chrupavky negativní pro kaspázu-3, avšak ve všech stádiích se její exprese projevovala v proliferujících chondrocytech. Exprese byla zachována v perichondriu a byla pozorována i v hypertrofické a osifikační zóně chrupavky, později také v buňkách nově vznikající

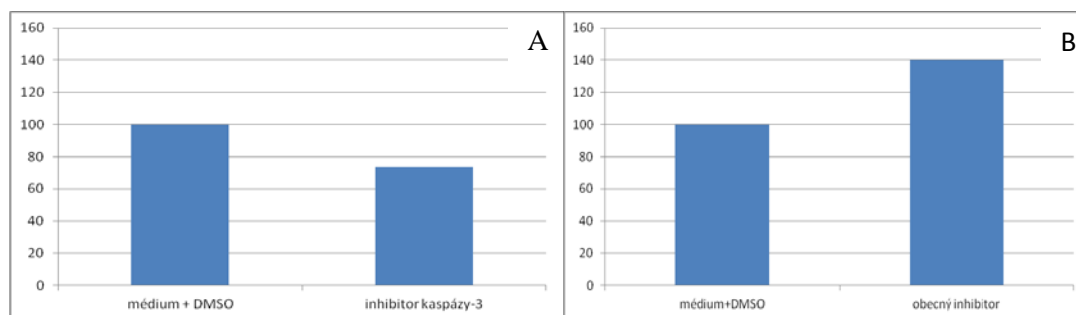
kosti. Při intramembranózní osifikaci byla kaspáza-3 pozorována ve všech zkoumaných stádiích ve vznikající mandibulární a alveolární kosti, kromě apoptotických buněk opět ve stejných místech jako exprese osteokalcinu, markeru pozdních osteoblastů.



Obrázek 1. Morfologie řezu částí myši končetiny a prostorová lokalizace aktivní kaspázy-3, osteokalcinu, apoptotických buněk a osteoklastů ve stádiu ED15,0. Barvení hematoxylinem a alciánovou modří (A), imunohistochemické značení kaspázy-3 (B, F), osteokalcinu (C, G), TRAP (D, H) a TUNEL (E, I) analýza. Černé šipky značí přítomnost pozitivních buněk (hnědá/fialová jádra). Měřítko: 100 μ m.

Změny exprese osteogenních markerů při inhibici kaspázy-3

Vliv inhibice kaspázy-3 na osteogenní markery byl hodnocen srovnáním kontrolních a inhibovaných kultur metodou PCR Arrays. Exprese genu Sox9 stanovená metodou qPCR (Graf.1) byla zvýšena u kultur s obecným inhibitorem kaspáz a naopak snížena u selektivní inhibice kaspázy-3. PCR Array pak v případě inhibice kaspázy-3 ukázala změnu genové exprese u kolagenu (typ II, α 1) (-15 %), katepsinu K (+23 %) a fosfoproteinu 1 (+36 %), avšak s nízkou statistickou významností.



Graf 1. Exprese genu Sox9 (qPCR) u buněčných kultur po 24 h inhibici kaspázy-3 (A) a všech kaspáz (B).

Diskuse a závěr

Imunohistochemická analýza prokázala aktivní kaspázu-3 i mimo apoptotické buňky, a to u obou typů osifikace. Tyto údaje potvrzují recentní názory, že aktivní kaspáza-3 má roli také v diferenciaci buněk (např. Szyczyk *et al.* 2006). qPCR analýza ukázala snížení exprese Sox9, markeru chondrogenese, po 24 h inkubaci u mikromas se specifickou inhibicí kaspázy-3. Navazující PCRArray analýza identifikovala geny, které se mohou na změnách v chondrogenezi/osteogenezi

dále podílet. Katepsin K patří mezi cysteinové proteázy, které exprimují osteoklasty (Littlewood-Evans *et al.* 1997). Jeho nárůst by mohl indikovat zvýšení osteoklastogeneze po inhibici kaspázy-3. Kolagen 2a1 je důležitý pro endochondrální osifikaci, intramembranózní při jeho chybění postižena není (Talts *et al.* 1998). Pokles kolagenu 2a1 při inhibici kaspázy-3 by ukazoval na snížení tvorby organické matrix a mohl by mít souvislost s nárůstem exprese katepsinu K, který se podílí na degradaci kolagenové matrix (Saftig *et al.* 1998). Osteopontin (OPN, fosfoprotein 1) se týká především osteoblastů, nicméně hraje roli i při remodelaci kosti. Některé studie ukazují přímou souvislost s osteoklasty, kdy se OPN zřejmě zúčastní ukotvování osteoklastů k minerální matrix kosti (Reinholt *et al.* 1990).

Dosavadní výsledky zatím umožňují pouze formulaci hypotéz a budou dále potvrzeny analýzou v delších časových intervalech. Již tato data však naznačují efekt chybění kaspázy-3 na osteogenní dráhy při vývoji kostí.

Seznam literatury:

- De Valck, D. *et al.* Caspase inhibition supports proper gene expression in *ex vivo* mouse limb cultures. *Cell Death Differ.* 2001, 8, 985-994.
- Chlastakova, I. *et al.* Dynamics of caspase-3 activation and inhibition in embryonic micromasses evaluated by a photon-counting chemiluminescence approach. *In Vitro Cell & Dev Biol-Anim.* 2012, 48, 545-549.
- Krajewska, M. *et al.* Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Can Res.* 1997, 57, 1605-1613.
- Kudelova, J. *et al.* The effect of caspase-3 inhibition on interdigital tissue regression in explant cultures of developing mouse limbs. *Anim Cell and Sys.* 2012, 16, 295-301.
- LittlewoodEvans, A. *et al.* Localization of cathepsin K in human osteoclasts by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Bone* 1997, 20, 81-86.
- Reinholt, F. P. *et al.* Osteopontin - a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990, 87, 4473-4475.
- Saftig, P. *et al.* Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998, 95, 13453-13458.
- Szymczyk, K. H. *et al.* Active caspase-3 is required for osteoclast differentiation. *J Cell Physiol.* 2006, 209, 836-844.
- Talts, J. F. *et al.* Endochondral ossification is dependent on the mechanical properties of cartilage tissue and on intracellular signals in chondrocytes. *In Morphogenesis: Cellular Interactions.* 1998, 857, 74-85.

Výzkum byl podpořen IGA VFU, projekt č. 101/2014/FVL.

Studium mechanismů omezujících vývoj náhradních generací zubů

Hana Dosedělová¹, Barbora Putnová², Kristýna Glocová², František Tichý¹, Marcela Buchtová¹

¹*Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství, VFU Brno*

²*Magisterský studijní program, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno*

Úvod

Zubní lišta je nezbytná pro vývoj náhradních generací zubů ryb, plazů i savců. První známkou vzniku zubní lišty obratlovců během embryonálního vývoje je ztlustění orálního epitelu a následný vznik epitelového čepu (Luckett, 1993). Apikální část epitelu se prodlužuje, prorůstá hlouběji do embryonální čelisti a postupně se rozšiřuje za vzniku zubního pupene. Vývoj zubů pak probíhá přes stejná vývojová stádia u všech obratlovců.

Délka perzistence zubní lišty ve tkáni čelisti souvisí s počtem generací zubů. U polyfyodontních druhů pak zubní lišta přetrvává po celý život jedince a je schopna produkce několika dalších generací zubů (Buchtova et al. 2008). U difyodontních druhů savců (jako je prase, fretka či člověk) dochází po založení pupene permanentní dentice k fragmentaci a rozpadu zubní lišty s následným přerušením spojení zubu a orálního epitelu (Jarvinen et al, 2009). Do procesu úplného zániku zubní lišty prasete je zapojena zejména buněčná migrace, částečně však i apoptóza a epitelu-mesenchymální transformace (Buchtová et al. 2012). Nicméně nejoblíbenějším modelovým druhem pro studium odontogeneze je laboratorní myš, která patří mezi savce s monofyodontní denticí. U monofyodontních druhů (myš, chameleon) došlo v průběhu jejich evoluce k sekundární ztrátě schopnosti tvořit další generace zubů. Cílem tohoto projektu bylo zjistit, zda dochází k iniciaci a vývoji náhradní zubní lišty u monofyodontních druhů a její případný osud před erupcí zubů.

Materiál a metodika

Histologická analýza:

Ke studiu morfologie vyvíjející se zubní lišty jsme použili embrya myši různého stáří ze sbírky našeho ústavu. Po fixaci ve 4% formaldehydu byly hlavy embryí zpracovány dle standardního protokolu a zality do parafínu. Přípravené bločky byly nakrájeny na mikrotomu v transverzální rovině. Hematoxylin-eosinem byla obarvena pouze část získaných řezů, alternativní řezy byly použity k imunohistochemické analýze. Skla byla po barvení fotografována fotoaparátem Leica.

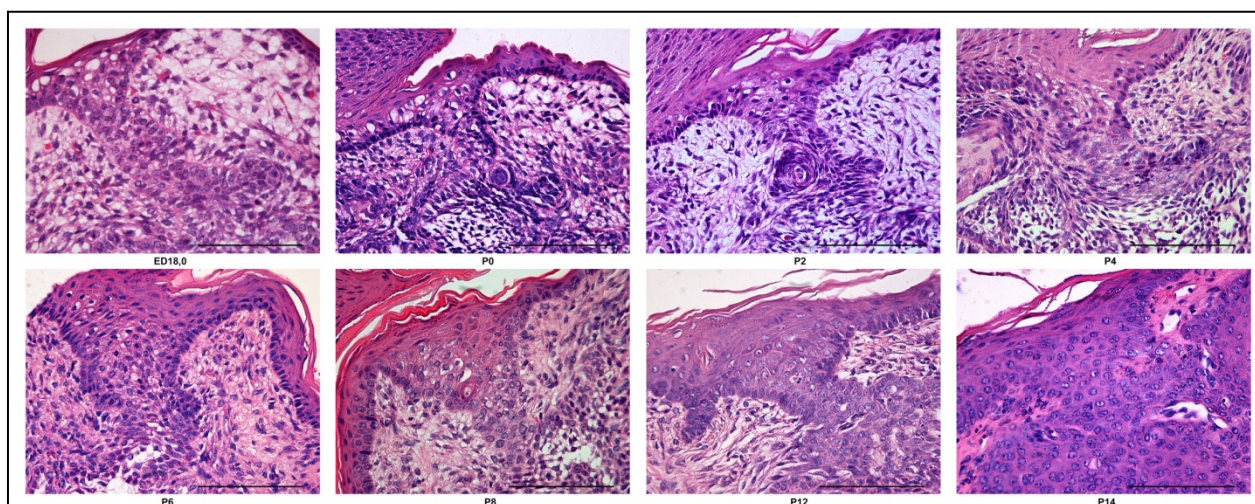
Imunohistochemická analýza:

Vybrané řezy byly deparafinovány xylenem a rehydratovány sestupnou alkoholovou řadou. Odkrytí epitopů bylo provedeno v citrátovém pufru při teplotě 97° C po dobu 15 minut, deaktivace peroxidáz pak 3% peroxidem vodíku po dobu 10 minut.

Proliferující buňky jsme detekovali pomocí PCNA kitu (kat. č.: 93-1143, Invitrogen). Detekce apoptotických buněk byla provedena ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (kat. č.: S7100, Chemicon International). Pozitivní buňky byly vizualizovány pomocí Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (kat. č.: K3468, Dako) a řezy následně kontrastně dobarveny hematoxylinem.

Transmisní elektronová mikroskopie:

Tkáň čelistí vybraných stádií myši byla odebrána do fixačního činidla (3% glutaraldehyd v 0,1M kakovylátovém pufru). K postfixaci byl použit 1% roztok OsO₄ ve stejném pufru. Po dehydrataci v alkoholové řadě a acetonu byly vzorky zality do epoxidové pryskyřice Durcupan. Polotenské řezy jsme obarvili toluidinovou modří, ultratenké řezy byly kontrastovány roztokem uranylacetátu s citrátem olovnatým. K analýze řezů byl použit mikroskop MorgagniTM 268 TEM (FEI Company) s fotoaparátem Veleta CCD Camera (Olympus).

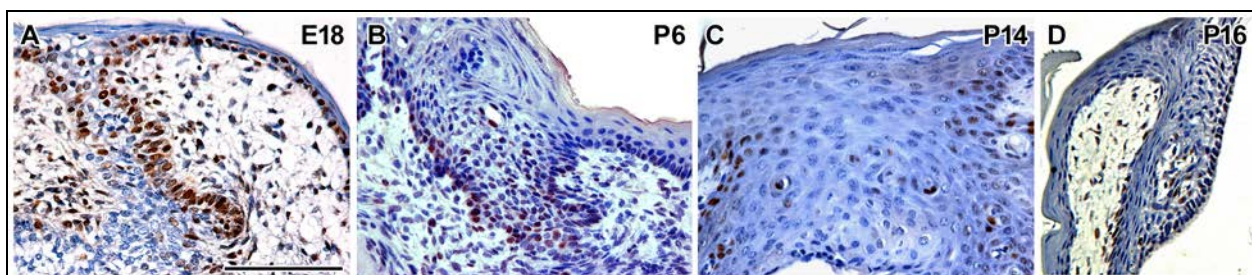


Obr. 1: Morfologie zubní lišty v pozdních embryonálních a v postnatálních stádiích myši v oblasti prvního moláru. Měřítko = 100 μ m

Výsledky

Zubní lišta myši zůstává spojena s orálním epitelem nejen v průběhu vývoje zubů během embryogeneze, ale toto spojení setrvává nepřerušeno až do erupce zubu (Fig. 1,2). V průběhu postnatálního vývoje se však výrazně mění morfologické a histochemické vlastnosti buněk, které zubní lištu tvoří. Zprvu dochází k postupnému narušení souvislosti bazální membrány zubní lišty.

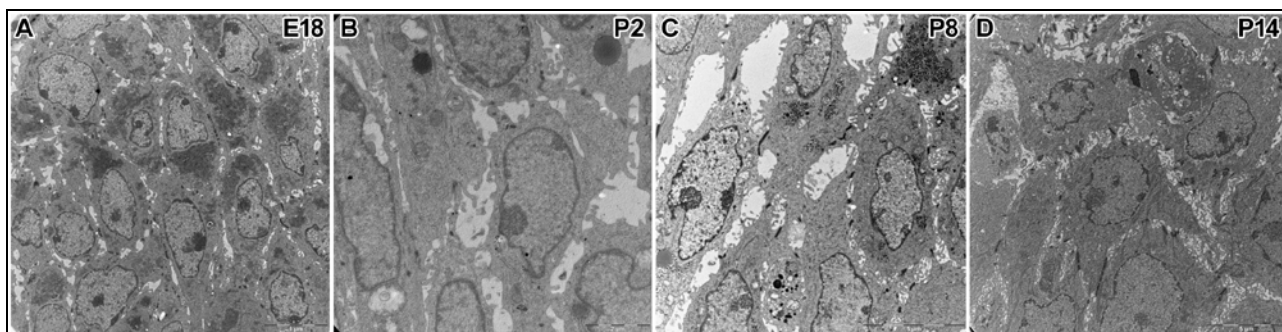
Buňky mesenchymu v okolí zubní lišty vytváří dlouhé výběžky směřující k liště. V okolí bazální membrány se pak v jejich blízkosti hromadí extracelulární matrix. V buňkách zubní lišty postupně přibývají mikrofilamenta a zásoby glykogenu, aktivita buněčného metabolismu klesá (Fig. 3). Dále dochází k vymizení rudimentální náhradní zubní lišty. Zubní lišta v souvislosti s rozpadem bazální membrány ztrácí jasné kontury a expanduje do šířky. Mitotický potenciál buněk klesá (Fig. 2), orgány jsou degradovány, nicméně počet apoptotických buněk se výrazně nezvyšuje. Epitelové perly se objevují ve středové oblasti rozpadající se zubní lišty v postnatálních stádiích.



Obr. 2: Proliferace buněk v oblasti zubní lišty značená protilátkou PCNA (hnědá jádra). Měřítko = 100 μ m

Závěr

Degradace zubní lišty myši je, podobně jako je tomu u prasete, výsledkem řady procesů, které se na ní podílejí různou měrou. Apoptóza buněk je zapojena v regresi náhradní lišty v mnohem menší míře, než jsme očekávali. Naopak nejvýznamnějším mechanismem zániku náhradní zubní lišty myši se zdá být snížená proliferace v oblasti náhradní lišty a ztráta schopnosti náhrady tkáňových kmenových buněk, které se podílí na formování náhradní dentice.



Obr. 3: Epitelové buňky zubní lišty v transmisním elektronovém mikroskopu.

Poděkování: Projekt byl financován Interní grantovou agenturou VFU Brno (grant 96/2014/FVL).

Seznam literatury:

- Buchtova, M., G.R. Handrigan, A.S. Tucker, S. Lozanoff, L. Town, K. Fu, V.M. Diewert, C. Wicking, J.M. Richman (2008) Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on Sonic hedgehog signaling. *Dev Biol* 319(1): 132-145.
- Buchtova, M., J. Stembirek, K. Glocova, E. Matalova, A.S. Tucker (2012) Early regression of the dental lamina underlies the development of diphyodont dentitions. *J Dent Res* 91(5): 491-498.
- Jarvinen, E., M. Tummers, I. Thesleff (2009) The role of the dental lamina in mammalian tooth replacement. *Journal of experimental zoology* 312B(4): 281-291.
- Luckett, W.P. (1993) Ontogenetic staging of the mammalian dentition, and its value for assessment of homology and heterochrony. *J Mamm Evol* 1: 269-282.

Vliv nedostatku železa a chladového stresu na produkci thyroïdních hormonů a termoregulaci selat

Zdeněk Fajt¹, Jonáš Vaňhara¹, Jan Vašek¹, Barbora Prokešová², Tomáš Baňoch³

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinární lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Fakulta veterinární lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno², Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat, welfare, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³

Úvod

Celá řada mikroprvků hraje důležitou roli jako součást mnoha enzymů a jsou tedy nutné pro jejich efektivní fyziologickou funkci. Studie probíhající u lidí a laboratorních potkanů dokázaly, že nedostatek železa a s tím související anémie zhoršuje metabolismus štítné žlázy, (Beard *et al.* 1990). Přesný mechanismus, jak nedostatek železa působí na metabolismus štítné žlázy, není znám. Předpokládá se ovlivnění metabolismu vlivem snížené oxygenace tkání při anémii (Galton 1972). Anémie může také ovlivňovat CNS složku v neuroendokrinním systému regulace produkce hormonů štítné žlázy (Beard *et al.* 1990). Činnost štítné žlázy úzce souvisí i se schopností termoregulace organismu, což dokazuje provedená studie Beardem *et al.* (1990), která demonstruje souvislost s anémií vyvolanou nedostatkem železa a schopností fyziologické termoregulace u lidí při experimentálně vyvolané hypotermii pomocí vodní lázně se studenou vodou. U zvířat může být vyvolána experimentální hypotermie také vodní lázní (Lossec *et al.* 1998). Cílem projektu bylo zhodnocení dopadu nedostatku železa a anémie na funkci štítné žlázy a kondici selat a vliv chladového stresu na termoregulační schopnost selat.

Materiál a metodika

Pokus byl realizován v podmínkách běžného chovu. Celkem bylo použito 40 zvířat (22 kanečků a 18 prasniček). Byly vytvořeny dvě skupiny. Každá skupina měla po 20 kusech selat. Při uspořádání skupin zvířat byl použit princip dělených vrhů.

Krev byla odebírána z *vena cava cranialis* pomocí sterilních jehel do zkumavek s aktivátorem srážení a do zkumavek EDTA. Selata byla před odběrem krve vážena a včetně pohlaví zaznamenávána. Krevní vzorky pro analýzu T₃, T₄, Fe, glukózy v séru, hematologii (Hb, Ht, počet Erys, počty Leu) byly odebrány od selat obou skupin (kontrolní skupina a pokusná skupina) 3., 10., 17., a 26. den stáří selat.

U první skupiny (kontrolní, 20 ks) selat byl aplikován 3. den po porodu (tak jak je to běžné v komerčních chovech prasat) přípravek s obsahem železa (Gleptosil 200 mg/ml injekční roztok pro selata v dávce 1 ml pro toto) intramuskulárně do gluteální nebo krční svaloviny jako prevence anémie.

Druhé skupině (pokusná, 20 ks) selat železo nebylo suplementováno. Od 10. - 14. dne se začala u selat bez suplementace železem rozvíjet anémie.

V 17. dni pokusu byl vyvolán u obou skupin chladový stres (ochlazením definované části těla studenou vodou o teplotě 7 °C na 30 vteřin). Selata byla ponořena do nádoby se studenou vodou celým tělem po úroveň krku. Bezprostředně po vytažení selat z nádoby jim byla odebrána krev. Po skončení působení chladového stresu byla selata z pokusné skupiny ošetřena aplikací železa preparátem Gleptosil 200 mg/ml injekční roztok pro selata.

Výsledky

U zkoumaných skupin selat, s železem i bez železa, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ve váhových přírůstcích. Nebyl zaznamenán vliv ponořování do studené vody na změnu teploty těla. Tělesná teplota selat nevykazovala statisticky významné odchylky před i po ponoření do studené vody.

1. odběr ve 3 dnech věku selat ukázal u obou zkoumaných skupin příznaky anemie. Byly naměřeny snížené hodnoty Ht, Hb, erys. Hodnoty leu byly v normě. Hodnoty Fe byly u obou skupin snížené, hodnoty Glu, T3, T4 byly v normě. Všechny naměřené hodnoty bez statisticky významných rozdílů.

2. odběr ve věku 10 dnů vykazovala skupina bez suplementace železa statisticky významně nižší hladiny sledovaných parametrů Ht, Hb a erys, Fe a T3, parametry T4 a Glu byly v normě bez statisticky významných rozdílů. U obou sledovaných skupin byly všechny hematologické parametry snižené.

3. odběr ve věku 17 dnů vykazovala skupina bez suplementace železa statisticky významně nižší hladiny sledovaných parametrů Ht, Hb a erys, Fe a T3, parametry T4 a Glu byly v normě bez statisticky významných rozdílů. Hematologické parametry byly snižené pouze u skupiny bez železa.

4. odběr ve věku 26 dnů vykazovala skupina bez suplementace železa statisticky významně nižší hladiny sledovaných parametrů Ht, Hb a erys, Fe a T3, parametry T4 a Glu byly opět v normě bez statisticky významných rozdílů. Hematologické parametry byly snižené pouze u skupiny bez železa, avšak se stoupající tendencí.

Závěr

Teplota vody okolo 7°C a doba ponoření selat pravděpodobně nestačila na vyvolání změn v oblasti termoregulace, jelikož jsme nezaznamenali žádné teplotní výkyvy při měření selat. Jednalo se pouze o mírný chladový stres, který pravděpodobně neovlivnil metabolismus štítné žlázy. Ostatní naměřené hodnoty odpovídají prohlubující se anemii u selat bez suplementace železa a její pravděpodobný vliv na metabolismus štítné žlázy. U skupiny bez suplementace železa došlo k poklesu sérových hladin železa s následným poklesem hormonu T3. Hormon T4 zůstal po celou dobu pokusu ve fyziologických hodnotách u obou skupin. Pokles T3 si vysvětlujeme pravděpodobně sníženou konverzí periferní T4 na T3, který byl prokázán v pokusech u lidí a laboratorních potkanů (Beard *et al.* 1990). Je tedy možné potvrdit hypotézu, že anemie u selat může negativně ovlivnit metabolismus štítné žlázy a snížit sérové hladiny hormonu T3, ne však natolik, aby se snížila hladina T4 v séru. Uvedený pokus naznačuje, že anemie u selat nepředstavuje tak velký problém ve vztahu k metabolismu štítné žlázy jak je tomu např. u lidí a laboratorních potkanů.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 71/2014/FVL.

Seznam literatury

- Beard, J., Borel, M., J., Derr, J. (1990) Impaired thermoregulation and thyroid function in iron-deficiency anemia. *Am. J. Clin. Nutr.* 52:813 – 819.
- Galton, V., A. (1972) Some effects of altitude on thyroid function. *Endocrinology* 91:1393 – 1403.
- Lossec, G., Herpin, P., Le Devidich, J. (1998) Thermoregulatory responses of the newborn pig during experimentally induced hypothermia and rewarming. *Exp. Physiol.* 83:667 – 678

Ověření biomechanických vlastností a cytotoxicity nového resorbovatelného polymerního gelu vyvinutého k výplni kostních defektů

Petra Fedorová, Alois Nečas, Lucie Urbanová, Kateřina Jiříčková, Nikola Pánková, Andrea
Nečasová

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

Úvod

Fraktury kostí končetin jsou v praxi malých zvířat velmi časté a mohou je doprovázet komplikace v hojení zlomenin, např. v případech fraktur záprstních kostí či u zlomenin distálního úseku radia u miniaturních plemen psů¹. Preferovaná léčba těchto typů fraktur je téměř vždy chirurgická, přičemž se nejčastěji volí jejich fixace (osteosyntéza) kostními ploténkami a šrouby². Nově se v oblasti osteosyntéz objevují techniky využívající k fixaci zlomenin různé biokompatibilní a biodegradabilní materiály³, a to za účelem prevence komplikací při chirurgické léčbě zlomenin. Naším současným záměrem je ověřit vlastnosti nově vyvinutého biodegradabilního polymerního gelu, který by měl sloužit k vyplňování kostních defektů vzniklých jednak iatrogeně (po vyjmutí implantátu), nebo v důsledku patologických procesů (kostní cysty, neoplazie) a k podpoře hojení takto postižené tkáně.

Materiál a metodika

Stěžejní část projektu byla provedena na *ex vivo* preparátech získaných z kadaverů psů. Byly použity kosti apikálních částí hrudních i pánevních končetin (metakarpy, metatarzy), které byly zbaveny všech okolních měkkých tkání tak, aby představovaly vhodný model kosti pro mechanické testování. V diafýzách kostí byly vytvořeny defekty simulující otvory po vyjmutí ploténkového šroubu o velikosti 2,0mm. Následně byly tyto defekty vyplněny zcela novým typem biomateriálu, kterým je speciální vstříkovatelný biodegradabilní netoxický polymer gelující při teplotě lidského těla. Jako kontrolní vzorky byly otestovány mtt/mtc kosti s defekty po šroubech bez vyplnění uvedeným biomateriálem a také mtt/mtc kosti bez zmíněných iatrogeních defektů. Preparáty byly podrobeny mechanickým testům při působení sil ohybu ve spolupráci s doc. Pěňčíkem a doc. Schmidem ze Stavební fakulty VUT v Brně.

Druhá část studie zahrnovala ověření biokompatibility syntetizovaného materiálu s MSCs. Pro testování byly použity mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně a také diferencované primokultivované chondrocyty. Testovaným materiálem byl polymerní termocitlivý hydrogel vyvinut pro biomedicínské aplikace do tkáňových defektů. Tato část studie byla provedena s využitím laboratorního vybavení a ve spolupráci s Národním centrem tkání a buněk (Ing. Košková).

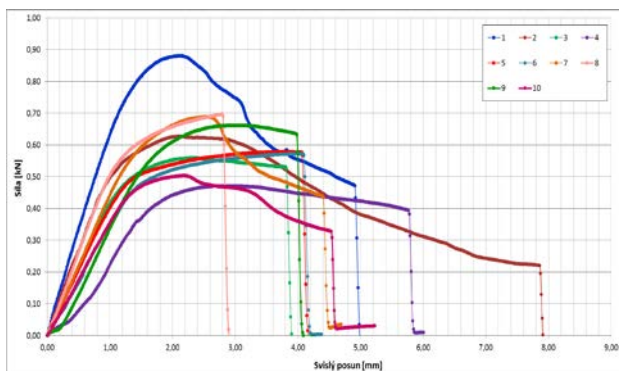
Výsledky

Mechanickým testům jsme podrobili 2 testovací skupinu s 9 a 7 testovacími preparáty a srovnali je s kontrolními skupinami. Kontrolní skupinu S1 (n=10) tvořily kosti zcela nepoškozené, kontrolní skupina S2 (n=11) byla s iatrogeně vytvořenými defekty v kosti představujícími otvory po vyjmutí ploténkových šroubů o průměru 2mm. Testovací skupina S3 byla tvořena kostmi s otvory vyplněnými hydrogelem o koncentraci 15% obohaceným o hydroxyapatit (HAP) a skupina S4 byla tvořena kostmi s otvory vyplněnými hydrogelem o koncentraci 10% obohaceným o hydroxyapatit (HAP). Tabulka 1 zobrazuje hodnoty sil potřebných k porušení integrity kostní tkáně u jednotlivých skupin.

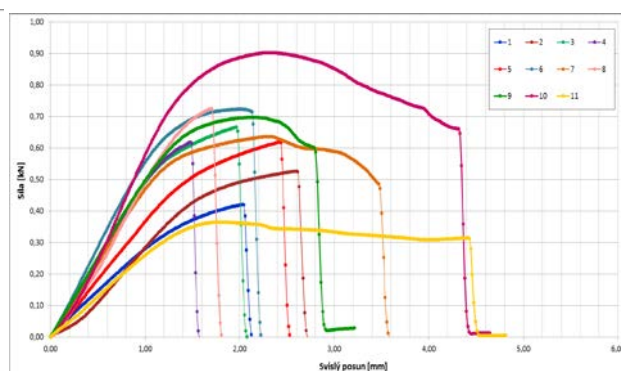
	Maximální síla (síla při porušení) F [N]			
	Série 1 plné kosti	Série 2 kosti s otvory	Série 3 kosti s výplní	Série 4 kosti s výplní
1	880,00	420,50	656,10	596,60
2	627,10	525,80	687,00	493,30
3	559,60	666,10	593,80	431,40
4	471,20	617,90	401,20	684,20
5	578,90	618,30	556,80	994,20
6	572,50	636,00	404,00	643,20
7	688,60	636,00	577,30	746,10
8	697,50	724,40	448,60	X
9	662,10	697,10	638,80	X
10	503,30	902,10	X	X
11	X	364,60	X	X
12	X	X	X	X
průměr	624,08	618,98	551,51	655,57

Tabulka 1: Hodnoty sil potřebných k porušení integrity kostní tkáně u jednotlivých skupin kostí

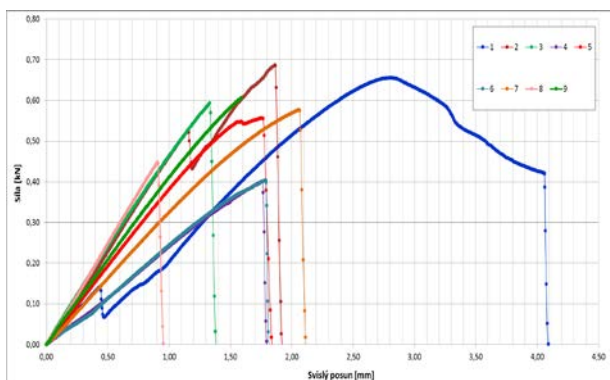
Na grafech 1-4 je vidět křivky představující vliv velikosti působící síly na vertikální posun, čili přelomení kosti u jednotlivých testovaných i kontrolních skupin.



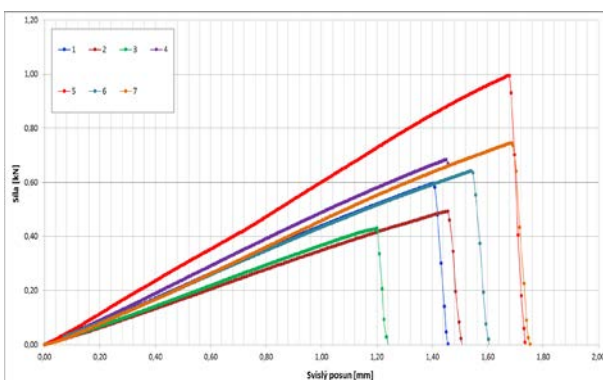
Graf 1: Závislost vertikálního posunu na velikosti působící síly u kontrolní skupiny S1 s nepoškozenými kostmi



Graf 2: Závislost vertikálního posunu na velikosti působící síly u kontrolní skupiny S2 s iatrogeně poškozenými kostmi s otvory bez výplně

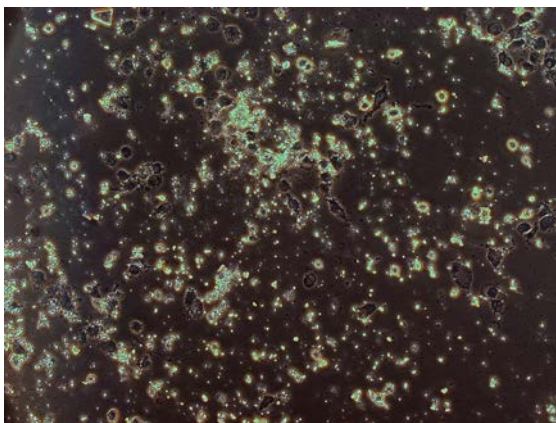


Graf 3: Závislost vertikálního posunu na velikosti působící síly u testované skupiny S3 s iatrogeně poškozenými kostmi s otvory s výplní 15% hydrogelu s HAP

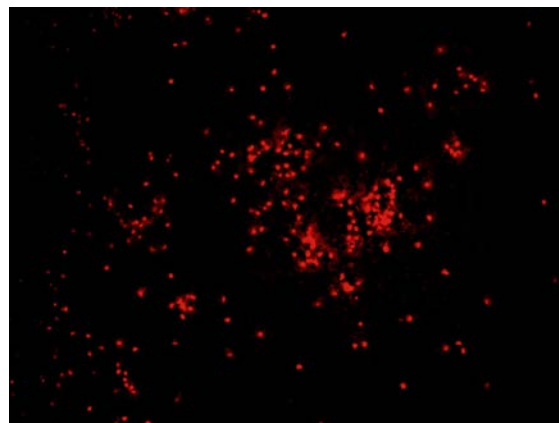


Graf 4: Závislost vertikálního posunu na velikosti působící síly u testované skupiny S3 s iatrogeně poškozenými kostmi s otvory s výplní 10% hydrogelu s HAP

Testy biokompatibility ukázaly, že hydrogel, který byl použit pro mechanické testování není vhodným prostředím pro proliferaci buněk a je cytotoxický (na základě barvení PI) a to již po 1 hod působení hydrogelu na buňky. Byla vyzkoušena 3D kultivace s chondrocyty i 2D kultivace. Oba způsoby potvrdily nevhodnost pro růst buněk. V rámci testování cytotoxicity byla kontrolována suspenze buněk ihned po smíchání s hydrogelem, zde byli buňky vitální. Po 1 hodině již byli buňky neviabilní.



Obr.1: Slide s hydrogelem
a inokulovanými chondrocyty



Obr.2: Obarvený slide s hydrogelem
a chondrocyty, po aplikaci PI jasně
znatelné červeně svítící signály mrtvých
buněk

Seznam literatury:

1. *Johnson AL, Houlton JEF, Vannini R: AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat, 2005, AO Publishing Switzerland, Davos.*
2. *Orozco R, Sale, JM, Videla M., Atlas of Internal Fixation. Fractures of Long Bones. Springer, 2000, Berlin.*
3. *Fan Y, Xiu K, Duan H, Zhang M: Biomechanical and histological evaluation of the application of biodegradable poly-L-lactic cushion to the plate internal fixation for bone fracture healing. Clinical Biomechanics 2008, 23:7-16*

Tato práce vznikla za laskavé podpory Grantové agentury VFU Brno (IGA VFU Brno 91/2014/FVL) a projektu “CEITEC - Central European Institute of Technology”(CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského regionálního rozvojového fondu.

Úloha ježků v koloběhu zoonóz v urbánních ekosystémech a v lidské péči

Lada Hofmannová¹, Tereza Šimonovská¹, Lucie Nováková¹, Milan Dudáš¹

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

Úvod

V České republice žijí ve volné přírodě ježek západní (*Erinaceus europaeus*) a ježek východní (*E. concolor*), jejichž jedinci jsou na podzim často umisťováni do útulků nebo domácností. Navíc také narůstají počty majitelů „afrického“ ježka bělobřichého (*Atelerix albiventris*). Nakolik mohou být ježci obecně zdrojem potencionálně zoonotických patogenů je v literatuře diskutováno zejména v souvislosti výskytem vnějších patogenů jako plísni a ektoparazitů. Dosud neexistuje komplexní studie zaměřená na stanovení prevalence širšího souboru zdravotně nejvýznamnějších patogenů (*Salmonella* spp., *Yersinia pseudotuberculosis*, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia intestinalis*, a také tkáňových parazitů *Toxoplasma gondii* a *Trichinella* spp.). Cílem práce bylo posoudit prevalence výše uvedených patogenů, vyhodnocení jejich vlivu na morbiditu a mortalitu ježků a také možnost posouzení úlohy ježků v koloběhu těchto patogenů v urbánních ekosystémech.

Materiál a metodika

Vyšetření vzorků trusu na přítomnost parazitů

Vyšetření 80 vzorků trusu zahrnovalo celkem 51 ježků ze záchranných stanic (ZS): 20 ježků východních a 31 ježků západních. Dále bylo vyšetřeno 30 jedinců ježka bělobřichého chovaných jako zájmová zvířata. Všechny vzorky byly nejprve celkově parazitologicky vyšetřeny centrifugačně flotační metodou, larvoskopií dle Baermanna a klasickou sedimentací. Počty nalezených parazitů byly kvantifikovány. Cca 200 mg trusu ze všech 81 vzorků bylo použito pro izolaci DNA za použití PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Získaná DNA byla skladována při –20°C. Přítomnost *Cryptosporidium* specifické DNA byla stanovena pomocí double PCR na genu SSU (small ribosomal subunit rRNA). Reakce probíhala v objemu 25 µl v pufru o složení 12,5 µl PPP Master Mixu (TopBio), 8,5 µl PCR H₂O (TopBio), 10 pmol každého z primerů a 2 µl DNA. PCR se skládala z úvodní denaturace při 94°C/3 min, následovaná 35 cykly denaturace při 94°C/45 s, annealingu při 55°C/45 s a extenze při 72°C/1 min, pak následovala závěrečná extenze při 72°C/7 min. Po proběhnutí prvního kola PCR byly 2 µl produktu reamplifikovány ve druhém kole PCR za identických podmínek. Přítomnost *Giardia* spp. byla zjišťována pomocí nested PCR na genu TPI (triosephosphate isomerase gene) za obdobných reakčních podmínek jako je uvedeno výše. Použité

primery pro diagnostiku kryptosporidií byly SSU F1(TTCTAGAGCTAATACATGCG) a SSU R1 (CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA) s délkou produktu ~1325 bp¹. Pro diagnostiku giardií vnější TPI F1 (AAATIATGCCTGCTCGTCG) a TPI R1 (CAAACCTTITCCGCAAACC), a vnitřní TPI F2 (CCCTTCATCGGIGGTAACCT) a TPI R2 (GTGGCCACCACICCCGTGCC) s délkou finálního produktu 530 bp². PCR produkty byly detekovány v agarózovém gelu za pomoci elektroforézy a UV světla a pozitivní byly po enzymatickém přečištění (ExoSap) zaslány k sekvenci (Macrogen). Sekvence byly analyzovány pomocí softwaru ChromasPro 1.5 a BioEdit 7.0.9 a následně porovnávány s dostupnými sekvencemi (BLAST) v databázi GenBank®. Fylogenetická analýza kladně vyhodnocených sekvencí bude následovat.

Bakteriologické vyšetření vzorků trusu

Vyšetřili jsme celkem 82 vzorků trusu ježků (20 ježků východních, 32 ježků západních a 30 ježků bělobřichých) na přítomnost bakterií *Yersinia pseudotuberculosis* a zástupců rodu *Salmonella*. Vzorky trusu byly odebrány za použití sterilních vatových tamponů a transportní půdy dle Amiense (COPAN). Kultivace salmonel spočívala v prvotním pomnožení bakterií v pufrované protonové vodě. Následovala kultivace na Rappaport – Vassiliadisově a pozitivní dále na XLD agaru. Prokázané kultury se odeslaly na serotypizaci. Kultivace yersinií byla prováděna ze sterilního fosfátového pufru jednak přímou kultivací na CIN agaru a jednak chladovým pomnožením při 4°C po 3 týdny, kdy opět následovalo pomnožení na CIN agaru.

Vyšetření tkání uhynulých ježků

Na přítomnost tkáňových parazitů *T. gondii* a *Trichinella* spp. bylo vyšetřeno celkem 51 uhynulých ježků, z toho bylo 26 ježků západních a 25 ježků východních. Při pitvě rozmrazených kadáverů byla sterilně odebrána mozková tkáň (0,35-2,82 g) a svalovina. Svalovina byla vyšetřena referenční trávicí metodou na přítomnost larev trichinel. Výsledný sediment tráveniny byl prohlížen se pod invertovaným mikroskopem při zvětšení 40x. Mozková tkáň byla použita k detekci DNA *T. gondii* za použití specifické magnetické izolace DNA a následné qPCR dle publikované metodiky³.

Výsledky

Výsledky parazitologického vyšetření trusu 51 jedinců ježků ze ZS prokázaly přítomnost běžných parazitů jako *Isoospora* sp., *Capillaria* spp., *Eucoleus aerophilus*, *Acanthocephala* a *Crenosoma striatum*, ale žádné oocysty kryptosporidií ani cysty giardií. U 30 ježků bělobřichého nebyli parazitologickým vyšetřením trusu detekováni žádní parazité. PCR vyšetření trusu 81 vzorků prokázalo u jednoho ježka západního (1,2%) přítomnost *C. parvum*. Analýzy *Giardia* spp. jsou

aktuálně finalizovány. Bakteriologické vyšetření a serotypizace prokázaly přítomnost *Salmonella typhimurium* u 3 ježků západních z 51 ježků ze ZS (5,9%). Kultivace pozitivní na *Yersinia* sp. byla potvrzena jen ve 2 případech (3,9%) u ježka východního ze ZS. Tyto nálezy budou ještě podrobeny typizaci. Bakteriologické vyšetření navíc přineslo záchyt bakterie r. *Rahnella* u tří (5,9%) a záchyt *Setaria liquefaciens* u dvou ježků (3,9%) ze ZS. Vyšetření svalové tkáně 51 uhynulých ježků neprokázalo u žádného z nich přítomnost larev *Trichinella* spp., detekovány byly pouze migrující larvy plicnivek *C. striatum*. Vyhodnocení detekce *T. gondii* ještě probíhá, proto nemohou být finální výsledky uvedeny.

Závěr

Ježci ze zájmových se dosud jeví jako prostí všech sledovaných patogenů. Vyšetření nejméně dalších 20 jedinců bude ještě v následujících měsících dokončeno. Ježci, u kterých byly detekovány salmonely, yersinie a *C. parvum*, nevykazovali žádné příznaky klinického onemocnění. Všichni tito ježci pocházeli ze ZS, kde o ně bylo přes celé zimní období pečováno. Oproti předběžným výsledkům parazitologických vyšetření z podzimních odběrů jsme zaznamenali celkově nižší prevalence parazitů zejména kryptosporidií, a pro to lze předpokládat, že poskytnutá péče přináší zlepšení zdravotního stavu a snížení vylučování patogenů. Ze získaných výsledků vyplývá vyšší pozitivita volně žijících ježků zejména u bakteriálních potencionálně zoonotických patogenů (salmonel a yersinií). Nicméně část dat je nyní ve stádiu finalizace a proto nemohou být veškeré závěry prezentovány.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 88/2014/FVL

Seznam literatury:

1. JIANG, Jianlin, ALDERISIO, A. Kerry a XIAO, Lihua. Distribution of cryptosporidium genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiolog.* 2005, **71**(8), 4446-4454. ISSN: 0099-2240.
2. SULAIMAN, Irshad M., FAYER, Ronald, BERN, Caryn, GILMAN, Robert H., TROUT, James M., SCHANTZ, Peter M., DAS, Pradeep, LAL, Altaf A. a XIAO, Lihua. Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Disease.* 2003, **9**(11), 1444-1452. ISSN: 1080-6040.
3. JURÁNKOVÁ, Jana, HŮRKOVÁ-HOFMANNOVÁ, Lada, VOLF, Jiří, BALÁŽ, Vojtěch a PIÁLEK, Jaroslav. Efficacy of magnetic capture in comparison with conventional DNA isolation in a survey of *Toxoplasma gondii* in wild house mice. *European Journal of Protistology.* 2014, **50**(1), 11-15. ISSN: 0932-4739.

Dynamika změn koncentrací imunoaktivních látek v kolostru

Josef Illek, Veronika Sujová, Jana Šmídková

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

Úvod

Kolostrum je sekret mléčné žlázy, který je důležitý pro zabezpečení kolostrální imunity a výživy novorozených telat. V průběhu několika dnů se jednotlivé složky kolostra významně mění a postupně se tvoří se mléko. Cílem naší práce bylo zjistit dynamiku změn vybraných parametrů kolostra v časové ose.

Materiál a metodika

Kolostrum a mléko bylo získáno dojením 10 krav holštýnského plemene na 2. – 4. laktaci z celkové nádoje. První kolostrum bylo odebráno bezprostředně po porodu do 1- 3 hodin. Druhé v době 6- 12 hod po porodu. Třetí vzorek byl odebrán s odstupem 12 až 15 hodin po druhém odběru. Další vzorky se odebírali při ranním dojení a to čtvrtý, šestý a osmý den. Odebrané vzorky kolostra a mléka z celkové nádoje byly uchovány v plastových vzorkovnicích při teplotě - 70 °C až do doby provedení analýz.

V první fázi byla stanovena v kolostru a mléku koncentrace vitamínu A a E pomocí kapalinové chromatografie.

V druhé fázi se připravovalo bezbuněčné kolostrum (sérum), kde se vzorky kolostra/mléka rozmrazily ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Po úplném rozmrazení se zředily s roztokem PBS v poměru 1:1. Dále se postupně 4-krát centrifugovaly. Výsledný vzorek se přefiltroval přes 0,2 mikrometrové filtry. Takto získaný výsledný čirý alikvot se použil na stanovení celkové bílkoviny, laktoferinu, celkových globulinů. Dále se stanovovali pomocí radiální imunodifuze hladiny IgG1.

Celková bílkovina v séru kolostra a mléka byla stanovena kolorimetricky pomocí soupravy 12751 f. BioVendor na přístroji Cobas Mira S. Jednotlivé frakce bílkovin byly stanoveny pomocí elektroforézy a vyhodnoceny denzitometricky.

Koncentrace IgG1 byly stanoveny metodou radiální imunodifuze, kdy se na připravený agarózový gel SEVAC nanasly vzorky a králičí antibovinní antisérum IgG1. Nanesené vzorky se nejdříve naředily v mikrotitrační desce 10-krát. Principem bylo navázání protilátek a antisera, které vytvořily precipitační linie v tvaru kruhu. Po 24 hodinách v termostatu se tyto linie odečetly, přičemž průměry byly úměrné koncentraci příslušného antigenu ve vzorku, což v našem případě byla podtřída 1 gama imunoglobulinu. Vlastní koncentrace se vypočítá dle kalibrační křivky, která byla tvořena komerčním kontrolním sérem naneseným v několika ředěních.

Laktoferin v séru kolostra a mléka byl stanoven metodou HPLC

Koncentrace mikroprvků v kolostru a mléku byly stanoveny pomocí AAS- atomové absorpční spektrometrie. Vzorky kolostra a mléka byly mineralizovány v uzavřené systému mokrou

cestou pomocí zařízení Milestone ETHOS. Zinek byl stanoven pomocí AAS SOLAR, selen byl stanoven hydridovou metodou AAS rovněž na přístroji SOLAR s hydridovou jednotkou VP 100.

Výsledky

Koncentrace vybraných parametrů kolostra a mléka jsou uvedeny v tabulkách 1-3. .

		1.	2.	3.	4.	5.	6.
CB (g/l)	x	129,04	90,18	36,22	23,14	17,38	15,83
	SD	26,94	11,50	11,91	7,74	4,90	3,81
	Vx (%)	20,88	12,75	32,88	33,45	28,19	24,07
Glob. (g/l)	x	78,46	49,22	11,98	4,42	3,05	2,40
	SD	17,66	7,17	4,52	2,26	1,33	0,76
	Vx (%)	22,51	14,56	37,73	51,13	43,61	31,67
IgG1 (g/l)	x	16,71	8,84	3,33	1,06	0,71	0,58
	SD	5,81	3,00	1,70	0,37	0,19	0,10
	Vx (%)	34,77	33,94	51,05	34,91	26,76	17,41

(CB – celková bílkovina)

		1.	2.	3.	4.	5.	6.
vit A (umol/l)	x	21,63	13,37	8,27	3,49	1,92	1,31
	SD	17,07	7,11	6,73	1,98	1,30	0,54
	Vx (%)	78,92	53,18	81,38	56,73	67,71	41,22
vit E (umol/l)	x	18,07	11,64	6,63	3,60	1,94	1,45
	SD	8,58	4,03	3,35	1,61	1,02	0,84
	Vx (%)	47,48	34,62	50,53	44,72	52,58	57,93

		1.	2.	3.	4.	5.	6.
Lf (mg/l)	x	1438,36	1171,73	602,28	366,28	309,63	249,40
	SD	522,53	385,27	217,80	144,04	174,51	154,08
	Vx (%)	36,33	30,62	36,22	39,33	56,36	52,34
Se (µg/l)	x	53,22	36,23	20,44	18,57	18,15	14,57
	SD	8,87	11,81	7,24	8,43	7,18	4,88
	Vx (%)	16,67	32,60	35,42	45,40	39,56	33,49
Zn (mg/l)	x	16,25	12,59	7,30	6,36	6,30	5,52
	SD	6,17	5,37	1,50	1,14	0,94	1,11
	Vx (%)	37,97	42,65	20,55	17,92	14,92	20,11

(Lf – laktoferin)

Závěry

Sledování prokázalo významné změny ve složení kolostra a mléka v časové ose od porodu do osmého dne laktace. Významně se snížila koncentrace všech sledovaných parametřů. Nejvýraznější změny byly zjištěny v koncentraci celkové bílovin (CB), a globulinů a (IgG1) v kolostru dojníc mezi prvním a druhým odběrem (nádojí).

Práce byla financována v rámci projektu IGA 103/2014/FVL

Seznam literatury:

- L. ADLEROVA, A. BARTOSKOVA, M. FALDYNA (2008): Lactoferrin: a review, Vet. Med. 53,2008 (9):457-468
- C. R. BAUMRUCKER, A.M. BURKETT, A.L. MAGLIARO-MACRINA, C.D. DECHOW (2010) :Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G₁ into colostrum, J Dairy Sci. 2010 Jul;93(7):3031-8
- ROY BURRIS and JOHN JOHNS: Feeding the Cow Herd, In Beef Management in Kentucky, ID-108.E. J. CARROL and F. A. MURPHY: Changes in whey proteins between drying and colostrums formativ,J. of D. Sci. Volume 48, Issue 9, 1246-1249, 1965
- M. DRÁČKOVÁ*, I. BORKOVCOVÁ, B. JANŠTOVÁ, M. NAISEROVÁ, H. PŘÍDALOVÁ, P. NAVRÁTILOVÁ and L. VORLOVÁ (2009): Determination of Lactoferrin in Goat Milk by HPLC Method, Czech J. Food Sci Vol. 27, 2009, Special Issue
- H. M. HAMMON, J. STEINHOFF-WAGNER, J. FLOR, U. SCHÖNHUSEN and C. C. METGES(2012): Lactation Biology Symposium: Role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves, J. Anim. Sci. 2013,91: 685-695
- HARALD M. HAMMON and JUERG W. BLUM4 : Metabolic and Endocrine Traits of Neonatal Calves Are Influenced by Feeding Colostrum for Different Durations or Only Milk Replacer1–3, J. Nutr. March 1, 1998 vol. 128 no. 3 624-632
- S. I. KEHOE , A. J. HEINRICHS ,2 PAS, M. L. MOODY , C. M. JONES and M. R. LONG (2011): Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum (Department of Dairy and Animal Science, The Pennsylvania State University, University Park 16802), The Prof. Anim. Scien. 27 (2011): 176-180
- MIANBIN WU, XUEWAN WANG, ZHENGYU ZHANG and RUTAO WANG: Isolation and Purification of Bioactive Proteins from Bovine Colostrum, DOI: 10.5772/20246
- K. STELWAGEN, E. CARPENTER, B. HAIGH, A. HODGKINSON and T. T. WHEELER (2008) : Immune components of bovine colostrum and milk, J. Anim. Sci. 2009.87(Suppl. 1): 3-9

Studium sezónní myopatie u koní v České republice

Františka Hrdinová, Zuzana Drábková, Petr Jahn

Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, VFU Brno

Úvod

Atypická myopatie (AM) je onemocnění s vysokou mortalitou, které se sezónně objevuje v Evropě u koní chovaných na pastvě. Klinicky se projevuje slabostí, svalovými fascikulacemi, ztrátou schopnosti pohybu a ulehnutím, pocením, dysurií, tachykardií, ztíženým dýcháním a myoglobinurií. Příčinou je rozsáhlá lýza kosterní svaloviny provázená enormní elevací aktivity svalových enzymů (CK, LD a AST) v periferní krvi (Aleman 2008). AM byla poprvé popsána ve Velké Británii v roce 1939 (Bowen a Craig 1942). Onemocnění s podobným klinickým průběhem, označované jako sezónní pastevní myopatie (SPM) se vyskytuje na americkém kontinentě (Valberg et al. 2013). V posledním desetiletí bývá výskyt AM/SPM zjišťován v několikaletých intervalech v západní Evropě, a to vždy na podzim a v následujícím jarním období (van Galen et al. 2012). V České republice nebyl výskyt dosud popsán. Na podzim roku 2013 bylo zaznamenáno v ČR několik případů nezátěžové rhabdomyolýzy, která svými klinickými projevy připomínala AM/SPM. Za příčinu AM/SPM se považuje hypoglycin A, jehož zdrojem jsou pravděpodobně nažky některých druhů javorů. Tato hypotéza byla vyslovena na základě nálezu metylencyklopropyloctové kyseliny, která je metabolitem hypoglycinu A, v séru postižených koní (Votion et al. 2013). Následkem intoxikace dochází k narušení funkce acyl-CoA dehydrogenázy a následné kumulaci acylkarnitinů s krátkým a středně dlouhým řetězcem v periferní krvi (Westerman et al. 2007, Votion et al. 2013). Pro potvrzení diagnózy AM/SPM je nutné u suspektních případů detekovat tyto metabolity v krvi, případně moči.

Cílem studie bylo:

1. Podchytit případy nezátěžové rhabdomyolýzy u koní s přístupem k pastvě, které se vyskytly v ČR na podzim 2013 a v roce 2014.
2. U získaných vzorků séra a moči těchto koní provést biochemické a metabolické vyšetření s cílem stanovit specifickou diagnózu.

Materiál a metodika

V první části studie byly na základě osobních kontaktů s terénními veterináři získány údaje o výskytu nezátěžových myopatií u koní s přístupem k pastvě v podzimním období 2013 a v roce 2014. U 10 koní byly získány vzorky séra (u některých opakovaně) a u 7 z nich i moči.

Ve vzorcích séra byla stanovena aktivita svalově specifických enzymů (CK a AST) pro potvrzení diagnózy myopatie. Vzorky byly zamraženy a v teplotě -80°C uchovány pro další analýzu.

V druhé části byla provedena Metabolomickou skupinou Lékařské Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci metabolomická analýza vzorků séra a moči u pacientů a kontrolní skupiny sestávající z 12 koní (12 vzorků séra a 6 vzorků moči). Celkem bylo analyzováno 31 vzorků séra a 13 vzorků moči. Analýzy byly prováděny na kapalinovém chromatografu Ultimate 3000, Dionex s detekcí tandemovou hmotnostní spektrometrií na přístroji QTRAP 5500, AB Sciex. Byla aplikována metoda přímého nástřiku do hmotnostního spektrometru umožňující analýzu 50 metabolitů zahrnujících aminokyseliny a acylované karnitiny. Metabolity byly detekovány v MRM módu v pozitivním módu ionizace, kvantifikovány v MultiQuant 3.0 a statisticky vyhodnoceny.

Výsledky

Ve sledovaném období bylo zaznamenáno v České republice 21 případů myopatie u koní s přístupem k pastvě, které svými příznaky odpovídaly AM/SPM. U všech koní byla myopatie potvrzena biochemickým vyšetřením na základě elevace CK (4 631,0 μ kat/l; 764,0 – 19 030,0 μ kat/l). V séru koní s atypickou myopatií byly nalezeny zvýšené hodnoty nejvíce diskriminujících acylovaných karnitinů s délkou uhlíkatého řetězce C5, C6, C8, C8:1, C10, C10:2, C16:1OH a C18:2OH - poměry mediánů byly 57, 191, 96, 118, 64, 128, 35 a 32. Dále byly sledovány mírně nižší hladiny citrulinu a argininu – poměry mediánů: 0,52 a 0,68. Ve vzorcích moči byly koncentrace metabolitů značně variabilní, ale i přesto byly sledovány významné rozdíly v mediánech u karnitinů C3, C4OH, C10:1 a C10:2 – poměry mediánů: 17, 15, 10, 13.

Tab. Hodnoty mediánů a poměrů pro jednotlivé aminokyseliny a acylované karnitiny

	Moči			Séra				Moči			Séra		
	kontroly	AM/SPM	poměr	kontroly	AM/SPM	poměr		kontroly	AM/SPM	poměr	kontroly	AM/SPM	poměr
Ala	270.18	1397.95	5.2	81.09	145.94	1.8	C5DC	19.82	36.27	1.8	0.06	0.93	16.1
Arg	46.71	71.94	1.5	73.82	50.45	0.7	C5:1	0.14	0.16	1.1	0.01	0.01	2.3
ArgSucc	3.61	0.28	0.1	0.01	0.02	1.8	C6	3.09	17.62	5.7	0.01	1.79	191.6
Cit	29.55	30.38	1.0	55.88	29.27	0.5	C6DC+C7OH	0.25	0.38	1.5	0.00	0.03	7.7
Glu	66.80	87.10	1.3	84.43	71.00	0.8	C8	6.00	21.84	3.6	0.00	0.47	96.0
Gly	1125.62	1990.30	1.8	308.51	334.44	1.1	C8:1	5.58	28.35	5.1	0.00	0.29	118.3
His	14.30	10.16	0.7	9.10	10.73	1.2	C10	0.52	3.38	6.6	0.00	0.23	64.3
Lys	149.71	206.70	1.4	123.47	117.51	1.0	C10:1	0.85	8.72	10.3	0.01	0.16	29.4
Met	12.97	24.60	1.9	20.71	16.82	0.8	C10:2	2.20	28.28	12.8	0.00	0.29	128.3
Orn	28.89	29.70	1.0	42.17	52.85	1.3	C12	0.13	0.22	1.6	0.00	0.06	23.3
Phe	10.89	23.34	2.1	72.15	76.59	1.1	C12:1	0.18	0.41	2.2	0.01	0.07	10.0
Pro	155.76	27.72	0.2	51.96	44.60	0.9	C14	0.07	0.16	2.2	0.00	0.05	15.8
Thr	13.41	7.44	0.6	6.46	5.17	0.8	C14:1	0.05	0.08	1.7	0.00	0.10	30.3
Trp	7.08	19.37	2.7	10.76	7.66	0.7	C14:2	0.04	0.03	0.9	0.00	0.02	14.8
Tyr	17.41	23.90	1.4	63.55	58.63	0.9	C14OH	0.03	0.05	1.9	0.00	0.01	29.2
Val	35.20	53.40	1.5	118.92	115.68	1.0	C16	0.06	0.14	2.2	0.01	0.12	16.4
Xle	98.78	132.80	1.3	152.07	165.03	1.1	C16:1	0.05	0.07	1.6	0.00	0.05	27.6
C0	109.45	733.43	6.7	12.09	22.55	1.9	C16OH	0.03	0.03	1.3	0.00	0.01	24.8
tAC	206.17	1251.48	6.1	15.26	49.78	3.3	C16:1OH	0.01	0.02	1.4	0.00	0.02	34.9
C2	70.74	409.55	5.8	3.01	17.74	5.9	C18	0.04	0.06	1.3	0.00	0.06	16.7
C3	3.22	54.98	17.1	0.39	0.92	2.4	C18:1	0.01	0.02	2.0	0.01	0.17	25.9
C3DC+C4OH	1.04	15.14	14.6	0.01	0.21	24.7	C18:2	0.03	0.04	1.1	0.00	0.03	11.2
C4	18.57	44.55	2.4	0.29	5.69	19.8	C18:1OH	0.01	0.01	2.6	0.00	0.02	27.5
C4DC+C5OH	1.16	1.49	1.3	0.02	0.10	4.5	C18:2OH	0.06	0.01	0.2	0.00	0.01	32.3
C5	13.88	48.49	3.5	0.11	6.20	56.9	C18OH	0.01	0.02	2.2	0.00	0.00	6.1

Závěr

Výsledky naší práce se shodují s dříve publikovanými údaji, které prokázaly zvýšení koncentrace acylovaných karnitinů u koní s atypickou myopatií. Další práce bude zaměřena na komplexní metabolomický profil sér a močí zahrnující 200 metabolitů.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 86/2014/FVL

Seznam použité literatury

- ALEMAN M.: A review of equine muscle disorders. *Neuromuscular disorders* 2008,18: 277-287.
- BOWEN J.N., CRAIG J.F.: Myoglobinuria in horses. *Veterinary Record* 1942, 35: 354.
- VAN GALEN G., MARCILLAUD PITEL C., SAEGERMAN S., PATARIN F., AMORY H., BAILY J.D., CASSART D., GERBER V., HAHN C., HARRIS P., KEEN J., KIRSCHVINK N., LEFERE L., MCGORUM B., MULLER J.M.V., PICAVET M.T.J.E., PIERCY R.J., ROSCHER K., SERTEYN D., UNGER L., VAN DER KOLK J.H., VAN LOON G., VERWILGHEN D., WESTERMANN C.M., VOTION D.M.: European outbreaks of atypical myopathy in grazing equids (2006 – 2009): Spatiotemporal distribution, history and clinical features. *Equine Veterinary Journal* 2012, 44:614-620.
- VOTION D.M., VAN GALEN G., SWEETMAN L., BOEMER F., DE TULLIO P., DOPAGNE C., LEFERE L., MOUITHYS-MICKALAD A., PATARIN F., ROUXHET S., VAN LOON G., SERTEYN D., SPONSELLER B.T., VALBERG S.J.: Identification of methylcyclopropyl acetic acid in serum of European horses with atypical myopathy. *Equine Veterinary Journal* 2013, DOI: 10.1111/evj.12117
- WESTERMANN C.M., DE SAIN-VAN DER VELDEN C.G.M., VAN DER KOLK J.H., BERGER R., WIJNBERG I.D., KOEMAN J.P., WANDERS R.J.A., LENSTRA J.A., TESTERINK N., VAANDRAGER A.B., VIANEY-SABAN C., ACQUAVIVA-BOURDAIN C., DORLAND L.: Equine biochemical multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency as a cause of rhabdomyolysis. *Molecular Genetics and Metabolism* 2007, 91:362-369

Vliv infekcí strongylidními hlísticemi na výskyt malárie u lidoopů a lidí

Barbora Kalousová, David Modrý, Mwanahamisi Issa, Klára Vlčková

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

Úvod

Plasmodium spp., stejně tak jako strongylidní hlístice, patří mezi jedny z nejčastějších parazitů primátů, včetně lidí (1). Geografické rozšíření těchto parazitů se překrývá, a proto můžeme očekávat i zvýšené riziko koinfekcí (2), které mohou vést k vysoké morbiditě a příležitostně i mortalitě (3). Některé studie popisují u lidí zhoršení průběhu malárie vlivem přítomnosti helmintů (4), jiné snížení její patogenity (5). Doposud však vzájemné vztahy mezi malárií a přítomností helmintů nebyly u lidoopů zkoumány. Cílem naší práce bylo zhodnotit koinfekce strongylidních hlístic a malárie u modelových populací primátů a pokusit se objasnit otázku výskytu krevních parazitů v trusu zkoumaných jedinců.

Materiál a metodika

Sběr a fixace vzorků

Zpracováno bylo celkem 51 vzorků trusu od 22 jedinců patřících do dvou skupin habituovaných goril nížinných (Makumba; n=9 a Mayele; n=13) žijících v chráněných oblastech Dzanga-Sangha ve Středoafrické republice. Vzorky použity pro koprologické analýzy byly fixovány do 4% formaldehydu, pro detekci malárie byly fixovány v *RNAlater* a skladovány při teplotě -20°C.

Detekce *Plasmodium* spp.

Celková DNA byla izolována pomocí QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany). Získaná DNA byla použita pro amplifikaci *Cytochromu b* podle modifikovaného protokolu (6, 7). PCR produkty byly osekvenovány (Macrogen, Netherland). Získané sekvence byly zpracovány pomocí softwaru Chromas Pro 1.5 (Technelysium, Ltd) a identifikovány do druhu v programu BLAST.

Koprologické analýzy

Všechny vzorky byly nejprve homogenizovány, propláchnuty přes síto a centrifugovány. Získaný sediment byl zvážen a doplněn 4% formaldehydem do 10 ml a vyšetřen pomocí Sheaterovy flotační metody (8) a modifikované sedimentační metody (9). Strongylidní hlístice byly navíc kvantifikovány a jejich množství bylo přepočteno na gram sedimentu (EPG).

Statistické analýzy

Pro statistické stanovení korelací koinfekcí malárie a strongylidních hlístic byly použity zobecněné lineární smíšené modely (GLMM) s binomickým rozložením. V prvním kroku byl porovnán statut přítomnosti *Plasmodium* sp. (pozitivní/negativní) s výskytem strongylidních hlístic a dalších parazitických helmintů a v kroku druhém statut přítomnosti *Plasmodium* sp. s intenzitou infekcí (EPG) strongylidních hlístic. Všechny statistické výpočty byly provedeny v software-u R (10).

Výsledky

Prevalence malárie

Z 51 vyšetřených vzorků od 22 identifikovaných jedinců bylo 24 (47%) pozitivních na malárii, a to zastoupením druhů *Plasmodium adleri* (n=10), *Plasmodium praefalciparum* (n=7), *Plasmodium blacklocki* (n=4), *Plasmodium vivax* (n=2) a *Plasmodium ovale* (n=1).

Prevalence nalezených hlístic

U všech jedinců byly detekovány strongylidní hlístice zahrnující blíže druhově nerozlišitelná vajíčka (100%) a rozlišitelná strongylidní vajíčka rodu *Mammomonogamus* sp. (72,7%). Rovněž jsme našli zástupce dalších hlístic, jako jsou blíže neidentifikované spiruridní hlístice, *Strongyloides* sp. a *Probstmayria* sp.

Koinfekce malárie a strongylidních hlístic

U poloviny jedinců byla identifikována přítomnost koinfekce strongylidních hlístic s plazmodii. Docházelo také ke koinfekci s ostatními druhy hlístic, kdy jedinci pozitivní na *Plasmodium* sp. byli dále infikováni třemi, dvěma a jen jedním z jejich zástupců (36.4%, 54.5%, 9%). Přítomnost *Plasmodium* sp. nijak nekorelovala s výskytem strongylidních hlístic ($z = -0.531$, $p = 0.595$) a ani s intenzitou infekcí (EPG) strongylidních hlístic ($z = -0.029$, $p = 0.977$). -0.029 , $p = 0.977$.

Závěry

Během vyhrazeného období se nám podařilo vyšetřit dostatečné množství vzorků trusu od dvou habituovaných skupin goril pro porovnání koinfekcí GIT parazitů (zejm. strongylidních hlístic) a původců malárie u volně žijících primátů. Předpokládali jsme, že nám tyto informace napomohou vysvětlit mechanismus výskytu krevních parazitů *Plasmodium* sp. v trusu. Statistické hodnocení těchto dat stále probíhá, avšak je již patrné, že zřejmě nedochází ke korelaci mezi výskytem strongylidních hlístic a detekcí plazmodií v trusu lidoopů. Toto zajímavé téma zůstává tedy i nadále neobjasněné.

Seznam literatury

1. KEITA, B. Mamadou et al. Looking in apes as a source of human pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2014, v tisku: 1-6.
2. HUMPHRIES, Debbie et al. Epidemiology of Hookworm Infection in Kintampo North Municipality, Ghana: Patterns of Malaria Coinfection, Anemia, and Albendazole Treatment Failure. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011, **84**(5): 792-800. ISSN 0002-9637.
3. GUILLOT, Jacques et al. Nematodes of the genus *Oesophagostomum*: an emerging risk for humans and apes in Africa? *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*. **195**(8): 1955-1963. ISSN 0001-4079
4. LE HESRAN, Jean-Yves et al. Severe malaria attack is associated with high prevalence of *Ascaris lumbricoides* infection among children in rural Senegal. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2004, **98**(7), 397-399. ISSN 0035-9203.
5. DEGAREGE, Abraham et al. Malaria severity status in patients with soil-transmitted helminth infections. *Acta Tropica*. 2009, **112**(1), 8-11. ISSN 0001-706X.
6. PRUGNOLLE, Franck et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, **107**(4): 1458-1463. ISSN 0027-8424.
7. MAPUA, I. Mwanahamisi et al. Ecology of malaria infections in western lowland gorillas inhabiting Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *Odesláno do tisku*. 2014.
8. SHEATHER, A, Leslie. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*. 1923, **36**: 266-275.
9. 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**(1): 23-28.
10. R Development Core Team 2008: R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Význam infekce a aktivity EHV2 a 5 na vznik klinického onemocnění herpesvirovou keratitidou u koní

Šárka Krisová¹, Dobromila Molínková²
Klinika Chorob Koní¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie², Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

EHV 2 a 5 patří do skupiny gamma herpesvirů, které u koní v organizmu doživotně perzistují a suspektně se manifestují různými formami ulcerující či neulcerující keratitidy. Typickým klinickým projevem akutního stadia jsou bodové opacity rohovky barvitelné bengálskou červení, mírná bolestivost, blefarospasmus a epifora. Matoucí mohou být další dvě stadia (ulcerující a skvrnité), které typický zjev postrádají a již jsou doprovázeny různě závažným stupněm uveitidy. Onemocnění má dlouhodobý průběh se střídavou latencí a rekurencí. Odpověď na antibiotickou terapii či terapii kortikosteroidy je nedostatečná, případně může dojít i ke zhoršení klinického stavu navzdory léčbě. K exacerbaci dochází zejména v období zvýšeného stresu, tj. transporty, závody, chovatelské akce. Z tohoto důvodu představuje problém hlavně u sportovních koní ve vysoké zátěži nebo u imunosuprimovaných jedinců. Vliv equinních herpesvirů na vznik a manifestaci klinického očního onemocnění nebyl zatím jednoznačně prokázán.

Materiál a Metodika

Od roku 2009 do roku 2014 bylo shromážděných celkově 55 pacientů s unilaterální, případně bilaterální oční lézí, vyšetřených na Klinice chorob koní. Vzorek na virologické vyšetření metodou real time PCR byl odebrán stěrem ze spojivkového vaku. V roce 2014 bylo u 15 koní kromě stěru ze spojivkového vaku odebráno 30 ml periferní krve na buffy coat. Přítomnost viru byla stanovená rovněž v cirkulujících mononukleárech.

Pomocí programu PrimerQuest (IDT Integrated DNA Technologies) byly navrženy 2 oligonukleotidové primery v oblasti genu pro DNA teminázu a to tak, aby vyhovovaly i pro virus EHV-2 i pro virus EHV-5. V úseku ohraničeném těmito primery byly pak navrženy 2 oligonukleotidové sondy značené různými fluoresceiny a detekující sekvence specifické pouze pro EHV-2 nebo pro EHV-5.

K provedení real time PCR reakce byla použita směs DyNAmo Flash Probe qPCR kit (Finnzymes, Finland) a zmiňované primery a sondy.

PCR byla prováděna na přístroji LC480 (Roche) ve 40 cyklech: 95°C/5s denaturace, 60°C/30s annealing, extenze a snímání dat.

Výsledky

Z celkového počtu 55 pacientů referovaných na kliniku chorob koní v období od roku 2009 do 2014 s oftalmologickým onemocněním byla přítomnost equinního herpesviru v signifikantním množství potvrzena u 26 koní ze spojivkového stěru.

V roce 2014 jsme na základě klinických projevů odebrali vzorky od 15 koní (22 očí). U 7 koní byly stěry spojivkového vaku provedeny bilaterálně. U dvou z nich byly léze přítomné na obou očích, u pěti pacientů byla zahájena terapie antivirotyky před odebráním vzorků, proto jsme odebrali druhý vzorek z kontralaterálního oka. Přítomnost jednoho typu viru či obou (EHV 2 i EHV 5) byla potvrzená u 10 koní (14 očí). Oba viry byli detekované ve spojivkovém stěru u 10 očí, infekce čistě EHV 2 u dvou očí, stejně jako u monoinfekce virem EHV 5. Přítomnost viru v cirkulujících mononukleárech jsme potvrdili u 4 koní.

Na základě virologického vyšetření byla zahájena lokální terapie acyclovirem (Zovirax ung.). V případech ulcerativní formy byla zvolena kombinace acyclovir/antibiotika, popř. byla konkurentní uveitida kontrolována aplikací atropinu. Kortikosteroidy byly nasazeny za účelem dosažení projasnění rohovky u neulcerujících forem po iniciální stabilizaci akutní fáze virostatikem. U většiny pacientů jsme dokázali stav stabilizovat a udržet zrakovou schopnost postiženého oka.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 97/2014/FVL

Seznam literatury:

Gilger CB 2011: Equine Ophthalmology. Elsevier Saunders, Missouri, 514p: 201-202

Nordengrahna A, Merzaa M, Rosb C, Lindholm A, Pálfi V, Hannante D, Belákb S 2002: Prevalence of equine herpesvirus types 2 and 5 in horse populations by using type-specific PCR assays, Vet Res 33: 251-259

Kershaw O, Oppen T, Glitz F, et al 2001: Detection of equine herpesvirus type 2 (EHV-2) in horses with keratoconjunctivitis, Virus Res 80:93–99

Telford EA, Watson MS, Aird HC, Perry J, Davison AJ 1995: The DNA Sequence of Equine Herpesvirus 2, J Mol Biol 249: 520–528

Charakteristika multirezistentních izolátů salmonel z odpadních vod a racků metodami molekulární biologie

^{1,2}Martina Masaříková, ¹Ludmila Kohoutová, ¹Ivan Manga, ^{1,2}Alois Čížek

¹Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²CEITEC VFU Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Salmonely patří mezi nejvýznamnější původce alimentárních infekcí člověka a zvířat po celém světě. V současné době je v České republice zaznamenáno přibližně 10 000 případů humánní salmonelózy ročně (1). Nejčastějším sérotypem uplatňujícím se v etiologii salmonelóz člověka v ČR je *S. Enteritidis*, na druhém místě sérotyp *Typhimurium* (2). Vážný zdravotní problém představují rezistentní izoláty salmonel. Dominující sérotyp *Enteritidis* se sice vyznačuje dobrou citlivostí k antimikrobiálním látkám, jiné sérotypy, jako například *S. Typhimurium* a její monofázická varianta, naopak citlivostí sníženou. Není výjimkou, že jsou izolovány kmeny rezistentní k pěti a více antibiotikům. Tyto virulentní salmonely se mohou šířit do životního prostředí prostřednictvím odpadních vod, proces čištění totiž nemusí zajistit inaktivaci všech kontaminujících bakterií (3).

Rezistentní izoláty salmonel byly v Česku prokázány i u volně žijících ptáků racků chechtavých (4). Cílem naší studie bylo (a.) dokumentovat po dobu jednoho roku aktuální úroveň výskytu rezistentních salmonel v Česku jejich monitoringem v odpadních vodách prošlých čističkou odpadních vod z velké městské aglomerace (město Brno), (b.) sledovat výskyt salmonel u mláďat racků chechtavých v povodí řeky Svatky, do které vyúsťují odpadní vody z monitorované čističky odpadních vod, (c.) pokusit se prokázat, že konkrétní přesně definované izoláty z odpadních vod kolonizovaly mláďata racků hnízdících v povodí řeky Svatky.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Vzorky odpadní vody (37) byly odebírány v Čistírně odpadních vod Modřice v místě výtoku do řeky Svatky. Odběry probíhaly v průběhu celého roku 2012 metodou Moorových tampónů (5), každý byl ve vodě umístěn po dobu jednoho týdne. V květnu 2012 bylo dále

odebráno 284 kloakálních výtěrů mláďat racka chechtavého hnízdícího v lokalitě nádrži Nové Mlýny. Každý vzorek reprezentoval jedno mláďe.

Izolace a identifikace salmonel

Prvním krokem při izolaci salmonel bylo neselektivní pomnožení odebraného materiálu. Moorovy tampóny byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin v 220 ml peptonové vody, tampóny s kloakálními výtěry v 10 ml peptonové vody za stejných podmínek. Z každého pomnoženého vzorku odpadní vody bylo přeneseno po 20 mikrolitrech do 1) semisolidního Rappaport-Vassiliadisova agaru s novobiocinem bez přidavku dalších antibiotik (MSRVA), (Oxoid, UK), 2) do MRSVA suplementovaného tetracyklinem (8 mg/l), 3) do MRSVA s cefotaximem (2 mg/l) a do MRSVA s ciprofloxacinem (0,05 mg/l). Dvacet mikrolitrů peptonové vody s pomnoženými vzorky kloakálních výtěrů racků bylo selektivně pomnožováno pouze v MRSVA bez přidavku dalších antibiotik. Vzorky, které vykázaly motilitu v MRSVA byly subkultivovány na agaru s xylózou, lyzinem a deoxycholátem sodným (XLD), (Oxoid, UK). Kolonie s morfologií typickou pro salmonely byly identifikovány metodou matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), (Bruker Daltonics, Germany). Sérotypizace byla provedena sklíčkovou aglutinací s použitím komerčních antisér (DenkaSeiken, Japonsko a BioRad, Francie), fágová typizace byla provedena na základě HPA Colindale protokolu.

Identifikace fenotypových a genotypových markerů rezistence

U všech izolovaných salmonel byla stanovena citlivost ke dvanácti antibiotikům diskovým difúzním testem dle standardních laboratorních protokolů (6). Konkrétně byla testována tato antibiotika: amoxicilin klavulanát (30 µg), ampicilin (10 µg), cefalotin (30 µg), ceftazidim (30 µg), chloramfenikol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg), kyselina nalidixová (30 µg), streptomycin (10 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (25 µg), směs sulfonamidů (300 µg) a tetracyklin (30 µg), (Oxoid, UK). U izolátů se sníženou citlivostí byly metodou PCR prokazovány příslušné geny rezistence, integrony třídy 1 a 2 a genové kazety uvnitř těchto integronů.

Porovnání salmonel izolovaných z odpadních vod a z racků

U 16 salmonel izolovaných z odpadních vod a racků se shodným sérotypem, fagotypem a fenotypem i genotypem rezistence byla provedena pulsní gelová elektroforéza (PFGE) za účelem posouzení epidemiologické relevance.

Výsledky

Z 37 vzorků vody bylo získáno 89 salmonel devatenácti různých sérotypů, nejčastější byla *S. Infantis* (35 %). Z 284 vzorků racků bylo 38 (13 %) pozitivních, izolované salmonely byly deseti různých sérotypů, nejčastěji se vyskytoval sérotyp Agona (34 %).

Rezistence byla prokázána u 63 procent salmonel z odpadních vod, 48 izolátů (86 %) bylo rezistentních ke třem a více antibiotikům. Nejvíce byla zastoupena rezistence k sulfonamidům a tetracyklinu. Mezi 38 salmonelami z racků bylo rezistentních 37 %, nejčastější byla rezistence k tetracyklinu a ampicilinu.

Šest izolátů sérotypu Agona se stejným fenotypem a genotypem (2 z odpadní vody, 4 z racků), osm *S. Enteritidis* (3 a 5) a dva izoláty sérotypu Senftenberg (1 a 1) vykázaly v PFGE stejný makrorestrikční profil.

Závěr

V roce 2012 bylo z 37 vzorků odpadních vod získáno různými kultivačními přístupy celkem 89 izolátů salmonel devatenácti různých sérotypů. Pomnožením vzorků v Rappaport – Vassiliadisově polotuhém médiu obohaceném o jednotlivá antibiotika se podařilo zachytit až o 82 % více rezistentních izolátů, než při kultivaci na půdách bez antibiotik. Celkem 63 % rezistentních, respektive 54 % multirezistentních salmonel bylo izolováno z odpadních vod po procesu čištění bezprostředně před jejich vypouštěním do řeky Svratky.

Ve stejném roce bylo z kloakálních výtěrů 284 mláďat racků izolováno 38 (13 %) izolátů salmonel, mezi nimiž bylo identifikováno deset různých sérotypů. Nejčastější fenotypy rezistence – rezistence k tetracyklinu a ampicilinu, byly kódovány zejména geny *tet(B)* a *bla_{TEM}*.

Další charakterizací 16 vybraných izolátů sérotypů Agona, Enteritidis PT 8 a Senftenberg byla potvrzena přítomnost identických izolátů a časová souslednost jejich izolace z odpadní vody a z racků chechtavých. Ze studie vyplývá, že odpadní vody kontaminují životní prostředí a mohou přispět ke kolonizaci volně žijících zvířat rezistentními mikroorganismy, které mohou být v přírodě dále šířeny.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 74/2014/FVL

Seznam literatury

1. Státní zdravotní ústav. Infekce v ČR - EPIDAT [Internet]. Prague: Státní zdravotní ústav; 2014 [cited 2014 Nov 19]. Available from: <http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>.
2. Karpíšková R. a Dědičová P. Výskyt a charakteristika salmonel ve vybraných lokalitách České republiky – porovnání epidemiologických a laboratorních dat. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2009;58(1):31 – 5.

3. Nogales B, Lanfranconi MP, Piña-Villalonga JM, Bosch R. Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35:275-298.
4. Čížek A, Dolejská M, Karpíšková R, Dědičová D, Literák I. Wild black-headed gulls (*Larus ridibundus*) as an environmental reservoir of *Salmonella* strains resistant to antimicrobial drugs. *Eur J Wildl Res.* 2007;53:55-60.
5. Moore B. The detection of paratyphoid carriers in towns by means of sewage examination. *Mon Bull Minist Health Public Health Lab Serv.* 1948;7:241-8.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard—tenth edition; M02-A10. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2010.

Genetická a fylogenetická analýza trusem vylučovaných parvovirů afrických primátů

Molinková Dobromila^{1,2}, Brožová Kristýna¹, Slaninková Eva¹

¹Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinární lékařství, VFU Brno, ²CEITEC Středoevropský technologický institut, VFU Brno

Úvod:

Parvoviry jsou malé, neobalené viry patřící do čeledi *Parvoviridae* s medicínsky významnými zástupci v rodech *Bocavirus* a *Erythrovirus*. Jejich genom je tvořen lineární jednořetězcovou molekulou DNA o délce asi 5000 nt¹. Bokaviry byly izolovány od široké škály savců, včetně člověka a afrických primátů^{1 2}. Bokavirus člověka (HBoV1-4) je spojován s onemocněním dýchacího a gastrointestinálního traktu, a to především u dětí a oslabených jedinců, jeho samostatná role v patogenezi onemocnění je však stále předmětem diskuse¹. Bokavirus gorily (GBoV) byl popsán u goril nížinných (*Gorilla gorilla*) trpících akutní gastroenteritidou³, bokaviry podobné lidským izolátům byly detekovány u divoce žijících šimpanzů v Kamerunu². Cílem naší práce bylo stanovit prevalenci výskytu bokavirů ve vzorcích trusu afrických primátů a pomocí fylogenetické analýzy stanovit jejich příbuznost s dosud popsanými kmeny HBoV, GBoV a bokaviru šimpanze.

Materiál a metody:

Virologická laboratoř VFU Brno disponuje vzorky DNA získané z trusu v zajetí chovaných (25) a divoce žijících šimpanzů v oblasti Ugalla, Tanzánie (206) a Kalinzu, Uganda (48). Základní screening přítomnosti DNA bokavirů byl proveden pomocí nested PCR s primery zacílenými do oblasti NS1 genu². Velikost amplifikovaných fragmentů byla určena pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a suspektní vzorky byly klonovány do pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA). Získané klony byly sekvenovány (Macrogen, Nizozemsko) a identita získaných sekvencí byla potvrzena srovnáním se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank. Pro bližší charakterizaci bokavirů byly navrženy další vzájemně se překrývající sady primerů zacílené v konzervovaných oblastech HBoV a GBoV. Pomocí nested PCR s těmito primery byly amplifikovány další oblasti genomu bokavirů.

Fylogenetická příbuznost se sekvencemi HBoV, GBoV a bokaviru šimpanze byla stanovena v oblastech NS1 a VP2 genů. Získané sekvence byly vzájemně porovnány pomocí

MAFFT algoritmu⁴. Nejvhodnější evoluční model byl určen pomocí Likelihood Ratio Testu (LRT). Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximum likelihood za využití programu PhyML 3.0⁵. Výsledné fylogenetické stromy byly zobrazeny v programu FigTree.

Výsledky:

Z celkového počtu 279 vzorků DNA bylo pomocí nested PCR detekováno 19 bokavirus pozitivních vzorků (Tab. 1). Pomocí série nested PCR se vzájemně se překrývajícími sadami primerů byly získány tři celogenomové sekvence.

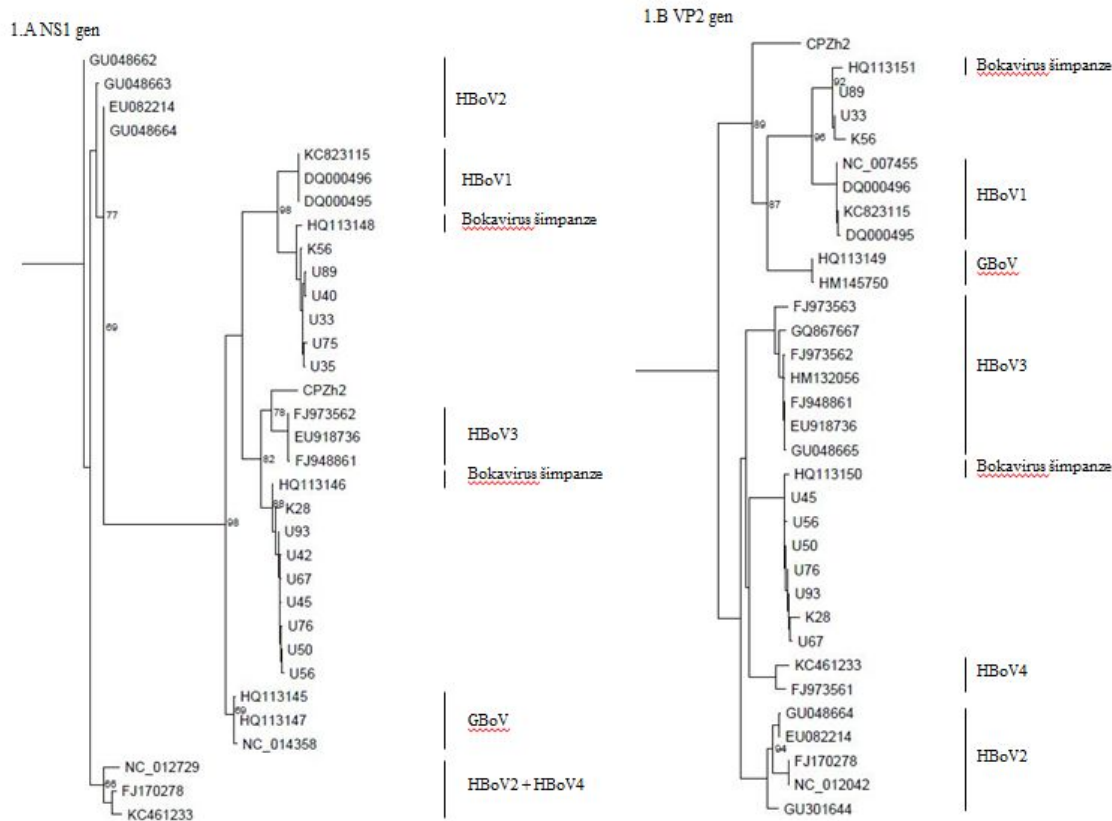
Fylogenetická analýza částečných sekvencí NS1 a VP2 genů přiřadila sekvence získané ze vzorků šimpanzů v obou studovaných oblastech k již existujícím sekvencím získaným od šimpanzů žijících v Kamerunu² (Obr. 1), které tvoří samostatné fylogenetické linie vzdáleně příbuzné HBoV1 a HBoV3. Bokavirus získaný z trusu šimpanze CPZh2 chovaného v zajetí v české zoologické zahradě není fylogeneticky příbuzný žádným doposud známým sekvencím bokaviru šimpanze. Detailnější analýza nukleotidové sekvence NS1 genu CPZh2 bokaviru ukázala 10.8% rozdíl od fylogeneticky nejpříbuznější HBoV3 sekvence, díky němuž lze dle pravidel ICTV⁶ hovořit o novém genotypu bokaviru šimpanze.

Závěr:

Získem částečných a celogenomových sekvencí bokavirů afrických primátů jsme přispěli k rozšíření znalostí o prevalenci a fylogenetických vztazích těchto nově popsáných parvovirů. Jako první jsme amplifikovali a popsali tři různé celogenomové sekvence získané od dvou divoce žijících a jednoho v zajetí chovaného šimpanze, které budou vloženy do databáze GenBank. Díky výsledkům fylogenetické analýzy získaných sekvencí můžeme podpořit teorii o existenci velmi úzkého vztahu mezi parvoviry a jejich savčími hostiteli⁷.

Tab. 1: Přehled pozitivních vzorků pocházejících z jednotlivých lokalit

	Zoo (ČR, SR)	Ugalla, Tanzánie	Kalinzu, Uganda
Počet vzorků	25	206	48
PCR pozitiv.	1	16	2
Prevalence (%)	4.0	7.8	4.2



Obr. 1: Fylogenetická analýza částečných sekvencí NS1 a VP2 genů získaných ze vzorků pocházejících z oblasti Ugalla (označeny U) a Kalinzu (označeny K) v porovnání se sekvencemi HBoV, GBoV a bokaviru šimpanze (zobrazeny pod tzv. accession numbers uloženými v databázi GenBank).

Práce byla financována v rámci projektu IGA 82/2014/FVL

Seznam použité literatury

1. Allander, T. *et al.* Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12891–12896 (2005).
2. Sharp, C. P. *et al.* Widespread Infection with Homologues of Human Parvoviruses B19, PARV4, and Human Bocavirus of Chimpanzees and Gorillas in the Wild. *J. Virol.* **84**, 10289–10296 (2010).
3. Kapoor, A. *et al.* Identification and Characterization of a New Bocavirus Species in Gorillas. *PLoS One* **5**, e11948 (2010).
4. Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. & Miyata, T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* **30**, 3059–3066 (2002).
5. Guindon, S. & Gascuel, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Syst. Biol.* **52**, 696–704 (2003).
6. Kapoor, A. *et al.* A newly Identified Bocavirus Species in Human Stool. *J. Infect. Dis.* **199**, 196–200 (2009).
7. Lukashov, V. V & Goudsmit, J. Evolutionary Relationships among Parvoviruses: Virus-Host Coevolution among Autonomous Primate Parvoviruses and Links between Adeno-Associated and Avian Parvoviruses. *J. Virol.* **75**, 2729–2740 (2001).

Metoda Next Generation Sequencing jako nový nástroj k diagnostice diverzity protozoárních patogenů kmene Apicomplexa v klíšťatech ze psů

Moneeb A. Qablan, Martina Gallusová, Barbora Mitková, David Modrý

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

Úvod

Klíšťata jsou významní vektorů širokého spektra patogenů zahrnující viry, bakterie a protozoa, způsobující onemocnění člověka i zvířat. V rámci prvoků kmene Apicomplexa se jedná zejména o zástupce rodů *Babesia*, *Theileria* a *Hepatozoon* (1). V průběhu životního cyklu těchto protozoárních parazitů se střídá nepohlavní fáze vývoje v obratlovčím hostiteli s pohlavním vývojem v klíštěti (2). Rychlé, specifické a citlivé diagnostické metody jsou v endemických oblastech výskytu klíčové jak v rámci rutinní diagnostiky, tak i epidemiologických depistáží. V posledním desetiletí expandovaly v rámci infektologických diagnostik techniky Next Generation Sequencing (NGS) využívající různé platformy, poskytující nástroj pro identifikaci spektra potenciálních patogenů včetně případů koinfekcí, velmi dobře adaptovatelné i na sledování patogenů ve vektorech (3). Cílem projektu je zavést novou molekulární metodu pro všechny klíšťaty přenášené protozoární parazity s využitím markeru 18s rRNA genu, s cílem odhalit skutečné spektrum genotypů a koinfekcí na modelovém souboru klíšťat ze psů a posoudit význam studovaných klíšťat jako rezervoárů ve sledovaných modelových lokalitách. Zároveň realizovat NGS techniku za účelem zjištění celého spektra protozoálních infekcí a zhodnotit tak jejich genetickou rozmanitost a identifikovat nové druhy.

Materiál a metodika

Odběr vzorků a izolace DNA

Z předchozích studií bylo použito 800 vzorků krve z domácích zvířat (psi, osli a přežvýkavci) pocházející z Evropy (Rumunsko) a Afriky (Keňa). Vzorky byly uchovány v 96% etanolu v laboratorních podmínkách. K dispozici také byly vzorky klíšťat (n=1480), která byla následovně uchována v 76% etanolu. DNA z krve zvířat bylo izolováno za využití kitu (QIAGEN, DNeasy Blood & Tissue Kit) dle instrukcí výrobce. DNA z klíšťat bylo izolováno standardní metodou za použití fenol-chloroformu.

Amplifikace DNA a NGS

Ve spolupráci s LECA (Laboratoire d'Ecologie Alpine, Grenoble, France) byly navrženy univerzální primery Piro-F (CAGGTCTGTGATGCCCTTAGATG) a Piro-R (CTTGCGCATACTAGGCATTCCTCG), na amplifikaci 167bp oblasti 18s rRNA genu pro všechny potenciální parazity kmene Apicomplexa. Výběr primerů a specifita testování byla primárně provedena in-silico za použití ecoPrimer a ecoPCR software, který je dostupný na K2 serveru na LECA. Prvotní testování primerů in vitro bylo provedeno na 339 vzorcích DNA z krví psů a z celých klíšťat. PCR amplifikace byla provedena za využití 12 forward a 32 reverse značených primerů na PCR destičkách. Podmínky a teplotní program PCR byl následující: PCR mix připraven v 25 ml objemu, což zahrnuje 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTP pro každý vzorek, 1 mM pro každý primer a 1 jednotka AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystems). Teplotní podmínky PCR protokolu byly optimalizovány následovně: 10 min při 95 °C pro aktivaci polymerázy; 45 cyklů (95°C na 30 s, 64°C na 30 s a 72°C na 1 min) 10 min konečné extenze. Přečištění PCR amplikonů bylo provedeno kitem (Qiaquick PCR purification kit). Knihovna NGS pro sekvenování byla připravena smíšením všech přečištěných PCR amplikonů v jedné 1.5 ml zkumavce a odeslána na komerční sekvenaci na platformě Illumina Sequencing- RUN- Miseq (Fasteris, Switzerland). Výsledky sekvenací byly analyzovány ve spolupráci s LECA týmem za využití OBItools pack, který je dostupný v K2 serveru v LECA.

Výsledky

Nový protokol amplifikace DNA byl využit pro vzorky DNA izolovaných z krve psů (n=195) a celých klíšťat (n=144) náležících ke dvěma rodům (*Rhipicephalus armatus* and *R. pulchellus*), které byly odebrány ze zvířat v Severní Keni. Celkem 301 vzorků (89%) bylo pozitivních na přítomnost prvoků kmene Apicomplexa; v rozmezí infekce jedním druhem patogenu po genotypově nebo druhově smíšenou infekci. Prevalence mezi psy byla 88% (n= 172), zatímco u klíšťat byla 99% (n= 142). Nejvíce zastoupený patogen kmene Apicomplexa byl *Hepatozoon* sp. následován *Babesia* spp. a *Theileria* spp. Výsledky ukazují, že oblast barcodu zaznamenává variabilitu, což nám umožňuje zařazení patogena do poddruhu a genotypů v případě právě *Babesia* a *Theileria* spp, nicméně v případě *Hepatozoon* jsme na základě části sekvencí byli schopni jej zařadit pouze do rodu.

Závěr

Ačkoliv vybraný barcode oblasti 18s rRNA genu vykazuje dostatečnou variabilitu k rozlišení jednotlivých druhů z rodu *Babesia* a *Theileria*, v případě *Hepatozoon* oblast barcodu nevykazuje

dostatečnou variabilitu pro rozlišení do druhu. K překonání této skutečnosti je potřeba zvolit jinou variabilní oblast stejného genu nebo ji prodloužit a prozkoumat tak další možnosti do budoucna.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 99/2014/FVL

Seznam literatury

1. SHOW, E. Susan, DAY, J. Michael, BIRTLES, J. Richard a BREITSCHWERDT, B. Edward. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*. 2001, **17**(2), 74-80.
2. KATZER, Frank, NGUGI, Daniel, OURA, Chris, BISHOP, P. Richard, TARACHA, L.N. Evans, WALKER, R. Alan, a MCKEEVER, J. Declan. Extensive genotyping diversity in a recombining population of the apicomplexan parasite *Theileria parva*. *Infection and Immunity*. 2006, **74**(10), 5456-5464.
3. GULLAPALLI, R. Rama, DESAI, V. Ketaki, SANTAN-SANTOS, Lucas, KANT, A. Jeffrey a BECICH, J. Michael. Next generation sequencing in clinical medicine: challenges and lessons for pathology and biomedical informatics. *Journal of Pathology Informatics*. 2012, **3**:40.

Vliv neuromuskulární blokády na respirační a kardiovaskulární parametry při laparoskopii u psů

Petr Raušer, Michal Crha, Agáta Sivková, Jana Zapletalová, Natália Korytárová

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

Brno

Úvod

V současné době stále častěji používané laparoskopické chirurgické výkony (např. sterilizace fen) jsou charakteristické menším rozsahem tkáňového poškození, nižší bolestivostí, kratší rekonvalescencí a menší morbiditou a mortalitou pacientů. Vlivem insuflace CO₂ do dutiny břišní (kapnoperitonea) dochází ke změnám kardiovaskulárních a respiračních parametrů – zvyšuje se srdeční frekvence, krevní tlak a hladina CO₂, snižuje se naopak funkční kapacita plic. Pro usnadnění chirurgických výkonů, pro navození dostatečného svalového uvolnění, se využívají periferní nedepolarizující myorelaxancia (např. atracurium). Jejich vliv byl posuzován při laparoskopii u psů, za podmínek normokapie při rozdílných ventilačních parametrech. Signifikantní odchylky u pacientů s relaxací a pacientů bez ní zaznamenány nebyly. Cílem této studie je posoudit vliv myorelaxancií (atracurium) při laparoskopii za použití standardních ventilačních parametrů.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 40 klinicky zdravých fen podstupujících laparoskopickou ovariektomii. Zvířata byla stará 4,2±3,2 roků (0,5–11,0) (průměr ± směrodatná odchylka, rozmezí), vážila 34,3±11,5 kg (15,0–64,0). Zvířata byla náhodně rozdělena do dvou skupin – testované (atracurium) a kontrolní (fyziologický roztok) po 20 jedincích. Zvířata měla předoperační hladovku bez omezení vody. Studie byla provedena formou prospektivní náhodné dvojité slepé klinické studie.

Všechny chirurgické výkony byly provedeny stejným operátorem (Crha), který nevěděl, o kterou skupinu pacientů se jedná. Při operaci byl použit standardní laparoskopický přístup se 3 porty. Veressovou jehlou byl vháněn do dutiny břišní CO₂, po ustálení kapnoperitonea byl udržován nitrobřišní tlak na 10 mmHg. Laparoskopickými nástroji byla lokalizována ovariální burza a bipolárním elektrokoagulačním zařízením odstraněny oba vaječníky. Po skončení výkonu byl CO₂ vypuštěn z dutiny břišní samovolně přes otevřené laparoskopické porty. Po odstranění portů byly incize břišní stěny uzavřeny standardní technikou sutury.

Všichni psi byli premedikováni medetomidinem (0,01 mg kg⁻¹ i.v.; Domitor 1 mg/ml, Orion, Finsko) s butorfanolem (0,4 mg kg⁻¹ i.v.; Butomidol 10 mg/ml, Richter Pharma AG, Rakousko),

úvod byl proveden propofolem (1–2 mg kg⁻¹ i.v.; Norfol 10 mg/ml, Norbrook, S. Irsko) a anestezie vedena isofluranem (1,5–2,0 vol.%, Isofluran, Torrex Chiesi, Rakousko) ve směsi kyslík–vzduch (1–2 l min⁻¹). Všichni pacienti byli kontrolovaně ventilováni tlakově omezenou objemově kontrolovanou ventilací. Dechová frekvence byla 10 dechů min⁻¹, špičkový tlak 15 cmH₂O a přetlak na konci exspira PEEP) 2 cmH₂O.

Po stabilizaci pacienta bylo intravenózně aplikováno atrakurium 0,4 mg kg⁻¹ (testovaná skupina, n=20) nebo fyziologický roztok 0,04 ml kg⁻¹ (kontrolní skupina, n=20).

Sledovanými parametry byly srdeční frekvence (HR), neinvazivně měřený krevní tlak (NIBP), endexpirační koncentrace CO₂ (EtCO₂), saturace hemoglobinu kyslíkem (SpO₂), dechový objem (V_T) a myorelaxace (TOF). Byly zaznamenány i časy související s prováděným výkonem – čas indukce kapnoperitonea a jeho trvání, čas lokalizace a excize levého i pravého vaječníku a celkový čas chirurgického výkonu

Po úplném probuzení byli psi propuštěni do domácího ošetření. Pro pooperační analgezií byl podán karprofen (2 mg kg⁻¹ s.c.; Rimadyl, Zoetis, Česká republika).

Sledované parametry – HR, NIBP, EtCO₂, SpO₂, V_T a TOF byly zaznamenávány před aplikací atrakuria nebo fyziologického roztoku a 2, 5, a 10 minut potom. Následně byla navozeno kapnoperitoneum. Pak byla opět zaznamenávána výše uvedená data v čase 2, 5 a 10 minut po stabilizaci kapnoperitonea na 10 cmH₂O.

Pro statistické zhodnocení byl použit Shapiro Wilkův test, test ANOVA pro opakovaná měření a Studentův t-test pro nezávislé proměnné, hladina významnosti $p < 0.05$.

Výsledky

Feny zahrnuté do testované skupiny měly 3,7±3,4 (0,5–11,0) roků a vážily 28,5±8,8 (15,0–49,5) kg, feny kontrolní skupiny měly 4,7±3,0 (0,8–9,0) roků a vážily 36,2±9,4 (23,0–64,0). Signifikantní rozdíl mezi skupinami zaznamenán nebyl.

Mezi sledovanými skupinami nebyl zaznamenán ani signifikantní rozdíl hodnot HR, NIBP, SpO₂, V_T a TOF. Nezaznamenali jsme signifikantní rozdíly u jednotlivých skupin ani při srovnání hodnot měřených před a po navození kapnoperitonea. Signifikantní vzestup EtCO₂ byl zaznamenán u pacientů testované skupiny oproti kontrolní skupině 5 minut po aplikaci atrakuria a také 5 minut po navození kapnoperitonea. Žádné jiné signifikantní rozdíly jsme nezaznamenali.

Aplikace atrakuria signifikantně neměnila ani sledované časy související s výkonem. Kapnoperitoneum bylo navozeno u testované skupiny po 183±126 (68–301) sekundách a u kontrolní skupiny po 228±102 (62–322) sekundách. Celkový čas kapnoperitonea byl u testované skupiny 28±10 (20–45) minut a u kontrolní skupiny 29±4 (25–35) minut. U testované skupiny

trvalo nalezení a excize pravého vaječníku 50 ± 30 (14–99) a 155 ± 55 (109–252) sekund, u kontrolní skupiny pak 37 ± 21 (5–68) a 157 ± 53 (85–212) sekund. U testované skupiny trvalo nalezení a excize levého vaječníku 60 ± 79 (7–236) a 150 ± 48 (88–230) sekund, u kontrolní skupiny pak 76 ± 64 (1–190) a 169 ± 52 (115–254) sekund. Celkový čas výkonu byl u testované skupiny 33 ± 5 (29–40) minut a u kontrolní skupiny 39 ± 9 (27–50) minut. Celkový čas anestezie byl u testované skupiny 75 ± 5 (70–80) minut a u kontrolní skupiny 78 ± 12 (65–95) minut. Signifikantní rozdíly ve sledovaných časech souvisejících s výkonem zaznamenány nebyly.

Závěr

Aplikace myorelaxans atrakuria u psů podstupujících laparoskopickou ovariektomii se standardizovaným ventilačním režimem nevyvolává klinicky významné odchylky ve sledovaných kardiovaskulárních a respiračních parametrech a časech souvisejících s výkonem ve srovnání se psy bez aplikace myorelaxans.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 80/2014/FVL

Seznam literatury

- Hanley E. Anesthesia for laparoscopic surgery. *The Surgical Clinics of North America*, 1992, **72**, 1013-1019
- Ishizaki Y, Bandai Y, Shimomura K, Abe H, Ohtomo Y, Idezuki Y. Safe intraabdominal pressure of carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic surgery. *Surgery*, 1993, **114**, 549-554
- Larijani GE, Gratz I, Minassian SS, Hughes DL, Afshar M, Karayannis BN. Comparative evaluation of the neuromuscular and cardiovascular effects of pipecuronium, pancuronium, atracurium, and vecuronium under isoflurane anesthesia. *Pharmacotherapy*, 1992, **12**, 278-282
- Lavery GG, Mirakhur RK, Clarke RS, Gibson FM (1986): The effect of atracurium, vecuronium and pancuronium on heart rate and arterial pressure in normal individuals. *European Journal of Anaesthesiology*, 1986, **3**, 459-467
- Luz CM1, Polarz H, Böhrer H, Hundt G, Dörsam J, Martin E. Hemodynamic and respiratory effects of pneumoperitoneum and PEEP during laparoscopic pelvic lymphadenectomy in dogs. *Surgical Endoscopy*, 1994, **8**, 25-27.
- Mehr EH, Hirshman CA, Lindeman KS. Mechanism of action of atracurium on airways. *Anesthesiology*, 1992, **76**, 448-454
- Van Goethem B, Van Nimwegen SA, Akkerdaas I, Murrell JC, Kirpensteijn J. The effect of neuromuscular blockade on canine laparoscopic ovariectomy: A double-blinded, prospective clinical trial. *Veterinary Surgery*, 2012, **41**, 374-380

Weil AB. Anesthesia for endoscopy in small animals. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, 2009, **39**, 839-848

Korelace morfoloického hodnocení retikulocytů s jejich kvantifikací na základě fluorescenční průtokové cytometrie v periferní krvi u anemických psů a koček

Kristína Řeháková, Jana Slováková

Klinická laboratoř pro malá zvířata, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Stanovení retikulocytů je u anemického syndromu indikováno jako základní vyšetření pro posouzení erythropoetické aktivity kostní dřeně. Identifikace těchto nezralých forem erytrocytů se odvíjí od průkazu reziduální ribozomální RNA supravitálním barvením. Morfoloické hodnocení retikulocytů u malých zvířat, zejména koček, je však zatíženo vysokou variabilitou výsledků vyplývajících z nejednotné morfoloické definice retikulocytů, rozdílnosti používaných barvicích protokolů, nerovnoměrné distribuce retikulocytů na krevním nátěru a výrazného vlivu subjektivity posuzovatele. Paralelní analýza prostřednictvím validovaného systému Sysmex s identifikací jednotlivých frakcí retikulocytů na základě intenzity fluorescence poskytuje adekvátní prostor pro upřesnění a standardizaci morfoloického hodnocení erythropoetické aktivity.

Materiál a metodika

Cílem studie byla kvantifikace retikulocytů na základě morfoloického hodnocení krevních nátěrů barvených supravitálními barvivy - novou metylénovou modří (NMM) a brilliant-krezylovou modří (BKM). Jako referenční metoda ke kvantifikaci retikulocytů byl použit automatický analyzátor Sysmex XT-2000iV, klasifikující populaci retikulocytů na frakce s nízkou (LFR), střední (MFR) a vysokou (HFR) fluorescencí. Paralelní morfoloická a automatická kvantifikace retikulocytů byla provedena celkem u 39 anemických psů a 21 anemických koček ošetřených na Klinice chorob psů a koček VFU Brno.

Anémie byla definována jako pokles koncentrace hemoglobinu pod 120 g/l u psů, resp. 80 g/l u koček v periferní krvi odebrané při vstupním vyšetření pacientů. Vzorky EDTA krve byly skladovány při teplotě 4°C. Barvení NMM a BKM se zhotovením nátěrů bylo provedeno do 6 hodin od odběru.

Pro morfoloické hodnocení retikulocytů v krevních nátěrech byly aplikovány 2 protokoly:

- 1) 15 min inkubace EDTA krve s 1% roztokem NMM (Sigma-Aldrich) v poměru 3:2
- 2) 20 min inkubace EDTA krve s 1% roztokem BKM (Fluka) v poměru 1:1

Následné morfoloické hodnocení probíhalo standardním způsobem s kvantifikací retikulocytů na 1000 erytrocytů.

Morfologická subklasifikace retikulocytů (kategorie P1-P3, resp. A1-A3) byla u všech pacientů v obou nátěrech provedena na základě obsahu granulofilamentózní substance (reziduální RNA) přičemž:

- kategorie P1 - P3 odpovídaly punktovaným formám retikulocytů; kategorie P1 byla zastoupena retikulocyty obsahujícími 3 - 6 teček, kategorie P2 odpovídala retikulocytům s přítomností 6 - 15 teček s individuální distribucí a kategorie P3 retikulocytům s obsahem 6 - 15 teček s lineárním řazením),
- kategorie A1 - A3 odpovídaly agregovaným formám retikulocytů; u kategorie A1 představoval obsah agregátů reziduální RNA méně než třetinu obsahu buňky, u kategorie A2 1/3 – 2/3 a u kategorie A3 víc než 2/3 buněčného obsahu.

Celkové % retikulocytů a retikulocytární produkční index získané morfologickým vyšetřením a automatickou analýzou byly porovnány párovým T-testem.

Jednotlivé frakce retikulocytů (LFR, MFR a HFR) získané na základě fluorescenční průtokové analýzy byly testovány s vybranými kombinacemi morfologických kategorií P1 - P3 a A1 - A3 prostřednictvím *One proportion* testu ($p > 0,05$). Výsledná shoda pro každou testovanou kombinaci byla vyjádřena jako % shodujících se výsledků mezi fluorescenční průtokovou cytometrií a morfologickým hodnocením z celkového počtu testovaných párů (pacientů).

Výsledky

Na základě výsledků fluorescenční průtokové analýzy a manuálního hodnocení retikulocytů nebyl mezi celkovým počtem retikulocytů u anemických psů a koček zjištěn signifikantní rozdíl. Zjištěné hodnoty mediánu pro % zastoupení retikulocytů u psů byly 1,56 (Sysmex-XT 2000iV), 1,68 (NMM), resp. 1,20 (BKM), u koček 2,16 (Sysmex-XT 2000iV), 2,15 (NMM), resp. 2,50 (BKM).

Mezi hodnotami retikulocytárního produkčního indexu s využitím výsledků morfologické (medián 0,63 u NMM, resp. 0,44 u BKM) a automatické (medián 0,56) kvantifikace retikulocytů nebyl u anemických psů zjištěn signifikantní rozdíl.

U anemických psů byla pro barvení NMM prokázána nejvyšší shoda u kombinace LFR s P1+P2+P3, MFR s A1 a HFR s A2+A3. U barvení BKM byla zjištěna nejvyšší shoda u kombinace LFR s P1+P2, MFR s P3 a HFR s A1+A2+A3. Naproti tomu u anemických koček byla pro barvení NMM prokázána nejvyšší shoda u kombinace LFR s P1+P2+P3+A1, MFR s A2 a HFR s A3. U barvení BKM byla zjištěna nejvyšší shoda u kombinace LFR s P1+P2+P3, MFR s A1 a HFR s A2+A3.

Závěr

Paralelní kvantifikace retikulocytů u anemických psů a koček fluorescenční průtokovou cytometrií poskytla prostor pro upřesnění morfologické definice retikulocytů se zaměřením na stupeň jejich maturace. Získané výsledky představují adekvátní podklad pro standardizaci protokolu morfologického hodnocení retikulocytů po obarvení novou metylénovou modří a briliant-krezylovou modří.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 92/2014/FVL

Seznam literatury

1. Tatsumi N, Tsuda I, Yokomatsu Y et al. (1989): Inaccuracy and imprecision of reticulocyte counting. *Osaka City Medical Journal* 35:39-47.
2. Perkins PC, Grindem CB, Cullins LD (1995): Flow cytometric analysis of punctate and aggregate reticulocyte responses in phlebotomized cats. *American Journal of Veterinary Research* 56:1564-1569.
3. Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB (2003): Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 33:1223-1244.
4. McKenzie SB, Gauger CA (1991): Analysis of reticulocyte counts using various methods. *Clinical Laboratory Science* 4:37-41.
5. Bauer N, Nakagawa J, Dunker C et al. (2012): Evaluation of the automated hematology analyzer Sysmex XT-2000iV TM compared to the ADVIA ® 2120 for its use in dogs, cats, and horses. Part II: Accuracy of leukocyte differential and reticulocyte count, impact of anticoagulant and sample aging. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 24:74-89.

Základní charakteristiky mechanického testování *in vitro* na modelu krční páteře psa

Robert Srnec¹, Alois Nečas¹, Iva Fialová¹, Michaela Paninárová², Jan Krhut³, Petra Hvizdošová³

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

*Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²*

*Magisterský studijní program - 5. ročník (student), Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno³*

Úvod

Kaudální cervikální spondylomyelopatie (CCSM) postihuje zejména velká plemena psů, kdy nejvyšší prevalenci pozorujeme u německých dog a dobrmanů.⁴ Příčiny vzniku tohoto onemocnění nejsou zcela objasněny.^{1,3} V průběhu více jak čtyřiceti let se provádí sledování různých plemen psů s výskytem CCSM s cílem najít jasnou odpověď na vyvolávající příčinu. Počítačová simulace a matematické modelování jsou moderní metody užívané v různých odvětvích lidské medicíny.⁵ V oblasti veterinárního lékařství jsou tyto metody v celosvětovém měřítku prozatím ojedinělé, ale zároveň unikátní s vysokým potenciálem v aplikacích výzkumných i klinických.¹ Hlavní výhodou modelování je relativně rychlé a levné ověření předem stanovených mechanických hypotéz. Nicméně v oblasti veterinární medicíny je nutné nejdříve tyto postupy kalibrovat a porovnat například s mechanickými testy *in vitro* na preparátech krční páteře z kadaverů psů a/nebo dynamickými studii zobrazovacích metod, což bylo impulsem pro řešení projektu tohoto zaměření. Již dlouhou dobu se pracoviště věnuje chirurgické léčbě kaudální cervikální spondylomyelopatie u psů s velmi dobrými výsledky.² V současnosti se také intenzivně rozvíjí řada výzkumných aktivit se zaměřením na nové možnosti chirurgické terapie.^{1,2,3}

Materiál a metodika

Celkem bylo k mechanickému testování *in vitro* připraveno 11 vzorků krční páteře. Modely pro testování byly vypreparovány z krční páteře psů střední velikosti, utracených nebo uhynulých z jiných příčin než pro onemocnění krční páteře. Z kadaverů psů byl vyjmut segment páteře v délce od C2 obratle po Th2 obratel včetně přilehlé svaloviny krku. Preparát krční páteře byl zbaven svaloviny a konce segmentu páteře byly zality do bloku technického polymethylmetakrylátu. Vzorky byly rozděleny do dvou testovacích skupin. První skupina vzorků (n=5) byla testována bez dalších úprav jako kontrolní. Ve druhé skupině (n=6) byla na vzorku provedena ventrální fenestrace meziobratlové ploténky v prostoru C6-C7 s následnou trakcí a stabilizací těchto obratlů. Trakce

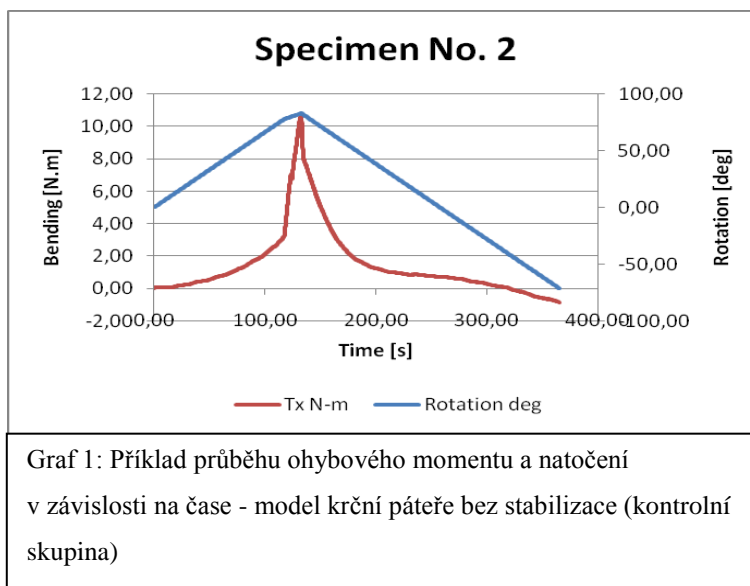
byla zajištěna kovovou meziobratlovou rozpěrkou v šířce 7,5mm a zajištěna kortikálním šroubem 3,5mm. Následně byly do těla obratle C6 i C7 zavedeny dva kortikální šrouby 3,5mm a spojeny mostem z kostního cementu (PMMA).

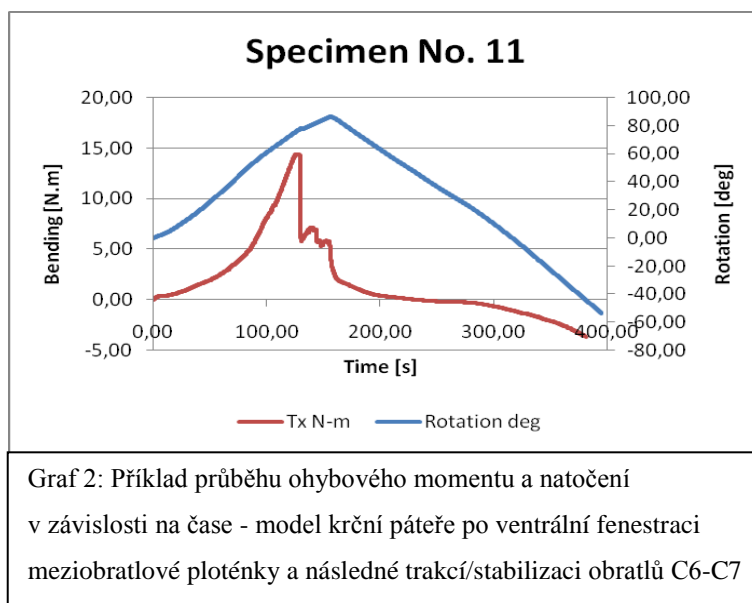
K testování byl použit systém MTS Mini Bionix 858.02 se speciálním páteřním simulátorem. Silové účinky byly měřeny snímačem 6DOF, který registruje 3 silové složky a 3 momentové složky zatížení. Zásadní hodnota směrodatná pro hodnocení experimentů byla složka T_x (ohybový moment zatěžující vzorek páteře). Při zatěžování byl řízen pohyb dolní části simulátoru rychlostí 20°/min do krajní polohy +40° (FLEXE) a poté do krajní polohy -40° (EXTENZE). Horní čelist byla volně pohyblivá. Celkový ohyb páteře (celkové natočení) je dán součtem natočení dolní a horní čelisti. Laterální náklony jakožto i posuvy ve směrech X a Y byly fixovány bez pohybu a osová síla byla udržována na nulové hodnotě. Ze získaných dat byly pro každý vzorek vyhodnoceny následující parametry:

- pracovní diagram – průběh měřených veličin v čase a průběh závislosti ohybového momentu M_o [N.m] na natočení ϕ [deg]
- maximální dosažený ohybový moment $M_{o\max}$ [N.m]
- ohybová tuhost z počátku zatěžování k_o [N.m/deg]

Výsledky

Z posouzení stanovených hodnot obou sledovaných skupin je zřejmé, že vzorky v kontrolní skupině dosahují nejmenší tuhosti a také nejnižší pevnosti při zatěžování ohybem. Na rozdíl od toho skupina s provedením trakce-stabilizace meziobratlového prostoru C6-C7 vykazuje podstatně tužší chování a také vyšší pevnost v ohybu. Příklady průběhu ohybového momentu a stupně natočení modelu v závislosti na čase u testovaných skupin modelů krční páteře názorně ukazují grafy 1 a 2.





PRÁCE BYLA FINANCOVÁNA V RÁMCI PROJEKTU IGA 94/2014/FVL

Seznam literatury:

1. Srnec R, Horák Z, Goldmann T, Nečas A 2013: Může počítačová simulace pomoci v chirurgické léčbě wobblers syndromu u psů? Veterinární klinika 10(2): 72–78
2. Srnec, R., Proks, P., Fedorová, P., Stehlík, L., Dvořák, M., Nečas, L. Myelographic diagnosis and results of surgical treatment of caudal cervical spondylomyelopathy in dogs: a retrospective study (2000–2010). Acta Vet Brno 2012;81:415–420.
3. Srnec, R. Diagnostika a terapie onemocnění páteře u psů: Analýza souboru pacientů s kaudální cervikální spondylomyelopatií. Disertační práce 2012, VFU Brno, 104 s.
4. Da Costa, R.C. Cervical spondylomyelopathy (wobbler syndrome) in dogs. Vet Clin N Am - Small Anim Pract 2010;40:881–913.
5. Fagan, M.J., Julian, S., Mohsen, A.M. Finite element analysis in spine research. Proc Inst Mech Eng Part H-J Eng Med 2002;216 (H5): 281-298

Dynamika kolonizace střeva telat *Escherichia coli* tvořící ESBL v podmínkách mléčné farmy

Jana Šmídková^{1,2}, Josef Illek², Alois Čížek¹

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie¹, Klinická laboratoř pro velká zvířata², Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Nadměrné a neuvážené použití ceftiofuru, cefoperazonu a cequinomu k terapeutickému ošetření dojnic a telat vede ke zvýšené úrovni kontaminace stájového prostředí farem a následné kolonizaci střeva telat *E. coli* tvořící betalaktamázy širokého spektra účinku (ESBL)¹⁻². V takových situacích vzniká potenciální riziko kontaminace živočišných produktů a otvírá se možná cesta šíření *E. coli* produkující ESBL do potravního řetězce člověka. Veterinární medicína je tak postavena před úkol jak omezit výskyt těchto bakterií v chovech³. Cílem projektu bylo nalézt vhodný chov mléčného skotu pro objasnění dynamiky kolonizace střeva telat *E. coli* produkující ESBL/AmpC, zjistit souvislost mezi kvalitou kolostra a dynamikou kolonizace střeva a pokusit se ovlivnit dynamiku kolonizace podáním probiotika v době příjmu mleziva.

Materiál a metodika

Ze čtyř vytypovaných farem mléčného skotu byla na základě výsledků bakteriologického vyšetření rektálních výtěrů telat vybrána jedna farma se základním stádem 620 dojnic. Ty byly ustájeny volně v boxech na hluboké podestýlce. Užitkovost dojnic přesahovala 12 000 litrů mléka. Na uvedené farmě byla sledována dynamika vylučování ESBL/AmpC produkující *E. coli* celkem u 13 telat. Nejprve byly jednorázově odebrány výkaly matek před porodem. Telata byla do dvou hodin po narození napojena 4 litry pasterizovaného mleziva, další napájení telete probíhalo během pravidelného krmení v 7 h ráno a ve 14 h odpoledne. Kvalita kolostra byla kontrolována mlezivoměrem. Ve stáří přibližně jednoho týdne byla odebírána krev a v séru byla následně stanovena hladina celkové bílkoviny za použití refraktometru.

Při opakovaných návštěvách chovu byly od sledované skupiny telat manuálně odebírány individuální vzorky výkalů do sterilního kontejneru a to od 1 dne do maximálně 63 dnů stáří. Při návštěvách chovu byly získány pro kultivační vyšetření také stěry z prostředí, vzorky

napájecí vody, mléka, stěry krmného vozíku, jícnové sondy apod. Všechny vzorky byly přepraveny v izotermickém boxu do laboratoře, kde bylo provedeno kultivační vyšetření. Vzorky byly nejdříve vyočkovány přímo na MacConkey agar (Oxoid, VB) s cefotaximem (2mg/l ; Sigma, ČR) , následně byly vzorky výkalů váženy, desetinasobně ředěny pufovanou peptonovou vodou a jednotlivá ředění očkována v objemu 100 µl na výše uvedené médium. Naočkované agary byly inkubovány 24 hodin při 37 °C. Cefotaxim rezistentní kultury byly identifikovány metodou MALDI TOF MS (Bruker, Německo) podle instrukcí výrobce a získané izoláty *E. coli* byly následně vyšetřeny „double disk diffusion“ testem za účelem zjištění tvorby širokospektrých betalaktamáz¹. Vzorky s negativním nálezem byly pomnožovány v Mac Conkey bujónu a vyočkovány na MCA s cefotaximem pro zjištění nízkých koncentrací hledaných bakterií. U vzorků s potvrzeným záchytem cefotaxim rezistentních *E. coli* byla vyjádřena jejich koncentrace na gram vzorku. Získané výsledky byly dokumentovány v tabulkovém procesoru MS Excel a vyjádřeny graficky. Izoláty *E. coli* produkující ESBL/AmpC byly uchovány v kryoprotektivním médiu při -80 °C pro další charakterizaci.

Skupina 5 telat byla v podmínkách farmy při prvním napojení ošetřena perorálním podáním probiotika a skupině 5 kontrolních telat nebylo probiotikum podáno. Odběr a zpracování vzorků probíhalo výše popsaným způsobem.

Výsledky

Jednorázovým vyšetřením 64 vzorků rektálních výtěrů telat ve stáří 1 až 32 dnů byly sledované bakterie zjištěny v 8 vzorcích (12,5 %). Zjištěné výsledky dynamiky vylučování cefotaxim rezistentních *E. coli* jednotlivých telat ve sledované skupině jsou dokumentovány v protokolární tabulce č. 1. Tyto výsledky ukázaly, že sledovaná telata vylučovala svými výkaly sledované bakterie nejčastěji od druhého dne po narození a vylučování přetrvávalo nejdéle do 63 dne stáří telat. Dosahovaná koncentrace cefotaxim rezistentních *E. coli* na gram výkalů byla zjištěna v rozsahu od 2×10^2 do 1×10^8 KTJ (kolonie tvořících jednotek). Vyšetřením 17 vzorků stěrů z napájecích kbelíků a povrchů jednotlivých chovných boxů byla ESBL/AmpC pozitivními *E. coli* prokázána v 30 % vzorků.

Vliv ošetření telat probiotikem na vylučování cefotaxim rezistentních *E. coli* nebyl doposud vyhodnocen, a to z důvodu dosud neukončeného experimentu.

Závěry

Dosažené výsledky potvrdily, že využívání cefalosporinů 3. a 4. generace k léčbě mléčného skotu vede ke zvýšenému výskytu ESBL/AmpC pozitivní *E. coli* na farmě. Jako vhodný indikátor výskytu těchto bakterií v chovu se ukázala, podobně jako v zahraničí^{4,5}, telata během mléčné výživy. Na skupině 13 telat byla dokumentována dynamika vylučování ESBL/AmpC pozitivními *E. coli*. Tyto výsledky umožnily provést experimentální ověření vlivu probiotik na vylučování sledovaných bakterií, které dosud probíhá.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 102/2014/FVL

Seznam literatury

1. Dolejska, M., Jurcickova, Z., Literak, I., Pokludova, L., Bures, J., Hera, A., Kohoutova, L., Smola, J., Cizek, A. IncN plasmids carrying carrying *bla*_{CTX-M-1} in *Escherichia coli* isolates on a dairy farm. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 149, no. 3-4, p. 513-516.
2. Hordijk J., Wagenaar, J.A., Arjen van de Giessen, Dierikx, C., Alieda van Essen-Zandbergen, Veldeman, K., Kant, A., Mevius, D. Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type- β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal calves from 1997 to 2010. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, vol.68, p. 1970-1973.
3. Seiffert, S.N., Hilty, M., Perreten, V., Endimiani, A. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resistance Updates* 16, p. 22-45.
4. Snow LC, Warner R.G., Cheney, T., Wearing H, Stokes, M., Harris, K., Teale, C.J., N.G.Coldham. Risk factors associated with extended spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on dairy farms in North West England and North Wales, *Preventive Veterinary Medicine*, 2012, vol. 106, p. 225-234.
5. Hordijk J., Mevius D.J., Kant A., Marian E. H. Bos, Graveland H., Bosman A.B., Hartskeerl C.M., Heederik D.J.J., Wagenaar J.A.. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, vol. 68, p. 11.

Tabulka č. 1: Zjištěné počty cefotaxim rezistentních *E. coli* na gram výkalů sledovaných telat v jejich různém stáří

tele A(74)		tele B(96)		tele D (41)		tele E (22)		tele H (21)		tele G(24)		tele J (16)	
stáří telete	Počty CTX A	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.
1	0	1	0	1	1000000	1	0		0	1	20000000	1	2000000
2	0	2	52000	2	20000000	20	10000000	2	30000	3	2000000	2	10000000
3	1,00E+08	3	9,00E+06	3	1,00E+07	26	1,00E+07	3	5,00E+05	4	4,00E+06	3	3,00E+06
5	5,00E+06	7	3,00E+07	6	3,00E+07	33	6,00E+02	5	7,00E+06	5	9,00E+05	16	2,00E+06
7	1,00E+08	21	3,00E+04	8	3,00E+07			7	50000000	7	30000000	22	2500
21	2,00E+06	28	1,00E+04	21	7,00E+05			18	7000000	15	70000000	29	400
36	0,00E+00	35	6,80E+04	25	0,00E+00			24	1000000	23	10000000	36	0
43	0,00E+00	42	0,00E+00	32	0,00E+00			31	1,40E+04	31	1,00E+05	47	1kol
54	0,00E+00	53	1,00E+03	39	0,00E+00			38	1,30E+03				
63	2,00E+02							49	0				

Pokračování tabulky č. 1

tele K		tele M (26)		tele N		tele Q		tele O		tele L	
stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.	stáří telete	Počty CTX E.c.
1	6400	1	3000000	1	0	1	0	2	1000000	2	3400
3	300000	2	6000000	2	0	2	0	3	40000000	3	100000
16	2,00E+07	3	1,00E+08	3	2,00E+04	3	5,00E+06	4	7,00E+05	7	1,00E+08
22	9,00E+02	6	7,00E+06	4	9,00E+07	7	0,00E+00	16	1,00E+07	15	1,00E+07
29	400	15	3000	14	40000000	15	400000	22	10000000	21	10000000
36	0	21	300000			21	8000000	29	400000	28	400000
47	0	28	300			28	10000000			35	0
		55	5300			35	800000			46	13300
						46	0,00E+00				
						55	0,00E+00				

Vylučování kmenů *Escherichia coli* produkující ESBL ve výkalech prasnic a jejich selat na velkokapacitní farmě

Jan Vašek¹, Jonáš Vaňhara¹, Pavla Kuncová⁴, Alois Čížek^{2,3}, Jiří Smola^{1,3}

¹Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ³CEITEC VFU, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ⁴ Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

V posledním období přibylo studií, které zaznamenaly vznik a šíření získané resistance na antimikrobiální látky používané k terapii potravinových zvířat. Nepřekvapuje proto, že v klinické veterinární praxi se stále častěji setkáváme s problémem rezistence některých původců infekcí, zejména k beta-laktamovým antimikrobikům. Tato rezistence souvisí zejména se schopností bakterií inaktivovat beta laktamy enzymaticky prostřednictvím beta laktamáz, které jsou systematicky klasifikovány do tříd. Jedna z jejich nejvýznamnějších podtříd zahrnuje tzv. „beta-laktamázy rozšířeného spektra“ (ESBL), z nichž většina patří k čeledím označovaným jako TEM, SHV, CTX-M nebo OXA. Jedním z nejsledovanějších problémů v souvislosti s tím je selekce bakteriálních kmenů druhu *Escherichia coli* produkujících ESBL v chovech potravinových zvířat jako následek používání cefalosporinů 3. a 4. generace. Některé z těchto cefalosporinů jsou registrovány u nás a používány pro terapii bakteriálních infekcí skotu a prasat. V případě prasat je na trhu ceftiofur (3. generace) doporučovaný k léčbě bakteriálních respiračních infekcí vyvolaných kmeny *A. pleuropneumonie*, *P. multocida*, *H. parasuis*, *S. Choleraesuis*, meningitid a artritid vyvolaných patogenními kmeny *Streptococcus suis*. V praxi se potom ceftiofur využíval k metafylaktické terapii sajících a odstavených selat s rizikem infekce *S. suis*. V porovnání s tím je cefquinom (4. generace) navíc doporučován pro léčbu septických stavů selat a MMA syndromu prasnic při infekci kmeny *E. coli*. Cefalosporiny těchto generací, však jak známo, indukují u *E. coli* tvorbu ESBL, které odpovídají za rezistenci k těmto cefalosporinům. Podobně jako u jiných zvířat, také v případě prasat byly publikovány studie popisující nálezy kmenů *E.*

E. coli produkující ESBL ve střevě a na povrchu těla prasat v porážkové hmotnosti. Z výsledků těchto prací bylo zřejmé, že nálezy těchto kmenů ve finální fázi výkrmu prasat musí souviset s použitím cefalosporinů ještě v období růstu těchto prasat. V souvislosti s hledáním možností šíření těchto kmenů jsme se v roce 2013 zaměřili na zjištění prevalence kmenů *E. coli* produkující ESBL na farmě A v období 3 měsíců od dobrovolného ukončení podávání ceftiofuru, používaného k terapii artritid a meningitid vyvolaných multiresistentním kmenem *Streptococcus suis serovar 2* (Čížek a kol. 2013). Jak se ukázalo, kmeny *E. coli* produkující ESBL jsme prokázali u 54 % prasat vyšetřených po jejich porážce. Cílem naší studie bylo s odstupem období dalších 12 měsíců monitorovat pokračující cirkulaci kmenů *E. coli* produkující ESBL ve stádě prasnic a jejich sajících selat na farmě A. Navíc bylo cílem sledovat výskyt kmenů u nakupovaných prasniček začleňovaných do stáda, původem z jiné farmy (B) bez historie použití cefalosporinů.

Materiál a metodika

Ve stádě farmy A jsme během roku 2014 zjišťovali výskyt kmenů *E. coli* produkující ESBL u těchto kategorií prasat: 1. celkem 100 prasnic základního stáda na porodně; 2. 166 sajících selat ve vrzích prasnic a prasniček; 3. 110 prasniček nakupovaných z farmy B v izolační stáji a 35 březích prasniček (primipar) před porodem. K vyšetření za účelem vyhledání nosičů byly odebrány nejprve vzorky rektálních výtěrů prasnic a prasniček. U prokázaných nosiček byly následně odebrány vzorky trusu pro semi kvantitativní stanovení vylučování sledovaných kmenů *E. coli* s produkcí ESBL. Celkem bylo použitím přímé selektivní kultivace na MacConkey agaru (MCA) s cefotaximem (2 mg / L) vyšetřeno 411 zvířat, z toho 37 prasnic a prasniček a 27 selat opakovaně. Získané izoláty byly druhově identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI TOF a v případě určení druhu *E. coli* byly testovány na produkci ESBL metodou DDST (double disc synergy test). Molekulární charakterizace získaných izolátů *E. coli* produkující ESBL a jejich vyhodnocení nadále pokračuje.

Výsledky

Z celkového počtu 100 vyšetřených prasnic (druhá parita a více) krátce před porodem bylo 25 (%) pozitivních v rektálním výtěru na *E. coli* produkující ESBL. Dalším vyšetřením těchto prasnic již po porodu, jsme zjistili vylučování kmenů *E. coli* produkující ESBL celkem u 24

prasníc v různé intenzitě v trusu. Ve 14 vzrích prasníc z 15 vyšetřených jsme zjistili přítomnost kmenů *E. coli* produkujících ESBL v rektálních výtěrech selat. Celkem jsme takto prokázali kmeny *E. coli* produkujících ESBL v rektálních výtěrech u 45 selat z celkového počtu 73 (61,6%) v období od 1. do 7. dne života (tab. 1). V případě vyšetření rektálních výtěrů prasniček původem z farmy B po jejich příjezdu na farmu A jsme v žádném vzorku nezjistili výskyt kmenů *E. coli* produkujících ESBL. Teprve na konci jejich březosti krátce před porodem byly výsledky kultivace pozitivní u 12 prasniček (primi par), přičemž již po porodu všechny s výjimkou jedné prasničky vylučovaly kmeny *E. coli* produkujících ESBL ve vysokých počtech ve výkalech. Vyšetřením 10 vrhů selat od pozitivních prasniček jsme kmeny *E. coli* produkujících ESBL prokázali v každém vrhu (tab. č.2). Tyto kmeny jsme izolovaly z rektálních výtěrů u 42 z 55 vyšetřených selat.

Tab. 1

Březí prasnice a jejich potomstvo; celkem 100 vzorků			
	rektál. výtěr	feces	
číslo prasnice	před porodem	o 7 dní později	selata (RV) vyš./pozitiv.
1	+	negativní	nevyšetřeno
2	+	+	11/6
3	+	+	10/10
4	+	+	nevyšetřeno
5	+	+	nevyšetřeno
6	+	+	8/0
7	+	+	8/1
8	+	+	nevyšetřeno
9	+	+	nevyšetřeno
10	+	+	3/2
11	+	++	nevyšetřeno
12	+	++	nevyšetřeno
13	+	+	3/2
14	+	+	3/2
15	+	++	3/2
16	+	++	3/2
17	+	+	nevyšetřeno
18	+	++	3/3
19	+	+++++	3/3
20	+	+	3/2
21	+	+++++	3/2
22	+	++++	3/2
23	+	+++	3/3
24	+	++++	3/3
25	+	+++	nevyšetřeno
Celkem	25	24	72/45

Míra positivity- počty kolonie tvořících jednotek: +; ++; +++; +++++

Tab. 2

Březí prasničky a jejich potomstvo; celkem 35 vzorků			
	rektál. výtěr	feces	
č. prasničky	před porodem	o 7 dní později	selata (RV) vyš./pozitiv.
1	+	+++	nevyšetřeno
2	+	+++	7.1
3	+	negativní	6.5
4	+	+++	6.4
5	+	+++++	6.2
6	+	+++	5.5
7	+	+++	5.5
8	+	+++++	5.5
9	+	+++++	nevyšetřeno
10	+	+++	5.5
11	+	+++++	5.5
12	+	+++	5.5
Celkem	12	11	55/42 (80,7%)

Míra pozitivity- počty kolonie tvořících jednotek: +; ++; +++; +++++

Závěry

Výsledky získané v této studii jasně ukazují dlouhodobou cirkulaci kmenů *E. coli* produkujících ESBL. Ve vrzích pozitivních prasnic a prasniček byl prokázán časný přenos kmenů na novorozená selata (do 12 hodin po porodu) a jejich následné vylučování. Novým zjištěním je míra kolonizace naivních prasniček začleňovaných do stáda, které navíc vylučují kmeny *E. coli* produkujících ESBL ve vyšším počtu ve výkalech než prasnice. Následně pak dochází k vyššímu procentu kolonizace selat ve vrzích prasniček.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 104/2014/FVL

Seznam literatury:

CIZEK, A. et al. Faecal shedding of ESBL-producing *Escherichia coli* in pigs on large scale farm after voluntary withdrawal of ceftiofur. In: *5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment*. Aula – Ghent, Belgium, 30 June – 3 July, 2013, P017:68

HANSEN, H. K. et al. Carriage and Fecal Counts of Cefotaxime M-Producing *Escherichia coli* in Pigs: a Longitudinal Study. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. 79(3):794.

DOI: 10.1128/AEM.02399-12.

HAMMERUM, M. A. et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms...In: *J Antimicrob Chemother.* 7 June, 2014. DOI:10.1093/jac/dku180

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Efekt platinových kovů na reprodukci roupice druhu *Enchytraeus crypticus*

Barbora Havelková, Veronika Kováčová, Miroslava Beklová

Ústav ekologie a chorob zvířer, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Při posuzování akutní zátěže životního prostředí se v poslední době stále více soustřeďuje pozornost na skupinu platinových kovů, zvláště pak na platinu (Pt), palladium (Pd) a rhodium (Rh), které přecházejí do životního prostředí z různých zdrojů. Za nejvýznamnější je považována doprava – emise z katalyzátorů a odpadní vody obsahující rezidua cytostatik na bázi cisplatin [4]. V České republice bylo množství platinových kovů stanoveno například v Praze a to $160 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Pt, $49 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Pd a $3,9 \mu\text{g.kg}^{-1}$ Rh ve vzorcích odebrané půdy [3]. Roupice (*Enchytraeidae*) jsou máloštětinatci (6 - 50 mm dlouzí) adaptovaní na semiterestriální a terestriální prostředí [1]. Na některých lokalitách mohou tvořit průměrně až 75% celkové biomasy půdní mikrofauny. K expozici chemickým látkám dochází přes povrch těla z okolní pórové vody nebo požitím kontaminované potravy. *Enchytraeidae* jsou nejčastěji používány v testech toxicity, kde jsou sledovány akutní či subletální účinky jak chemických individuí, tak směsí látek. Dále jsou tyto organismy využívány v testech bioakumulace, ve studiích biodostupnosti, případně v testech půdní kvality po bioremediaci [2]. Cílem předkládané práce bylo rozšíření informací a zhodnocení vlivu platinových kovů platiny, paladia a rhodia (Pt, Pd, Rh) na reprodukci půdního kroužkovce – roupice druhu *Enchytraeus crypticus*.

Materiál a metodika

Roupice pocházely z laboratorní kultury Ústavu ekologie a chorob zvířer, ryb a včel, VFU Brno a byly chovány na agaru v Petriho miskách. Jedinci byli chováni v kultivační komoře při $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ve tmě a krmeni dvakrát týdně autoklávovanými drcenými ovesnými vločkami.

Byl proveden test inhibice reprodukce roupic (*Enchytraeus crypticus*), dle metodiky OECD 220 [CSN EN ISO 16387 (2014) Kvalita půdy – Vliv znečišťujících látek na *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.) – Stanovení vlivu na reprodukci.]. Podstatou zkoušky je vystavení deseti zdravých dospělých jedinců roupic *Enchytraeus crypticus* s viditelným opaskem (clitellum) působení směsi zkoušeného vzorku s umělou půdou. Koncentrační řada PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 použitá v experimentu byla stanovena na základě předběžných testů. Jednalo se o koncentrace 5, 10, 25, 50 a $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ PdCl_2 a 50, 100, 150, 200 a $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ $\text{PtCl}_4/\text{RhCl}_3$. Po 28 dnech byl zjištěn celkový počet roupic. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou pro zkoušenou směs a pro kontrolu (obojí v 5 opakováních) se vyjádřil jako procento inhibice reprodukce roupic.

Umělá půda jako testovací substrát byla připravena tak, jak je předepsáno v OECD 220 (2004): 70% písku, 20% kaolínu a 10% jemně mleté rašeliny. K úpravě pH na $6,0 \pm 0,5$ byl použit CaCO_3 . Do zkušebních nádob o objemu 100 ml bylo přidáno 20 g přirozeně vlhké umělé půdy a přidaná příslušná koncentrace platinového kovu v množství odpovídajícím 50 % maximální vodní kapacity (WHC). Na takto připravený substrát bylo umístěno 10 adultních roupic. Nádoby byly přikryty víčky a umístěny do kultivačního boxu při 20 °C s fotoperiodou světlo/tma 16h/8h a intenzitou osvětlení 400 - 800 lx. Roupice byly krmeny autoklávovanými drcenými ovesnými vločkami na počátku experimentu a pravidelně po 7 dnech. Zkouška trvala 28 dní. Po jejím ukončení bylo do každé nádoby aplikováno 5 ml etanolu s přídavkem roztoku bengálské červeně. Druhý den byly fixované, červeně obarvené roupice spočítány a test vyhodnocen. Vliv platinových kovů na reprodukci roupic byl hodnocen na základě efektivní koncentrace (EC) PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 , která způsobila 50% inhibici reprodukce ve srovnání s kontrolou za 28 dní.

Výsledky

Zkouška s *Enchytraeus crypticus* splnila kritéria normy ČSN ISO pro validaci. Mortalita dospělých jedinců na konci zkoušky s kyselinou boritou (referenční látka) byla v kontrole 0 %, variační koeficient (CV) reprodukce v kontrole 6 % a průměrný počet juvenilů na jednu zkušební nádobu byl 199,6. Hodnota $28\text{dEC}_{50} \text{H}_3\text{BO}_3$ byla stanovena na $156,2 \text{ mg.kg}^{-1}$. Výsledky testu toxicity s PtCl_4 , PdCl_2 a RhCl_3 jsou uvedeny v tabulce 1 - 3.

Tabulka 1: Shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu PtCl_4 na *Enchytraeus crypticus*.

Koncentrace PtCl_4 [μM]	Počet dospělých		Mortalita [%]	Počet juvenilů (průměr \pm SD)	CV [%]	Inhibice reprodukce [%]
	Na začátku testu (\bar{x})	Na konci testu (\bar{x})				
50	10	9.8	2	130.0 ± 11.5	9	0
100	10	9.8	2	105.00 ± 12.4	12	19
150	10	9.4	6	69.2 ± 10.7	15	47
200	10	9.2	8	57.2 ± 12.4	22	56
250	10	8.8	12	30.4 ± 9.6	32	77

Tabulka 2: Shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu PdCl_2 na *Enchytraeus crypticus*.

Koncentrace PdCl_2 [μM]	Počet dospělých		Mortalita [%]	Počet juvenilů (průměr \pm SD)	CV [%]	Inhibice reprodukce [%]
	Na začátku testu (\bar{x})	Na konci testu (\bar{x})				
5	10	8.8	12	115.6 ± 10.9	9	11
10	10	8.8	12	100.2 ± 14.6	15	23
25	10	8.4	16	71.0 ± 13.5	19	45
50	10	6.6	34	73.6 ± 17.9	24	43
100	10	6.8	32	62.8 ± 20.9	33	52

Tabulka 3: Shrnutí výsledků sledovaných parametrů vlivu RhCl_3 na *Enchytraeus crypticus*.

Koncentrace RhCl_3 [μM]	Počet dospělých		Mortalita [%]	Počet juvenilů (průměr \pm SD)	CV [%]	Inhibice reprodukce [%]
	Na začátku testu (\bar{x})	Na konci testu (\bar{x})				
50	10	10	0	128.8 \pm 16.5	13	1
100	10	9.2	8	126.0 \pm 21.8	17	3
150	10	9	10	124.4 \pm 17.7	14	4
200	10	6.2	38	95.2 \pm 15.7	16	27
250	10	4.4	56	60.6 \pm 26.7	44	53

Mortalita dospělých jedinců na konci zkoušky byla v kontrole 0 %, variační koeficient (CV) reprodukce v kontrole 10 % a průměrný počet juvenilů na jednu nádobu byl 129, 8. Efektivní koncentrace (28hEC50) byla stanovena na 161,9 $\mu\text{m.l}^{-1}$ PtCl_4 , 70 $\mu\text{m.l}^{-1}$ PdCl_2 a 246,2 $\mu\text{m.l}^{-1}$ RhCl_3 .

Závěr

Z výsledků řešeného projektu je patrné, že platinové kovy výrazně ovlivňují reprodukci roupic. Počet juvenilních jedinců jako reprodukční parametr obvykle ukázal vyšší variabilitu než mortalita. V porovnání s dostupnou literaturou a našimi novými poznatky můžeme potvrdit, že relativní pořadí toxicity je následující $\text{Pd (II)} > \text{Pt (IV)} \gg \text{Rh (III)}$. Výsledky lze považovat za aktuální pro praktické posuzování možného vlivu platinových kovů na půdní prostředí.

Seznam literatury

1. CHRISTENSEN, B., GLENNER, H. Molecular phylogeny of Enchytraeidae (Oligochaeta) indicates separate invasions of the terrestrial environment. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 2010, vol. 48, p. 208-212.
2. HARTZELL, P., NGHIEM, JV., RICHIO, KJ., SHAIN, DH. Distribution and phylogeny of glacier ice worms. *Canadian Journal of Zoology*. 2005, vol. 83, p. 1206-1213.
3. MIHALJEVIČ, M., GALUŠKOVÁ, I., STRNAD, L., MAJER, V. Distribution of platinum group elements in urban soils, comparison of historically different large cities Prague and Ostrava, Czech Republic. *Journal of Geochemical Exploration*. 2013, vol. 124, p. 212-217.
4. RAVINDRA, K., BENCS, L., VAN GRIEKEN, R. Platinum group elements in the environment and their health risk. *Science of the Total Environment*. 2004, vol. 318, p. 1-43.

Poděkování: Práce byla financována v rámci projektu IGA 33/2014/FVHE.

Monitoring výskytu vztekliny a reziduí těžkých kovů u středoevropských netopýrů

Miroslava Mikšíková, Hana Bandouchová, Jiří Brichta, Barbora Havelková, Hana Hrubá,
Veronika Kováčová

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

Úvod

Netopýři hostí rozmanitou skupinu virů přenosnou na člověka. Specifickou variantou nákazy, jejímž výskytem není dotčen statut České republiky jako země prosté nákazy dle kritérií OIE, je vztekliny netopýrů (Schatz et al., 2012). Na rozdíl od ostatních zemí Evropy se v České republice doposud nikdo aktivně vzteklinou netopýrů nezabýval, a to i přes význam této problematiky pro ochranu veřejného zdraví (Johnson et al., 2010). Hmyzožraví netopýři jsou také známí bioakumulací toxických polutantů.

V rámci naší studie byl proveden screening středoevropských netopýrů k průkazu cirkulace lyssavirů v populaci netopýrů a reziduí těžkých kovů ve tkáních. Ve spolupráci se záchrannými centry a institucemi zabývajícími se ochranou, léčbou a výzkumem netopýrů v České republice se nám podařilo získat v průběhu několika posledních let 980 vzorků netopýrů z přirozených úhynů nebo euthanázie pro neléčitelná poranění jako je např. traumatická ztráta končetin, a to od druhů *Myotis myotis*, *M. daubentonii*, *M. bechsteinii*, *M. nattereri*, *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. emarginatus*, *M. dasycneme*, *Rhinolophus hipposideros*, *Eptesicus serotinus*, *E. nilssonii*, *Plecotus auritus*, *P. austriacus*, *Barbastella barbastellus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Vespertilio murinus* a *Nyctalus noctula*.

Monitoring vztekliny netopýrů lze provádět pasivně (standardní metody detekce viru v CNS netopýrů, kteří uhynuli např. v záchranných centrech nebo byli utraceni pro kontakt a poranění člověka) a aktivně v populaci netopýrů (detekce virové RNA ve stěrech z dutiny ústní pomocí RT-PCR, izolace viru, a/nebo serologický průkaz protilátek) (Schatz et al., 2012). Vzhledem k tomu, že všichni evropské netopýři jsou chráněni, jedná se o nesmírně cenný materiál (Zukal et al., 2012).

Materiál a metodika

Seroprevalence protilátek proti vzteklině

Odebírané vzorky

Pro tuto analýzu jsme použili krevní séra získaná od 20 netopýrů ze Slovinska, 21 z Ruska (oblast Jekaterinburgu, Ural), 12 z Kateřinské jeskyně (Moravský kras), 20 z Malé Morávky (Jeseníky) a 70 z Národního parku Podyjí. Protilátky proti vzteklině byly testovány pomocí komerčního kitu Platelia™ RABIES II. Test je založen na nepřímé ELISA, kdy mikrotitrační destičky byly pokryty glykoproteinem viru vztekliny extrahovaném z inaktivované a purifikované virové membrány. Enzymatický konjugát se skládá z proteinu A ze *Staphylococcus aureus* spolu s peroxidázou. Pozitivní kontroly, kalibrované proti normě OIE, umožnily kvalitativní nebo kvantitativní stanovení protilátek vztekliny v séru.

Chemická analýza

Vzorky z jater, ledvin a prsních svalů byly použity k prokázání přítomnosti těžkých kovů pomocí diferenční pulsní anodické voltametrie. Tkáňové hladiny metalothioneinů (MT) byly stanoveny pomocí elektrochemické detekce.

Výsledky

Ze 143 odebraných vzorků krevního séra byl 1 pozitivní na vzteklinu. Tento vzorek pocházel z druhu *Myotis myotis*, který byl vzorkován v polovině dubna 2014 v Malé Morávce v Jeseníkách.

Nejvyšší hodnoty metalothioneinů (MT) byly zjištěny u *Pipistrellus pipistrellus* (játra, ledviny, prsní svaly) a nejnižší u *Pipistrellus nathusii* (prsní svaly). Nejvyšší hodnota Zn byla nalezena v játrech *Pipistrellus pipistrellus*, v ledvinách *Pipistrellus pygmaeus* a v prsních svalech *Myotis myotis*. Hodnoty Pb byly nejvyšší v játrech *Eptesicus serotinus*, v ledvinách *Myotis myotis* a v prsních svalech *Myotis daubentonii*. Cd bylo v koncentraci 0.01 µg/g zjištěno v játrech *Myotis myotis*.

Relativní směrodatná odchylka (SD) MT byla pod 5%. Detekční limit MT byl 2 pM. Těžké kovy (Zn, Cd a Pb) byly prokázány ve vzorcích jater, ledvin, a prsních svalů. Relativní SD byla pod 8%. Detekční limity Zn, Cd, Pb a byly 20, 6 a 8 pM.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 23/2014/FVHE

Seznam literatury

1. Schatz J, Fooks AR, McElhinney L, Horton D, Echevarria J, Vásquez-Moron S, Kooi EA, Rasmussen TB, Müller T, Freuling CM. 2012. Bat rabies Surveillance in Europe. *Zoonose and Public Health*. Doi: 10.1111/zph.12002
2. Johnson N, Vos A, Freuling C, Tordo N, Fooks AR, Müller T. 2010. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Veterinary Microbiology*, 142:151–159.
3. Zukal, J., Pikula, J., Bandouchova, H. (2012). Bats and toxic pollutants. Pp. 75-79. 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. December 2012. ISBN: 978-84-87790-69-0.

Průkaz mléčné bílkoviny a karagenanů v masných výrobcích

Matej Pospiech, Ludmila Luňáková, Josef Jandásek, Bohuslava Tremlová, Martina Bednářová,
Petra Čáslavková, Jana Škriňová

*Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Do potravin jsou často přidávány různé náhražky původních surovin. Jedná se například o náhradu svalové bílkoviny jinou živočišnou bílkovinou jako je například mléčná bílkovina (Ballin, 2010), nebo náhražkou hydrokoloidy kde jsou často voleny karagenany (Farouk et al., 2011). Důvodem pro jejich použití je zlepšení vaznosti vody, zlevnění surovin a tedy snížení nákladů na výrobu. Přidávání aditivních látek do tepelně opracovaných masných výrobků je běžnou praxí s omezeními vyplývajícími z národní legislativy a také předpisů EU (Vyhláška č. 326/2001, vyhláška č. 113/2005, Směrnice ES 2000/13, Nařízení ES č. 1333/2008). Mléčná bílkovina je také řazena mezi potencionální alergeny a musí být tedy patřičně značena s cílem chránit spotřebitele. Pro detekci obou zmíněných aditiv jsou používány různé metody detekce s různou mírou úspěšnosti (Campo et al., 2009, Monaci et al., 2011, Ballin, 2010, Grappin et al., 2002).

Cílem projektu bylo vytvoření metody pro imunohistochemický a imunofluorescenční průkaz mléčné bílkoviny a histochemický průkaz karagenanů v masných výrobcích. Současně byl vytvořen mikroskopický popis mléčné bílkoviny a karagenanů a její uspořádání v matici výrobku.

Materiál a metodika

Analyzované vzorky

V rámci řešení projektu bylo analyzováno pět typů mléčných aditiv (kaseinát vápenatý, kaseinát sodný, syrovátkový protein s vysokým obsahem laktózy, syrovátkový koncentrát termostabilní a syrovátkový koncentrát s obsahem 85 % kaseinu). Pro určení detekčního limitu byla analyzována koncentrační řada v koncentracích 0 %, 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 10 %. Pro ověření sestaveného protokolu bylo analyzováno 21 masných výrobků s přidavkem mléčné bílkoviny v různých formách.

Dále byly v rámci řešení projektu analyzovány 3 druhy karagenanů κ -karagenan, λ -karagenan a ι -karagenan v čisté práškové formě izolované z červených řas (Eurogum A/S, Herlev, DE).

Průkaz mléčné bílkoviny

Byla použita sendvičová imunohistochemická metoda ABC komplexu (IHC), a nepřímá imunofluorescenční metoda. Jako primární protilátka byla použita polygonální protilátka proti β -

kaseinu v koncentraci 1:500. Pro imunohistochemickou metodu byl použit peroxidázový chromogen HistoGreen s dobarvením pozadí jádrovou červení, pro imunofluorescenční metodu byl použit fluorochrom texas red.

Průkaz karagenanů

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Testované karagenany (κ , λ , ι) ve formě prášku byly nanесeny na nosné terčíky, pokryty oboustrannou lepicí uhlíkovou páskou a pokoveny 10 nm vrstvou zlata. Snímky karagenanů byly získány pomocí skenovacího elektronového mikroskopu MIRA3 FEG SEM (TESCAN, ČR).

Světelná mikroskopie (SM)

Pro vyšetření ve světelném mikroskopu byly karagenany barveny toluidinovou modří (TM), barvením PAS-Calleja a barvením Lugol-Calleja. Pro analýzu vlivu přísadky na matici výrobku byly vyrobeny dušené šunky s přísadkou karagenanů vliv byl hodnocen histologicky a na základě technologických vlastností (barva, textura, ztráta vody a výtěžnost).

Výsledky

Stanovení mléčné bílkoviny

V rámci projektu bylo ověřeno použití primárních protilátek a jejich koncentrace pro sestavený imunohistochemický a imunofluorescenční protokol (tabulka 1, 2).

Tabulka 1: Výběr vhodné koncentrace primární protilátky

Koncentrace Modelový vzorek	1:10	1:100	1:500	1:1000	1:1500
Kaseinát vápenatý 1%	+++	+++	+++	+++	+++
Kaseinát vápenatý 2,5%	+++	+++	+++	++	+

Tabulka 2: Ověření možnosti detekce forem používaných přísadků

Přísadka	Modelový výrobek	Výrobek		Modelový výrobek	Výrobek
Kaseinát vápenatý	+	+	Syrovátkový koncentrát	+	N/A
Kaseinát sodný	+	+	Mléko	-	-
Syrovátkový protein s vysokým obsahem laktózy	+	N/A	Nespecifikovaná mléčná bílkovina	N/A	+/-
Syrovátkový koncentrát s 85 % kaseinu	+	N/A			

Z uvedeného vyplývá, že nejvhodnější koncentrace primární protilátky je 1:500. Ve vyšších koncentracích přísadky a při vysokém stupni ředění docházelo k nedostatečné vizualizaci proteinu. S ohledem na doporučené dávkování mléčných bílkovin do masných výrobků (dle výrobků kolem 3 %) je nutno volit nižší ředění primární protilátky. Tabulka 2 ukazuje různý výsledek podle formy přísadky a dokladuje také, že je možné zvolenou primární protilátku použít pro různé formy přísadků, což bylo rovněž ověřeno v masných výrobcích. Jenom u přísadky mléka byl výsledek

negativní s ohledem na nízkou koncentraci antigenu. U mléčné bílkoviny bylo histologické vyšetření negativní a IHC dubiózní. Snížení reaktivity u masných výrobků ve srovnání s MV je dáno denaturací proteinu β -kaseinu, nicméně část epitopů zůstává zachována a umožňuje jeho detekci. Toto zjištění je ve shodě s Monaci et al., (2011). Detekční limit byl stanoven na 0,0001 % přídávku.

Stanovení karagenanů

Byly zaznamenány výrazně odlišné vlastnosti ve struktuře povrchu ι -karagenanu v porovnání s κ - a λ -karagenany. U ι -karagenanu je povrch složen z drobných útvarů podobných škrobovým zrnům, které na sebe navzájem přiléhají. Rozlišení κ a λ -karagenanů je obtížnější neboť detaily z povrchů ukazují určitou podobnost. Vyšetření ze světelného mikroskopu ukázalo, že nejlepší výsledky, co se týká rozlišení jednotlivých druhů karagenanů vykazuje barvení PAS-Calleja. Toto barvení poskytlo škálu růžově obarvených struktur karagenanu, což potvrzuje i Bancroft and Cook (2000).

Výrazný vliv měl přídavek karagenanu na vybrané technologické vlastnosti vyrobených dušených šunek. Zejména u šunek s přídávkem κ - karagenanu byl zaznamenán příznivý vliv na texturu a byla zde zaznamenaná nejnížší ztráta vody.

Závěr

Vyvinutá imunohistochemická metoda průkazu β -kaseinu jako indikátoru použití mléčné bílkoviny se ukazuje jako metoda vhodná a specifická pro stanovení mléčné bílkoviny v masných výrobcích. Mikroskopické techniky jsou vhodné ke vzájemnému rozlišení κ -, λ -, ι -karagenanu. Snímky z elektronového mikroskopu poskytují podrobnější informace o struktuře a povrchu jednotlivých fragmentů karagenanů a lze je použít na odlišení ι -karagenanu od κ - a λ -karagenanu.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 27/2014/FVHE

Seznam literatury:

BANCROFT, J. D.; COOK, H. C. Manual of histological techniques and their diagnostic application—Churchill Livingstone. *Edinburgh, London, Madrid, Melbourne, New York, Tokyo*, 2000, 350 p.

BALLIN, N. Z., *Authentication of meat and meat products*, Meat Science 86, 2010, p. 577 – 587

CAMPO, V. L., et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis—A review. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77.2: 167-180.

GRAPPIN, R., et al. *MILK PROTEINS: Analytical Methods*, Encyclopedia of Dairy Sciences 2002, p. 1967–1976

MONACI, L., et al. *Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA*, Food Chemistry 127, 2011, p. 669 – 675

FAROUK, M. M., et al. Phase behaviour, rheology and microstructure of mixture of meat proteins and kappa and iota carrageenans. *Food Hydrocolloids*, 2011, 25.6: 1627-1636.

Využití rakytníkových výlisků v dietě užitkových nosnic

Jana Krejcarová, Eva Straková

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

Úvod

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*) patří do čeledi hlošínovité (*Elaeagnaceae*). Jedná se o dvoudomý, trnitý strom, který dosahuje výšky obvykle kolem 3 – 4 metrů (Li and Beveridge, 2003). Přirozeně se rakytník vyskytuje ve střední Asii a severozápadní Evropě (Michel et al., 2012). Má drobné oválné plody, které ve stádiu zralosti mají barvu od tmavě žluté až po načervenalou. Plody rakytníku mají vzhled peckovice a obsahují velké množství olejů. Listy jsou dlouhé, kopinaté, na povrchu kryté trichomy a mají střídavé uspořádání (Li and Beveridge, 2003; Michel et al., 2012). Celá rostlina obsahuje velice hodnotné bioaktivní složky. Obsahuje velké množství vitamínů a minerálních látek. Dále je bohatá na přírodní antioxidanty a obsahuje značné množství barviv (Michel et al., 2012). Velice důležitý je obsah mastných kyselin. Z mastných kyselin v rakytníku dominují nenasycené mastné kyseliny. V oleji ze semen jsou nejvíce zastoupeny kyselina linolová (18:2,n-6) a kyselina α -linolenová (18:3,n-3). V oleji, který byl získán z celých plodů, dominuje kyselina palmitoolejová (16:1,n-7) (Yang and Kallio, 2001). Rakytník je bohatým zdrojem i dalších esenciálních mastných kyselin z řady n-3, n-6, n-7 a n-9 (Solcan et al., 2012). Dále je také důležitým zdrojem i dalších látek jako jsou bílkoviny, sacharidy, organické kyseliny a flavonoidy (Christaki, 2012). Díky těmto obsahovým látkám má mnohé prospěšné účinky na zdraví organismu.

Materiál a metodika

Experiment byl prováděn na nosnicích Isa Brown. Nosnice v průběhu pokusu byly chovány v obohacených klecích v akreditované experimentální stáji Ústavu výživy zvířat. V pokusných stájích byl řízen světelný, teplotní, zoohygienický a krmně-technologický režim. Do pokusu bylo zařazeno celkem 32 nosnic, které byly rozděleny do 4 skupin. V každé skupině bylo 8 nosnic. Tyto 4 skupiny se lišily v množství rakytníkových výlisků přidávaných do krmné směsi. První skupina nosnic dostávala přídavek 2 % výlisků (P2%), druhá skupina 5 % (P5%) a třetí skupina měla krmnou směs obohacenou o 10 % (P10%) rakytníkových výlisků. Poslední skupina byla skupina kontrolní a těmto nosnicím byla podávána krmná směs bez přídavku rakytníkových výlisků (K0%). Celý pokus trval celkem 4 týdny. Každý týden došlo k odebrání 40 vajec od každé skupiny, tedy z každé testované skupiny za celé trvání pokusu bylo odebráno celkem 160 vajec. Následně byla

vejce podrobena analýze a bylo posouzeno aminokyselinové složení vaječného žloutku u všech nosnic z každé testované skupiny.

Tuk ze vzorku byl extrahován pomocí směsi rozpouštědel n-hexanu a isopropanolu (v poměru 6:4). Rozpouštědlo bylo následně odpařeno ve vakuové odparce. Poté byla provedena transesterifikace s BF₃ a mastné kyseliny byly převedeny na těkavé estery. Estery mastných kyselin byly detekovány za pomoci plynové chromatografie na přístroji GAS CHROMATOGRAPH GC – 2010 (od firmy Shimadzu) s plamenově-ionizačním detektorem a následně vyhodnoceny pomocí programu GC Postrun. Výsledky projektu byly statisticky zpracovány pomocí programu UNISTAT for Excel (verze 5.6.).

Výsledky

Výsledky hmotnosti vajec, hmotnosti vaječného žloutku a objemu vaječného žloutku jsou uvedeny v tabulce 1.

Výsledky zastoupení mastných kyselin ve vaječném žloutku jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

Hodnoty uvedené v tabulkách 1, 2 a 3 jsou průměrné hodnoty za celou testovanou skupinu.

	Hmotnost vajec (g)	Hmotnost žloutku (g)	Objem žloutku (ml)
K0%	59,62	16,74	16,73
P2%	62,70	17,18	17,20
P5%	62,15	17,77	17,76
P10%	63,10	17,43	17,40

Tabulka 1 Výsledky hmotnosti vajec, hmotnosti vaječného žloutku a objemu vaječného žloutku

	Σ mastné kyseliny (mg/g)	Nasycené mastné kyseliny (mg/g)	Nenasycené mastné kyseliny (mg/g)	Nenasycené/nasycené mastné kyseliny (mg/g)
K0%	75,687	25,462	50,225	1,976
P2%	75,641	25,687	49,955	1,946
P5%	76,139	26,508	49,632	1,874
P10%	76,073	26,325	49,749	1,895

Tabulka 2 Výsledky množství mastných kyselin ve vaječném žloutku, množství nasycených a nenasycených kyselin ve vaječném žloutku a vzájemný poměr nenasycených a nasycených mastných kyselin

	MUFA (mg/g)	PUFA (mg/g)	MUFA/PUFA	n-3 (mg/g)	n-6 (mg/g)	n-6/n-3
K0%	37,538	12,688	2,973	1,085	11,603	14,859
P2%	38,817	11,138	3,514	1,096	10,042	13,185
P5%	39,091	10,541	3,808	1,169	9,372	11,677
P10%	38,256	11,493	3,415	1,195	10,298	13,917

Tabulka 3 Výsledky množství MUFA a PUFA ve vaječném žloutku, vzájemný poměr MUFA/PUFA, množství n-3 a n-6 mastných kyselin ve vaječném žloutku a jejich vzájemný poměr

Závěr

Výsledky experimentu dokládají, že rakytníkové výlisky mohou být vhodnou komponentou do krmných směsí pro užitkové nosnice a to především pro jejich:

- příznivý vliv na hmotnost vajec a na hmotnost žloutku
- příznivý efekt na množství mastných kyselin ve vaječném žloutku a to především na zastoupení nasycených mastných kyselin
- pozitivní účinek na množství MUFA ve vaječném žloutku
- pozitivní působení na množství n-3 mastných kyselin ve vaječném žloutku

Práce byla financována v rámci projektu IGA 1/2014/FVHE

Seznam literatury:

Li, Thomas S.C. a Thomas H.J. Beveridge. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): Production and utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003. ISBN 0-660-19265-9.

Michel, T., E. Destandau, G. Floch, M.E. Lucchesi a C. Eefakir. Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations od sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. *Food Chemistry*. 2012, č. 131, s. 754-760. ISSN 0308-8146.

Solcan, C., M. Gogu, V. Floristean, B. Oprisan a G. Solcan. The hepatotoxic effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries on induced aflatoxin B1 poisoning in chickens. *Poultry science*. 2012, č. 92, s. 966-974. ISSN 0032-5791.

Yang, Baoru a Heikki P. Kallio. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001. č. 49, s. 1939-1947. ISSN 0021-8561.

Optimalizace metod pro stanovení methylrtuti ve vodním ekosystému

Zuzana Králová, Petra Komárková, Miroslava Beklová

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

Úvod

Rtuť je rizikový prvek, který se nachází ve všech složkách životního prostředí a je považován za globální polutant. Methylrtuť je nejtoxičtější formou rtuti a její přeměna procesem biomethylace z anorganické rtuti je vázána na vodní prostředí. Methylrtuť vzniká v sedimentech činností některých druhů mikroorganismů a její nebezpečí spočívá ve schopnosti bioakumulace v potravním řetězci (DONG a kol., 2004). Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) je vysoce citlivá metoda pro stanovení analytů ve vzorku. Základem je křemenné vlákno se stacionární fází, které je umístěno do SPME lahvičky se vzorkem, kde je vystaveno určitým podmínkám (pH, teplota, doba extrakce) (SPORKERT a PRAGST, 2000). Cílem práce bylo optimalizovat metody pro stanovení methylrtuti ve vodě a sedimentu, aby bylo možné zjistit úroveň kontaminace těchto složek ve vodním ekosystému.

Materiál a metodika

Chemikálie

Tetraethylborát sodný, octan sodný, ethanol pro HPLC, standard methylrtuti (Pestanal®) a SPME vlákna SUPELCO byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, Německo. Hydroxid sodný Emsure, kyselina octová p.a., methanol pro HPLC analýzu, mořský písek p.a., hydroxid sodný p.a. a voda pro chromatografii byly zakoupeny od firmy Merck, Německo.

Acetátový pufr o pH 5,0 a 5,3 byl připraven z kyseliny octové o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ a octanu sodného o koncentraci $0,2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Derivatizační roztok (1% tetraethylborát sodný) byl připravován denně čerstvý, rozpuštěním v roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Kalibrační roztoky byly připraveny ze zásobního roztoku methylrtuti ($1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) v methanolu.

Pracovní postup pro stanovení methylrtuti ve vodě

Metoda byla optimalizována na základě metody již publikované (CAI a BAYONA, 1995). Do skleněné SPME lahvičky bylo napipetováno 15 ml vody, 2,5 ml pufru o určitém pH, 200 μl derivatizačního činidla a 100 μl standardu methylrtuti. Do lahvičky se vložilo magnetické míchadlo, poté se lahvička uzavřela a nechala 15 minut temperovat ve vodní lázni. Po této době se do lahvičky vložilo SPME vlákno a proběhla

izolace analytů na stacionární fázi. Vlákno se pak ihned vložilo do nástřikového prostoru plynového chromatografu s detektorem elektronového záchytu (GC/ECD), kde při vysoké teplotě probíhá desorpce látek z vlákna.

Pracovní postup pro stanovení methylrtuti v sedimentu

Byla optimalizována metoda (SMAELE a kol., 1999). Do 50 ml skleněné lahvičky se navážilo 0,5 g mořského písku, přidal se 1 ml koncentrované kyseliny octové, 1 ml methanolu a standard methylrtuti. Následovala sonikace reakční směsi po dobu 60 minut. Po zchlazení se přidalo 25 ml pufru o pH 5,3 a 500 µl tetraethylborátu sodného, vložilo se míchadlo, lahvička se uzavřela a nechala temperovat ve vodní lázni. Následovala extrakce pomocí Head space – SPME (HS-SPME) a analýza na GC/ECD.

Výsledky

Pro stanovení methylrtuti v reálných vzorcích vody byl vybrán monitoring Čistírny odpadních vod (ČOV) Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Vody byly odebírány během 14-ti dnů, jak z přítoku na ČOV (surová voda), tak na odtoku z ČOV (vyčištěná voda vypouštěná do kanalizace města Brna). V těchto vzorcích byla stanovena methylrtuť pomocí optimalizované metody HS-SPME, kvantifikace byla provedena metodou standardního přídávku. Celková rtuť byla stanovena na atomovém absorpčním spektrometru AMA 254. Dále byl z regresní rovnice kalibrační křivky (m) a výšky šumu signálu detektoru (Hn) stanoven detekční (LOD) a kvantifikační (LOQ) limit (IUPAC, 1997). Detekční limit byl stanoven na $5,106 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ a kvantifikační limit na $15,98 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot Hn}{m} \qquad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot Hn}{m}$$

Tabulka č. 1 Výsledky methylrtuti (MeHg) a celkové rtuti (THg) z monitoringu ČOV VFU Brno

Den	THg (ng·L ⁻¹)		MeHg (ng·L ⁻¹)		pH	
	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok	Přítok	Odtok
1	179,00	111,00	< LOD	< LOQ	8,27	7,45
2	174,33	159,33	< LOD	< LOQ	7,98	7,72
3	166,33	101,67	< LOD	< LOQ	8,06	7,53
4	69,00	41,67	< LOD	< LOQ	7,46	7,88
5	155,33	87,00	< LOD	< LOQ	8,21	7,69
6	71,00	64,67	< LOD	< LOD	8,13	7,52
7	29,33	44,00	< LOD	< LOD	7,59	7,70
8	21,00	58,00	< LOD	< LOD	7,68	7,99
9	6,00	15,00	< LOD	< LOD	7,77	7,52
10	99,33	91,33	< LOD	< LOD	8,30	7,39
11	82,00	27,00	< LOD	< LOD	7,60	8,00
12	6,00	7,33	< LOD	< LOD	7,81	7,45
13	19,00	18,33	< LOD	< LOD	7,91	8,02
14	16,00	3,33	< LOD	< LOD	7,40	7,73

Výsledky celkové rtuti a methylrtuti stanovené v odpadní vodě VFU Brno jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z hodnot je patrné, že methylrtuť je v odpadní vodě pod úrovní detekce a pouze v pěti případech pod úrovní kvantifikace.

Závěr

Metoda HS-SPME byla optimalizována na vodě a mořském písku kontaminovaných standardem methylrtuti. U každé metody byly optimalizovány čtyři parametry, a to typ stacionární fáze, pH přidávaného pufru, teplota a doba extrakce. Pro stanovení methylrtuti ve vodě byly optimální podmínky následující – SPME vlákno se 100 µm PDMS (polydimethylsiloxan), pH pufru 5,0, teplota pro derivatizaci a extrakci 40 °C a doba extrakce 5 minut. Analýza byla provedena optimalizovanou metodou na GC/ECD. Methylrtuť a celková rtuť byly stanoveny ve vzorcích odpadní vody VFU Brno. Pro stanovení methylrtuti v sedimentu byly optimální podmínky následující – SPME vlákno se 100 µm PDMS, pH pufru 5,3, teplota pro derivatizaci a extrakci 40 °C a doba extrakce 7 minut. Analýza byla provedena optimalizovanou metodou na GC/ECD.

Poděkování: Tato práce byla financována v rámci projektu IGA 32/2014/FVHE.

Seznam literatury:

CAI, Yong a Josep M. BAYONA. Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1995, vol. 696, issue 1, s. 113-122. DOI: 10.1016/0021-9673(94)01177-g.

DONG, Li-Ming, Xiu-Ping YAN, Yan LI, Yan JIANG, Shan-Wei WANG a Dong-Qing JIANG. On-line coupling of flow injection displacement sorption preconcentration to high-performance liquid chromatography for speciation analysis of mercury in seafood. *Journal of Chromatography A*. 2004, vol. 1036, issue 2, s. 119-125. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.02.070.

IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1997).

SMAELE, Tom De, Luc MOENS, Pat SANDRA, Richard DAMS, R.H. GADDY, Yuri A. RYNDIN a Yuri I. YERMAKOV. Determination of organometallic compounds in surface water and sediment samples with SPME-CGC-ICPMS. *Microchimica Acta*. 1999, vol. 130, issue 4, s. 241-251. DOI: 10.1007/bf01242912.

SPORKERT, F a F PRAGST. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Science International*. 2000, vol. 107, 1-3, s. 129-148. DOI: 10.1016/s0379-0738(99)00158-9.

Účinky ciprofloxacinu na ryby se zaměřením na vybrané markery oxidativního stresu

Dana Živná, Lucie Plhalová, Lucie Chromcová, Jana Blahová, Petr Maršálek, Stanislava Štěpánová,
Zdeňka Svobodová

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

Úvod

Antibiotika jsou léčiva používaná pro léčbu a prevenci mikrobiálních chorob. Bylo zjištěno, že v těle jsou po podání metabolizována z 30 – 90% a poté vyloučena močí v aktivní formě (Rang et al., 1999). Tyto látky se odpadními vodami dostávají do čističek odpadních vod (ČOV), kde by mělo dojít k jejich odbourání. Množství studií však ukázalo, že ke kompletnímu odbourání těchto látek v ČOV nedochází a jejich rezidua jsou v nízkých koncentracích nalézána v povrchových vodách, kde představují riziko především pro vodní organismy (Golet et al., 2002, 2003; Fick et al., 2009).

Ciprofloxacin (CIP) je širokospektrální antibiotikum patřící do skupiny fluorovaných chinolonů. Je používán jak v humánní tak i veterinární medicíně a jeho rezidua jsou často nacházena v povrchových vodách. Koncentrace CIP zjištěné v povrchových vodách ve Švýcarsku byly 62 - 106 ng/l, zatímco v Indii byly zjištěny hodnoty až 14 mg/l (Golet et al., 2002; Fick et al., 2009). Nežádoucím účinkem CIP, stejně jako ostatních fluorochinolonů, je chondrotoxicita pro juvenilní jedince (Stahlmann and Lode, 1999). Proto byla provedena série testů toxicity, jejichž cílem bylo posouzení subchronických účinků CIP na embryonální a juvenilní stádia ryb.

Vliv CIP na ryby byl posuzován především na základě stanovení markerů oxidativního stresu, které byly použity v řadě studií k hodnocení účinků xenobiotik (Pamplona et al., 2011; Plhalova et al., 2011; Stepanova et al., 2013). Stanovení těchto markerů představuje možnost, jak sledovat a hodnotit míru oxidativního stresu, který vzniká v důsledku nerovnováhy mezi tvorbou a eliminací reaktivních forem kyslíku (ROS). Výsledkem této nerovnováhy je vzestup koncentrace ROS, který může vést k narušení buněčného metabolismu a poškození částí buněk (Lushchak, 2011). Pro posouzení míry oxidativního stresu byla v naší studii měřena aktivita antioxidantních a biotransformačních enzymů a produktů lipidní peroxidace. Byla hodnocena aktivita enzymů glutathion-S-transferasy (GST), glutathion peroxidasy (GPx), glutathion reduktasy (GR), katalázy (CAT) a množství látek reagujících s kyselinou thiobarbiturovou (TBARS), které jsou měřeny pro zjištění míry lipidní peroxidace.

Materiál a metodika

Za účelem posouzení subchronických účinků CIP byly provedeny testy toxicity dle metodik OECD 215 (Fish, Juvenile Growth Test) a OECD 210 (Fish, Early-life Stage Toxicity Test).

Pro test prováděný dle metodiky OECD 215 byly použity ryby *Danio. rerio* ve věku 30 dnů. Ryby byly umístěny po 50 kusech do 30 litrových akvárií. Testované koncentrace byly 0.7, 100, 650, 1100 a 3000 µg/l. Testování každé skupiny probíhalo duplicitně. Test probíhal 28 dní v průtočných nádržích s obměnou roztoků po 12 hodinách. Ryby byly krmeny 2x denně sušenou žábřonožkou solnou (*Artemia salina*).

Pro test prováděný dle metodiky OECD 210 byly použity oplozené jikry kapra obecného (*Cyprinus carpio*), které byly po 100 kusech umístěny do krystalizačních misek. Testované koncentrace byly 1, 100, 500, 1000 a 3000 µg/l. Každá skupina byla testována triplicitně. Test probíhal 33 dní a byl prováděn semistatickou metodou s obměnou roztoků po 12 hodinách. Larvální stádia byla krmena čerstvě vylíhlými naupliemi žábřonožky solné (*A. salina*).

K měření jednotlivých markerů oxidativního stresu byl použit celotělový homogenát. Aktivita GST byla založena na spektrofotometrické detekci tvorby konjugátu mezi redukováným glutathionem a substrátem 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (Habig et al., 1974). Měření aktivity GPx a GR bylo založeno na katalýze přeměny oxidovaného glutathionu na redukováný glutathion za spotřeby NADPH, která byla detekována spektrofotometricky. Měření aktivity CAT vycházelo ze schopnosti tohoto enzymu rozkládat za poklesu absorbance peroxid vodíku na vodu a kyslík. Tento pokles byl následně stanovován spektrofotometricky ve speciálních mikrokyvetách (Aebi, 1984). Pro stanovení rozsahu lipidní peroxidace byl použit TBARS test. Tato metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení barevných adduktů vznikajících reakcí produktů lipidní peroxidace s kyselinou thiobarbiturovou (Livingstone et al., 1989; Surai et al., 1996; Uchiyama and Mihara, 1978).

Výsledky

Výsledky stanovení markerů oxidativního stresu ze vzorků získaných z testů toxicity prováděných dle metodik OECD 215 a OECD 210 jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

	Kontrola	0.7 µg/l	100 µg/l	650 µg/l	1100 µg/l	3000 µg/l
GST	114.02 ± 10.94	140.52 ± 23.42**	132.73 ± 14.70**	107.69 ± 8.94	107.56 ± 14.48	108.83 ± 7.23
GR	10.15 ± 1.07	10.11 ± 1.80	10.79 ± 0.71	8.97 ± 1.71	8.35 ± 1.39*	8.38 ± 1.36*
GPx	41.89 ± 10.89	26.82 ± 7.19**	49.44 ± 14.55	30.80 ± 5.77*	28.43 ± 6.46**	25.59 ± 4.77**
CAT	88.01 ± 4.98	78.86 ± 2.36	86.33 ± 3.02	83.89 ± 2.98	85.61 ± 5.66	92.66 ± 4.07
TBARS	20.51 ± 5.22	19.53 ± 2.45	14.99 ± 2.15**	19.10 ± 3.03	22.14 ± 3.22	19.64 ± 3.56

Tabulka 1: Hodnoty markerů oxidativního stresu u vzorků získaných z růstového testu toxicity na *D. rerio* po 28 dnech expozice CIP (** p < 0.01, * p < 0.05, průměr ± SEM). Aktivita GST (nmol/min/mg protein), GPx (nmol NADPH/min/mg protein), GR (nmol NADPH/min/mg protein), CAT (μmol H₂O₂/ min/ mg protein) a obsah TBARS (nmol/g vzorku).

	Kontrola	1 μg/l	100 μg/l	500 μg/l	1000 μg/l	3000 μg/l
GST	101.80 ± 2.47	98.41 ± 2.51	97.08 ± 2.46	91.18 ± 1.89**	95.83 ± 1.33	88.99 ± 1.97**
GPx	22.17 ± 0.68	34.85 ± 2.10**	34.21 ± 1.15**	33.58 ± 1.63**	35.89 ± 1.54**	32.65 ± 0.87**
GR	6.04 ± 0.16	6.32 ± 0.53	6.48 ± 0.38	4.79 ± 0.30*	6.92 ± 0.30	4.88 ± 0.36
CAT	19.67 ± 0.59	23.17 ± 1.05	25.29 ± 1.07**	26.26 ± 1.53**	27.65 ± 1.58**	24.62 ± 0.93*
TBARS	17.96 ± 2.90	7.76 ± 0.71**	6.31 ± 0.59**	4.77 ± 0.55**	6.73 ± 0.78**	4.25 ± 0.27**

Tabulka 2: Hodnoty markerů oxidativního stresu u vzorků získaných z embryolárního testu toxicity na kapru obecném po 33 dnech expozice CIP (** p < 0.01, * p < 0.05, průměr ± SEM). Aktivita GST (nmol/min/mg protein), GPx (nmol NADPH/min/mg protein), GR (nmol NADPH/min/mg protein), CAT (μmol H₂O₂/ min/ mg protein) a obsah TBARS (nmol/g vzorku).

Závěr

Na základě výše uvedených výsledků byla pro CIP stanovena hodnota LOEC 0.7 μg/l pro juvenilní ryby *D. rerio* a 1 μg/l pro larvální stádia kapra obecného. Výsledky z obou testů prokázaly, že i koncentrace CIP běžně detekované v povrchových vodách mohou mít vliv na larvální a juvenilní stádia ryb. Hodnoty jednotlivých markerů získané v rámci těchto testů se však mezi sebou značně liší. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnou druhovou citlivostí nebo rozdílnou citlivostí larválních a juvenilních stádií ryb vůči působení CIP. Rozdílné výsledky aktivit markerů oxidativního stresu u různých vývojových stádií ryb byly zjištěny i v dalších studiích (Domingues et al., 2010; Oliveira et al., 2013). Mechanismy působení CIP na jednotlivé antioxidační a biotransformační enzymy a lipidní peroxidaci nejsou přesně známy. Pro poznání jejich přesnějších a detailnějších účinků je nutné provést další studie.

Výzkum byl financován z projektu IGA 4/2014/FVHE.

Seznam literatury:

Seznam použité literatury a citovaných zdrojů je k dispozici u autora.

Kolostrum jako zdroj významných biomolekul a jejich dynamika v průběhu laktace

Lucia Hodulová¹, Ivana Borkovcová¹, Romana Kostrhounová¹, Lenka Vorlová¹, Jitka Langová¹,
Žofie Bulandrová¹, Adela Hriadelová¹

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

Úvod

Kolostrum je prozatím nejznámější přírodní komplex sloučenin podporujících imunitní systém. Je významnějším zdrojem bílkovin, imunoglobulinů (Ig), neproteinového dusíku, tuku, popelu, vitamínů a minerálů než zralé mléko. Některé vitamíny nepřechází placentární bariérou a proto je kolostrum primárním a esenciálním zdrojem lipofilních vitamínů. Imunomodulační molekuly a imunoglobuliny chrání organismus v prvních dnech života před vírusovými a bakteriálními infekcemi. Kolostrum je výborným zdrojem laktoferinu, který má schopnost poutat železo a tím inhibovat růst a množení bakterií (Uruakpa, 2002).

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

Celkem bylo analyzováno 181 vzorků mleziv přežvýkavců – koz, skotu a ovcí. Mlezivo bylo oddojené ručně v průběhu prvních 120 hodin po porodu. Vzorky kozích mleziv v počtu 81 byly odebírané od koz bílých krátkosrstých na Klinice chorob přežvýkavců, VFU Brno, ovčí mlezivo pocházelo ze soukromé farmy Pejškovo, plemeno černé východofrijské v počtu 45 mleziv a mlezivo kravské, červenostrakatý skot 55 vzorků ze ŠZP Nové Dvory. Ke každému mlezivu bylo odebráno i mléko, cca měsíc po porodu.

Základní chemické parametry (bílkoviny, tuk, sacharidy) byly změřeny rutinní laboratorní metodou pomocí NIR spektrofotometra a sušina byla stanovená gravimetricky použitím halogenového analyzátoru vlhkosti.

Metody extrakce lipofilní složky

K extraktu lipofilních vitamínů (A,D,E) a cholesterolu byla použita alkalická saponifikace a přímá extrakce do hexanu. Pro polární lipidy byla využita metoda Bligh- Dyerovej lipidové extrakce.

Metody extrakce hydrofilní složky

K analýze vitamínu B1 se využila derivatizace na thiochrom po předchozím uvolnění z vazeb pomocí enzymu „Clara diestasa“

K extrakci proteinové složky (laktoferin, alfa a beta laktalbumín) a vitamínu B2 se využila kyselá hydrolyza pomocí kyseliny octové do hodnoty izoelektrického bodu bílkovin.

Analytická koncovka

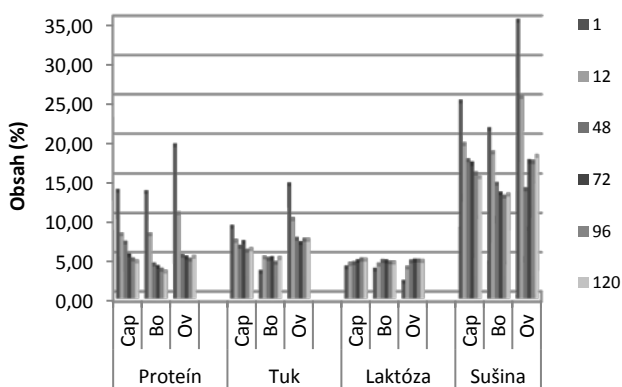
Pro lipofilní složku bylo UHPLC s UV detekcí a konfirmace pomocí UHPLC/MS/MS.

Pro polární lipidy byla použita HPLC/MS/MS ve spolupráci s VÚVeL Brno.

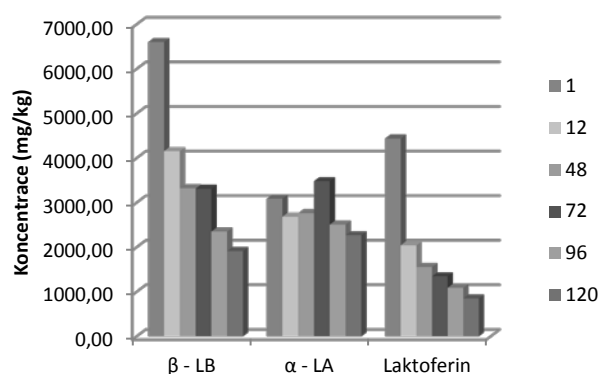
Hydrofilní složka mleziva byla analyzovaná pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

K zpracování výsledků byl použit MS Ecel 2010 a ke statistickému zpracování program Unistat for Exel 6.0.

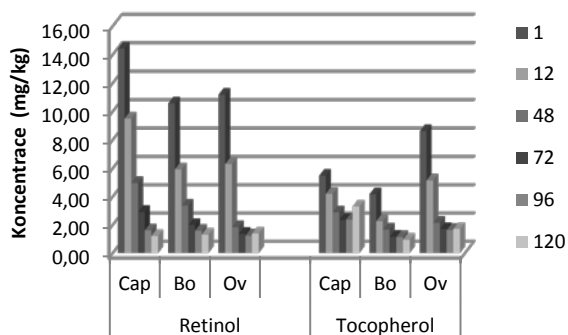
Výsledky



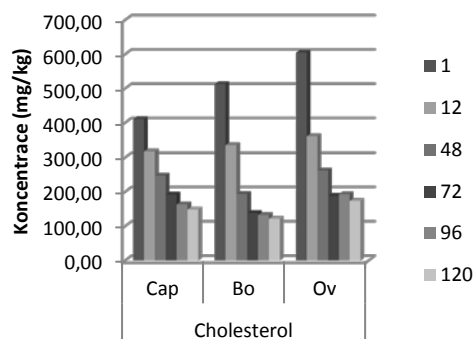
Graf č.1: Variabilita základního chemického zloženia



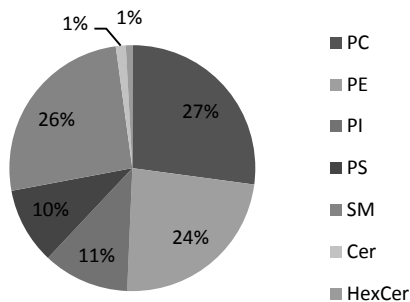
Graf č.2: Dynamika vybraných proteinů kozího kolostra



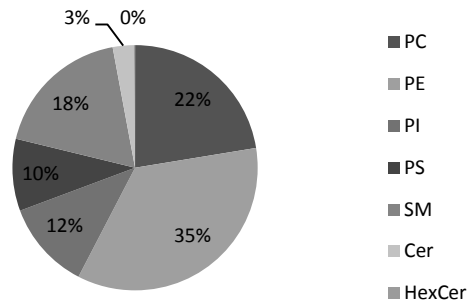
Graf č.3: Dynamika koncentrace vit. A a E v mlezivu



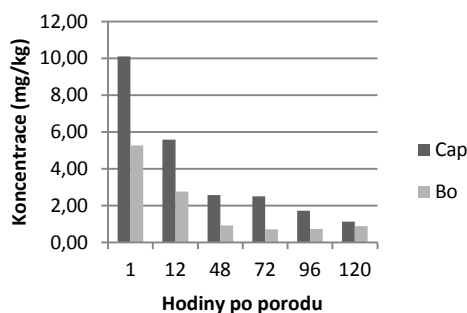
Graf č.4: Dynamika koncentrace vit. A a E v mlezivu



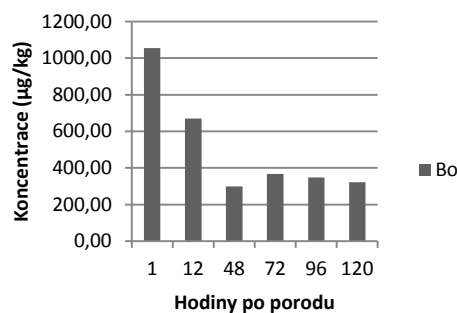
Graf. č.5: % zastoupení polárních lipidů v kozím mlezivu



Graf č.6: % zastoupení polárních lipidů v kozím mléce



Graf č.7: Dynamika koncentrace riboflavinu



Graf č.8: Dynamika koncentrace thiaminu

Závěr

Většina vědeckých publikací je zaměřena jenom na různé druhy mléka. O kolostru, kterého využití jako potravinového doplňku je podporováno také Nařízením Komise (ES)č. 1662/2006 a Vyhláškou č. 225/2008 Sb. k Zákonu č. 110/1997 Sb. je omezený počet informací. Výsledky z naší studie je možné nejlíp srovnat s mlékem jednotlivých přežvýkavců. Z nutričního hlediska má kolostrum až téměř 10krát vyšší obsah vybraných vitamínů v prvním nádoji. Nejvýraznější změny všech komponent nastávají po prvních 12 hodinách porodu a statisticky jsou významné do 48 hodin po porodu. Nevýhodou ovčího kolostra je vyšší obsah tuku oproti mlezivu kozímu a kravskému a tedy i vysoký obsah cholesterolu. Některé potravinové doplňky z mleziva se vyrábí z mleziva odtučněného i na úkor ztrat důležitých antioxidantů – retinolu a tokoferolu. V prvních hodinách po porodu jsou viditelné největší odchylky mezi jednotlivými vzorky, které se po dvanácti hodinách vyrovnávají. Zajímavostí je změna procentuálního zastoupení polárních lipidů. Mezidruhové rozdíly nejsou patrné, ale mlezivo má vyšší zastoupení fosfatidyletanolamínu o 10 %. Kozí a kravské mlezivo mají téměř stejný obsah vybraných biomolekul a z nutričního hlediska kromě cholesterolu výborným přírodním zdrojem vitamínu a imunomodulačních látek v nádoji během prvních 48 hodin porodu.

Seznam literatury:

- Uruakpa F.O., Ismond M.A.H., Akobundu E.N.T. (2002): Colostrum and its benefits: a review. *Nut. Research*, 22, s. 755–767.
- Georgiev, Penchev I. (2005): Alterations in Chemical Composition of colostrum in relationship to post-partum time. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 8, s. 35–39.
- Kehoe, S. I., Jayarao, B. M., Heinrichs, A. J. (2007): A Survey of Bovine Colostrum Composition and Colostrum Management Practices on Pennsylvania Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 90, 4108–4116.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury IGA VFU Brno 25/2014/FVHE.

Možnosti terapie nematodózy lososovitých ryb chovaných v recirkulačním systému dánského typu

Zdeňka Soukupová¹, Petr Maršálek², Veronika Doubková², Miroslava Palíková¹, Štěpán Lang³

Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel¹, Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare²,
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

[Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství](#), Agronomická fakulta, Mendelova univerzita
v Brně³

Úvod

Infekce parazitickými červy (helmintózy) patří k častým onemocněním. Vývoj některých parazitických druhů je jednoduchý, u jiných velmi složitý a probíhá za účasti mezipřehostitelů. Ryby mohou být hlavním hostitelem, ale i mezipřehostitelem parazitů. Hostiteli a mezipřehostiteli bývají také vodní ptáci a jiní vodní živočichové. V důsledku složitosti vývoje je terapie a prevence helmintóz někdy velmi problematická (Svobodová a kol., 2007). K léčbě ryb jsou v současné době registrovány pouze tři antibiotické léčebné přípravky. Registrované antiparazitikum není k dispozici, ačkoli parazitózy jsou nejčastějšími diagnózami v chovech ryb. Jako vhodné léčivo pro tlumení helmintóz u ryb se jeví použití praziquantelu (Ishimaru a kol., 2013; Sudová a kol., 2010). Farmakokinetické studie mimo jiné poukazují na to, že léčba praziquantelem je vysoce efektivní a relativně bezpečná (Ishimaru a kol., 2013). Další variantou je použití preparátu s účinnou látkou fenbendazolum. V přípravcích pro veterinární použití se obvykle fenbendazol kombinuje s praziquantelem. Cílem předkládané studie bylo zhodnotit účinnost praziquantelu a fenbendazolu na hlístici *Raphidascaris acus* a dále rychlost metabolizace a eliminace praziquantelu, fenbendazolu a jejich kombinovaného podání v různých částech organismu lososovitých ryb a z výskytu reziduí zjistit, zda na úplné vyloučení látky z těla postačuje doba zákonné ochranné lhůty.

Materiál a metodika

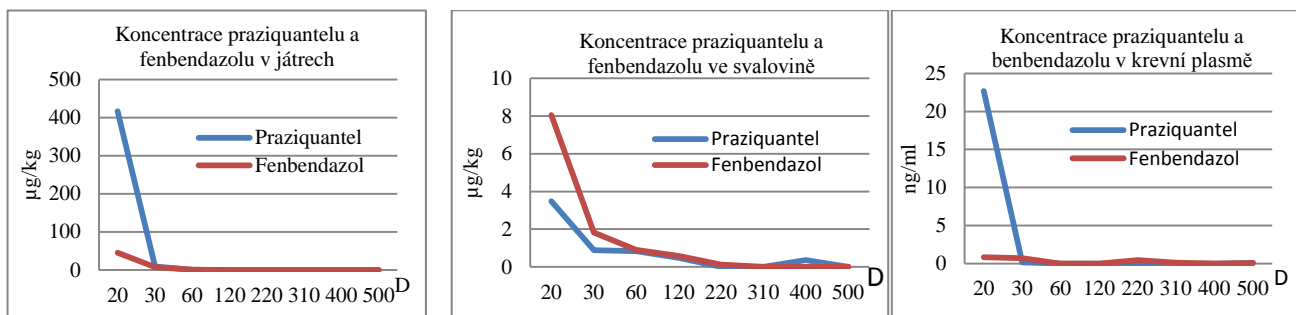
Experiment probíhal v jarním období (duben, květen). Modelovým druhem pro tento experiment byl siven americký (*Salvelinus fontinalis*). Do pokusu byli zařazeni jedinci s hmotností cca 200 g. Celkem bylo pro analýzy použito 158 kusů ryb, které byly rozděleny do čtyř kruhových nádrží. K experimentální terapii byly vybrány přípravky Praziquantel EP 100g v práškové formě (účinná látka praziquantel) – dovezen na vyjímku povolenou SVS ČR a Panacur 25 mg/l, p.o. suspenze (účinná látka fenbendazolum). Skupiny byly označeny jako kontrolní, skupina s aplikací fenbendazolu, skupina s aplikací praziquantelu a skupina s kombinovanou aplikací (praziquantel +

fenbendazol). Obě léčiva byla aplikována jícnovou sondou do gastrointestinálního traktu, jednorázově v čase t₀, v množství 50 mg/kg živé hmotnosti. U kombinované expozice v množství 25 mg/kg ž.hm. každé látky. Pro sledování farmakokinetiky byly prováděny odběry po 6 kusech ryb v čase t₂₄ (24 h po aplikaci léčiva), t₄₈, t₁₂₀, t₃₁₂, t₄₈₀, t₆₄₈, t₈₁₆, t₁₀₀₈. Pokusným zvířatům byla odebrána krev. Poté byla zvířata zákonným způsobem usmrcena vykvrvením po předchozím omráčení tupým úderem do hlavy, bylo provedeno parazitologické vyšetření a odebrány vnitřní orgány (játra, ledviny, svalovina) pro další analýzu. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Příprava vzorku spočívala v extrakci do metanolu a následné extrakci na pevné fázi.

Výsledky a diskuse

Parazitologickým vyšetřením jsme zjistili přítomnost larválních stádií i dospělců hlístic *Raphidascaris acus* v pylorických přívěscích, ve střevě i v játrech, v průběhu celého experimentu téměř u všech vyšetřovaných ryb. Zvolená koncentrace použitých léčiv (50 mg/kg ž. hm.), ať už v samostatném nebo kombinovaném podání, neměla žádný vliv na larvální stádia ani na dospělé hlístic. Sudová a kol. (2010) naopak prokázali, že dávka 50 mg/kg ž. hm. je účinná při eliminaci střevních parazitů – tasemnic u kapra obecného. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu v průběhu experimentu ve sledovaných matricích jsou uvedeny v Tabulce č. 1.

Z výsledků testování je patrné, že v případě praziquantelu i fenbendazolu jejich nejvyšší koncentrace v těle dosahují maxima do 24 hodin po podání. V dalších 24 hodinách jejich koncentrace prudce klesají (viz. Graf č. 1, 2 a 3). Vrchol koncentrace v séru je u člověka (ale i u opic a potkanů) dosažen za 1-2 hodiny po podání 50 mg/kg tělesné hmotnosti u zdravých dospělých jedinců (Leopold a kol., 1978, Pearson a Guerrant, 1983). Testy na zvířatech dále ukázaly, že toxicita praziquantelu je velmi nízká, jak v akutních tak v dlouhodobých experimentech (Frohberg, 1984). Mutagenními studiemi na bakteriálních, kvasinkových a savčích systémech se neprokázalo žádné riziko genotoxicity (Kramers a kol., 1991, cit. dle Cioli a Pica-Mattocia, 2003). Tento fakt je důležitý zejména pro hodnocení výskytu případných reziduí u potravinových zvířat. Až na výjimku, kdy se vyskytovala stopová množství obou látek v krevní plazmě, došlo k jejich úplnému odbourání a eliminaci z těla. V době ukončení pokusu jsme dosáhli ochranné lhůty odpovídající 497,6 denních stupňů (viz. Tabulka č. 1). Lze tedy říci, že doba zákonné ochranné lhůty pro tržní ryby byla v tomto případě dodržena.



Graf č. 1, 2, 3. Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu v játrech, svalovině a v krevní plazmě.

D°	Doba [h]	Játra		Krevní plazma		Svalovina	
		Prazi. [µg/kg]	Fen. [µg/kg]	Prazi. [µg/kg]	Fen. [µg/kg]	Prazi. [µg/kg]	Fen. [µg/kg]
20,24	t24	416,42	45,27	22,67	0,82	3,49	8,05
29,71	t48	9,11	7,64	0,15	0,71	0,88	1,82
59,37	t120	0,18	0,16	0	0	0,84	0,91
132,89	t312	0	0,07	0	0	0,48	0,58
223,79	t480	0	0,03	0	0,43	0	0,13
309,95	t648	0	0,1	0	0,09	0	0
400,77	t816	0	0	0	0	0,36	0
497,6	t1008	0	0	0,06	0,06	0	0

Tabulka č. 1: Koncentrace praziquantelu a fenbendazolu v játrech, krevní plazmě a svalovině v časech odběrů vzorků v porovnání se souvisejícími denními stupni (D°).

Závěr

Předpokládaný účinek praziquantelu, fenbendazolu a jejich kombinace na hlístice *Raphidascaris acus* se v tomto experimentu neprokázal.

K analýze reziduí léčiv byla použita vysoce citlivá metoda HPLC, což nám umožnilo detekci ještě velmi malých množství xenobiotik v tělesných tekutinách i tkáních. Výsledky testu potvrdily předchozí poznatky - praziquantel i fenbendazol vykazují vysokou rychlost metabolizace a eliminace z organismu ryb. Obě látky by se na základě současných znalostí o léčebném účinku daly dobře uplatnit k terapii helmintóz, neboť splňují podmínky ochranné lhůty dle zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči.

Poděkování: Studie byla finančně podpořena projektem IGA 24/2014/FVHE.

Seznam literatury: Seznam použité literatury je k dispozici u autorky.

Rozšíření a diverzita IncX plazmidů nesoucích geny rezistence ke klinicky významným antibiotikům u *Enterobacteriaceae*

Hana Dobiášová^{1,2}, Jiří Vojtěch¹, Monika Dolejšká^{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

V posledních desetiletích došlo u Gram-negativních bakterií k výraznému rozšíření genů rezistence k cefalosporinům, karbapenemům a fluorochinolonům, které patří mezi nejvýznamnější skupiny antibiotik humánní i veterinární medicíny.^{1,2} Při rozšiřování genů rezistence k antibiotikům hraje u Gram-negativních bakterií nejvýznamnější roli horizontální přenos plazmidů.¹

Až do současné doby byly rozpoznávány pouze dvě podskupiny plazmidů skupiny inkompatibility X (IncX), IncX1 a IncX2. Na základě srovnání primární struktury konzervativního genu *taxC* byla tato skupina konjugativních plazmidů s úzkým spektrem hostitelů rozšířena o další podskupiny, IncX3-X5.^{3,4} Rozmanité geny rezistence k antibiotikům, včetně genů rezistence k chinolonům, genů širokospektrých beta-laktamáz a karbapenemáz, byly detekovány na všech podskupinách IncX plazmidů.^{3,4} Z tohoto důvodu se IncX plazmidy mohly u Gram-negativních bakterií významně podílet na rozšíření genů rezistence ke klinicky významným antibiotikům.³

Cílem této studie bylo prozkoumat diverzitu IncX plazmidů získaných z izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k cefotaximu nebo se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu z různých zdrojů a země původu a identifikovat nejrozšířenější linie těchto plazmidů.

Materiál a metody

IncX plazmidy byly testovány pomocí PCR u 1800 izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních k cefotaximu (≥ 2 mg/l) nebo se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu ($\geq 0,05$ mg/l), které byly získány ze zvířat, člověka i životního prostředí z Evropy, Afriky, Austrálie, Severní a Jižní Ameriky v letech 2006–2012.³ Geny rezistence k beta-laktamům a chinolonům byly u těchto izolátů detekovány pomocí PCR a sekvenování. Izoláty byly identifikovány pomocí API 10 S (bioMérieux, Francie) nebo MALDI-TOF. Příbuznost izolátů byla stanovena pomocí pulzní gelové elektroforézy (PFGE) a software BioNumerics (Applied Maths, Belgie). IncX plazmidy byly studovány pouze u izolátů s unikátním makrorestrikčním profilem nebo u náhodně vybraného zástupce skupiny identických izolátů. Horizontální přenos IncX plazmidů byl testován pomocí transformace chemicky kompetentních buněk *E. coli* DH5 α nebo Top10 a konjugace na

bakteriologických filtrech. Velikost IncX plazmidů byla stanovena štěpením S1-nukleázou a PFGE. Příbuznost IncX plazmidů byla hodnocena restriční analýzou a hybridizací se značenými sondami pro geny rezistence k antibiotikům a gen *taxC*. Primární struktura vybraných IncX plazmidů byla stanovena pomocí 454 sekvenování (GS Junior, Roche). Anotace sekvencí IncX plazmidů byla provedena pomocí bioinformatických databází a nástrojů (GenBank, Geneious, RAST, IS Finder).

Výsledky

Alespoň jedna podskupina IncX1-X4 byla prokázána u 190 izolátů čeledi *Enterobacteriaceae* (10,6 %, n=1800) rezistentních k cefotaximu nebo se sníženou citlivostí k ciprofloxacinu pocházejících z různých geografických oblastí i zdrojů. Nejčastěji byly detekovány podskupiny IncX1 (107 izolátů) a IncX2 (47 izolátů). Podskupina IncX4 byla detekována u 28 izolátů, podskupina IncX3 u 17 izolátů. Celkem bylo získáno 46 transformantů (TF) nebo transkonjugantů (TC) nesoucích pouze jeden IncX1 plazmid, 22 TF/TC nesoucích pouze jeden IncX2 plazmid, 5 TF/TC nesoucích pouze jeden IncX3 plazmid z izolátů s unikátním makrorestričním profilem. IncX4 plazmidy byly přeneseny do recipientních kmenů společně s dalšími plazmidy, proto nebyly dále charakterizovány.

IncX1 plazmidy nesly nejčastěji gen rezistence k chinolonům *qnrS1*, který byl detekován na 44 (96 %, n=46) IncX1 plazmidech. Pomocí restriční analýzy a hybridizace se specificky značenými sondami bylo identifikováno 37 identických nebo příbuzných IncX1 plazmidů (35–50 kb) nesoucí gen *qnrS1* a *bla*_{TEM-1/-1-like}. Tyto plazmidy pocházely z izolátů z volně žijících zvířat, zvířat chovaných v zoologických zahradách, domestikovaných zvířat a prostředí včetně odpadních vod z České republiky, Polska a Austrálie. Sekvence náhodně vybraného zástupce této linie plazmidů pocházejícího z *E. coli* z havrana polního (Česká republika) poukázala 99% identitu nukleotidové sekvence s IncX1 plazmidem začleněným do IncHI1 plazmidu pEQ2 (GenBank KF362122.2).

IncX2 plazmidy byly nejčastěji spojeny s geny rezistence k chinolonům, konkrétně *qnrS1* (19 plazmidů), *qnrS2* (1) a *qnrB* (1). Nejčastěji detekovaná linie IncX2 plazmidu (35–40 kb) s geny *qnrS1* a *tetA(A)* byla nalezena u 9 izolátů *E. coli* pocházejících z kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) z České republiky a havrana polního (*Corvus frugilegus*) z Polska. Sekvence náhodně vybraného zástupce této linie plazmidů pocházejícího z *E. coli* z kachny divoké (Česká republika) poukázala na 99% identitu nukleotidové sekvence s IncX2 plazmidem pEBG1 (GenBank KF738053.1).

Pět IncX3 plazmidů pocházelo z nepříbuzných izolátů *E. coli* a *E. cloacae* z racků, havrana polního, člověka a odpadních vod z České republiky a Německa. Tyto plazmidy byly variabilní z hlediska velikosti (40-80 kb) a genů rezistence (*bla*_{SHV-12}, *bla*_{NDM-4}, *bla*_{TEM-1}, *qnrS1* a *qnrB*).

Závěry

IncX plazmidy byly široce rozšířené u enterobakterií izolovaných z volně žijících zvířat a prostředí včetně odpadních vod, což může poukazovat na jejich možný zdroj. IncX plazmidy byly nejčastěji spojeny s geny rezistence k chinolonům, především *qnrS1*. Identické nebo příbuzné IncX1 a IncX2 plazmidy byly detekovány u izolátů s unikátním makrorestrikčním profilem pocházejících z různých zdrojů a země původu. Tyto výsledky ukazují na široké rozšíření určitých linií IncX plazmidů u enterobakterií. Vyšší variabilita IncX2 a IncX3 plazmidů poukazuje na evoluční změny, kterými tyto molekuly prochází. Studium diverzity IncX4 a IncX5 plazmidů by mohlo být námětem dalších studií.

Poděkování

Vznik této studie byl finančně podpořen projektem IGA VFU Brno (13/2014/FVHE).

Použitá literatura

¹HAWKEY, Peter M. a JONES, Annie M. The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009, **64**(Supplement 1), i3-i10. ISSN 1460-2091.

²LIVERMORE, David M. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012, **27**(2), s. 128-142. ISSN 1226-3303.

³JOHNSON, Timothy J., BIELAK, Eliza M., FORTINI, Daniela, HANSEN, Lars Hestbjerg, HASMAN, Henrik, DEBROY, Chitrita, NOLAN, Lisa K. a CARATTOLI, Alessandra. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. 2012, **68**(1), s. 43-50. ISSN 0147-619X.

⁴CHEN, Liang, CHAVDA, Kalyan D., FRAIMOW, Henry S., MEDIIVILLA, José R., MELANO, Roberto G., JACOBS, Michael R., BONOMO, Robert A. a KREISWIRTH, Barry N. Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4}- and *bla*_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012, **57**(1), s. 269-276. ISSN 0066-4804.

Skrytá hrozba želvích klišťat? Virus krymsko-konžské hemoragické horečky 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

Virus krymsko-konžské hemoragické horůčky (ďalej len CCHFV – Crimean-Congo haemorrhagic fever virus) patrí do rodu Nairovirus (čel'ad' Bunyaviridae). Vírus bol izolovaný z mnohých stavovcov a najmenej z 31 druhov klišťov. Hlavným vektorom vírusu sú klišťe rodu *Hyalomma*. Cieľom práce bolo zistiť prítomnosť a prevalenciu CCHFV na lokalitách v Turecku, Gruzínsku, Iráne a Severnej Afrike. Okrem vírusu CCHF sme diagnostikovali aj prítomnosť baktérií *Anaplasma phagocytophilum* a *Coxiella burnetii*.

Materiál a metodika

Vzorky klišťov (izolácia RNA a DNA)

Analyzovali sme 485 jedincov *H. aegyptium* z 30 lokalít (Turecko, Sýria, Irán, Gruzínsko, Maroko, Alžírsko). RNA bola izolovaná z polovic pozdĺžne delených klišťov kitom RNeasy MiniKit – Qiagen (Germany). DNA (na diagnostiku *A. phagocytophilum* a *C. burnetii*) bola izolovaná z rovnakých jedincov (druhá polovica klišťov) kitom NucleoSpin Tissue - Macherey-Nagel (Germany). Izolovaná RNA a DNA bola uchovávaná pri teplote -20°C.

Primery

K diagnostike CCHFV sme testovali niekoľko sád primerov z publikovaných prác: S-segment (Schwartz *et al.* 1996): F2; F3; R2; R3. M-segment (Chinakar *et al.* 2004): P5; P3. S, M, L-segment (Deyde *et al.* 2006): CCHF-SF; CCHF-SR; CCHF-MF; CCHF-MR; CCHF-L1F; CCHF-L1R; CCHF-L2F; CCHF-L2R. Na diagnostiku *Anaplasma phagocytophilum* sme použili primery ge3a; ge10r; g9f a g2 kt. amplifikujú fragment 16S rDNA podľa Majláthovej *et al.* (2011)

Na diagnostiku *Coxiella burnetii* sme použili C.B.1 a C.B.2 primery (Syridaki *et al.* 1998)

RT-PCR a PCR

Pri RT-PCR sme použili reverznú transkriptázu: M-MLV reverznú transkriptázu (Top-Bio, CZ). Ako pozitívnu kontrolu sme použili najprv pozitívne vzorky z pilotnej štúdie (Široký *et al.* 2014),

ktoré ale vykazovali známky degradácie RNA. Neskôr nám pozitívnu kontrolu vo forme cDNA poskytla prof. Anna Papa (Aristotelova Univerzita, Thessaloniki).

CCHFV: Program u nested PCR S-segmentu prebiehal podľa Schwarz *et al.* (1996) s modifikáciou anneal. teploty. Ďalšie fragmenty boli amplifikované programami podľa programov autorov. Objemy reakcií boli 25 μ l: 12,5 μ l PPP Combi MasterMix (Top-Bio, CZ), 1 μ l RT, 0,875 μ l z každého primeru a 7,75 μ l PCR-H₂O, ku každej reakcii sa pridali 2 μ l RNA.

Anaplasma a *Coxiella*: amplifikáciu 16S rDNA fragmentu u *A. phagocytophilum* bola použitá nested PCR o celkovom objeme 25 μ l: 12,5 μ l Combi PPP MAsterMix (Top-Bio, CZ); 1 μ l každého primeru; 8,5 μ l PCR-H₂O a 2 μ l 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 fragmentu superoxid-dismutázy u *C. burnetii* sme použili celkový objem 25 μ l: 12,5 μ l Combi PPP MAsterMix (Top-Bio, CZ); 8,5 μ l PCR-H₂O; 0,5 μ l z každého primeru a 3 μ l DNA s nasledovným PCR programom: 94°C – 5min; 40x(94°C – 45s; 50°C – 30s; 72°C – 1min); 72°C – 10min.

Diagnostika a sekvenovanie

Diagnostika CCHFV, *C. burnetii* a *A. phagocytophilum* prebiehala porovnaním dĺžky amplif. fragmentov na 1,5% agarózovom gély s pozitívnu 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

CCHFV: zo všetkých vyššie uvedených metodík na diagnostiku CCHFV sa nám podarilo opakovane amplifikovať iba S-segment (Schwarz 1996). Okrem pozitívnej kontroly sa nám zatiaľ nepodarilo osekvenovať (zlá kvalita amplikónov aj výsledných sekvencií) pozitívnu vzorku CCHFV, a teda diagnostika je zatiaľ založená na porovnaní dĺžky amplikónov s pozitívnu kontrolou a veľkostným štandardom. Výsledky sú uvedené v Tab. 1.

C. burnetii a *A. phagocytophilum*: vzorky boli rovnako diagnostikované porovnávaním dĺžky amplifikovaných fragmentov s pozitívnu kontrolou a veľkostným štandardom. Vybrané vzorky boli osekvenované a pozitívne určené porovnaním s databázou NCBI GenBank metódou BLAST. Výsledky sú uvedené v Tab. 1. Pozitívnych vz. Na *C. burnetii* bolo viac ako 70%, preto budú podrobené opakovanej analýze.

Tab. 1.

krajina	n RNA	n poz. CCHFV	n dub. vzorky	n DNA	n poz.vz. <i>Anaplasma</i>
Turecko	112	10	2	112	2
Sýria	16	-	-	16	0
Irán	146	4	5	146	2
Gruzínsko	61	0	0	61	6
Alžírsko	74	0	0	74	0
Maroko	74	0	0	-	-
spolu	483	14	7	409	10

Pod'akovanie: Práca vznikla za finančnej podpory IGA15/2014/FVHE

Zoznam literatúry:

CHINIKAR, S., S-M. PERSSON, M. JOHANSSON, L. BLATH, M. GOYA, B. HOUSHMAND, A. MIRAZIMI, A. PLYUSNIN, A. LUNKVIST a M. NILSSON. Genetic analysis of crimean-congo haemorrhagic fever virus in Iran. *Journal of Medical Virology*. 2004, č. 73, s. 404-401.

DEYDE, V. M., M. L. KHRISTOVA, P. E. ROLLIN, T. G. KSIAZEK a S. T. NICHOL. Crimean-congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *Journal of Virology*. 2006, vol. 80, issue 17, s. 8834-8842. DOI: 10.1128/JVI.00752-06.

MAJLÁTHOVÁ, V., Igor M., 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, s. 1447-1451.

SCHWARZ, T. F., H. NSANZE, M. LONGSON, H. NITSCHKO, S. GILCH, H. SHURIE, A. AMEEN, A. R. M. ZAHIR, U. G. ACHARYA a G. JAGER. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of crimean-congo haemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. *J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 55(2), s. 190-196.

SPYRIDAKI, I., A. GIKAS, D. KOFTERIDIS, A. PSAROULAKI a Y. TSELENTIS. Q Fever in the Greek Island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, vol. 36, č. 7, s. 2063-2067.

ŠIROKÝ, P., T. BĚLOHLÁVEK, I. PAPOUŠEK, D. JANDZÍK, P. MIKULÍČEK, M. KUBELOVÁ a 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, vol. 7, issue 1, s. 101-. DOI: 10.1186/1756-3305-7-101.

***Escherichia coli* ST131: molekulárně-biologické srovnání epidemiologicky významného, multirezistentního klonu z různých zdrojů**

Ivana Jamborová¹, Pavla Julínková¹, Monika Dolejská^{1,2}, 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

Úvod

Escherichia coli sekvenční typ 131 (ST131) je v současnosti jednou z nejvýznamnějších bakteriálních klonálních linií značného klinického významu, podílející se na globálním šíření širokospektré beta-laktamázy (ESBL) CTX-M-15. Tento klon je charakteristický vysokou virulencí a přítomností celé řady plazmidově přenášených genů antibiotické rezistence. Právě kombinace vysoké virulence a schopnosti nést mobilní genetické elementy významně přispívá k selekčnímu úspěchu a pandemickému rozšíření tohoto klonu po celém světě.¹ *E. coli* ST131 je spojována se vznikem nozokomiálních infekcí u lidí, zahrnující zejména infekce močových cest, bakteriémie a neonatální sepse. V posledních letech je však stále častěji dokumentována u domácích, hospodářských a volně žijících zvířat i v potravinách.² Objev této významné multirezistentní bakterie v jídle, vodě, prostředí a nehumánních zdrojích poukazuje na zcela neprobádanou komplexnost cest přenosu, kde synantropní migrující ptáci a čistírny odpadních vod mohou sehrávat významnou roli v cirkulaci a distribuci těchto klonů mezi různými geografickými oblastmi a ekologickými nikami.³ Podstatou této studie byla komparativní analýza fenotypových, genotypových a klonálních charakteristik 168 kmenů *E. coli* ST131 izolovaných z různých zdrojů: volně žijící zvířata (n=19), odpadní vody (19), komunitní i nozokomiální izoláty (130), ve snaze zjistit, zda volně žijící zvířata sdílejí identické kmene humánního původu a tím dokumentovat šíření klonu ST131 do volné přírody.

Materiál a metodika

Analyzován byl soubor 168 izolátů *E. coli* ST131 identifikovaných v rámci různých studií a uložených ve sbírce kmenů Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat. Izoláty byly testovány pomocí PCR na přítomnost subklonů *H30* a *H30Rx*,⁴ genů kódujících rezistenci k beta-laktamům (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV})⁵ a chinolonům (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB*),⁵ 52 genů virulence (*pap*, *papA*, *papC*, *papEF*, *papG*, *allele I*, *allele I'*, *allele II*, *allele III*, *sfa/foc*, *sfaS*, *focG*, *afa/draBC*, *afaE8*, *iha*, *bmaE*, *gafD*, *f17*, *clpG*, *fimH*, *hra*, *hlyD*, *cnf1*, *cdtB*, *sat*, *astA*, *hlyF*, *pic*, *tsh*, *vat*, *fyuA*, *iutA*, *iroN*, *ireA*, *kpsM II*, *kpsMT K1*, *kpsM K2*, *kpsMT III*,

kfiC, *kpsM*, *rfc*, *cvaC*, *iss*, *traT*, *ompT*, *ibeA*, *H7 fliC*, *usp*, *malX*, *uidA*, *clbB*, *clbN*),^{1,4} integronů⁵ a replikonů⁵. Zařazení do klonální linie ST131 bylo ověřeno u vybraných zástupců metodou multi-locus sequence typing (MLST). Geny kódující beta-laktamázy a geny pro rezistenci k chinolonům byly následně sekvenovány pro zjištění konkrétní varianty genu. Integrony byly analyzovány metodikou polymorfismu délky reskričních fragmentů (RFLP). Citlivost k 32 antimikrobiálním látkám byla stanovena kombinací diskové difuzní metody a mikrodiluční metody.⁵ Příbuznost izolátů byla určena na základě Xbal pulzní gelové elektroforézy (PFGE),⁵ a jednotlivé makrorestrikční profily byly analyzovány pomocí BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gent, Belgie) a na základě získaných dat byl kalkulován dendrogram.

Výsledky

Komparovaný soubor zahrnoval 151 ESBL-pozitivních a 17 ESBL-negativní kmenů *E. coli* ST131. Většina (99%) kmenů byla multirezistentní (rezistence ke třem a více látkám) a to především k antimikrobiální látkám chinolonové povahy, cefalosporinům, aminoglykosidům, makrolidům a tetracyklinům. Majorita izolátů nesla gen *bla*_{CTX-M-15} (n=106, 70%) či *bla*_{CTX-M-27} (42, 28%) kódující ESBL fenotyp a další geny rezistence charakteristické pro tento pandemický klon (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *aac(6')-Ib*). Sto deset (65 %) izolátů patřilo mezi velmi rychle se rozšiřující subklon *H30-Rx*, který se vyznačuje vysokou mírou rezistence.⁵ Většina zástupců tohoto subklonu (93%) nesla gen *bla*_{CTX-M-15}. Zbývajících 58 (35%) izolátů náleželo k subklonu *H30R* a neslo převážně gen *bla*_{CTX-M-27} (42, 72%). Totožný profil jedenácti faktorů virulence (*afa/dra*, *iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsII*, *traT*, *usp*, *ompT*, *malX*) byl nalezen u 74 (45%) kmenů *E. coli* ST131, z nichž naprostá většina nesla gen *bla*_{CTX-M-15} (72, 97%) a náležela k subklonu *H30-Rx*. Druhý nejčastější virulentní profil (*iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsII*, *kii*, *kpsM II-K5*, *traT*, *usp*, *ompT*, *malX*) byl identifikován u *H30R* subklonu (35, 80%) s produkcí CTX-M-27. Většina izolátů (98%) nesla FIA replikon, často v kombinaci s FIB replikonem (31%) a 125 (77%) izolátů neslo integron třídy 1 o velikosti variabilní oblasti 1.7 kb a genovými kazetami *dhfr17* a *aadA5*. Pomocí PFGE byly identifikovány kmeny se stejnými pulzními profily původem od člověka, odpadních vod a volně žijících zvířat. Kromě identického makrorestrikčního profilu řada izolátů sdílela další výše uvedené fenotypové a genotypové charakteristiky, podporující hypotézu šíření kmenů humánního původu do prostředí. Námi identifikované kmeny z volně žijících zvířat a odpadních vod byly shodné s celosvětově rozšířenými nozokomiálními pulzotypy 968 a 812.

Závěr

Naše studie prokázala, že vysoký podíl *E. coli* ST131 izolovaných z lidí, odpadních vod a volně žijících zvířat, vykazuje společné genetické vlastnosti, poukazující na možnost šíření tohoto pandemického klonu mezi různými prostředími, včetně volně žijících živočichů. Z klonálních charakteristik izolátů vyplývá, že volně žijící zvířata a prostředí sdílejí identické kmeny spolu s lidmi a mohou tak přispívat ke globálnímu šíření tohoto klonu. Vzhledem k tomu, že rozšíření této klonální linie má zásadní dopad na lidské zdraví, zamezení jejího šíření do prostředí a eliminace rezervoárů by mělo být prioritou v oblasti veřejného zdraví.

Tato práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno č. 12/2014/FVHE.

Seznam literatury:

- 1) JOHNSON, J. R., B. JOHNSTON, C. CLABOTS, M. A. KUSKOWSKI a M. CASTANHEIRA. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. 2010, vol. 51, issue 3, s. 286-294.
- 2) PLATELL, J. L., J. R. JOHNSON, R. N. COBBOLD a D. J. TROTT. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods. *Veterinary Microbiology*. 2011, vol. 153, 1-2, s. 99-108.
- 3) WOODFORD, N., J. F. TURTON a D. M. LIVERMORE. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 2011, vol. 35, issue 5, s. 736-755.
- 4) PRICE, L. B., J. R. JOHNSON, M. AZIZ, C. CLABOTS, B. JOHNSTON, V. TCHESNOKOVA, L. NORDSTROM, M. BILLIG, S. CHATTOPADHYAY, M. STEGGER, P. S. ANDERSEN, T. PEARSON, K. RIDDELL, P. ROGERS, D. SCHOLE, B. KAHL, P. KEIM a E. V. SOKURENKO. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *MBio*. 2013, vol. 4, issue 6, e00377-13-e00377-13.
- 5) 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, vol. 85, issue 3, s. 604-611.

Využití metody RT-PCR při vyhodnocení vlivu vybraných léčiv na genovou expresi u dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Radka Dobšíková, Marta Bartošková, Vlasta Stancová, Gabriela Želinská

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

Úvod

Primárním zdrojem kontaminace vodního prostředí léčiv a jejich metabolity jsou lidé a zvířata, resp. nemocnice a subjekty chovající zvířata, zvláště intenzivní velkochovy. Léčiva jsou prostřednictvím splaškových vod transportována do čistíren odpadních vod, kde mnoho z nich není z důvodu své stability degradováno a dostává se do vod povrchových (1). Rezidua farmakologicky aktivních látek mohou významně ovlivňovat fyziologické funkce ryb a dalších vodních živočichů. Při zjišťování míry exprese specifických cílových genů u ryb vystavených působení léčiv je využívána metoda kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR), umožňující přímou kvantifikaci exprese genů v reálném čase (2).

Cílem práce bylo sledovat vliv dvou léčivých látek, kyseliny acetylsalicylové, která patří do skupiny nesteroidních antiflogistik, a fluorochinolonového chemoterapeutika ciprofloxacinu, na expresi vybraných genů zájmu (CYP1A a CYP3C4) u dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Míra exprese je v práci vyjádřena jako hodnota tzv. relativní exprese, tj. exprese sledovaného genu zájmu vůči expresi tzv. housekeepingového genu, tj. genu, u něhož je experimentálně prokázáno, že za různých podmínek prostředí vykazuje stabilní míru exprese. V naší studii byl jako housekeepingový gen využit gen pro beta1 actin (actb1).

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

Při realizaci projektu byly použity vzorky hepatopankreatu dánia pruhovaného (*Danio rerio*), exponovaného testovaným léčivům, a vzorky získané od kontrolních ryb. Testované ryby byly v souladu s metodikou OECD 215 (Fish, Juvenile Growth Test) po dobu 28 dnů vystaveny působení různých koncentrací léčiv ve vodě. Testované koncentrace kyseliny acetylsalicylové byly 0,004 mg/l (environmentální koncentrace), 0,40 mg/l, 40 mg/l a 120 mg/l. Pro ciprofloxacin byly testovány následující koncentrace, a to 0,70 µg/l (environmentální koncentrace), 100 µg/l, 650 µg/l a 1100 µg/l. Testy byly provedeny v průtočném systému 30l akvárií s obměnou vody 1krát za 12 hodin. Na konci testu byly ryby usmrceny a z ryb určených pro qRT-PCR byl okamžitě po usmrcení odebrán a zamražen vzorek hepatopankreatu.

Izolace mRNA a reverzní transkripce na cDNA

Vzorky o průměrné hmotnosti 5 mg byly před vlastní instrumentální analýzou individuálně zhomogenizovány v komerčním pufru (Lysis/Binding Solution, Applied Biosystems), vzniklém smícháním podílu Lysis Binding Solution Concentrate a β -merkaptoetanolu. Homogenáty byly následně převedeny do 96jamkové destičky a po přidání 60 μ l 100% isopropanolu použity pro instrumentální izolaci mRNA na přístroji MagMax s využitím komerčního izolačního kitu MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems). Vzorky izolované mRNA byly následně reverzní transkripcí převedeny na cDNA, a to s využitím komerčního setu High Capacity RNA-to-cDNA Kit od firmy Applied Biosystems, a to za následujících podmínek: 37°C/60 min. (reverzní transkripce), 95°C/5 min. (denaturace enzymu transkriptázy) a 4°C/10 min. (zchlazení produktu).

Použité primery

Ve studii byly využity jako geny zájmu (GOI, „gen of interest“) geny pro CYP1A a CYP3C4. Jako housekeepingový gen byl využit gen pro beta1 actin (actb1). Všechny testované primery byly dodány ve formě komerčních kitů od firmy Applied Biosystems.

Polymerázová řetězová reakce

Vlastní qRT-PCR byla provedena za následujících podmínek: počáteční denaturace při 94°C/7:40 min., 40 cyklů hybridizace (dosednutí) primeru, tzv. annealingu při 62°C/25 sek. a následná elongace 72°C/25 sek. se závěrečnou denaturací dsDNA při 95°C/30 sek.

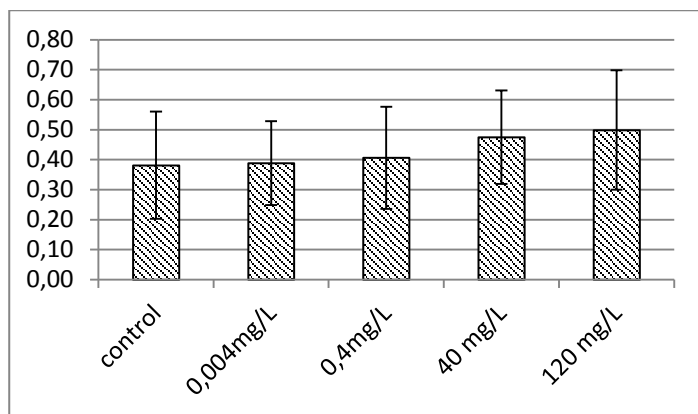
Analýza výsledků

Cílem práce bylo vyhodnotit míru exprese vybraných genů zájmu, tj. CYP1A a CYP3C4. Výsledky jsou vyjádřeny jako tzv. relativní inhibice/stimulace exprese, kdy jsou hodnoty exprese genů zájmu vztaženy v poměru k hodnotám exprese genu housekeepingového, v našem případě genu pro beta1 actin, actb1. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny programem Unistat 5.6 (Unistat Ltd., GB) s využitím Tukey testu. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti $P < 0.05$.

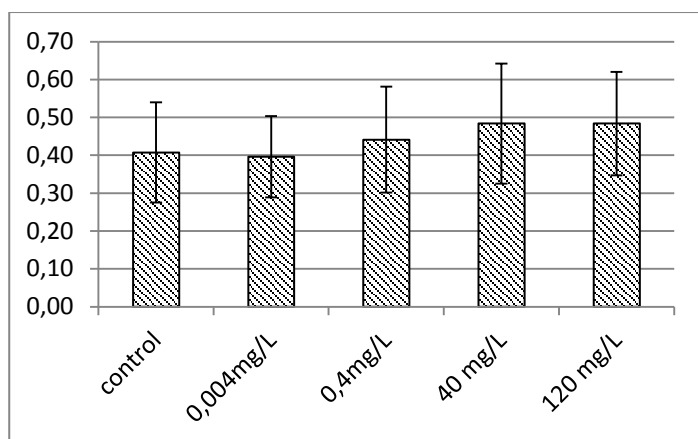
Výsledky

Výsledky relativní exprese genů zájmu (CYP1A a CYP3C4) z qRT-PCR analýzy vzorků hepatopankreatu dánia pruhovaného (*Danio rerio*) exponovaného ciprofloxacinem jsou uvedeny v grafu 1 (CYP1A) a grafu 2 (CYP3C4). Výsledky pro kyselinu acetylsalicylovou jsou momentálně zpracovávány.

Graf 1. Relativní exprese CYP1A u dánia pruhovaného vystaveného účinku ciprofloxacinu



Graf 2. Relativní exprese CYP3C4 u dánía pruhovaného vystaveného účinku ciprofloxacinu



Závěr

Ve studii byla sledována míra exprese genů pro cytochromy CYP1A a CYP3C4, vyjádřena jako tzv. relativní exprese (v porovnání s mírou exprese housekeepingového genu, tj. genu pro beta 1 actin, actb1). Sledovanými geny zájmu byly geny pro vybrané cytochromy, které jsou součástí tzv. cytochromoxidázového systému hladkého endoplazmatického retikula buněk, podílejícího se na první fázi detoxikace xenobiotik v organismu (3). Z grafů relativní exprese genů vyplývá, že u obou genů došlo ke statisticky nevýznamnému ($P > 0.05$) zvýšení jejich exprese v porovnání s kontrolou.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 3/2014/FVHE

Seznam literatury:

1. Kotyza J., Soudek P., Kafka Z., Vaněk T. (2009). Léčiva – „nový“ environmentální polutant. Chem Listy. 103: 540-547.
2. Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžicková V., Koptíková J. (2005). Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 188 s. ISBN: 80-210-3841-1.
3. Shaya L., Dejong C., Wilson J.Y. (2014). Expression patterns of cytochrome P4503B and 3C genes in model fish species. Comp Biochem Physiol C. 166: 115-125.

Distribuce a biodiverzita babesií v klíštěti obecném (*Ixodes ricinus*) na jižní Moravě

Markéta Rybářová, Pavel Široký

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

Úvod

Babesie jsou protozoární krevní parazité obratlovců patřící do řádu Piroplasem. Jejich životní cyklus částečně probíhá v erythrocytech hostitele. Jsou přenášeny klíšťaty, která jsou zároveň jejich definitivními hostiteli, probíhá v nich sexuální rozmnožování parazita. Babesie mají vysokou hostitelskou specifitu na úrovni vektora. Jako první byla babesióza popsána u skotu (Uilenberg 2006). Jedná se o hemolytické onemocnění, které bez včasné a adekvátní terapie může končit fatálně. Vyskytuje se u přežvýkavců, šelem a v neposlední řadě má i zoonotický potenciál.

Humánní babesióza v Evropě je způsobována druhy *B. divergens*, *B. microti* a nedávno popsaným druhem *B. venatorum*. Všechny tyto druhy jsou přenášeny klíštětem obecným (*I. ricinus*) (Yabsley a Shock 2013). Na území České republiky byla doposud zdokumentovaná přítomnost pouze *B. microti* (Rudolf et al. 2005). Současným veterinárním tématem je psí babesióza. Tu ve střední Evropě způsobuje *B. canis*, kterou přenáší piják lužní (*Dermacentor reticulatus*). I přes přítomnost tohoto vektora dosud není zdokumentován žádný případ autochtonní infekce na území České republiky.

Cílem naší práce bylo zmapovat výskyt piroplasem v klíšťatech obecných na území jižní Moravy. Vzhledem k navýšení finančních prostředků jsme rozšířili sledovanou oblast i na západ Slovenska, čímž jsme pokryli celé území geomorfologického celku Dolnomoravský úval. Pro doplnění celkového obrazu jsme vyšetřili i klíšťata *Haemaphysalis concinna* z těchto oblastí. Třetím významným druhem, který se v této oblasti vyskytuje je *D. reticulatus*, tato klíšťata byla vyšetřena řešitelkou v roce 2013 v rámci diplomové práce.

Materiál a metodika

Vyšetřeno bylo celkem 1458 klíšťat *I. ricinus* a 87 klíšťat *H. concinna*. Tato klíšťata byla sbírána vlnáčením na jižní Moravě a západním Slovensku v letech 2009-2011 a následně uchovávána v 96% ethanolu v mrazících boxech.

DNA z českých klíšťat byla izolována alkalickou hydrolýzou (Rijpkema et al. 1996). Následně jsme zavedli modifikovanou metodu dle Chomczynskiho (1993), která je založena na použití fenolu a

guanidin thiokyanátu. DNA izoláty byly uchovávány při -20 °C až do zpracování. PCR diagnostika proběhla nested metodou dle Jefferies a kol. (2007), která amplifikuje cca 750 bp dlouhý úsek genu 18S rRNA. Pro snížení specifity jsme zde snížili annealingovou teplotu na 55 °C. U pozitivních vzorků proběhla i druhá PCR reakce pro amplifikaci 550 bp dlouhé části genu pro COX3 metodou dle Tian a kol. (2013). Analýzy jsme doplnili o amplifikaci 550 bp dlouhého úseku genu pro COB (Tian et al. 2013b). Získané produkty jsme po přečištění komerčním kitem nechali osekvenovat (Macrogen, Nizozemí). Zpracování sekvencí probíhalo v programu MEGA5 (Tamura et al. 2011).

Výsledky

Část 18S podjednotky specifické pro piroplazmy jsme amplifikovali u 22 klíšťat *I. ricinus* a u 6 klíšťat *H. concinna* z celkem 14 lokalit. Zjištěná prevalence dosahuje hodnoty 1,5 % u *I. ricinus* a 7 % u *H. concinna*.

Analýza sekvencí ukázala, že dva ze získaných izolátů patří k druhu *B. venatorum* a ostatní jsou geneticky blízké *B. canis*. Amplifikace genu pro COX3 proběhla pouze u dvou vzorků, stejně jako amplifikace genu pro COB. U jednoho vzorku se nám podařilo získat sekvence 18S, COX3 i COB. Sekvence byly vloženy do databáze GenBank.

Závěr

Přestože naše studie neprokázala přítomnost *B. microti* na území jižní Moravy, zdokumentovali jsme zde přítomnost jiného druhu se zoonotickým potenciálem. Nález *B. venatorum* by neměl být podceňen, bylo by vhodné tyto analýzy rozšířit na celé území České republiky pro zjištění současné situace. Překvapivý byl i nález parazita blízkého *B. canis* v klíštěti obecném. Nicméně pro *B. canis* je specifickým vektorem piják lužní *D. reticulatus*. Protože na území České republiky zatím nebyl hlášen případ autochtonní psí babesiózy, můžeme předpokládat, že se jedná o odlišný velice blízký druh nepatogenní pro psy.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 11/2014/FVHE

Reference

JEFFERIES, R., U. M. RYAN a P. J. IRWIN, 2007. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology* [online]. 15.3., roč. 144, č. 1–2, s. 20–27. ISSN 0304-4017.

CHOMCZYNSKI, 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*. 9., roč. 15, č. 3, s. 532–4, 536–7. ISSN 0736-6205.

RIJPKEMA, S., D. GOLUBIĆ, M. MOLKENBOER, N. VERBEEK-DE KRUIF a J. SCHELLEKENS, 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental & Applied Acarology*. 1., roč. 20, č. 1, s. 23–30. ISSN 0168-8162.

RUDOLF, Ivo, Maryna GOLOVCHENKO, Silvie SIKUTOVÁ, Nataliia RUDENKO, Libor GRUBHOFFER a Zdenek HUBÁLEK, 2005. *Babesia microti* (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic. *Folia Parasitologica*. 9., roč. 52, č. 3, s. 274–276. ISSN 0015-5683.

TAMURA, Koichiro, Daniel PETERSON, Nicholas PETERSON, Glen STECHER, Masatoshi NEI a Sudhir KUMAR, 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 10., roč. 28, č. 10, s. 2731–2739. ISSN 1537-1719.

TIAN, Zhancheng, Guangyuan LIU, Hong YIN, Jianxun LUO, Guiquan GUAN, Junren XIE, Jin LUO, Jinfeng ZHENG, Meiyuan TIAN, Xiaosong YUAN, Fangfang WANG, Ronggui CHEN a Haijun WANG, 2013a. Cytochrome c oxidase subunit III (COX3) gene, an informative marker for phylogenetic analysis and differentiation of *Babesia* species in China. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 8., roč. 18, s. 13–17. ISSN 1567-1348.

TIAN, Zhancheng, Jin LUO, Jinfeng ZHENG, Junren XIE, Hui SHEN, Hong YIN, Jianxun LUO, Meiyuan TIAN, Xiaosong YUAN, Fangfang WANG a Guangyuan LIU, 2013b. Phylogenetic analysis of *Babesia* species in China based on cytochrome b (COB) gene. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 1., roč. 13, s. 36–40. ISSN 1567-1348. UILENBERG, Gerrit, 2006. *Babesia*--a historical overview. *Veterinary Parasitology* [online]. 31.5., roč. 138, č. 1-2, s. 3–10. ISSN 0304-4017.

YABSLEY, Michael J. a Barbara C. SHOCK, 2013. Natural history of Zoonotic *Babesia*: Role of wildlife reservoirs. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* [online]. 12., roč. 2, s. 18–31 [vid. 18. listopad 2014]. ISSN 2213-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijppaw.2012.11.003

Biodiverzita a fylogenetické vztahy krevních parazitů u sladkovodních želv jihovýchodní a východní Asie

Nela Dvořáková, Pavel Široký

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

Úvod

Zástupci rodu *Haemogregarina* Danilewsky, 1885 jsou heteroxenní intracelulární parazité, jimiž ve volné přírodě bývají často infikovány vodní želvy (Mihalca, 2002; Telford *et al.* 2009; Davis and Sterrett, 2011; Hossen *et al.* 2013). Jejich vývojový cyklus zahrnuje gamogonii a sporogonii probíhající v pijavkách a erytrocytární a exoerytrocytární merogonii v želvím hostiteli (Desser, 1993; Siddall, 1995). Haemogregariny byly dříve považovány za vysoce hostitelsky specifické, a proto každý parazit z nového hostitele vedl k popisu nového druhu. Z jižní a východní Asie existuje mnoho záznamů o těchto parazitech popsanych z krve želv, ale většina z nich pochází z doby před více než 100 lety. Nicméně, doposud nejsou k dispozici žádná molekulární data pro haemogregariny z této oblasti.

V rámci naší studie jsme vyšetřili vzorky z pěti druhů vodních želv pocházející z jihovýchodní Asie na přítomnost druhů *Haemogregarina*, provedli jsme jejich morfologické srovnání, fylogenetickou analýzu a zhodnotili jejich hostitelskou specifitu s využitím dostupné literatury k revizi druhů *Haemogregarina* z Orientální zoogeografické oblasti.

Materiál a metodika

Odebrané vzorky, mikroskopie

Celkem jsme vyšetřili 21 krevních vzorků z 5 druhů želv (2 *Cuora galbinifrons*, 13 *Malayemys subtrijuga*, 2 *Platysternon megacephalum*, 1 *Sacalia quadriocellata* a 3 jedinců *Leucocephalon yuwonoi*) importovaných z Číny, Indonésie, Thajska a Vietnamu. Vyšetřované krevní nátěry byly fixovány absolutním metanolem a obarveny Giemsovým barvivem (ředění 1:10 v pufrované vodě, pH 7) po dobu 15 minut. Parazitologii jsme stanovili pod imerzí při zvětšení 1.000×. Několik kapek krve z každého vzorku bylo vždy fixováno v 96 % etanolu pro následnou molekulárně genetickou analýzu.

Izolace DNA, PCR metoda, analýza dat

Pro extrakci DNA z fixované krve byl použit NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Německo). Kvantifikace DNA probíhala spektrofotometricky pomocí přístroje Nanodrop ASP-3700

(ACTGene, USA) a poté skladována při -20°C . Specifické primery (Kvičarová *et al.* 2008) pro metodu seminested PCR amplifikovaly u pozitivních vzorků přibližně 1500bp dlouhý fragment 18S rDNA. Reakce probíhala v objemu 25 μl , množství složek reakční směsi a reakční podmínky byly převzaty z článku Dvořáková a kol. (2014). Amplikony byly vizualizovány elektroforeticky na 1,2% agarózovém gelu za použití Midori Green (Elisabeth PHARMACON, Česká republika). Pozitivní PCR produkty byly následně purifikovány pomocí Gel/PCR Fragments DNA Extraction kitu (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) a odeslány k sekvenaci DNA specializovanou laboratoří (Macrogen, Holandsko).

Získané sekvence byly identifikovány s použitím aplikace BLAST a upraveny pomocí souboru programů DNASTAR (DNASTAR Inc.). Alignment byl vytvořen pomocí programu BioEdit (Hall, 1999) v algoritmu Clustal W (Thompson *et al.* 1994). Pro fylogenetické analýzy byla vybrána Bayesiánská analýza (BI), metoda Maximum Likelihood (ML) a Maximum Parsimony (MP). BI proběhla v programu MrBayes 3.1.2. v nastaveném GTR modelu pro 10^7 generací (Ronquist & Huelsenbeck 2003). PHYML 2.4.4. (Guindon & Gascuel, 2003) byl použit k provedení ML analýzy v GTR modelu, bootstrap byl vypočten z 1000 opakování. Pro výpočet MP jsme použili program PAUP 4.0b10 (Swofford, 2001) s podporou bootstrap opět vypočtenou pro 1000 opakování.

Výsledky a Závěr

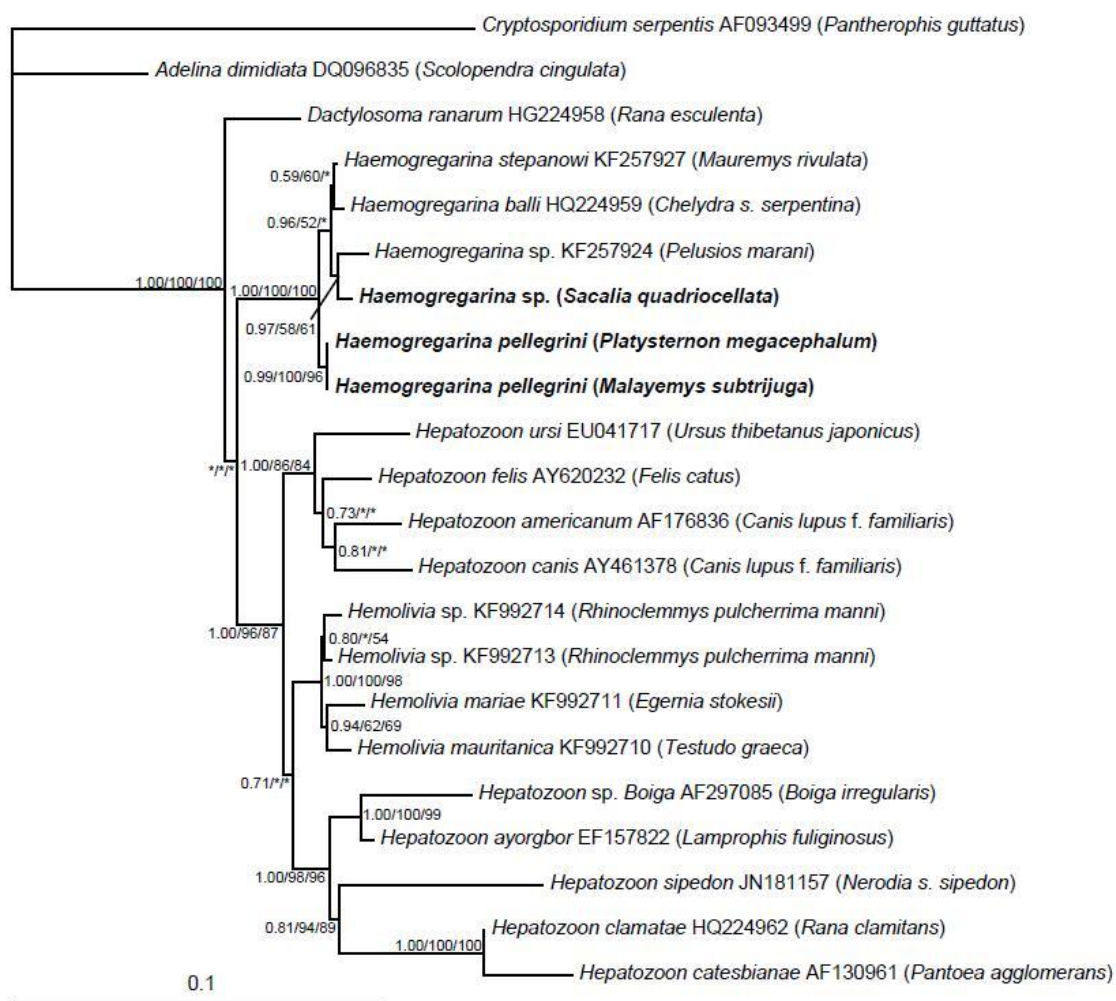
Krevními parazity bylo infikováno 6 (28.6%) z 21 studovaných želv (Tab. 1). Nejvyšší míra parazitémie - 4.58 % byla stanovena pro *S. quadriocellata*, následována 0.88 - 0.02 % v *M. subtrijuga* a 0.01 % pro *P. megacephalum*. Haemogregariny nalezené na krevních nátěrech 3 jedinců *M. subtrijuga* z Thajska, jednoho *M. subtrijuga* z Vietnamu a *P. megacephalum* z Číny byly identifikovány jako *Haemogregarina pellegrini* Laveran & Pettit 1910. *Haemogregarina* sp. nalezená na krevních nátěrech *S. quadriocellata* je dosud nepopsaným druhem.

Fylogenetické analýzy (BI, ML a MP) nabídky identickou topologii evolučních linií (Obr. 1). *Haemogregarina* sp. z *S. quadriocellata* reprezentuje sesterský druh k haemogregarině izolované z tereky maranovy (*Pelusios marani*) z Gabonu. *Haemogregarina pellegrini* byla diagnostikována v *M. subtrijuga* z Vietnamu a v *P. megacephalum* z Číny. Všechny izoláty byly geneticky identické a tvoří samostatnou větev monofyletického taxonu *Haemogregarina*.

Kromě záchytu nového druhu rodu *Haemogregarina* u vodní želvy jsme zaznamenali krevního parazita *Haemogregarina pellegrini* Laveran et Petit, 1910 po více než sto letech od jeho původního popisu. Studie také potvrdila nízkou hostitelskou specifitu parazitů rodu *Haemogregarina* vzhledem k jejich mezihostitelům - želvám.

Tabulka 1 Výsledky mikroskopického a PCR vyšetření

Druh	Počet odebraných jedinců	Počet pozitivních jedinců (<i>Haemogregarina</i> sp.)
<i>Cuora galbinifrons</i>	2	0
<i>Malayemys subtrijuga</i>	13	4
<i>Platysternon megacephalum</i>	2	1
<i>Sacalia quadriocellata</i>	1	1
<i>Leucocephalon yuwonoi</i>	3	0
Celkem	21	6



Obrázek 1. Fylogenetický strom znázorňující postavení detekovaných haemogregarin vytvořený na základě srovnání sekvencí 18S rDNA pomocí BI, ML a MP metody

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory IGA 6/2014/FVHE.

Seznam literatury:

Seznam použité literatury a citovaných zdrojů jsou k dispozici u autorů.

Epidemiologická príbuznosť klinicky významných enterokoků rezistentních k vankomycinu získaných z nemocnice, z čističky odpadních vod a z vodního ptactva

Veronika Oravcová¹, Martina Masaříková², Ivan Literák¹

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

Úvod

Enterokoky sú súčasťou bežnej črevnej mikroflóry, niektoré kmene však môžu byť dôležitými oportunitnými patogénmi, zodpovednými za vážne ochorenia ľudí a za nozokomiálne infekcie (Simjee et al., 2006). Vývoj a šírenie antibiotickej rezistencie u enterokokov sa stal významnou klinickou a epidemiologickou otázkou, pričom rezistencia k vankomycínu je považovaná za jednu z najzávažnejších rezistencií. Výskyt vankomycín-rezistentných enterokokov (VRE) je závažným problémom v nemocniciach v USA (Desphande et al., 2007), a nadobúda stále väčší význam aj v európskych nemocniciach. V Českej republike došlo v posledných rokoch k nárastu prevalencie VRE z 1,6% v roku 2001 na 11,5% v roku 2012 (EARSS, 2014). Ako závažný problém sa ukazuje aj výskyt VRE v čističkách odpadových vôd (ČOV), ktoré sú vďaka interakciám baktérií a priaznivým podmienkam prostredia ideálnym miestom pre vznik a šírenie rezistentných baktérií. Odpadové vody po prečistení sú vypúšťané do riek, a umožňujú tak šírenie rezistentných baktérií do životného prostredia.

Materiál a metodika

Počas projektu bolo odobraných 284 vzoriek kloakálnych výterov čajky smejivej (*Chroicocephalus ridibundus*) z vodnej nádrže Nové Mlýny, 81 vzoriek z infekčného oddelenia Fakultnej nemocnice v Brne (21 sterov z prostredia, 49 rektálnych výterov od pacientov a 11 od personálu) a 37 pravidelne (v týždňových intervaloch) odobraných vzoriek z čističky odpadových vôd v Brne Modřicích. Vzorky boli kultivované na Slanetz-Bartley agare s vankomycínom (32 mg/l), inkubované pri 37 °C 48 hodín. Suspektné kolónie boli druhovo identifikované pomocou MALDI-TOF MS a sekvenáciou *sodA* génu. U VRE bola otestovaná minimálna inhibičná koncentrácia vankomycínu a citlivosť k 14 rôznym antibiotikám. Pomocou PCR bol preukázaný výskyt génov rezistencie a virulencie. Na zistenie epidemiologickej príbuznosti izolátov bola použitá pulzná gélová elektroforéza a MLST (multilocus sequence typing) (Oravcova et al., 2014).

Výsledky

Kultivácia

VRE boli nájdené u 32 (86 %) vzoriek odpadovej vody, u 72 % hospitalizovaných pacientov a na rôznych miestach nemocničného prostredia (podlaha, posteľ, prenosné WC, kľučka na dverách, invalidné chodítko, vozík so zdravotníckym materiálom, ale aj izba po dezinfekcii), ošetrojúci personál však nebol kolonizovaný VRE. VRE neboli nájdené ani vo vzorkách z čajky smejivej. Na základe odberu morfoloogicky odlišných kolónií sme z odpadových vôd získali celkom 49 izolátov - *Enterococcus faecium* (44 izolátov), *E. gallinarum* (2), *E. casseliflavus* (2) a *E. raffinosus* (1). Izoláty z pacientov patrili k druhu *E. faecium* (34), *E. faecalis* (4) a *E. raffinosus* (2), a z nemocničného prostredia k *E. faecium* (3) a *E. faecalis* (3).

Antibiotická rezistencia a virulencia

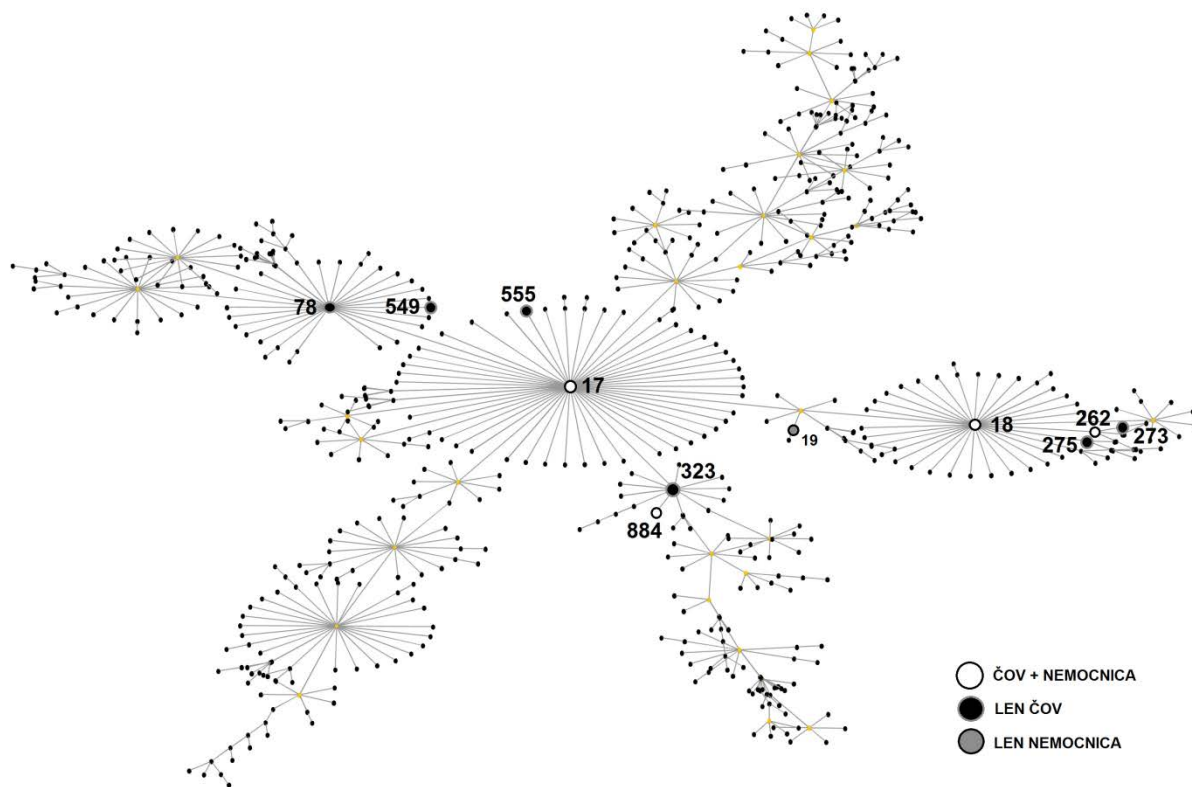
Všetky izoláty *E. faecium* boli multirezistentné s rezistenciou k päť a viac antibiotikám. Rezistencia k vankomycínu bola kodovaná génom *vanA*, k erytromycínu génom *ermB*, k tetracyklínu génmi *tet(M)* a/alebo *tet(L)* a ku gentamicínu génmi *aac(3)-IIIa* a/alebo *aac(6')-aph(2'')*. Celkom 35 izolátov z ČOV (71 %, n=49) nieslo gény virulencie *hyl* a/alebo *esp*. Zo 40 humánných izolátov sme detekovali gény virulencie u 35 (87%), u *E. faecium* sa jednalo o gény *esp* a *hyl*, u *E. faecalis* o *gelE*, *cylA* a *asa1*.

Epidemiologická príbuznosť

Na základe MLST analýzy boli izoláty *E. faecium* zaradené do sekvenčných typov (ST) z klinicky významných klonálnych komplexov **17** – ST17 (10 izolátov z ČOV + 4 z nemocnice), ST555 (2+0); **18** – ST18 (9+8), ST262 (1+6), ST273 (3+0), ST275 (1+0); a **78** – ST78 (5+0), ST549 (2+0). Ostatné izoláty patrili do ST19 (0+1), ST323 (3+0) a jeho novej single locus varianty ST884 (7+17). Výsledky a príbuznosť ST je zobrazená v eBURST diagrame (Obrázok 1). Izoláty *E. faecalis* pochádzali iba z pacientov a nemocničného prostredia a všetky patrili do klinicky významného ST6. Pomocou metódy PFGE sme preukázali prítomnosť identických izolátov v ČOV a vo Fakultnej nemocnici Brno.

Záver

VRE sa vyskytujú takmer permanentne vo vode vypúšťanej z ČOV, a môžu predstavovať riziko environmentálnej kontaminácie. Preukázali sme výskyt identických izolátov v čističke odpadových vôd a u hospitalizovaných pacientov.



Obrázok 1: eBURST diagram izolátov *E. faecium* zostavený na základe MLST analýzy. Každý ST je zobrazený ako bod, čiary spájajú „single locus variants“. Zvýraznené sú ST nájdené v našej štúdií.

Táto práca vznikla za finančnej podpory Interní grantové agentury VFU Brno č. 17/2014/FVHE.

Zoznam literatúry

DESHPANDE, L.; et al. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2007, vol. 58, issue 2, s. 163-170.

EARSS. *Antimicrobial resistance interactive database* [online]. 2014 [cit. 2014-11-18]. Dostupné z: http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx

SIMJEE, S.; et al. *Enterococcus*. In AARESTRUP, F. M.; et al. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington, D.C.: ASM Press, 2006, s. 315-323.

ORAVCOVA, V.; et al. American crows as carriers of vancomycin-resistant enterococci with *vanA* gene: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Environmental Microbiology*. 2014, vol. 16, issue 4, s. 939-949.

Využití spektrofotometrické metody pro stanovení metalothioneinů jako indikátorů znečištění vodního prostředí ryb

Petra Friedrichová¹, Milena Bušová¹, Radka Opatřilová², Gabriela Havlíková¹

Ústav biochemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Ústav chemických léčiv, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Metalothioneiny (MTs) patří do skupiny nízkomolekulárních intracelulárních proteinů charakterizovaných vysokým obsahem cysteinu. Vyznačují se vysokou afinitou k některým esenciálním i toxickým kovům. Za jejich schopnost vázat kovy jsou odpovědny thiolové skupiny (-SH) cysteinu. Touto vazbou je eliminován toxický účinek kovů na intracelulární proteiny a enzymatické funkce (1). MTs mají vysokou afinitu především k mědi (Cu), zinku (Zn), kadmiu (Cd), rtuti (Hg) a některým dalším kovům. Jejich hlavní biologickou funkcí v organismu je především udržování homeostázy a hospodaření s kovy, slouží jako zásobárna pro metaloenzymy. Dle některých studií jsou MTs řazeny mezi reaktanty akutní fáze (2,3). Od objevu MTs v roce 1957, jako kadmium vázajících proteinů objevených v koňských ledvinách, je soustavně studována jejich struktura i vlastnosti (4,5,10). Detoxikační mechanismy MTs byly studovány především u ryb exponovaných vysokým koncentracím těžkých kovů ze znečištěného vodního prostředí (6). Ryby z takových lokalit mohou ve svých tkáních, především ledvinách, játrech, žábrech i svalovině kumulovat značné množství toxických kovů (7,8). Zvýšená koncentrace kadmia ve vodním prostředí, ale i řada dalších faktorů navozuje indukci syntézy MTs (11,12). Buňky, které obsahují vyšší koncentrace MTs, se lépe vyrovnávají s toxickými účinky kovů (9).

Ke stanovení MTs ve tkáních může být použito několik metod. Nejznámější je Brdičkova elektrochemická metoda (13). Stejně i další instrumentální metody (ELISA, HPLC, GC, RIA, další elektroforetické metody) jsou náročné na laboratorní přístrojové vybavení.

Cílem této studie bylo zavedení a optimalizace spektrofotometrické metody ke stanovení MTs jako indikátorové biomolekuly u ryb.

Materiál a metodika

Principem metody je spektrofotometrické stanovení koncentrace MTs ve tkáňovém homogenátu Ellmanovou reakcí (14,15,16). Příprava tkáňového homogenátu vyžaduje použití homogenizátoru s nekovovým pístem. Homogenizace musí probíhat v ledové vodní lázni při 0 - 2 °C, aby nedošlo k destrukci proteinů. Po precipitaci MTs chlazeným absolutním etanolem (96%) a odpaření vzorků je za použití denaturačního pufru precipitát resuspendován. Reakcí s Ellmanovým činidlem dojde k vytvoření barevného komplexu, který je

stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 412 nm. V průběhu celého procesu je nutné manipulovat se vzorkem za přísně chlazených podmínek a chránit homogenát před oxidací a účinkem proteas.

Pro stanovení koncentrace MTs u ryb byly použity vzorky jater a svaloviny ryb odlovených na odlišných lokalitách.

Výsledky

Metoda byla použita ke stanovení koncentrace MTs ve 32 vzorcích svaloviny a 32 vzorcích jater odebraných od karasa stříbrného (*Carassius gibelio*) z přirozené lokality a 16 vzorků jater kapra obecného (*Cyprinus carpio*) z chovu. K vyhodnocení koncentrace MTs a výpočtu jejich obsahu ve tkáních ryb byla sestrojena standardní kalibrační křivka - Fig. 1. Bylo připraveno 5 koncentračních bodů standardního roztoku 4 mM redukovaného glutathionu, který byl poté přepočten na koncentraci MTs. Výsledky analýz (koncentrace MTs ve tkáních) se vyjadřují po přepočtu na koncentraci celkových proteinů v analyzované tkáni.

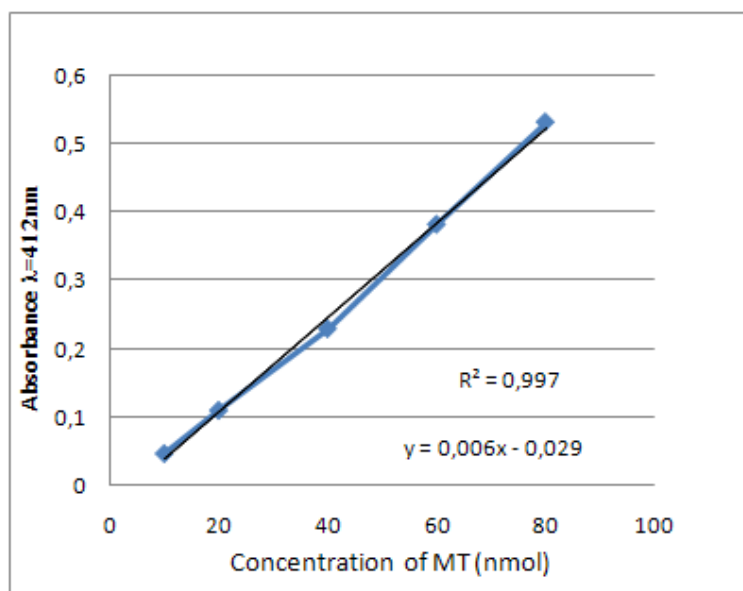


Fig. 1. Kalibrační křivka MTs

Metoda byla použita pro stanovení MTs u karasa stříbrného a kapra obecného pocházejících z odlišných lokalit. Limit detekce stanovení MTs ve tkáňovém homogenátu je $< 0,2$ nM. Tato metoda je dostatečně citlivá pro stanovení koncentrace MTs u ryb. Ověření této metody použitím standardního referenčního materiálu je dostatečnou zárukou specificity a sensitivity metody pro její použití ve tkáních ryb.

Závěr

Metalothioneny u ryb jsou využitelné z několika důvodů. Poskytují informace o zdravotním stavu ryb ve vztahu k udržení homeostázy a hospodaření organismu s kovy. Jako rychlý marker jsou využitelné pro informaci o možné kontaminaci ryb těžkými kovy a s tím související bezpečnou konzumací ryb jako významné složky potravy člověka. Naším cílem bylo zavést a optimalizovat spektrofotometrickou metodu jako poměrně jednoduchý a rychlý test pro stanovení koncentrace metalothioneinů ve tkáni ryb jako markeru rutinně použitelného pro odborný odhad hygienické kvality ryb pocházejících z různých přírodních lokalit

Práce byla financována v rámci projektu IGA 34/2014/FVHE.

Přehled literatury:

- [1] Lobinski, R., Chassaingne, H., Szpunar, J., *Talanta* 1998, 46, 271 – 289.
- [2] Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., *Comparative Biochemistry and Physiology* 2001, Part C 128, 189 – 201.
- [3] Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Barka,S., *et al. Aquatic Toxicology* 2006, 76, 160-202.
- [4] Margoshes, M., Vallee, B.L., *Journal of the American Chemical Society* 1957, 79, 4813-4814.
- [5] Klaassen, C.D., Liu, J., Diwan, B.A., *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 238, 215-220.
- [6] Kay, J., Thomas, D.G., Brown, M.W., Cryer, A. *et al.*, *Environmental Health perspectives* 1986, 65, 133-139.
- [7] Rankin, C., Jensen, F.B., *Fish Ecophysiology*, Chapman and Hall, London, 1993.
- [8] Shaw, C.F., Savas, M.M., Petering, D.H., *Methods in Enzymology* 1991, 205, 401-414.
- [9] Enger, M.D., Tesmer, J.G., Travis, G.L., Barham, S.S., *American Journal of Physiology* 1986, 250, C253-256.
- [10] Rutkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R., *International Journal of Molecular Sciences* 2013, 14, 6044-6066.
- [11] Bonwick, G.A., Fielden, P.R., Davies, D.H., *Comparative Biochemistry and Physiology* 1991, 99C, 119-125.
- [12] Dallinger, R., Egg, M., Kock, G., Hofer, R., *Aquatic Toxicology* 1997, 38, 47-66.
- [13] Kizek, R., Vacek, J., Trnková, L., Klejdus, B., Havel, L., *Chemické listy* 2004, 98, 166-173.
- [14] Ellman, G.L. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1959, 82, 70.
- [15] Viarengo, A., Ponzanon, E., Dondero, F., Fabbri, R., *Marine Environmental Research* 1997, 44, 69-84.
- [16] Gagne, F. *Biochemical Ecotoxicology. Principles and Methods*. Academic Press, San Diego 2014.

Vliv T-2 toxinu na parametry oxidačního stresu u pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*)

Josef Vakula, Helena Modrá, Martin Hostovský, Iveta Matejová, Tereza Foldynová, Zuzana Čerlíková

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

Úvod

T-2 toxin patří mezi trichothecenové mykotoxiny, toxické sekundární metabolity mikroskopických hub produkované plísněmi rodu *Fusarium*. Fusariové mykotoxiny jsou nejčastěji se vyskytující mykotoxiny v různých částech Evropy (Schatzmayer and Streit, 2013). Ke kontaminaci zemědělských plodin trichotheceny dochází během pěstování, proto bývají označovány jako předsklizňové polní mykotoxiny. Mezi nejvýznamnější trichoteceny patří deoxynivalenol (DON), T-2 toxin, HT-2 toxin a diacetoxyscirpenol (DAS). V rámci skupiny trichothecenů se nejčastěji a v nejvyšších koncentracích vyskytuje DON, T-2 toxin však patří mezi nejvíce toxické trichotheceny (Bryden, 2012).

V současnosti se do krmných směsí pro dravé ryby vzhledem k vysoké ceně rybí moučky stále více využívají obiloviny a jejich vedlejší produkty. Dravé ryby jsou přitom velmi citlivé na působení mykotoxinů (Manning and Abbas, 2012).

Zatímco pro DON existují v rámci EU doporučené limity pro jeho obsah v krmivech, limity pro obsah T-2 toxinu dosud nebyly navrženy. Účinky T-2 toxinu u savců a ptáků byly studovány, u dravých ryb byl dosud pouze hodnocen vliv T-2 toxinu na příjem a konverzi krmiva. T-2 toxin v krmivu v koncentracích vyšších než 2,5 mg.kg⁻¹ způsobuje u pstruhů snížení růstu a příjmu krmiva, koncentrace vyšší než 10 mg.kg⁻¹ způsobují zvýšenou mortalitu (Poston et al., 1982). Negativní účinky T-2 toxinu na některé parametry oxidačního stresu byly pozorovány u kapra (*Cyprinus carpio*) v koncentraci 2,45 mg.kg⁻¹ krmiva (Balogh et al., 2009).

Pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) je hospodářsky využívaným druhem ryb s velkým ekonomickým významem. Ročně se v akvakulturách ČR vyprodukuje více než 500 tun pstruhů. Znalosti o účincích T-2 toxinu v krmivu přispějí k návrhu limitů pro tento mykotoxin a prohloubí poznatky o jeho působení na organismus ryb.

Popis a metodika řešení projektu

V rámci předloženého projektu proběhl subchronický 28 denní test toxicity na pstruzích duhových. Pstruhům bylo podáváno dvakrát denně krmivo s přídatkem T-2 toxinu v koncentraci 1 a 2 mg kg⁻¹. Test se uskutečnil v recirkulačním systému Ústavu ekologie a chorob zvířete, ryb a včel VFU Brno. Po ukončení testu byla rybám odebrána krev, ryby byly usmrceny a při pitvě byly odebrány orgány (játra a zadní ledvina) na stanovení jednotlivých markerů oxidačního stresu. Získaná plazma a tkáně byly zmrazeny.

V druhé fázi projektu byly stanoveny následující parametry oxidačního stresu: aktivita glutathion peroxidázy (GPx), glutathion reductázy (GR), glutathion S-transferázy (GST), katalázy (CAT) a lipidní peroxidace (TBARS). Stanovení uvedených parametrů ve vzorcích jater, a zadní ledviny bylo provedeno spektrofotometricky s využitím multifunkčního readru Varioskan Flash.

Výsledky a diskuze

Výsledky markerů oxidačního stresu (GPx, GR, TBARS, CAT) a aktivita detoxikačního enzymu (GST) v játrech a zadní ledvině pstruha duhového jsou uvedeny v tabulce 1.

Ze získaných výsledků je zřejmé, že koncentrace T2-toxinu 1 mg.kg⁻¹ a 2 mg.kg⁻¹ krmiva má vliv na oxidační stres u pstruha duhového. Nejvýraznější změny v aktivitách ukazatelů oxidačního stresu byly zaznamenány v játrech. Toxický efekt T2-toxinu se projevuje především v játrech a v zažívacím traktu (Wu et al. 2014), zřejmě proto v naší studii změny v ledvinách byly méně průkazné.

U savců a ptáků T2-toxin inhibuje proteosyntézu a snižuje aktivitu enzymů nezbytných pro detoxikaci cizorodých látek a zvyšuje lipidní peroxidaci a aktivitu glutathion S-transferázy (Kalantari and Moosavi 2010). Tyto závěry potvrdily i výsledky získané v naší studii u pstruhů duhových v nízkých koncentracích T-2 toxinu v krmivu.

Tabulka 1: Aktivita katalázy (CAT, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg protein}$), glutathion reductázy (GR, $\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{mg protein}$), glutathion peroxidázy (GPx, $\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{mg protein}$), glutathion S-transferázy (GST, $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg protein}$) a lipidní peroxidace (TBARS, $\text{nmol}/\text{g ww}^{-1}$) v játrech a zadní ledvině pstruha duhového po 28 denním působení T2-toxinu [1 mg.kg⁻¹ (n=36) and 2 mg.kg⁻¹ (n=40)]. Data jsou vyjádřena jako průměr \pm SEM ($n_{\text{kontrola}} = 19$). Vysoce významný rozdíl ($p < 0.01$) mezi testovanými skupinami a kontrolou je vyjádřen pomocí písmen.

Parametr	Játra			Ledviny		
	Kontrola	1 mg.kg ⁻¹	2 mg.kg ⁻¹	Kontrola	1 mg.kg ⁻¹	2 mg.kg ⁻¹
CAT	433.57 ± 28.40 ^a	345.64 ± 15.74 ^b	316.84 ± 16.69 ^b	26.60 ± 1.13 ^a	27.16 ± 0.86 ^{bc}	25.62 ± 0.90 ^{ac}
GR	11.50 ± 0.53 ^a	12.14 ± 0.53 ^b	11.86 ± 0.57 ^b	43.40 ± 1.63 ^a	43.02 ± 1.09 ^a	44.09 ± 0.89 ^a
GPx	26.57 ± 1.68 ^a	28.84 ± 1.04 ^b	27.49 ± 0.81 ^b	50.22 ± 1.80 ^a	55.47 ± 1.11 ^{bc}	54.45 ± 1.25 ^{ac}
GST	467.65 ± 28.46 ^a	479.62 ± 21.67 ^b	500.93 ± 22.52 ^b	196.22 ± 9.63 ^a	203.60 ± 5.08 ^b	214.52 ± 9.45 ^b
TBARS	28.77 ± 5.35 ^a	26.61 ± 1.56 ^a	36.92 ± 2.34 ^b	7.56 ± 0.38 ^a	7.76 ± 0.58 ^a	7.12 ± 0.45 ^a

Práce byla financována v rámci projektu IGA 31/2014/FVHE

Seznam literatury

Balogh K, Heincinger M, Fodor J, Mézes M (2009). Effect of long term feeding of T-2 and HT-2 toxin contaminated diet on the glutathione redox status and lipid peroxidation processes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biologica Szegediensis*, 53: 23–27.

Bryden WL (2012). Mycotoxin Contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173: 134–158.

Kalantari H, Moosavi M, (2010). Review on T-2 toxin, *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 5(1): 26-38.

Manning BB, Abbas HK (2012). The effect of *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol, fumonisin, and moniliformin from contaminated modly grains on aquaculture fish. *Toxin Reviews*, 31(1-2):11–15.

Poston HA, Coffin JL, Combs GF (1982). Biological effects of dietary T-2 toxin on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquatic Toxicology*, 2: 79–88.

Schatzmayr G, Streit E (2013). Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. *World Mycotoxin Journal*, 6 (3): 213–222.

Wu Q-H, Wang X, Yang W, Nüssler AK, Xiong L-Y, Kuča K, Dohnal V, Zhang X-J, Yuan Z-H (2014). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humus an update. *Archives fo Toxicology*, 88: 1309–1326.

Příspěvky
Farmaceutické fakulty

Vztah mezi funkcí rodiny p53 a 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosinem

Lucie Holaňová¹, Matej Adámik², Alena Polášková², Robert Helma², Zuzana Bábková¹, Marek Petr², Jana Nygrýnová¹, Jana Pokorová¹, Klára Odehnalová¹, Michaela Vorlíčková², Jana Poletínová¹, Milena Bušová³, Stanislav Hasoň², Radka Opatřilová¹ a Marie Brázdová¹

Ústav chemických léčiv, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Biofyzikální ústav AVČR v.v.i Brno², Ústav biochemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³

Úvod

Oxidativní stres a zvýšená hladina reaktivních forem kyslíku hraje důležitou roli v onkogenezi a ukazuje se, že nádorová suprese prostřednictvím rodiny p53 je také zprostředkována redukcí úrovně ROS a zesílením antioxidační obrany. Produkce ROS je kromě karcinogeneze spojena také s protinádorovou terapií. Jedním z široce používaných a efektivních biomarkerů pro oxidativní stres i karcinogenezi je 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG). Jako transkripční faktory se proteiny rodiny p53 uplatňují v regulaci cílových genů odpovědných za rozmanité buněčné reakce, zahrnující i opravu DNA. Bylo zjištěno, p53 je schopen interakce s DNA obsahující 8-oxodG a poukázáno na souvislost mezi regulací reparační aktivity *hOGG1* a funkčností p53 (1). V naší práci jsme se zaměřili na studium souvislostí mezi proteiny rodiny p53, 8-oxodG a reparačním enzymem hOGG1 převážně u oxidačního stresu způsobeného cytostatiky, H₂O₂ či těžkými kovy.

Materiál a metodika

Byly použity linie nádoru tlustého střeva (HCT116p53^{+/+}, HCT116p53^{-/-}, HCT116p53^{-/248}) a glioblastomové linie (U251, U87, Onda10 a Onda11) vyznačující se různým statusem genu *TP53*. Buňky byly pro detekci modifikace DNA 8-oxodG ovlivněny působením 5 μM cisplatinu, 0,5 μM doxorubicinu, 25 μM 5-FU, 50 μM temozolomidu, případně 100 μM H₂O₂ či ionty přechodných kovů. Detekce exprese p53 a cílových genů na proteinové úrovni byla provedena dle (2). Detekce exprese cílových genů na úrovni mRNA byla provedena pomocí RT-PCR dle (2,3). Buněčné přežívání a test MTT/WST1 byl proveden dle (2). Detekce vazby proteinů rodiny p53 byla provedena pomocí metody ELISA nebo EMSA dle (3,4). Detekce 8-oxodG byla provedena pomocí kompetitivní ELISA s použitím komerčních kitů a ELISA readeru Cytation 3 (BioTek), elektrochemické metody (dle(5)) a HPLC/MS (Agilent 1100 Series LC/MSD Trap, YMC-Triart C18).

Výsledky

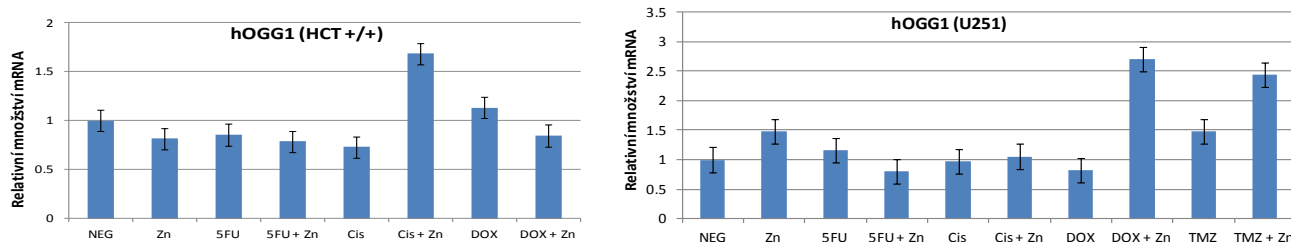
Vliv 8-oxodG na funkci proteinů rodiny p53 jsme sledovali na několika úrovních, na úrovni rozpoznání modifikované DNA 8-oxodG, exprese cílových genů rodiny p53 (*hOGG1*, *PUMA* a

další) a na úrovni detekce modifikace 8-oxodG genomové DNA po působení oxidativního stresu. Vzhledem ke schopnosti proteinu p53 rozpoznávat poškozenou DNA jsme sledovali vazbu standardního a mutantních proteinů p53 a homologů p63 a p73 na DNA modifikovanou 8-oxodG. Nejprve byly připraveny rekombinantní proteiny wtp53, mutp53 a centrální domény p63 a p73 a byly provedeny základní studie: vliv oxidativního stavu proteinů, vliv iontů přechodných kovů (4), vliv teploty a to především na specifické sekvenci p53CON ať již v oligonukleotidu či fragmentu DNA. Vazba na 8-oxodG modifikovanou DNA byla srovnávána s vazbou sekvenčně specifickou. Pro eliminaci vlivu specifické sekvence jsme studovali vazbu na repetitivní G-bohatou DNA modifikovanou 8-oxodG v různých polohách (Obr. 1). Z vazby p53 na takto modifikovanou DNA a srovnání s nemodifikovanou DNA vyplývá, že jediná modifikace dG v rámci duplexu neovlivňuje



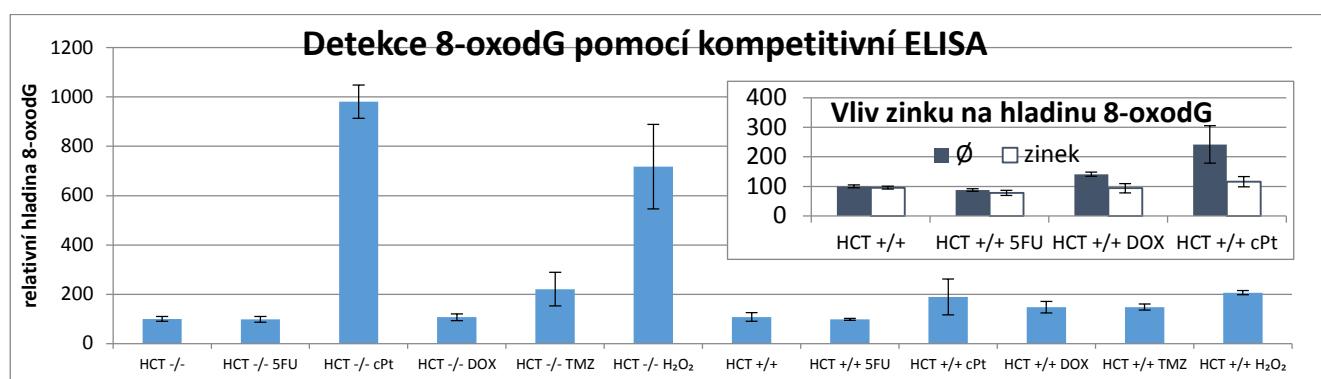
výrazně schopnost p53 rozpoznávat DNA zatímco v případě jednořetězcové ano. Obr. 1 Vazba p53 na DNA modifikovanou na pozicích 4,9,14 a srovnání s vazbou na DNA nemodifikovanou pomocí EMSA.

Dále byl zkoumán vliv oxidativního stresu na expresi genů spojených s nádorově supresorovou funkcí proteinů rodiny p53. Ke studiu byly vybrány již zmíněné linie s různým statusem genu *TP53*. Jako zdroje oxidačního stresu byla vybrána cytostatika, H_2O_2 a ionty těžkých kovů. Zjišťovali jsme vliv statusu *TP53* na buněčnou odpověď na úrovni proteinů i mRNA, kde jsme se především zaměřili na geny *PUMA* a *hOGG1*. Z předešlých studií vyplývalo, že ionty zinku mohou ovlivňovat konformaci mutantních proteinů p53 a mohli by tak výrazně měnit expresní profily zvláště po použití testovaných cytostatik, proto jsme studovali jejich vliv také v kombinaci s ionty zinku. Zjistili jsme, že hladina exprese genů *hOGG1*, *PUMA* a dalších na úrovni mRNA byla ovlivněná kombinací $ZnCl_2$ a cytostatika. U linie HCT116^{+/+} reagovala zvýšenou expresí *hOGG1* především na DOX a dále pak CIS jen v kombinaci s $ZnCl_2$ (Obr. 2A). U linie U251 byly pozorovány výraznější změny exprese tohoto genu u DOX i temozolomidu také především v kombinaci se $ZnCl_2$ (Obr. 2B).



Obr.2 Expresa genu *hOGG1* v buňkách HCT116^{+/+} a U251 (mutp53 R273H) po působení cytostatik
Poslední oblastí výzkumu byla vlastní detekce 8-oxodG ve vzorcích získaných z nádorových linií po působení výše zmíněných původců oxidačního stresu. Byla prováděna optimalizace detekce 8-

8-oxodG pomocí několika metod: kompetitivní ELISA, přímé imunodetekce na membráně, elektrochemické detekce (5) a HPLC/MS. Bohužel mez detekce posledních tří zmíněných metod nebyla pro naše účely využitelná, proto prezentujeme výsledky získané metodou kompetitivní ELISA analýzou štěpené genomové DNA získané z buněčných linií odvozených od linie HCT116 po působení vybraných původců oxidativního stresu. V případě linie HCT116^{+/+} obsahující funkční protein p53, byla převážná část 8-oxodG reparována a odstraněna z DNA, na rozdíl od linie HCT116^{-/-}, která p53 neobsahuje. Z použitých cytostatik největší množství 8-oxodG bylo pozorováno u působení cisplatin, poměr mezi hladinou 8-oxodG před a po působení cisplatin byl výrazně vyšší u linie HCT116^{-/-} (Obr. 3) na rozdíl od linie HCT116^{+/+}. V obou případech byly hladiny 8-oxodG srovnatelné s působením 100 μM H₂O₂ (Obr. 3). Také v tomto případě nás zajímal vliv ZnCl₂ na působení cytostatik, v případě linie HCT116^{+/+} ZnCl₂ výrazně snižoval hladinu 8-oxodG ().



Obr. 3 Detekce hladiny 8-oxodG pomocí kompetitivní ELISA v relativním vyjádření

Závěr

Zjistili jsme, že proteiny rodiny p53 rozpoznávají i DNA modifikovanou 8-oxodG. Na základě získaných výsledků na buněčné úrovni předpokládáme, že ZnCl₂ má pozitivní vliv na funkci proteinů p53, na transkripční úrovni pozitivně ovlivnil hladinu *hOGG1* a tím i jeho aktivitu. Pozorovali jsme podporu reparace poškození DNA po působení zinečnatých iontů v přítomnosti proteinu p53 prostřednictvím detekce hladiny modifikace 8-oxodG genomové DNA pomocí kompetitivní ELISA.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 67/2014/FAF.

Seznam literatury:

1. Achanta, G., and Huang, P. (2004) *Cancer Res* 64, 6233-6239.
2. Hronesova, L., Holacka, K.; Polaskova, A.; et al. (2013) *CHEMICKE LISTY*,107,SI3, S376-S377
3. Brazdova, M., Navrátilová, L., Tichý, V., Nemcová, K., Lexa, M., Hrstka, R., Pecinka, P., Adamik, M., Vojtesek, B., Palecek, E., Deppert, W., and Fojta, M. (2013) *PLoS One* 8, e59567.

4. Adámik, M., Bažantová, P., Navrátilová L., Polášková A., Pečinka, P., Holaňová, L., Tichý, V., Brázdová, M. (2014), accepted *Biochem Biophys Res Commun* 433, 445-449.
5. Hason S, Stepankova S, Kourilova A, Vetterl V, Lata J, Fojta M, Jelen F. (2009) *Anal Chem.*;81(11):4302-7

Hodnocení potenciální antiradikálové aktivity měďnatých komplexů u alloxanového modelu diabetu na myších

Dlouhá Markéta, Račanská Eva, Bartošová Ladislava, Abdulkarim Al-Fadhli

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, VFU Brno

Úvod

Předběžné experimenty ukázaly, že měďnaté komplexy na principu Schiffových bazí s různými ligandy mohou vykazovat antiradikálovou a antidiabetickou aktivitu [1]. Schopnosti komplexů inaktivovat radikály vznikající v živém organismu by bylo možné využít při terapii některých civilizačních chorob. Měďnaté komplexy by tedy mohly působit protektivně na β buňky pankreatu a tím ovlivňovat produkci inzulínu. Cílem projektu bylo otestovat v podmínkách *in vivo* u myší potenciální hypoglykemizující, *resp.* cytoprotektivní účinek látek.

Materiál a metodika

Testované sloučeniny byly syntetizovány na Farmaceutické fakultě UK v Bratislavě a zprostředkovány k testování na Farmaceutické fakultě VFU Brno. Celkem jsme testovali 5 originálních měďnatých komplexů typu Schiffových bazí a porovnávali jejich účinek se standardem troloxem, což je hydrofilní forma antioxidantu α -tokoferolu (vitamín E). Označení nových testovaných látek je uvedeno v Tabulce 1.

Tabulka 1 Označení testovaných látek

Označení	JV2	ZP27	ZP30	ZP45	95
Komplex	Cu(sal-L- α -Ala)(H ₂ O)	Cu(sal-DL- α -aB)(H ₂ O)	Cu(sal- β -AB)(H ₂ O)	Cu(sal-GABA)(H ₂ O)	Cu(Hsal-L- α -Ala)(H ₂ O)

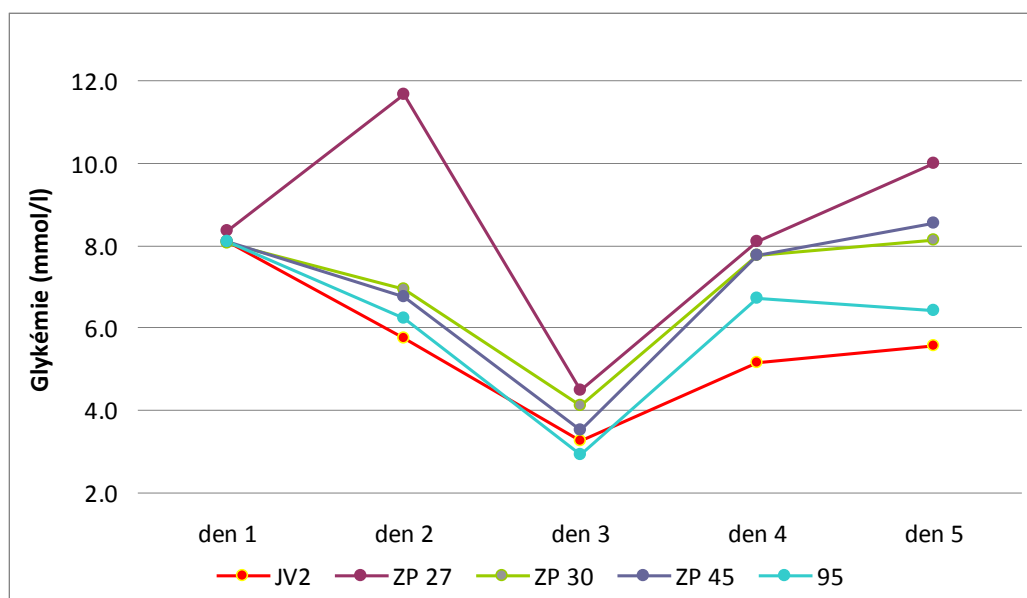
K pokusu byli použiti samci laboratorních myší. V rámci experimentu bylo použito celkem 85 zvířat. Pokusná zvířata byla rozdělena do devíti skupin a skupiny byly označeny římskými číslicemi (I-IX). Skupinám I až V (skupiny po 10 myších) byl první den navozen diabetes pomocí *i.v.* aplikace alloxanu. Testované měďnaté komplexy byly podány skupinám I až V *i.p.* profylakticky 3 h před podáním alloxanu [2]. Skupině VI (skupina o 10 myších) byl aplikován alloxan a obdobně profylakticky podána referenční látka s antiradikálovým účinkem trolox. Skupině

VII (skupina o 5 myších) byl vyvolán diabetes alloxanem bez profylaktické aplikace dalších látek. Skupina VIII (skupina o 10 myších) sloužila jako intaktní kontrola (bez aplikace látek). Skupina IX (skupina o 10 myších) sloužila jako pozitivní kontrola. U této skupiny byl místo alloxanu nebo testované látky aplikován pouze fyziologický roztok.

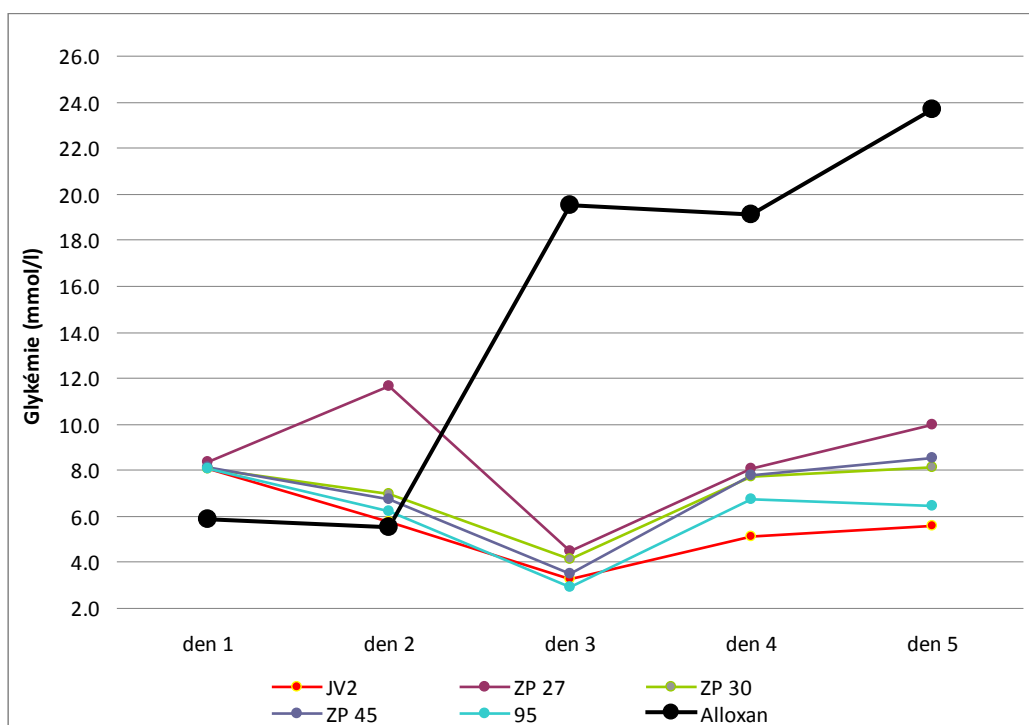
V průběhu experimentu byla u všech myší ze všech skupin po dobu 5 dní pravidelně sledována hladina glykémie pomocí analyzátoru Accutrend. Glykémie byly měřeny po lačnění v trvání 10 h.

Výsledky

Naměřené průměrné hodnoty glykémie podle skupin testovaných látek v jednotlivých dnech jsou znázorněny v grafech na Obr.1. Hodnoty glykémie z prvního dne byly naměřeny před aplikací látek po deseti hodinovém lačnění. Všechny tyto hodnoty se pohybovaly kolem 8 mmol/l. Do třetího dne od podání testovaných komplexů hodnoty glykémie klesaly téměř u všech látek s výjimkou komplexu ZP 27, kde hodnota glykémie druhý den prudce vzrostla. Od třetího dne měly hodnoty glykémie u všech testovaných komplexů rostoucí charakter. Ve srovnání se skupinou zvířat, které byl podán pouze alloxan, viz Obr. 2, je zřejmé, že testované komplexy mají od třetího dne statisticky významný vliv na snížení hladiny glykémie. Pro statistické vyhodnocení výsledků byl použit jednovýběrový studentův t-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.



Obr 1: Průměrné hodnoty glykémie po aplikaci hodnocených komplexů a alloxanu v jednotlivých dnech experimentu.



Obr 2: Hodnoty glykémie skupin myší premedikovaných testovanými látkami ve srovnání s hodnotami kontrolní alloxanové skupiny.

Závěr

Všechny hodnocené měďnaté komplexy, podané preventivně myším 3 h před aplikací alloxanu, potvrdily schopnost snižovat hodnoty glykémie měřené v intervalu následujících pěti dnů, a to v porovnání s kontrolní skupinou. Kontrolní skupině byl navozen diabetes pomocí látky alloxan. Další výzkum se zaměří na posouzení efektu testovaných komplexů na stav β -buněk pankreasu vystavených toxickému účinku alloxanu.

Poděkování

Výzkum byl podpořen projektem IGA VFU - 2014, číslo projektu 65/2014/FaF.

Seznam literatury

- [1] VANČO, J. et al. Synthesis, structural characterization, antiradical and antidiabetic activities of copper(II) and zinc(II) Schiff base complexes derived from salicylaldehyde and beta-alanine. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2008, 102, p. 595-605.
- [2] VALENTOVÁ, J. et al. Antihyperglycemic and antioxidant effect of komplex $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{sal-}\beta\text{-ala})_2](\text{H}_2\text{O})$ in alloxan-induced diabetes in mice. *Chemické listy*, 2007, 289, p. 73-310.

Protizánětlivá aktivita obsahových látek *Eucalyptus globulus*

Markéta Gazdová, Václav Suchý, Ivana Jelšíková, Karel Šmejkal

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

Úvod

Eucalyptus globulus – blahovičník kulatoplodý je rostlinou tradičně využívanou v lidovém léčitelství Austrálie a Tasmánie. Původní obyvatelé těchto oblastí jej používali při léčbě horečnatých stavů, bolesti, zánětu, průjmu či hadího uštknutí [1]. Díky bohatému spektru obsahových látek patří blahovičníky mezi fytochemicky intenzivně zkoumané rostliny. Doposud známý profil obsahových látek zahrnuje jak látky prchavé, které jsou obsaženy v silici, tak látky neprchavé, z nichž převažují zejména acylfloroglucinoly, flavonoidy, trísloviny či terpenické sloučeniny [2]. Silice a látky fenolické povahy mají bohatou biologickou aktivitu. Byl prokázán analgetický a antiflogistický efekt extraktu a silice, fenolickým sloučeninám bývá připisována i aktivita antioxidační a antibakteriální [3].

Ústav přírodních léčiv FaF VFU Brno se věnuje analýze obsahových látek rostlin s potenciálním terapeutickým využitím. Mezi ně patří i *Eucalyptus globulus*. Díky dostatku rostlinného materiálu bylo možné provést separaci, izolaci a identifikaci majoritních i minoritních obsahových látek. Většina látek byla získána také v množství dostatečném pro testování biologické aktivity.

Materiál a metodika

Rostlinný materiál a extrakce:

Jako rostlinný materiál byly použity listy a tenké listonosné větve *Eucalyptus globulus* získané v Centru léčivých rostlin Masarykovy univerzity. Tento rostlinný materiál o hmotnosti 2406 g byl extrahován 96% ethanolem (3 x 24 hod). Extrakt o hmotnosti 567,259 g byl dělen v soustavě vzájemně nemísitelných kapalin a ze čtyř získaných podílů byl pro další práci použit podíl chloroformový (82,919 g) a ethylacetátový (50,113 g).

Chromatografická separace:

Sloupcová chromatografie

Chloroformový podíl byl dělen na koloně délky 85 cm a průměru 2 cm. Jako stacionární fáze byl zvolen silikagel, mobilní fází byla směs chloroform:benzen:methanol v poměru 8:1:1 (v/v/v). Byly jímány frakce o objemu 120 ml, které byly následně dle výsledků TLC a HPLC spojeny do

výsledných 27 frakcí. Z těchto frakcí byly pro další separaci zvoleny frakce EGCHII/3, EGCHII/4, EGCHII/5-6, EGCHII/12. Tyto frakce byly následně děleny sloupcovou chromatografií při použití mobilních fází benzen, ethylacetát, hexan, aceton v různém složení a poměru.

Ethylacetátový podíl byl rozpuštěn v methanolu a separován s využitím molekulového síta Sephadex LH-20 o hmotnosti 250 g. Sloupec o délce 40 cm a průměru 6 cm byl promýván methanolem a byly jímány frakce o objemu 100 ml. Eluát byl analyzován pomocí TLC s UV a chemickou detekcí a spojen do výsledných 11 frakcí. Látky přítomné ve vybraných frakcích se dále separovaly na Sephadexu LH-20, resp. silikagelu. Pro další separaci byly vybrány frakce C (1,8 g) a K (1,2 g). Jako eluční směsi byly zvoleny kombinace benzenu, acetonu, ethylacetátu a methanolu v různých poměrech dle polaritativy a pohyblivosti dělených látek. Jímané objemy eluátu byly 10 ml (frakce C), resp. 5 ml (frakce K). Pro další analýzu byly zvoleny frakce C3 a K3.

Semipreparativní a analytické HPLC

Získané subfrakce byly děleny, případně přečišťovány pro účely identifikace pomocí semipreparativní HPLC. K separaci byly použity přístroje YL 9100 HPLC Systém (Young Lin) se sběračem frakcí FOXY R2 (Teledyne Isco) a semipreparativní kolona Ascentis™ RP-Amide 25 cm x 10 mm, velikost zrn 5µm (Sigma-Aldrich) a přístroj Dionex UltiMate 3000 s toutéž kolonou. Jako mobilní fáze byl použit gradient redestilovaného acetonitrilu a 0,2 % kyseliny mravenčí s rostoucím zastoupením acetonitrilu při průtoku 5ml/min a nástřiku 20 µl. Čistota látek byla ověřována pomocí analytické HPLC (Agilent 1100 Series, DAD UV-VIS detektor, kolony SUPELCOSIL ABZ+PLUS 15 cm x 4,6 mm, velikost částic 3 µm a Ascentis RP-Amide 15 cm x 2,1 mm, velikost částic 2,7µm).

Identifikační metody:

Identifikace probíhala za současného využití čtyř spektrálních metod, zahrnujících UV-VIS (Lambda25, PerkinElmer Instruments), IČ (Nicolet Impact 400 D FT-IR), MS (ESI-TOF, Mariner, PE Biosystems; Agilent HP 1100 LC/MSD Trap VL Series) a NMR (¹H-NMR, 2D HSQC, 2D HMBC, 2D COSY, 2D NOESY, 2D TOCSY; Bruker Advance 400 Ultrashield, Bruker).

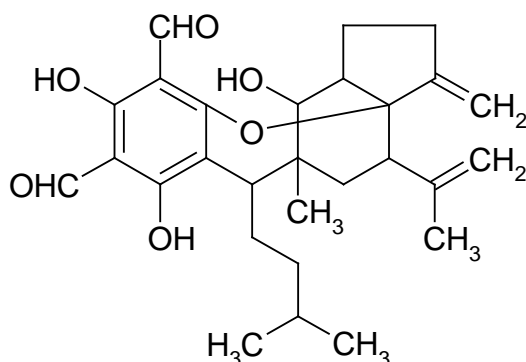
Výsledky

Separaci chloroformového a ethylacetátového podílu pomocí opakované sloupcové chromatografie a semipreparativní HPLC bylo získáno celkem 12 látek, jejichž čistota přesahovala 95 % a mohly tak být podrobeny identifikaci. Látky z chloroformového podílu byly identifikovány v rámci zahraniční studijní stáže na Università degli Studi di Padova. Pomocí UV-VIS, IČ, MS a NMR byly

tyto látky identifikovány jako grandinol (EGCHII/5-6/9-11/13-17/9-10/A, EGCHII/5-6/9-11/13-17/11-14/A), 8-desmethyleucalyptin (EGCHII/5-6/9-11/13-17/5-6/A, EGCHII/5-6/12/17-19, EGCHII/3/12), identifikována byla také jedna látka nová (EGCHII/3/14-16/13-16). Frakce EGCHII/5-6/9-11/19-20, EGCHII/5-6/12/25-27, EGCHII/4/11/C a EGCHII/12/11-12/17 nebyly doposud identifikovány, ale pravděpodobně se bude jednat o látky typu euglobalů a makrokarpalů, tedy aduktů acylfloroglucinolu s terpeny (EGCHII/5-6/9-11/19-20), terpeny (EGCHII/5-6/12/25-27, EGCHII/4/11/C) či flavonoidy (EGCHII/12/11-12/17). Frakce získané z podílu ethylacetátového byly identifikovány na základě porovnání se známými standardy a dle MS spektrometrie. Dvě majoritní látky z frakce K3 byly identifikovány jako kyselina gallová a methylester kyseliny gallové, látky z frakce C lze definovat jako glykosidní sloučeniny s aglykony od chrysinu a kvercetinu.

Závěr

Z vybraných frakcí chloroformového a ethylacetátového podílu ethanolickeho extraktu listů *E. globulus* se podařilo izolovat celkem 12 látek různého biosyntetického původu. Doposud bylo identifikováno 5 látek, z nichž jedna nebyla doposud popsána v literatuře (viz. obrázek č.1). U vybraných izolátů probíhá v současné době stanovení antiflogistické a antibakteriální aktivity.



Obrázek č.1: Nová látka izolovaná z *E. globulus*

Práce byla financována v rámci projektu IGA 57/2014/FAF.

Seznam literatury:

1. Silva, J. et al.: Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology* 2003, 89, 277–283.

2. Brezáni, V.: *Isolation of constituents from Eucalyptus globulus*, Brno, 2013, Rigorózní práce. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav přírodních léčiv.
3. Gilles, M. et al.: Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry* 2010, 119, 731–737.

Časné a chronické účinky olanzapinu na sérové hladiny adipokinů

Ludmila Havelková, Monika Zatloukalová, Jiří Procházka, Hana Kotolová, Kateřina Horská

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

Úvod

Schizofrenie je závažné neuropsychiatrické onemocnění projevující se nejčastěji symptomaticky již v mladém věku, a jejíž farmakoterapie je stále neuspokojivá. V terapii schizofrenie jsou v současnosti využívána zejména antipsychotika 2. generace, tzv. atypická antipsychotika (AAP), která postrádají závažné extrapyramidové nežádoucí účinky 1. generace. Přesto je léčba těmito antipsychotiky i přes výborný bezpečnostní profil oproti starším generacím spojena s řadou nežádoucích, především metabolických účinků. Zvýšené riziko vzniku obezity, dyslipidémie, hypertenze a diabetes mellitus II. typu vedoucí v konečném důsledku až k rozvoji metabolického syndromu patří k nejčastějším komplikacím dlouhodobé terapie AAP. Metabolická dysbalance je nejčastěji pozorována v souvislosti s terapií multireceptorovými AAP ze skupiny MARTA, např. s olanzapinem, které vykazují vysokou afinitu k řadě receptorů ovlivňujících energetický metabolismus. Mechanismus vzniku metabolické dysregulace v souvislosti s terapií AAP je však nadále nejasný. Pochopení vzájemného vztahu mezi antipsychotickou terapií a její schopností navodit celkový metabolický rozvrat by mohlo přispět k vývoji nových antipsychotik s nižším potenciálem k negativnímu ovlivnění metabolismu.

Cílem této práce bylo hodnocení vlivu podávaného atypického antipsychotika olanzapinu na metabolické změny u experimentálního zvířecího modelu schizofrenie. Sledován byl efekt hypertučné diety na nárůst hmotnosti, příjem potravy a vliv na sérové koncentrace základních klinicko-biochemických ukazatelů lipidového metabolismu a relevantních adipokinů, hormonů a prozánětlivých cytokinů významně se podílejících na metabolických regulacích a energetické homeostáze.

Metodika

Experiment byl proveden na 70-ti laboratorních myších kmene CD-1 samičího pohlaví o hmotnosti $31,6 \pm 2,67$ g. Zvířata byla získána z komerčního chovu z LF MU, kde bylo 30 z nich prenatalně vystaveno působení imunostimulační látky poly I:C (i.v. aplikace matky dávkou 5 mg/kg). Tato látka byla použita za účelem experimentálního navození modelu schizofrenie u exponovaných zvířat. Pokus probíhal v laboratoři splňující zásady Správné laboratorní praxe a byl schválen a kontrolován odbornou komisí VFU Brno, v souladu se zákonem č.246/1992 Sb., na

ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a s vyhláškou č.419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat. Po týdenní aklimatizaci byla zvířata rozdělena metodou náhodného výběru do 7 experimentálních skupin:

Skupina N-kontrola: kontrolní skupina, bez medikace, normální strava (n=10)

Skupina N-kontrola-T: kontrolní skupina, bez medikace, tučná strava (n=10)

Skupina N-olanzapin: kontrolní skupina, olanzapin, normální strava (n=10)

Skupina N-olanzapin-T: kontrolní skupina, olanzapin, tučná strava (n=10)

Skupina SH-kontrola: model schizofrenie, bez medikace, normální strava (n=10)

Skupina SH-olanzapin: model schizofrenie, olanzapin, normální strava (n=10)

Skupina SH-olanzapin-T: model schizofrenie, olanzapin, tučná strava (n=10)

Léčeným skupinám byl i.p. aplikován olanzapin v dávce 4 mg/kg/den a současně i p.o. v dávce 4 mg/kg/den (ve vodě). Zvířata byla chována v akreditovaném zvířetníku, byla krmena standardní (normální) krmnou směsí a vybrané skupiny byly krmeny speciální (tučnou) krmnou směsí s vyšším obsahem cholesterolu a sacharózy (dodavatel Biokron s.r.o.) za účelem navození metabolické dysbalance. Voda i strava byla podávána *ad libitum*. Zvířata byla jednou týdně vážena za účelem zhodnocení hmotnostního přírůstku a rovněž bylo váženo množství spotřebovaného krmiva. Experiment byl ukončen po 9 týdnech, zvířata byla usmrcena po 12-ti hodinovém lačnění dekapitací s následným odběrem krve (exsanguinací ze srdce), která byla poté upravena pro biochemické vyšetření centrifugací (10 min při 3500 otáčkách) za konstantní laboratorní teploty. Získané krevní sérum bylo odpipetováno, zamraženo a následně použito k biochemickému vyšetření.

Biochemické parametry lipidového metabolismu (celkový cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceridy, glukóza) byly stanoveny spektrofotometricky na automatizovaném biochemickém analyzátoru Dimension Xpad Plus za použití setů firmy Siemens, relevantní adipokiny (adiponektin, leptin, rezistin) byly stanoveny na Bio-Plex® readeru za použití setů firmy Bio-Rad. Pro porovnání rozdílů biochemických parametrů byl použit F-test a nepárový Studentův t-test. Data jsou uváděna jako průměry ± SD (směrodatná odchylka).

Výsledky

V průběhu chronické aplikace olanzapinu v dávce 4 mg/kg/den i.p. a současně i p.o. po dobu 9 týdnů nedošlo ke statisticky významnému nárůstu hmotnosti, ani ke zvýšené spotřebě krmiva. Výsledky změn základních klinicko-biochemických ukazatelů lipidového metabolismu a relevantních adipokinů jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Hladina základních klinicko-biochemických parametrů metabolického syndromu

	N-kontrola	N-kontrola-T	N-olanzapin	N-olanzapin-T	SH-kontrola	SH-olanzapin	SH-olanzapin-T
Celkový cholesterol (mmol/l)	1,91 ± 0,43	3,58 ± 0,53 ***	2,72 ± 0,57 ***	3,54 ± 0,52 ***	2,44 ± 0,56 *	2,35 ± 0,67	3,56 ± 0,67 ***
HDL-cholesterol (mmol/l)	2,17 ± 0,31	3,60 ± 0,33 ***	2,88 ± 0,53 ***	3,48 ± 0,36 ***	2,63 ± 0,62 *	2,53 ± 0,70	3,56 ± 0,46 ***
LDL-cholesterol (mmol/l)	0,21 ± 0,05	1,39 ± 0,51 ***	0,27 ± 0,05 **	1,19 ± 0,20 ***	0,17 ± 0,07	0,24 ± 0,06	1,11 ± 0,09 **
Triglyceridy (mmol/l)	1,60 ± 0,41	1,16 ± 0,28 *	1,48 ± 0,55	1,03 ± 0,30 ***	2,23 ± 0,96 *	1,51 ± 0,35	0,78 ± 0,24 ***
Adiponektin (ng/ml)	2014,89 ± 460,83	3189,53 ± 2402,66	2791,64 ± 2462,53	2506,85 ± 2324,88	1145,32 ± 552,12 **	2354,14 ± 1428,59	2207,15 ± 1628,74
Leptin (pg/ml)	2304 ± 2165	3782 ± 2939	1724 ± 999	1984 ± 1252	2192 ± 1317	2762 ± 1899	3765 ± 2700
Rezistin (pg/ml)	93466 ± 24888	88743 ± 18571	141865 ± 44831 **	134206 ± 24520 ***	164799 ± 67559 **	183836 ± 88120 **	177479 ± 40523 ***

Data jsou uváděna jako průměry získaných hodnot ± SD; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$; Léčené skupiny jsou porovnávány se skupinou kontrolní

Závěr

Předkládaná studie potvrzuje narušení lipidového metabolismu a dyslipidémii indukovanou chronickou aplikací olanzapinu u experimentálního modelu, a to i bez současného vzestupu hmotnosti a bez zvýšení spotřeby krmiva.

Aplikace olanzapinu vedla k signifikantnímu zvýšení plazmatické koncentrace celkového cholesterolu, HDL-cholesterolu a LDL-cholesterolu v porovnání s kontrolní skupinou bez medikace. Podobný trend v porovnání s kontrolní skupinou bez medikace byl taktéž pozorován u experimentálního zvířecího modelu schizofrenie (POLY – IC, SH-kontrola), u něhož došlo navíc i k rozvoji mírné hypertriglyceridémie. Chronická aplikace olanzapinu u skupiny schizofrenní (SH-olanzapin) neprokázala žádné signifikantní změny lipidového spektra, v porovnání se schizofrenní skupinou bez medikace.

Byly prokázány alterace endokrinní funkce tukové tkáně na úrovni sekrece relevantních adipokinů – adiponektinu a rezistinu - které se mohou podílet v etiopatogenezi metabolického syndromu a zvýšeného rizika kardiometabolických komplikací asociovaných s terapií atypickými antipsychotiky. Plazmatická koncentrace adiponektinu byla signifikantně snížena u schizofrenní skupiny bez medikace v porovnání se skupinou kontrolní. Zároveň bylo zjištěno v experimentálním modelu schizofrenie zvýšení plazmatické koncentrace adiponektinu u skupiny medikované v porovnání se skupinou schizofrenní kontrolní. Aplikace olanzapinu u všech experimentálních skupin vedla k signifikantnímu zvýšení plazmatické koncentrace rezistinu v porovnání se skupinou kontrolní. Experimentální model schizofrenie bez medikace také vykazoval statisticky zvýšenou hladinu rezistinu vůči kontrolní skupině. Při vzájemném porovnání všech experimentálních skupin v modelu schizofrenie nebyla zjištěna statisticky významná změna v plazmatické koncentraci rezistinu. Plazmatická koncentrace leptinu nevykazovala statisticky významné změny mezi experimentálními skupinami.

Výsledky tohoto experimentu potvrzují negativní efekt dlouhodobé léčby olanzapinem, jenž navenek nemusí vést k výraznému přírůstku hmotnosti, a přesto může akcelarovat pozdější rozvoj metabolického syndromu. Tento trend je navíc významně zhoršen u schizofrenního modelu. Přesto zůstávají otázky týkající se objasnění mechanismu vzniku nežádoucích metabolických účinků a jejich následných komplikací po podání APP nadále předmětem intenzivního výzkumu řady současných studií.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 48/2014/FAF.

Antiureázová aktivita *Rhus typhina*

Petra Hřibová¹, Eva Zajasová¹

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

Úvod

Ureázová aktivita představuje závažný problém při infekci *H. pylori* a ureolytickými bakteriemi způsobujícími záněty močového traktu. Eradikace těchto bakterií antibiotiky je spojena s častými nežádoucími účinky a vznikem rezistence bakterií k antibiotikům. Alternativní inhibitory ureázy mají za cíl eradikovat tyto patogeny a nepoškodit organismus. Cílem práce bylo najít potenciální inhibitory ureázy v extraktu z listů *Rhus typhina*, u kterého se při skríningu desítek rostlin projevila velmi vysoká inhibiční aktivita.

Materiál a metodika

Rostlinný materiál

Listy z *Rhus typhina* byly sbírány v červenci roku 2013 v arboretu MZLU Brno a sušeny na vzduchu při laboratorní teplotě. Materiál identifikoval doc. Žemlička z Ústavu přírodních léčiv FaF VFU Brno.

Metody extrakce

Z drcených listů byly připraveny dva typy extraktu. Materiál byl opakovaně extrahován v 60% methanolem za podpory ultrazvuku, rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce a zbylá voda byla odstraněna lyofilizací. Pro separaci s použitím Sephadexu jako stacionární fáze byl připraven acetonový extrakt, kdy byl rostlinný materiál opakovaně extrahován v 60% acetonu za podpory ultrazvuku, rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce a zbylá voda byla odstraněna lyofilizací.

Sloupcová chromatografie a preparativní HPLC

Extrakt rozpustný v mobilní fázi nebo v methanolu byl aplikován na kolonu obsahující adsorbent silikagel nebo Sephadex LH-20 jako stacionární fázi. Jako mobilní fáze byla použita směs

vhodných rozpouštědel v případě silikagelu a methanol v případě Sephadexu. Frakce byly jímány do baněk a zahuštěny na vakuové rotační odparce. Suché frakce byly uchovány při 4 °C pro další použití.

Pro preparativní HPLC byl použit systém Young Lin (Korea) s autosamplerem, kvaternární pumpou, DAD detektorem a sběračem frakcí. Průtok mobilní fáze byl 5 ml/min, kolona RP-Amid 30 cm, teplota kolony 40 °C. Mobilní fáze byla složena ze směsi acetonitrilu (ACN) a 0,2% kyseliny mravenčí (HCOOH) s použitím gradientové eluce. Detekce probíhala při vlnových délkách 254 a 280 nm.

Testování antiureázové aktivity

K testování antiureázové aktivity byla využita indofenolová metoda upravená pro Multiplate reader (Synergy HT BIOTEK, USA). Reakční směs obsahovala 60 µl roztoku ureázy a 60 µl roztoku inhibitoru. Po 3 minutové inkubaci při 27°C bylo přidáno 60 µl roztoku urey a inkubováno po dobu 7 minut při 27°C. Dále se do reakce přidalo 60 µl roztoku A (1% fenol + 0,005% nitroprusid sodný) a 60 µl roztoku B (0,5% hydroxid sodný + 0,1% chlornan sodný). Absorbance byla sledována při 630 nm. Reakce byly provedeny v triplicátu v konečném objemu 300 µl a pro statistické zpracování byl použit Excel 2010. Procento inhibice bylo vypočítáno pomocí tohoto vzorce:

$$UI(\%) = 100 - (A_{\text{rest.jamka}}/A_{\text{ctrl}}) * 100$$

Výsledky

Antiureázová aktivita byla stanovena pro frakce po separaci na silikagelu. Frakce s nejvyšší aktivitou byla separována na další koloně naplněnou silikagelem. Byla získána frakce RT4-7-sub8 obsahující čistou látku s molekulovou hmotností 180 D a UV maximy 222 a 272 nm. Tato látka vykazala velmi slabou antiureázovou aktivitu.

Z kolony s použitím Sephadexu byla získána frakce RTac/w-3 obsahující velmi polární látku a frakce RTac/w-13 obsahující dvě polární látky, z nichž druhou v pořadí se podařilo získat jako čistou pomocí preparativního HPLC. Aktivita těchto frakcí byla asi 10krát slabší než u standardního inhibitoru kyseliny acetohydroxamové.

Frakce RTac/w-40 obsahující čistou látku o molekulové hmotnosti 470 D s UV maximy 224 a 278 nm vykázala velmi slibnou inhibiční aktivitu proti ureáze. Struktura látek bude objasněna pomocí NMR analýzy.

Tabulka 1 Antiureázová aktivita izolovaných frakcí

Seznam literatury

concentration	% inhibition \pm % SEM	
mg/ml	RTac/w-3	Rtac/w-13
1.67	96.2 \pm 4.7	94.7 \pm 2.4
0.83	46.8 \pm 3.5	11.1 \pm 1.3
0.42	no inhibition	no inhibition
0.21	no inhibition	no inhibition
0.10	no inhibition	no inhibition
mM	RTac/w-40	RT4-7-sub8 (methyl gallate?)
3.0 (2.0)	99.9 \pm 2.7	13.9 \pm 1.8
2.0 (1.5)	99.6 \pm 2.6	1.1 \pm 1.7
1.0	93.5 \pm 1.7	no inhibition
0.5	14.8 \pm 4.8	no inhibition
0.1	no inhibition	no inhibition
1 mM	acetohydroxamic acid	72.6 \pm 3.6

Krajewska B. 2009. Ureases. I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review. J Mol Catal B: Enzym. 59:9–21.

Thomas B, Tolley D. 2008. Concurrent urinary tract infection and stone disease: pathogenesis, diagnosis and management. Nat Clin Pract Urol. 5:668–675.

Weatherburn M. 1967. Phenol–hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem. 39:971–974.

Tento projekt byl podpořen grantem IGA VFU Brno 2014 č. 54/2014/FaF.

Syntéza amidů kyseliny kynureninové jako biologicky aktivních látek

Josef Jampílek, Michaela Hrubá, Marie Moravcová

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

Úvod

Vzrůstající rezistence patogenů vůči stávajícím léčivům, resp. zvyšující se výskyt infekcí způsobených multirezistentními kmeny podtrhuje význam hledání nových protiinfekčních a protiinvazivních chemoterapeutik. Základní strategií při vývoji nových antimikrobiálních léčiv je příprava analogů již používaných látek, u kterých by na základě studia vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou (SAR) došlo ke zlepšení terapeutického indexu, zvýšení aktivity vůči rezistentním kmenům či zlepšení biologické dostupnosti. Dalším řešením tohoto problému je syntéza látek s novou strukturou a novým mechanismem účinku [1-5].

Chinolin je možno pokládat za tzv. privilegovanou strukturu [6]. Deriváty 8-hydroxychinolinu vykazují významné antimikrobiální vlastnosti [7-9]. Předmětem této studie je příprava série substituovaných amidů kyseliny kynureninové (4-hydroxychinolin-2-karboxamidů), viz Schéma 1, s předpokládanou antimikrobiální aktivitou jako polohových izomerů 8-hydroxychinolinů. Deriváty esterů 4-oxo-1,4-dihydrochinolin-2-karboxylové kyseliny byly v minulosti popsány jako potenciální nesteroidní protizánětlivé látky [10], resp. isosterní *N*-substituované 4-aminochinolin-2-karboxyláty prokázaly účinky na CNS [11]. Nicméně dle výše uvedených studií SAR je v tomto projektu navrhovaná náhrada karboxylu amidovou skupinou zcela nová a unikátní. Amidová skupina simuluje peptidovou vazbu a sloučeniny s tímto fragmentem se mohou snadno vázat na enzymy a vyvolávat jejich změny [12], což je pro nové potenciální léčivo nesporná přednost. Jednoduché amidy jako malé molekuly vykazují široké spektrum biologických účinků od protiinfekčních a antineoplastických až po herbicidní aktivitu [13,14 a ref. zde].

Materiál a metodika

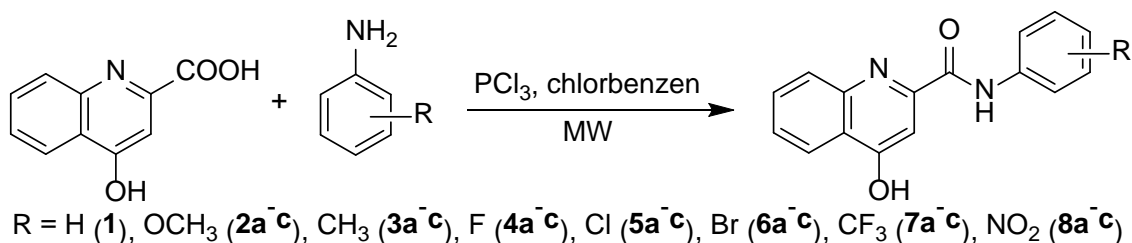
Všechny chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich nebo Merck. TLC bylo prováděno na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 40 F254 (Merck). Teploty tání byly stanoveny pomocí bodotávku Kofler HMK (Franz Kustner Nacht KG). IČ spektra byla měřena na Smart MIRacle™ ATR ZnSe Nicolet™ Impact 410 FT-IR spektrometru (Thermo Electron Corporation). Všechna ¹H- a ¹³C-NMR spektra byla měřena na Agilent 300 MHz VNMR spektrometru (299,96 MHz pro ¹H a 75,43 MHz pro ¹³C; Agilent Technologies) v DMSO-*d*₆. Hmotnostní spektra byla měřena pomocí LTQ Orbitrap Hybrid Mass Spectrometer (Thermo Electron Corporation) s přímým nástřikem do APCI zdroje (400 °C) v pozitivním modu.

Obecný postup syntézy 4-hydroxychinolin-2-karboxanilidů (**1–8c**): Kynureninová kyselina (5,3 mmol) a odpovídající anilin (5,3 mmol) byly suspendovány v bezvodém chlorbenzenu (30 ml), byl přidán chlorid fosforitý (2,65 mmol) a reakční směs byla zahřívána 20 min v mikrovlnném reaktoru při 500 W a 130 °C. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku, pevný zbytek promyt roztokem 2M HCl a surový produkt rekrystalizován.

Výsledky

Amidy kyseliny kynureninové byly syntetizovány na základě dříve popsané metodiky [13,14], viz Schéma 1, ale konkrétní reakční podmínky musely být optimalizovány vzhledem ke specifickým vlastnostem používané kynureninové kyseliny. Jednotlivé substituenty na anilinovém kruhu byly voleny dle zásad Toplissovy modifikace struktury. Struktura a čistota syntetizovaných látek byly ověřeny pomocí NMR, IČ a HRMS spektroskopie. Po charakterizaci byly látky předány na pracoviště, kde v současnosti probíhají hodnocení antibakteriální, antimykobakteriální a antifungální aktivity. Doplnkově je u všech studovaných látek hodnocena schopnost inhibice fotosyntetického přenosu elektronu (PET) v chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea* L), která odráží inhibici vývoje kyslíku. Ze získaných výsledků budou následně vyvozeny vztahy mezi strukturou a biologickou aktivitou.

Schéma 1. Struktura a syntéza 4-hydroxychinolin-2-karboxanilidů **1–8c**.



Závěr

Mikrovlnnou syntézou bylo připraveno celkem 22 nových 4-hydroxychinolin-2-karboxanilidů, které byly strukturně charakterizovány a předány na biologické hodnocení.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 37/2014/FAF.

Seznam literatury:

1. WHO: *World Health Statistics*. WHO Press, Geneva, 2014.
2. WHO: *Global Tuberculosis Report 2014*. WHO Press, Geneva, 2014.

3. WHO: *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*. WHO Press, Geneva, 2014.
4. WHO: *Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance 2001, up-date 2013*. WHO Press, Geneva, 2013.
5. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2011**, *55*, 3649–3660.
6. POLANSKI, J.; KURCZYK, A.; BAK A.; MUSIOL, R. Privileged structures – dream or reality: Preferential organization of azanaphthalene scaffold. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 1921–1945.
7. JAMPÍLEK, J.; DOLEŽAL, M.; KUNEŠ, J.; BUCHTA, V.; KRÁĽOVÁ, K. Quinaldine derivatives: Preparation and biological activity. *Medicinal Chemistry* **2005**, *1*, 591–599.
8. MUSIOL, R.; JAMPÍLEK, J.; BUCHTA, V.; NIEDBALA, H.; PODESZWA, B.; PALKA, A.; MAJERZ-MANIECKA, K.; OLEKSYN, B.; POLANSKI, J. Antifungal properties of new series of quinoline derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2006**, *14*, 3592–3598.
9. CIESLIK, W.; MUSIOL, R.; NYCZ, J.; JAMPÍLEK, J.; VEJSOVÁ, M.; WOLFF, M.; MACHURA, B.; POLANSKI, J. Contribution to investigation of antimicrobial activity of styrylquinolines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2012**, *20*, 6960–6968.
10. MAZZONI, O.; ESPOSITO, G.; DIURNO, M.V.; BRANCACCIO, D.; CAROTENUTO, A.; GRIECO, P.; NOVELLINO, E.; FILIPPELLI, W. Synthesis and pharmacological evaluation of some 4-oxo-quinoline-2-carboxylic acid derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents. *Archiv der Pharmazie* **2010**, *343*, 561–569.
11. STONE, T.W. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends in Pharmacological Sciences* **2000**, *21*, 149–154.
12. PATTABIRAMAN, V.R.; BODE, J.W. Rethinking amide bond synthesis. *Nature* **2011**, *480*, 471–479.
13. GONĚC, T.; KOS, J.; ZADRAŽILOVÁ, I.; PEŠKO, M.; KELTOŠOVÁ, S.; TENGLER, J.; BOBÁL, P.; KOLLÁR, P.; ČÍŽEK, A.; KRÁĽOVÁ, K.; JAMPÍLEK, J. Antimycobacterial and herbicidal activity of ring-substituted 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 6531–6541.
14. GONĚC, T.; KOS, J.; NEVIN, E.; GOVENDER, R.; PEŠKO, M.; TENGLER, J.; KUSHKEVYCH, I.; ORAVEC, M.; KOLLÁR, P.; O'MAHONY, J.; KRÁĽOVÁ, K.; COFFEY, A.; JAMPÍLEK, J. Preparation and biological properties of ring-substituted naphthalene-1-carboxanilides. *Molecules* **2014**, *19*, 10386–10409.

Syntéza potenciálních léčiv s vlivem na CNS s fragmentem

omega-laktamu a *in-vitro* hodnocení

Jakub Káňa, Irena Macků, Oldřich Farsa

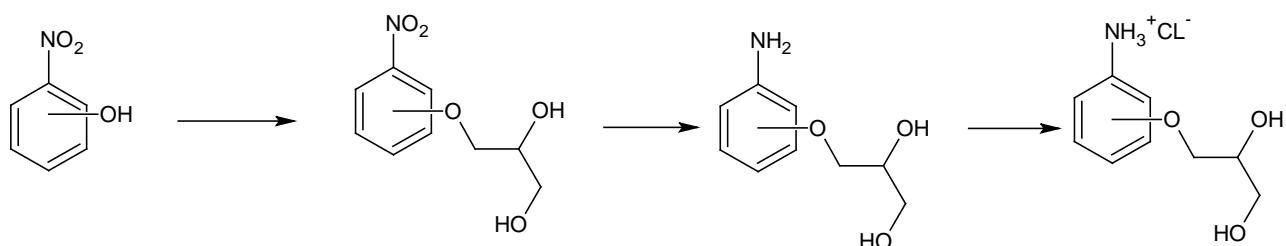
Ústav chemických léčiv, Faf, VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno

Úvod

Peptidové neuromediátory v CNS, které se podílí na tvorbě a přenosu vzruchů, štěpí mimo jiné i aminopeptidasa-N, a domníváme se, že jedním z možných mechanismů fungování kognitiv je inhibice aminopeptidas včetně aminopeptidasy-N, čímž se docílí vyšších hladin neuropeptidů. Aminopeptidasu je možné inhibovat i některými aminokyselinami, např. prolinem, jemuž jsou omega-laktamy strukturálně podobné a lze tedy očekávat, že obměnami tohoto skeletu se podaří získat účinný inhibitor Aminopeptidasy-N¹.

Materiál a metodika

Nitrofenoláty sodné byly alkylovány 3-chloropropan-1,2-diolem. Po rozpuštění sodíku v propanolu byl přidán příslušný nitrofenol a chlorpropandiol, směs byla udržována ve varu pod zpětným chladičem a argonovou atmosférou. Výsledný produkt byl překrystalizován z toluenu. Hydrogenace byla provedena v methanolu s přidávkou palladia na aktivním uhlí, vodík byl dodán ze zásobní láhve s přidávným ventilem, kde tlak byl zajištěn vhodným polohováním vodního sloupce. Pro vytvoření hydrochloridu byl použit nadbytek methanolického chlorovodíku. Nové sloučeniny byly testovány *in-vitro*. Byly připraveny vzorky obsahující aminopeptidasu-N, mikrosomální enzym z prasečích ledvin (Sigma-Aldrich), 4mM L-leucyl-p-nitroanilid jako substrát a měnící se koncentrace potenciálních inhibitorů, vše v 0,01M TRIS pufru o pH 7,5 o celkovém objemu 300μl. Směs se nechala inkubovat 45 minut při teplotě 37°C a poté byla při 405 nm na UV/Vis spektrofotometru proměřena absorbance vzorků. Z naměřených dat byla pomocí MS Excel a GraFit 5 (Erithacus Software) spočtena hodnota IC₅₀. Pro srovnání IC₅₀ bestatinu je 0,67 mmol/dm³.



Výsledky:

Při syntéze bylo připraveno celkem 9 sloučenin všechny otestovány *in-vitro* na potenciální aktivitu, přičemž u *o-,m-,p*-aminofenoxypropan-1,2-diolů ve formě rozpustných hydrochloridů byla stanovena IC₅₀: 1,4; 1,3 a 1,7 mmol/dm³, sloučeniny však zatím neobsahují omega-laktamový fragment.

Závěr:

Byly připraveny 3 sloučeniny vykazující inhibiční aktivitu na aminopeptidasu-N, pravděpodobně kovalentní vazbou na aktivní místo enzymu, práce poskytla podklady pro možnou strukturu inhibitorů aminopeptidasy-N odlišné od struktury prolinu.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 60/2014/FAF.

Seznam literatury:

¹BAUVOIS, B. AND D. DAUZONNE, AMINOPEPTIDASE-N/CD13 (EC 3.4.11.2) INHIBITORS: CHEMISTRY, BIOLOGICAL EVALUATIONS, AND THERAPEUTIC PROSPECTS. MEDICINAL RESEARCH REVIEWS, 88-130

Hodnotenie antiproliferačných účinkov novo substituovaných chinazolínových derivátov na ľudských nádorových bunkách.

Stanislava Keltošová¹, Peter Kollár¹

Ústav humánnej farmakológie a toxikológie, Farmaceutická fakulta, Veterinárna a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Vážnym problémom v rámci terapie onkologických ochorení je neadekvátna terapeutická odpoveď, ktorá je spôsobená rezistenciou organizmu na používané chemoterapeutiká. Práve to je dôvodom neustálej snahy vyhľadávať nové protinádorové účinné liečivá.

Na Ústave chemických liečiv Farmaceutickej fakulty VFU v Brne bola syntetizovaná nová skupina 4-aminoaryl-2-styrylchinazolínov. Chinazolíny sa vyznačujú širokým spektrom biologických účinkov – antibakteriálnymi, antimalarickými, antiflogistickými, ai. (1, 2, 3). Mnoho liečiv z tejto skupiny sa používa v rámci protinádorovej terapie ako inhibítory tyrozínkináz (TKI) – napr. gefitinib, lapatinib, niektoré sú inhibítory dihydrofolát reduktázy (DHFRI), niektoré interagujú s tubulínom, iné ovplyvňujú bunkový cyklus alebo pôsobia ako indukory apoptózy (4). Cieľom práce bolo zistiť *in vitro* antiproliferačnú/cytotoxickú aktivitu troch nových 4-aminoaryl-2-styrylchinazolínov (JF-derivátov) na THP-1 bunkovú líniu, analyzovať bunkový cyklus prietokovou cytometriou a zistiť spôsob bunkovej smrti indukovanej danými látkami.

Materiál a metódika

K realizácii projektu bola použitá THP-1 línia ľudských monocytárnych leukemických buniek. Testovanými látkami boli 4-aminoaryl-2-styrylchinazolínové deriváty (JF-131, JF-132, JF-134). Ako rozpúšťadlo bolo použité DMSO (dimethylsulfoxid), ktorého výsledná koncentrácia pri aplikácii látok k bunkám nikdy nepresiahla 0,5 %.

Antiproliferačný účinok bol zisťovaný WST-1 analýzou a priamym počítaním buniek. Na WST-1 analýzu boli použité komerčne dostupné kity presne podľa pokynov výrobcu (Roche Applied Science, Nemecko). Metóda priameho počítania bola využitá aj na hodnotenie viability buniek – stanovenie cytotoxicity testovaných látok. Počítanie buniek (v hemocytometri) nasledovalo po

farbení erythrosinom B – viabilné bunky (ostávajú nezafarbené) a usmrtené bunky (červeno sfarbené).

Na hodnotenie vplyvu látok na bunkový cyklus a určenie typu bunkovej smrti indukovanej látkami bol použitý prietokový cytometer Cell Lab Quanta (Beckman Coulter, USA). Pre konečnú analýzu dát z prietokového cytometru boli použité software MultiCycle AV (Phoenix Flow Systems, USA) a Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter, USA). Na analýzu typu bunkovej smrti prietokovým cytometrom bol použitý Annexin V kit.

Výsledky sú priemerné hodnoty troch nezávislých experimentov a získané dáta boli podrobené štatistickej analýze (neparametrický one-way ANOVA test v kombinácii s Dunnettovým testom).

Výsledky

Z troch derivátov (JF-131, JF-132, JF-134), testovaných v koncentračnom rozsahu 0,5 – 30 $\mu\text{mol/l}$, vykázal antiproliferačnú aktivitu iba JF-131. Hodnoty IC_{50} boli v rozsahu od 9,8 do 12,5 $\mu\text{mol/l}$ v rôznych časoch pôsobenia látky (24, 48 a 72h). Výsledky sú zhrnuté v tab. 1. V rozmedzí efektívnych koncentrácií vykazoval derivát JF-131 cytotoxické účinky, ktoré sa prejavili poklesom viability buniek. Efekt bol časovo a koncentračne závislý.

Tab. 1: Hodnoty IC_{50} JF-derivátov určené WST-1 analýzou a priamym počítaním.

	24 hod	48 hod	72 hod
	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)		
WST-1	11,4 \pm 0,3	11,3 \pm 0,3	11,1 \pm 0,2
Hemocytometer	12,5 \pm 0,8	11,1 \pm 0,3	9,8 \pm 0,7

Uvedené IC_{50} sú priemery \pm SD z troch nezávislých experimentov.

Výsledok analýzy bunkového cyklu (BC) ukazuje, že derivát JF-131 ovplyvňuje distribúciu buniek v jednotlivých fázach BC a zároveň sa od určitých koncentrácií javí ako potenciálny induktor apoptózy, čo bolo dokázané aj farbením s využitím kitu Annexin V.

Tab. 2: Vplyv derivátu JF-131 na profil bunkového cyklu THP-1 buniek po 24 hodinách.

	Kontrola	8 µmol/l	10 µmol/l	12 µmol/l	15 µmol/l	PC
G ₀ /G ₁	46	51	56	51	43	
S	31	25	21	19	14	
G ₂ /M	23	24	23	30	43	
sub-G ₁	2	1,5	6	12	20	38

PC = pozitívna kontrola (cis-Pt v koncentrácii 10 µg/ml)

Práce byla financována v rámci projektu IGA 44/2014/FAF.

Zoznam literatúry:

1. KUYPER, L. F. et al. High-affinity inhibitors of dihydrofolate reductase: antimicrobial and anticancer activities of 7,8-dialkyl-1,3-diaminopyrrolo[3,2-f]quinazolines with small molecular size. *J Med Chem.* 1996, 39(4): 892-903.
2. VERHAEGHE, P. et al. Synthesis and antiplasmodial activity of new 4-aryl-2-trichloromethylquinazolines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2008, 18(1): 396-401.
3. ALAGARSAMY, V. et al. Design and synthesis of 3-(4-Ethylphenyl)-2-substituted amino-3 H-quinazolin-4-ones as a novel class of analgesic and anti-inflammatory agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2008, 23(6): 839-847.
4. MORENO, E. et al. Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: Synthesis and study of their potential cytotoxic activity in vitro. *Eur J Med Chem.* 2012, 47: 283-298.

Polymorfismy exonové oblasti genu pro TNFRSF1B, jejich asociace s efektivitou biologické léčby infliximabem.

Michal Kolorz, Eva Dvořáková

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

Úvod

Crohnova choroba (CD) představuje chronické zánětlivé onemocnění, jehož prevalence vykazuje v posledních desetiletích vysoký nárůst a to především v ekonomicky vyspělých zemích. Perspektivním farmakologickým přístupem v terapii CD je biologická léčba využívající monoklonální protilátky. Jako první z této skupiny byl pro terapii CD registrován infliximab. Jeho účinnost byla v dlouhodobých studiích potvrzena u 70 % pacientů, u ostatních pacientů však nedochází k navození remise onemocnění¹. Z tohoto důvodu jsou hledány diagnostické postupy umožňující identifikovat pacienta, u kterého je vysoká, či naopak nízká pravděpodobnost terapeutické účinnosti^{2,3}. Zdá se, že určitý predikční potenciál by mohla mít detekce genových polymorfismů ovlivňujících expresi a aktivitu proteinů účastnících se procesů signalizace TNF-alfa a ovlivňujících tak vlastní účinek infliximabu.

Biologická aktivita TNF-alfa je zprostředkována jeho interakcí s TNF-receptory (TNFR). Existují dvě základní rodiny těchto receptorů (A, B), jejichž aktivace vede k rozdílným biologickým účinkům. Interakce TNF-alfa s receptorem TNFRA vede k expresi dalších pro-zánětlivých cytokinů, zatímco aktivace receptoru TNFRB vede k indukci apoptózy a celkovému útlumu zánětlivé reakce. Souvislost mezi mechanismem účinku infliximabu a signální dráhou zprostředkovanou TNF-alfa spočívá právě v inhibici exprese těchto pro-zánětlivých cytokinů a zároveň v indukci apoptózy via TNFRB⁴. Tato práce se zaměřuje na polymorfismy v oblasti kódující exon 3 a 4 *TNFR1B*, které mohou ovlivnit nativní konformaci proteinové domény, narušit proces interakce s receptorovým ligandem a ovlivnit tak schopnost indukce apoptózy. Přítomnost polymorfismů v těchto exonových oblastech pak vede k translaci odlišné aminokyselinové sekvence, dochází k narušení vzájemných interakcí s TNF-alfa a zároveň se posiluje, či oslabuje schopnost infliximabu indukovat apoptózu⁵.

Materiál a metodika

V této studii bylo genotypizováno 109 pacientů s diagnózou CD, u kterých byl indikován infliximab. Všichni jedinci vstupující do studie vyslovili svůj souhlas s genotypizací podpisem

Informovaného souhlasu. Studie byla schválena etickou komisí (FN Ostrava, č.j. 289/2013). Efektivita terapie byla hodnocena po deseti týdnech podávání infliximabu. Na základě klinických kritérií (změna CDAI, endoskopické vyšetření) byli pacienti rozděleni na skupinu primárních responderů (n=93) a skupinu primárních non-responderů (n=16). Mezi pacienty- respondery, byli dále rozlišováni pacienti s klinickou i morfologickou odpovědí (n=47) a pacienti s klinickou odpovědí, u kterých však nedošlo k morfologickému zhojení lézí (n=46). Pro detekci genových polymorfismů jsme použili metodu PCR doplněnou o sekvenování. Navrhli jsme sekvence primerů a po následné optimalizaci jsme vytvořili PCR metodiku pro amplifikaci genomové DNA v oblasti 3. a 4. exonu genu *TNFRSF1B*. V rámci genové sekvence byly vybrány 3 oblasti, které kódují primární strukturu proteinu v oblastech významných pro vazbu ligandu či aminokyseliny významným způsobem ovlivňující sekundární a terciární strukturu. Celkem jsme navrhli 3 PCR reakce, zahrnující 3 různé oblasti a určili sekvence části genu o velikosti cca 1200bp. Produkt amplifikace byl verifikován gelovou elektroforézou a po přečištění byl podstoupen sekvenování. Za použití této metody jsme byli schopni detekovat alelovou variantu u 50 známých SNP. Výsledky byly statisticky hodnoceny Fisherovým testem a výpočtem Odds ratio. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Výsledky

Z celkového počtu 109 subjektů hodnocení bylo u 93 jedinců (85 %) dosaženo terapeutického efektu. Mezi skupinami responderů a non-responderů nebyla nalezena signifikantní souvislost mezi sledovanými klinickými parametry onemocnění a efektivitou terapie infliximabem ani mezi těmito parametry a výskytem sledovaných variantních alel. Celkem jsme sledovali genotyp u 50 známých SNP. Ve většině případů se jednalo o výskyt pouze standardní alely. Ve sledovaném vzorku populace byl popsán výskyt (frekvence) variantních alel polymorfismů rs1768642 (43,1 %), rs1061622 (43,1 %), rs5746026 (2,8 %), rs5746016 (10,1 %), rs472093 (35,8 %), rs498906 (44 %), rs653667 (67 %) a rs150721544 (1,8 %). Prokázali jsme, že variantní alely rs1768642 a rs1061622 se vyskytují vždy ve vazbě. Analýza souborů subjektů hodnocení na základě terapeutické efektivity terapie ukázala, že u pacientů-nositelů variantní alely rs1768642 a rs1061622 častěji dochází k selhání terapie ($P=0,0486$). Taktéž nositelé variantní alely rs498906 jsou signifikantně častěji rezistentní k infliximabu ($P=0,0486$).

Diskuze a závěr

Frekvence výskytu variantních alel odpovídají frekvencím jejich výskytu u kavkazské populace. Variantní alely *TNFRSF1B* rs1768642 a rs1061622 se vyskytovaly ve sledovaném souboru ve vazbě s frekvencí 43,1 %. U nositelů těchto alel dochází také častěji k selhání terapie ($P=0,0486$). Zmiňované polymorfismy leží v oblasti 3. exonu v těsné blízkosti sekvence kódující

místo štěpení TACE, enzymem, který zajišťuje odštěpení extracelulární domény receptoru a tím funkce jeho solubilní formy (např. pro-apoptický efekt). Je možno předpokládat, že nukleotidová záměna v této oblasti, vedoucí ke změně primární struktury aminokyselinového řetězce také ovlivní jeho sekundární a terciární strukturu a tím omezí přístup TACE ke štěpnému místu. Takto by bylo možno vysvětlit sníženou schopnost pro-apoptické indukce u zánětlivých buněk a tím i sníženou účinnost infliximabu u nositelů variantního genotypu. Variantní alela rs498906 byla taktéž v našem souboru popsána častěji u pacientů nereagujících na terapii ($P=0,0486$). V tomto případě je polymorfismus přítomen v intronové oblasti těsně sousedící s exonem 4. Nelze tedy předpokládat přímý vliv na strukturu proteinu receptoru. Polymorfismy v oblasti spojení intron/exon však často ovlivňují nativní protein (kvalitativně či kvantitativně) pozměněným splicingem v rámci procesu transkripce a translace. Výskyt ostatních polymorfismů, u kterých byla nalezena v testovaném souboru variantní forma genu, byl velmi nízký, což neumožňovalo statistickou analýzu. Prokázali jsme tedy, že výskyt 3 různých polymorfismů v genu pro TNFR1B souvisí s efektivitou terapie infliximabem. Pro jednoznačné vymezení možných genetických markerů účinnosti terapie infliximabem je bezesporu potřeba dalších studií na velkém počtu pacientů.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 42/2014/FAF.

Seznam literatury

- [1] COENEN, M.J., TOONEN, E.J., SCHEFFER, H., RADSTAKE, T.R., BARRERA, P., FRANKE, B.: Pharmacogenetics of anti-TNF treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2007, 8, 761-773.
- [2] STEENHOLDT, C., ENEVOLD, C., AINSWORTH, M.A., BRYNSKOV, J., THOMSEN, O.Ø., BENDTZEN, K.: Genetic polymorphisms of tumour necrosis factor receptor superfamily 1b and fas ligand are associated with clinical efficacy and/or acute severe infusion reactions to infliximab in Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012, 36, 650-659.
- [3] JONES, J., KENYON, C., SEOW, C.H.: Predictors of response to anti-tumour necrosis factor therapy in patients with Crohn's disease. *European Gastroenterology & Hepatology Review*. 2011, 7, 21-25.
- [4] MASCHERETTI, S., HAMPE, J., KÜHBACHER, T., HERFARTH, H., KRAWCZAK, M., FÖLSCH, U.R., SCHREIBER, S.: Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. *Pharmacogenomics Journal*. 2002, 2, 127-136.

[5] MUKAI, Y., SHIBATA, H., NAKAMURA, T., YOSHIOKA, Y., ABE, Y., NOMURA, T., TANIAI, M., OHTA, T., IKEMIZU, S., NAKAGAWA, S., TSUNODA, S., KAMADA, H., YAMAGATA, Y., TSUTSUMI, Y.: Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) an its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. *Journal of Molecular Biology*. 2009, 30, 1221-1229.

Tvorba biorelevantní disoluční metody pro kontrolu kvality tablet s obsahem warfarinu

Jan Muselík, Aleš Franc, Daniela Majerčíková, Veronika Ďurovcová, Ivana Lukášová, Dana Sabadková

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

Úvod

Byla navržena rozlišující a biorelevantní disoluční metoda pro hodnocení léků s okamžitým uvolňováním léčivé látky ve formě solí slabých kyselin, které z hlediska jejich špatné rozpustnosti obvykle nelze testovat v kyselém žaludečním prostředí. Jedná se o bifázickou metodu, skládající se ze spodní vrstvy, simulující kyselé žaludeční prostředí, a vrchní oktanolové vrstvy, simulující membránové lipidy. Na tabletách s rozdílnou koncentrací modelového léčiva klatrátu sodné soli warfarinu (1 mg a 10 mg) s odlišnou distribucí velikosti částic, se za použití faktoru podobnosti f_2 a rozdílnosti f_1 , podařilo prokázat statisticky významný vliv těchto parametrů na disoluční profil. Tím se potvrdil i rozlišující charakter metody. Popsaná bifázická disoluční metoda je využitelná při vývoji lékové formy včetně odhadu IVIVC (In vivo – In vitro Correlation), při klinickém hodnocení šarží a při rutinním hodnocení v rámci QC (Quality Control).

Materiál a metodika

Příprava tablet

Za účelem vývoje biorelevantní disoluční metody byly ze společné směsi připraveny metodou přímého lisování tablety s obsahem API 1 mg a 10 mg. Od každé síly tablet byly připraveny dvě šarže, které se lišily rozdílnou distribucí velikosti částic API, a to šarže s obsahem API 1 mg nebo 10 mg a úzkou distribucí částic (šarže W1A a W10A) nebo širokou distribucí velikosti částic (šarže W1B a W10B). Složení tabletových směsí a postup přípravy vychází z patentu VFU Brno [1], a literárních zdrojů [2].

Složení tabletových směsí v procentech bylo: 70 % hydrogenfosforečnanu vápenatého (Di-cafos; Budenheim KG), 25 % mikrokryalické celulosy (Avicel PH 101; FMC BioPolymer), 2 % sodné soli kroskarmelosy (Ac-Di-Sol; FMC BioPolymer), 1 % stearanu hořečnatého (Peter Greven) a 2 % warfarinu sodné soli klatrátu ($D_{90}=10,3 \mu\text{m}$ nebo $D_{90}=234,3 \mu\text{m}$). Jednotlivé látky byly přesítovány sítem o velikosti oka 250 mikronů a míseny 10 minut bez stearanu hořečnatého, který bylo přidán následně a mísení pokračovalo dalších 5 minut. Mísení probíhalo v homogenizačním zařízení Turbula (T2C, Switzerland) rychlostí 40 ot./min. Hmotnost jedné šarže byla 500,0 g.

Tablety s obsahem 1 mg měly hmotnost 54,2 mg, byly ploché o průměru 5 mm, tvrdost byla okolo 100 N. Tablety s obsahem 10 mg měly hmotnost 542,0 mg, byly ploché o průměru 10 mm, tvrdost

byla okolo 100 N. Všechny šarže byly vyrobeny s využitím ekcentrického lisu EK0 (Korsch EK0, Germany).

Podmínky zkoušky disoluce

Disoluce probíhaly na zařízení SOTAX (AT 7 Donau Lab, Switzerland). Bifázická disoluce byla provedena s použitím 900 ml 0,1 M HCl a 70,0 g 1-oktanolu při teplotě 37.0 ± 0.5 °C, s využitím pádel při 50 ot./min. Disoluční médium (organická fáze) bylo odebíráno po 1, 2, 4 a 8 hodinách. Vzorky z disolučních testů byly zfiltrány přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a následně analyzovány pomocí kapalinové chromatografie. Výsledky jsou udávány jako průměr a směrodatná odchylka z 6 tablet každé šarže.

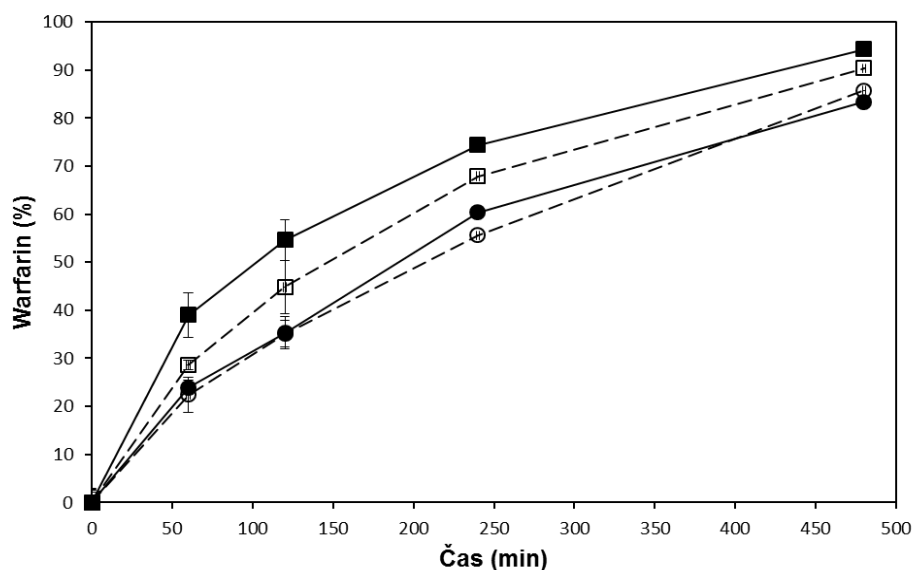
Výsledky

Za účelem vývoje rozlišující a biorelevantní disoluční metody, vhodné zejména k hodnocení léčiv charakteru solí slabých kyselin, byly připraveny tablety s obsahem klathrátu sodné soli warfarinu o nejnižší a nejvyšší koncentraci účinné látky, v níž se komerčně vyskytuje (1 mg nebo 10 mg). Vzhledem k tomu, že fyzikální charakter API může ovlivnit farmakokinetiku léčiva, byla jako kvalitativní parametr zvolena rozdílná distribuce velikosti částic účinné látky ($D_{90} = 10,3$ μm nebo 234,3 μm). Tyto proměnné byly zvoleny s ohledem na to, že optimální disoluční metoda by měla postihnout změny v kvalitě přípravku a zároveň být použitelná pro celou škálu jeho sil.

U léčiv ve formě solí slabých kyselin, jejichž kyselá forma je špatně rozpustná ve vodě, se jeví jako optimální využití bifázické disoluční metody, přičemž podmínky zkoušky by měly co nejvíce simulovat reálné podmínky v gastrointestinálním traktu. Z tohoto důvodu byla zvolena jako vodná fáze 0,1 M HCl (simulace prostředí žaludku) a jako organická fáze 1-oktanol (simulace prostupu přes biologické bariéry). Další podmínky zkoušky disoluce jako objem vodné fáze, teplota nebo rychlost otáček pádel byly převzaty z článku USP pro disoluce sodné soli warfarinu ve vodě (USP <29>). Objem organické fáze byl zvolen co nejmenší, tak aby tloušťka organické vrstvy umožňovala bezproblémový odběr vzorků a aby byly v průběhu zkoušky disoluce splněny „sink podmínky“ pro všechny síly testovaných tablet.

Při pohledu na disoluční křivky pořízené bifázickou metodou lze pozorovat, že disoluční profily se navzájem liší. Při použití faktoru podobnosti f_2 a rozdílnosti f_1 ke statistickému posouzení rozdílnosti těchto disolučních profilů bylo zjištěno, že statisticky významně se liší disoluční profily tablet s rozdílným obsahem účinné látky, pokud obsahují API s širokou distribucí velikosti částic ($f_2=40,9$; $f_1=29,3$). Disoluční profily tablet s rozdílným obsahem účinné látky, ale s obsahem API s úzkou distribucí velikosti částic jsou statisticky odlišné na základě srovnání vypočtené hodnoty f_1 ($f_1=16,5$). Na základě výpočtu f_2 nebyla statisticky významná odlišnost těchto profilů prokázána,

hodnota f_2 se však blíží kritické hodnotě 50. Z uvedeného vyplývá, že za zvolených podmínek bifázické zkoušky disoluce má tato metoda rozlišující charakter s ohledem na obsah účinné látky v tabletě. Při statistickém porovnání disolučních profilů tablet se stejným obsahem API a s rozdílnou distribucí velikosti částic léčiva byla na základě vypočtených hodnot f_2 a f_1 zjištěna podobnost těchto disolučních profilů. Nicméně z číselných hodnot f_2 a f_1 lze pozorovat, že vliv distribuce velikosti částic na disoluční profil má větší efekt u tablet s vyšším obsahem API ($f_2=54,5$; $f_1=11,7$), než u tablet s nižším obsahem API ($f_2=76,7$; $f_1=4,3$). Z uvedeného vyplývá, že rozdílný obsah API v jednotlivých tabletách vede k větším rozdílům v disoluci než kvalita resp. velikost částic použité substance.



Obrázek 1. Disoluční profily tablet s obsahem warfarinu v biorelevantním médiu; (□) W10A, (○) W1A, (■) W10B, (●) W1B

Práce byla financována v rámci projektu IGA 55/2014/FAF.

Seznam literatury:

1. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. Způsob přípravy pevné lékové formy se sodnou solí warfarinu ve formě klathrátu izopropanolu. Vynálezci: Aleš FRANC a Jan Muselík. Česká republika. Patentový spis CZ 304136 B6. 2.10.2013.
2. MUSELÍK, Jan, FRANC, Aleš, DOLEŽEL, Petr, GONĚC, Roman, KRONDLOVÁ, Anna, LUKÁŠOVÁ, Ivana. Influence of process parameters on content uniformity of a low dose active pharmaceutical ingredient in a tablet formulation according to GMP. *Acta Pharmaceutica*. 2014, **64**(3), 355-367. ISSN 1846-9558.

Syntéza a ověření katalytické aktivity chirálních bifunkčních thiomocovinových (CBTU) a selenomocovinových organokatalyzátorů u asymetrické Henryho adice.

Jan Otevřel, Lucie Brunclíková, Pavel Bobál

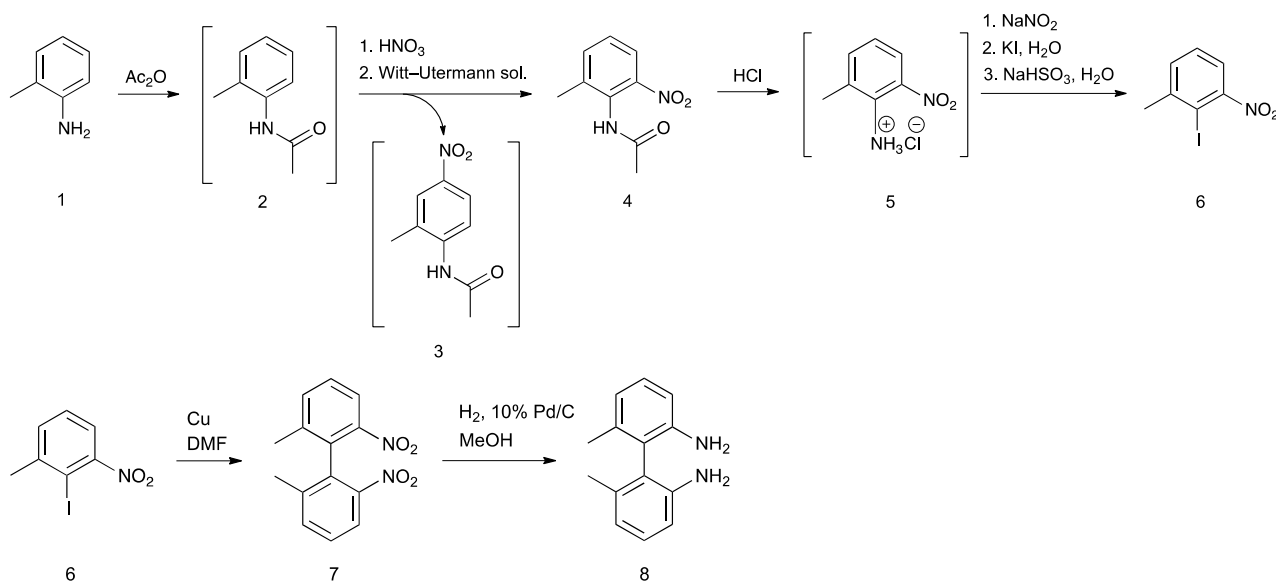
Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Henryho (nitroaldolová) reakce je adice nitroalkanu na karbonylovou sloučeninu vedoucí ke vzniku β -nitroalkoholu, který je eduktem při přípravě řady organických molekul.^[1] Díky možnosti přípravy opticky obohacených β -nitroalkoholů přitahuje asymetrická Henryho reakce pozornost organických chemiků a stala se předmětem jejich intenzivního studia.^[2] Jednou z možností asymetrického vedení Henryho reakce je použití chirálního bifunkčního thiomocovinového organokatalyzátoru.^[2-4] V asymetrické organokatalýze Henryho reakce dosáhly značné účinnosti organokatalyzátory obsahující bis(thiomocovinový) fragment.^[3,4] Nevýhodou současných organokatalyzátorů je však použití chirálních fragmentů, jejichž příprava je příliš obtížná a mnohdy vychází ze silně karcinogenních výchozích látek, dalším nedostatkem je složitá resoluce a nemožnost snadné chemické obměny chirálního skeletu. Právě tyto nevýhody překonávají chirální bifenyly, kterým se v chemické literatuře doposud nevěnovala velká pozornost.

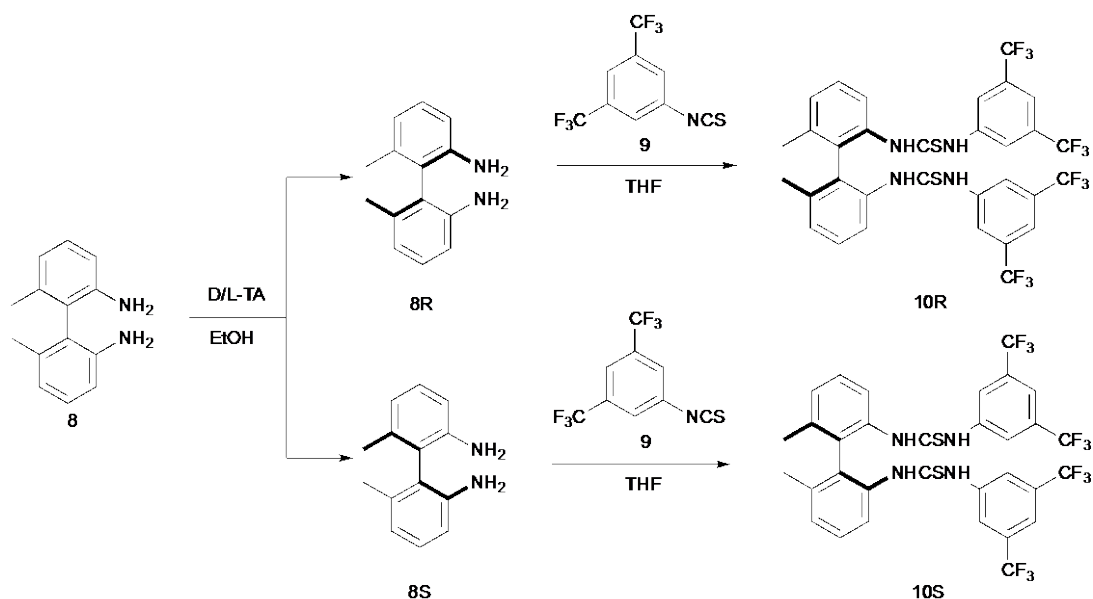
Materiál a metodika

Dva enantiomery organokatalyzátoru (10R a 10S) byly získány lineární syntézou ilustrovanou na následujících schématech.



Jako výchozí látka byl zvolen 2-methylanilin (1), který po acetylaci a nitraci poskytl dva regioisomery 3 a 4. Separace probíhala na základě rozdílné rozpustnosti ve Wittově–Utermannově roztoku, ve kterém se isomer 4 rozpouští, zatímco isomer 3 nikoli. Po hydrolyze amidické funkce

(5), diazotaci a jodaci (6), následovala Ullmanova reakce, která vedla ke tvorbě bifenyly (7). Redukce bifenyly (7) vodíkem na palladiu poskytla diamin (8), jenž se podrobil resoluci s *D*- nebo



L-vinnou kyselinou a reakci s isothiokyanátem (9). U připravených sloučenin byla naměřena spektrální data, optické otáčivosti a teploty tání (sekce výsledků). Podle získaných hodnot jsou oba enantiomery chirálního bifunkčního bis(thioamocovinového) organokatalyzátoru připraveny ve více než 99% enantiomerním přebytku, což ilustrují chromatografické záznamy níže. V současné době se pracuje na optimalizaci podmínek organokatalyzované asymetrické Henryho reakce a na modifikaci struktury katalyzátorů za účelem maximalizace jejich katalytické aktivity.

Výsledky

10RAC: $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 1,98 (s, 6H); 7,27 (d, $J = 6$ Hz, 2H); 7,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 2 H); 7,53 (d, $J = 9$ Hz, 2 H); 7,71 (s, 2 H); 8,00 (s, 4 H); 9,15 (s, 2 H); 9,95 (s, 2 H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ : 19,79; 117,3; 123,14 (q, $^1J_{\text{FC}} = 271,5$ Hz); 123,76 (q, $^4J_{\text{FC}} = 1,5$ Hz); 125,50 (q, $^3J_{\text{FC}} = 3$ Hz); 126,18; 127,92; 129,87 (q, $^2J_{\text{FC}} = 33$ Hz); 132,78; 136,74; 137,69; 141,25; 179,93.

IČ (Zn/Se ATR, cm^{-1}): 3151 w , 2968 w , 1520 m , 1466 w , 1377 m , 1344 w , 1274 s , 1170 m , 1127 s , 995 w , 889 m , 700 w , 681 m .

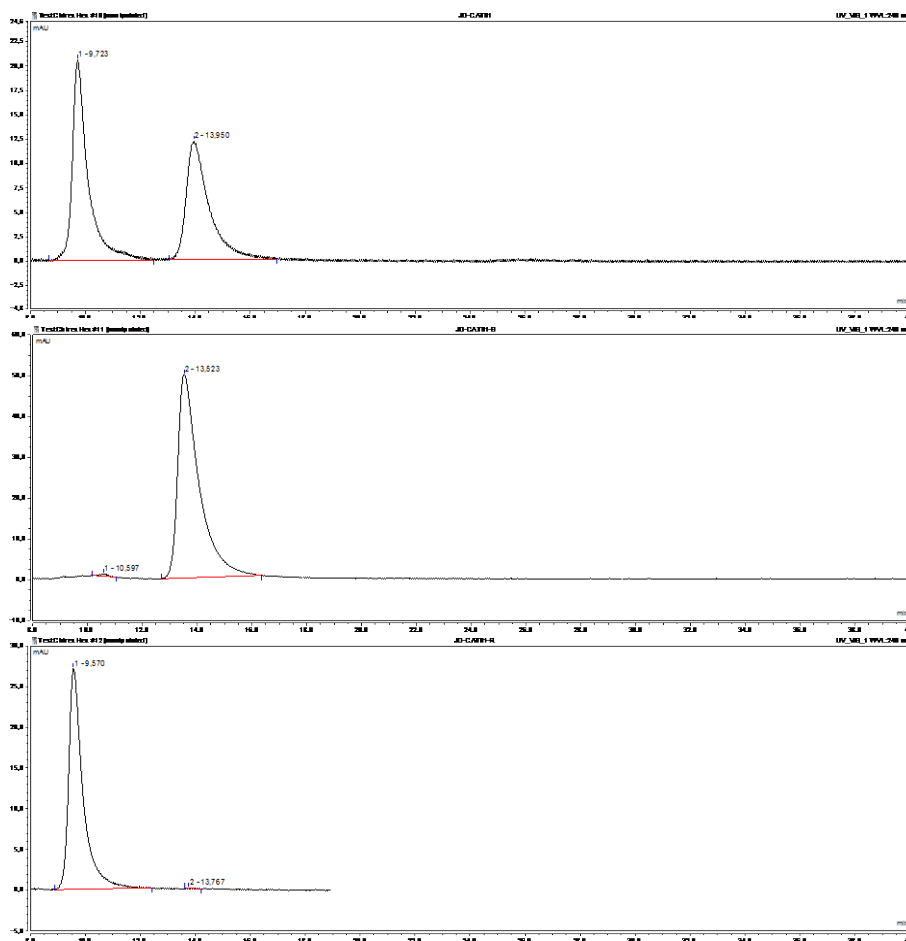
LC MS (ESI) m/z 755,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

10S: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -137$ ($c = 1,00$, Me_2CO), t. t. 114–116 °C.

10R: $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +136$ ($c = 1,00$, Me_2CO), t. t. 112–114 °C.

Následující záznamy vizualizují výsledky chirální separace na HPLC (kolona Chirex, 20 °C, průtok 1 ml/min, isokratická eluce $^i\text{PrOH-HX}$, 20 : 80).

10RAC ($t_{\text{R}1} = 9,72$ min; $t_{\text{R}2} = 13,95$ min), 10S ($t_{\text{R}} = 13,52$ min) a 10R ($t_{\text{R}} = 9,57$ min).



Tato práce byla financovaná grantem IGA č. 50/2014/FaF.

Seznam literatury

- [1]. Henry, L. Nitro-Alcohols. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 1895, 120, 1265–1268.
- [2]. a) Palomo, C. et al. Recent Advances in the Catalytic Asymmetric Nitroaldol (Henry) Reaction. *Eur. J. Org Chem.* 2007, 16, 2561–2574. b) Alvarez-Casao, Y. et al. Organocatalytic Enantioselective Henry Reactions. *Symmetry.* 2011, 3, 220–245.
- [3]. a) Sohtome, Y.; Nagasawa, K. The Design of Chiral Double Hydrogen Bonding Networks and Their Applications to Catalytic Asymmetric Carbon–Carbon and Carbon–Oxygen Bond-Forming Reactions. *Synlett.* 2010, X, 000A–000V. b) Sohtome, Y.; Nagasawa, K. Dynamic Asymmetric Organocatalysis: Cooperative Effects of Weak Interactions and Conformational Flexibility in Asymmetric Organocatalysis. *Chem. Commun.* 2012, 48, 7777–7789.
- [4]. a) Liu, X.-G. et al. Development of Axially Chiral Bis(arylthiourea)-Based Organocatalysts and Their Application in the Enantioselective Henry Reaction. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2007, 18, 2773–2781. b) Kitagaki, S. et al. Planar Chiral [2.2]Paracyclophane-Based Bis(thiourea) Catalyst: Application to Asymmetric Henry Reaction. *Chem. Commun.* 2013, 49, 4030–4032.

SEPARACE ISOMERŮ INOSITOLU POMOCÍ HPLC V MÓDU HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ CHROMATOGRAFIE (HILIC)

S DETEKTOREM ELSD

Jiří Pazourek, René Rak

Ústav chemických léčiv, Fakulta farmaceutická, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Inositol (cyklohexan-1,2,3,4,5,6-hexol) je znám pod řadou označení: *meso*-inositol, *i*-inositol, faseomannitol, nucitol, Bios I, vitamín B nebo B8. V těle se vyskytuje vázaný na fosfolipidy do komplexů označovaných jako fosfatidyl-inositoly, které působí jako vnitřní signál (někdy označované jako druhý posel), ovlivňují významně i aktivitu nervových buněk. Nejběžnějším isomerem je *myo*-inositol; další biologicky aktivní jsou *D-chiro*-inositol, *epi*-inositol, *scyllo*-inositol. *Myo*-inositol je složkou některých potravinových doplňků, přidává se také do kojeneckých výživ.

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*, HILIC) se v současnosti používá pro separaci (nederivatizovaných) sacharidů, obvykle na aminopropylsilylové stacionární fázi s mobilní fází acetonitril/voda. V tomto případě však byla použita kolona Lichrosphere100 DIOL (Merck), detekce byla prováděna detektorem ELSD (*Evaporative Light Scattering Detector*) [1].

Materiál a metodika

Experimentální podmínky

Kolona: Merck LiChrospher100 DIOL 125x4 mm; 5 µm; $V_0=1,6$ mL. Mobilní fáze: isokratická eluce – acetonitril a voda 90% + 10% (v/v).

Systém HPLC Young Lin YL 9100 (Soul, Jižní Korea). Ovládání přístroje bylo realizováno pomocí software Clarity 3.0.6 (DataApex, CZ), v tomto programu byly také vyhodnocovány záznamy analýz. Teplota termostatu: 10/25°C, objem nástřiku 10 µl, průtok 2 ml/min. ELSD: teplota 40°C, gain 6, filtr 5s, tlak dusíku 3,0 bar. Rozsah kalibrace 0,4 – 4,0 mg/ml.

Příprava vzorku

INOSITOL, Vitamín B (Nutristar, ČR)

50 mg prášku z tobolky rozpuštěno do 50 ml vody, roztok 5 minut v ultrazvuku, 1 ml filtrováno do vialky

NOSIFOL (Axonia, ČR)

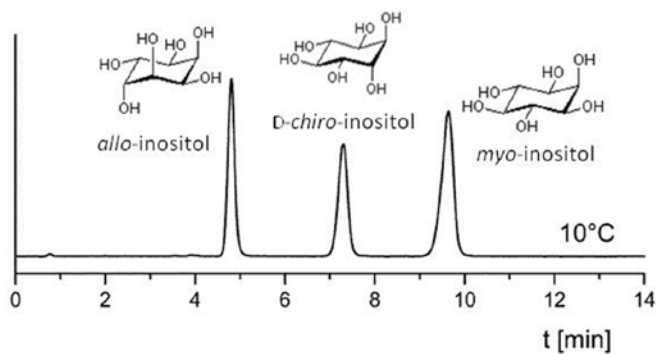
50 mg prášku ze sáčku rozpuštěno v 10 ml vody, roztok 5 minut v ultrazvuku, 1 ml filtrováno do vialky

INOCELL (Biopol GN, Kanada)

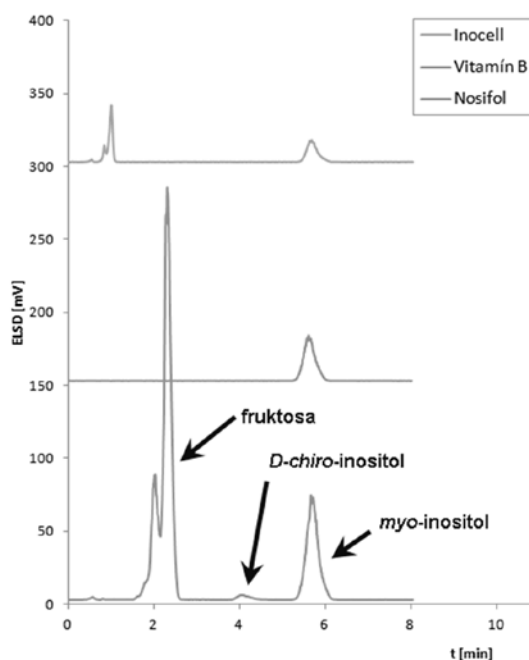
Tableta rozdrčena v třecí misce, 100 mg suspendováno do 1 ml vody, do mikroskopické Eppendorf odebráno 0,5 ml, přidáno 1,0 ml acetonitrilu, 15 minut centrifugováno při 14 000 ot/min, odebráno 1 ml supernatantu do vialky

Výsledky

Cílem práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro stanovení inositolu v potravinových doplňcích. Vzhledem k vysoké selektivitě separační metody bylo zjištěno, že majoritním izomerem v potravinových doplňcích je *myo*-inositol. Nejdůležitější dosažené výsledky jsou ilustrovány na obrázcích 1 a 2 a v tabulce 1.



Obr. 1 Separace izomerů inositolu (10°C)



Obr.2 Analýza vzorků (25°C)

	Inositol (Vitamín B)	Nosifol	Inocell
Výtěžnost metody	90%	108%	90%
Deklarovaný obsah	79,0%	36,4%	n/a
Stanovení	74,9%	40,3%	2,5%
Opakovatelnost metody (n=7)	8,2%	8,3%	7,4%

Tabulka 1 Parametry vyvinuté metody, výsledky stanovení ve vzorcích potravinových doplňků

Závěr

Byla vyvinuta metoda v módu HILIC (kolona DIOL, acetonitril 90%, voda 10%). K separaci izomerů inositolu dochází do 10 min, limit detekce (LOD) je 5 – 9 mg/ml v závislosti na použité teplotě. Pro *myo*-inositol byla zjištěna vysoká selektivita vůči isomerům *D-chiro* a *allo*-: 12 a 5, také byla zjištěna vysoká selektivita *myo*-inositolu vůči nečistotám podle ČL (mannitol, glycerol).

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s podporou grantu 46/2014/FaF IGA VFU Brno.

Seznam literatury:

[1] Pazourek, J., J. Sep. Sci. 33(6-7), 974 – 981 (2010).

Vývoj pH závislé disoluční metody pro kontrolu uvolňování glukosy z pelet s řízeným uvolňováním pro prevenci hypoglykémie

Dana Sabadková, Aleš Franc, Jan Muselík, Eva Večeřová, Lubica Pósová

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

Úvod

Hypoglykémiu možno z laboratorneho hľadiska definovať ako stav charakterizovaný poklesom hladiny glukózy v krvi pod 3,9 mmol/l (1). Keďže sa pacienti obávajú hypoglykémie, v rámci prevencie často prijímajú nadmerné množstvo sacharidov „do zásoby“, čo naopak spôsobí hyperglykémiu, ktorá môže vyústiť do vážnych chronických komplikácií. Riešením týchto problémov je lieková forma tvorená inertným jadrom vo forme pelety s obsahom glukózy, obaleným membránou, ktorá uvoľňuje glukózu až s časovým odstupom pri prechode gastrointestinálnym traktom. Takto je možné docieľiť bezpečné hladiny krvného cukru po potrebnú dobu bez narušenia režimu diabetika.

Počas pasáže zažívacím traktom dochádza k zmene pH, čo môže mať vplyv na priestupnosť obalu pelety a rýchlosť uvoľňovania glukózy. Cieľom tejto práce bolo vyvinúť kontinuálnu disolučnú metódu, počas ktorej dôjde k zmenám pH behom testovania disolúcie.

Materiál

Na prípravu peliet bola použitá bezvodá glukóza (Dr. Kulich Pharma), mikrokryštalická celulóza (Avicel PH 101[®]; FMC Biopolymer), zmes mikrokryštalickej celulózy a sodnej soli karboxymetyl celulózy (Avicel RC 591[®]; FMC Biopolymer), sodná soľ kroskarmelózy (Ac-Di-Sol[®]; FMC Biopolymer), makrogol 6000 (Merck), sodná soľ karboxymetyl škrobu (Vivastar[®] P 5000; JRS Pharma). Polopriepustná membrána bola pripravená z vodnej disperzie etylcelulózy (Surelease[®] typ B NF; Colorcon). Disolučným médiom bola 0,1 mol/l HCl s postupným prídavkom dodekahydrátu fosforečnanu sodného.

Metodika

Príprava peliet

Bolo navážených 100 g práškovej zmesi podľa zložení v tabuľke 1. Suroviny boli preosiate cez sito 250 μm a zmiesené v mixéri. Prídavkom vlhčiva (čistená voda) bola vytvorená plastická hmota, ktorá bola pomocou dopravníka pretlačená cez radiálnu extrúznu priehradku priemeru 0,6 mm. Po dokončení extrúzie bol extrudát vložený na rotujúci tanier sféronizéra po dobu 5 minút. Vzniknuté pelety boli vysušené v teplovzdušnej sušiarňi pri teplote 40 °C po dobu 2 hodín.

Zloženie	1	2	3	4
Glukóza	80,0	75,0	75,0	80,0
Avicel PH 101	15,0	-	-	15,0
Ac-Di-Sol	5,0	-	-	-
Avicel RC 591	-	25,0	-	-
Makrogol 6000	-	-	25,0	-
Karboxymetyl škrob	-	-	-	5,0

Tabuľka 1. Jednotlivé zloženia pripravených peliet (v g)

Príprava obalu

Jadrá peliet boli fluidne potiahnuté 15 % vodnou disperziou etylcelulózy Wursterovou metódou. Konečný pot'ah tvoril 35 % (zloženia 2 a 4), respektíve 50 % (zloženia 1 a 3) z celkovej hmotnosti peliet. Obalené pelety boli vysušené v teplovzdušnej sušiarňi pri teplote 60 °C po dobu 4 hodín.

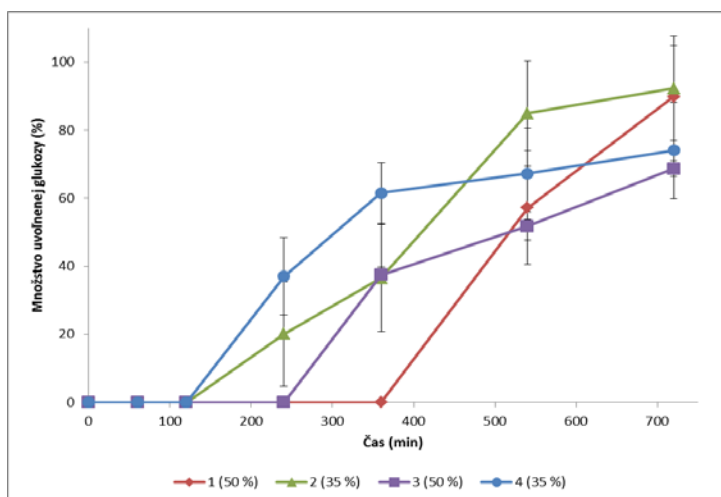
Disolúcia

Skúška disolúcie bola prevedená na disolučnom aparáte (Sotax AT-7) košíkovou metódou (aparátúra 1) pri rýchlosti otáčok 100 rpm a teplote 37 ± 5 °C. Navážka vzoriek bola 1,0 g. Na začiatku disolúcie bola disolučná kvapalina tvorená 1000 ml 0,1 mol/l HCl. Postupne bol na zmenu pH pridávaný dodekahydrát fosforečnanu sodného. Po odobratí vzorky v 60. minúte bolo pridaných 18,15 g s úpravou pH na 4,5. Po odobratí vzorky v 120. minúte bolo pridaných 6,35 g s úpravou pH na 6,8. Vzorky boli odoberané po 60, 120, 240, 360, 540 a 720 min. Obsah glukózy bol stanovený metódou HPLC-ELSD na kolóne LICHROSPHER 100 DIOL. Zloženie mobilnej fázy bolo 90 % acetonitrilu (A) a 10 % vody (B) použitých s nasledujúcim gradientom: 90 % (A), 10 % (B) do 4,5. minúty; 50 % (A), 50 % (B) do 5. minúty; 50 % (A), 50 % (B) do 10. minúty; 90 % (A), 10 % (B) do 10,5. minúty. Celková dĺžka analýzy bola 15 minút.

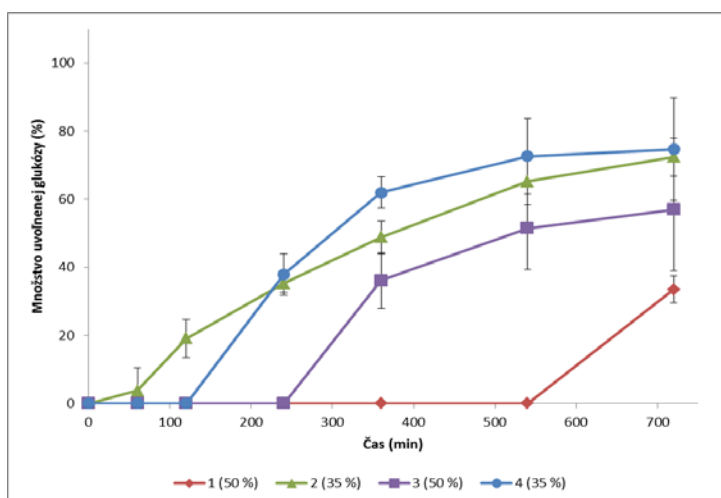
Výsledky

Bola vytvorená pH závislá disolučná metóda, ktorá je využiteľná pri vývoji peliet s riadeným uvoľňovaním. Behom disolúcie boli použité celkom tri pH, ktoré zodpovedajú častiam zažívacieho traktu – pH 1,2 (oblasť žalúdka); pH 4,5 (oblasť duodena) a pH 6,8 (oblasť tenkého čreva) (2). Priebeh pH závislej disolúcie, ktorý je znázornený na obrázku 1, bol porovnaný s priebehom disolúcie rovnakých vzoriek vo vode za rovnakých disolučných podmienok (obrázok 2). Pri porovnaní disolučných profilov možno pozorovať, že pH prostredia do istej miery ovplyvňuje uvoľňovanie glukózy zo vzoriek 1 a 2 najmä z hľadiska pozorovaných *lag time*. Vo vzorke 1, obsahujúcej sodnú soľ kroskarmelózy, je to pravdepodobne spôsobené tým, že kroskarmelóza rýchlejšie napučia v kyslom prostredí, čím sa *lag time* znižuje (3). V prípade sodnej soli

karmelózy v nezosieťovanej forme obsiahnutej vo vzorke 2 sa prejavuje jej nekompatibilita so silnými kyselinami, kedy dochádza k jej protonizácii, čo v porovnaní s vodou zrejme vyvolá spomalenie napučievania a zároveň predĺženie *lag time* (4). Uvoľňovanie glukózy zo vzoriek 3 a 4 nie je ovplyvnené zmenou pH a disolučné profily sú totožné. Z tohto dôvodu boli vzorky následne vybrané pre ďalší výskum (overenie výsledkov *in vivo*), ktorý je plánovaný v nasledujúcom roku.



Obrázok 1. Disolučné profily jednotlivých vzoriek pri zmene pH



Obrázok 2. Disolučné profily jednotlivých vzoriek vo vode

Práce byla financována v rámci projektu IGA 61/2014/FAF.

Zoznam literatúry:

- (1) AMERICAN DIABETES ASSOCIATION WORKGROUP ON HYPOGLYCEMIA. Defining and reporting hypoglycemia in diabetes. *Diabetes Care*, 2005, 28, 1245-1249.
- (2) FRANC, A. et al. Physiological factors with impact on the drug behaviour in the gastrointestinal tract. *Čes. Slov. Farm.*, 2013, vol. 62, 243-248.
- (3) SHANGRAW R., MITREVEJ A., SHAH M. A New Era of Tablet Disintegrants. *Pharm. Tech.*, 1980, 4, 49-57.
- (4) FMC BIOPOLYMER. Avicel® for Suspensions. *Application bulletin*. 2013, 1-9.

Izolace obsahových látek *Nasa triphylla* a stanovení jejich antiflogistické aktivity

Daniela Veselá, Karel Šmejkal

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

Úvod

Nasa triphylla je rostlina z čeledi Loasaceae pocházející z jihu Severní Ameriky, Střední Ameriky a severní části Jižní Ameriky v podhůří And. Obsahové látky rostliny doposud nejsou podrobně prozkoumány, *N. triphylla* je však v lidovém léčitelství Kostariky využívána pro své protizánětlivé účinky. Z tohoto důvodu byla již dříve zkoumána antiflogistická aktivita vodného extraktu, u něhož byla zjištěna antiflogistická aktivita srovnatelná s indomethacinem. [1, 2]

Materiál a metodika

Rostlinným materiálem byla celá sušená rostlina *N. triphylla*, sesbíraná roku 2013 v zahradě léčivých rostlin VFU. Identifikaci provedl Mgr. Filip Zpurný, Ph.D. (kurátor Botanické zahrady Teplice). Vzorek je pod názvem NT02 uchován v herbáriu Ústavu přírodních léčiv (FaF VFU).

Rostlinný materiál byl rozdělen na podzemní (37,2 g, označení radix = R) a nadzemní (300 g, označení herba = H) část rostliny. Rostlinný materiál byl extrahován ethanolem a byly získány dva extrakty označené NT2R (1,2 g) a NT2H (21,1 g). Extrakty byly děleny na základě rozdílné polaritivy vytřepáváním mezi nemísitelné kapaliny na podíl hexanový (NT2R-hex (0,16 g) a NT2H-hex (3,24 g)), chloroformový (NT2R-CH (0,32 g) a NT2H-CH (3,17 g)), ethylacetátový (NT2R-EtAc (0,04 g) a NT2H-EtAc (0,4 g)) a vodný (NT2R-H₂O (0,32 g) a NT2H-H₂O (7,85 g)).

Pro další separaci byl vybrán hexanový a chloroformový podíl z nadzemní části rostliny. Chloroformový podíl byl analyzován pomocí HPLC, která byla provedena na koloně SUPELCOSIL TM ABZ+Plus (15 cm × 4,6 mm, velikost částic 3 μm). Jako metoda byla použita gradientová eluce, složení mobilní fáze je zapsáno v tabulce č. 1, průtok byl 1 ml/min, teplota kolony 40 °C, DAD detekce byla prováděna při 254 a 280 nm (metoda 1). Kvůli vyšší lipofilitě hexanového podílu bylo třeba pro analýzu tohoto podílu použít jinou kolonu a tedy i metodu. HPLC analýza byla provedena na koloně Ascentis® Express C8 (15 cm × 2,1 mm, velikost částic 2,7 μm) gradientovou elucí se složením mobilní fáze zapsaným v tabulce č. 2, s průtokem 0,3 ml/min, teplotou kolony 40 °C, DAD detekce proběhla při 254 a 280 nm (metoda 2).

Podíly NT2H-CH a NT2H-hex byly dále děleny pomocí sloupcové chromatografie. Jako stacionární fáze byl použit silikagel s velikostí částic 0,040–0,063 mm, složení mobilní fáze zvolené dle TLC analýzy se lišilo dle separovaného podílu. Pro NT2H-CH se mobilní fáze skládala z chloroformu, benzenu a methanolu v poměru 7:3:1 (v/v/v), při separaci se postupně zvyšoval

obsah methanolu a na závěr byl sloupec promyt čistým methanolem. Frakce byly sbírány přibližně po 100 ml a získáno bylo 31 frakcí. V případě NT2H-hex byla mobilní fáze složena z benzenu a ethylacetátu v poměru 10:1 (v/v), podíl ethylacetátu byl postupně zvyšován a na závěr byla kolona promyta methanolem. Frakce byly opět odebírány přibližně po 100 ml a výsledkem bylo 60 frakcí. Frakce byly analyzovány pomocí TLC a HPLC a spojeny na základě podobnosti.

Dále jsme se zabývali frakcemi NT2H-hex28-32, NT2H-CH15-16 a NT2H-CH7-8. První dvě frakce byly rozděleny na dvě části na základě rozdílné rozpustnosti v methanolu, takto byly získány čisté bílé látky označené jako NT2H-hex28-32/B a NT2H-CH15-16/B (v MeOH málo rozpustné). Frakce NT2H-CH7-8 obsahovala čistou látku.

Získané látky byly identifikovány pomocí UV/Vis spektrometrie (měření spektra při HPLC analýze), IR spektrometrie (Nicolet Impact 400 D FT-IR), MS (Agilent HP 1100 LC/MSD Trap VL Series) a NMR (Bruker Avance 400 Ultrashield).

Tabulka č. 1: Složení mobilní fáze pro analýzu chloroformové frakce

Minuta	ACN (%)	0,2% HCOOH (%)
0,00	10	90
36,00	100	0
40,00	100	0

Tabulka č. 2: Složení mobilní fáze pro analýzu hexanové frakce

Minuta	ACN (%)	0,2% HCOOH (%)	MeOH (%)
0,00	62	23	15
25,00	90	0	10
25,01	100	0	0
29,00	100	0	0

Výsledky

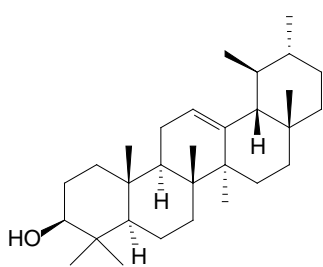
Ethanolické extrakty byly rozděleny pomocí vytřepávání mezi nemísitelné kapaliny na podíl hexanový, chloroformový, ethylacetátový a vodný. Jednotlivé podíly byly testovány s cílem stanovit protizánětlivou aktivitu pomocí měření aktivity NF- κ B a stanovením koncentrace TNF- α metodou ELISA. Chloroformový a hexanový podíl vykazovaly aktivitu srovnatelnou s kontrolou prednisonem, díky čemuž byly vybrány pro další zpracování.

Podíly NT2H-hex a NT2H-CH byly podrobeny sloupcové chromatografii, byly získány frakce, které byly analyzovány a spojeny dle podobnosti. Byly získány a identifikovány 3 čisté látky: NT2H-hex28-32/B (v současné době probíhá identifikace, jedná se pravděpodobně o α - či β -amyrin), NT2H-CH15-16/B (16-hydroxybetulinová kyselina) a NT2H-CH7-8 (skopoletin). Přesto, že všechny látky byly dříve izolovány z početných rostlinných druhů, z *N. triphylla* dosud získány nebyly.

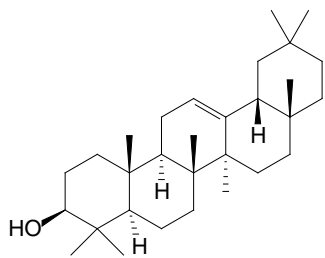
α - i β -amyrin (viz obrázek č. 1 a 2) vykázaly ve studiích antiflogistické [3], hepatoprotektivní [4] a gastroprotektivní [5] účinky.

U skopoletinu (viz obrázek č. 3) jsou známy například účinky antioxidační, protizánětlivé, protinádorové, antidepressivní či antihyperglykemické. [6]

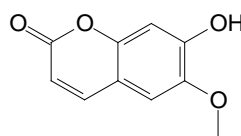
Kyselina 16-hydroxybetulinová (viz. obrázek č. 4) byla dosud izolována pouze z pěti rostlinných zdrojů a její biologická aktivita nebyla zkoumána. Izolováno bylo množství dostatečné nejen pro identifikaci látky, ale i pro testování biologické aktivity, což bude objektem dalšího zkoumání.



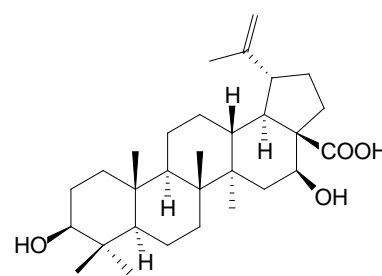
Obrázek č. 1:
 α -amyrin



Obrázek č. 2:
 β -amyrin



Obrázek č. 3:
skopoletin



Obrázek č. 4:
16-hydroxybetulinová kys.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 63/2014/FAF.

Seznam literatury:

- [1] Plante: la loasa. 1jardin2plantes.info [online]. 2012 [cit. 2012-12-29]. Dostupné z: <http://www.1jardin2plantes.info/fiches/450/loasa-triphylla.php>
- [2] BADILLA, B., MORA, G., POVEDA, L. J. Anti-inflammatory activity of aqueous extracts of Ove Costa Rican medicinal plants in Sprague-Dawley rats. *Revista de biología tropical*, 1999, vol. 47, p. 723–727.
- [3] HOLANDA, P. S. at al. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 2008, vol. 16, p. 48–52.
- [4] OLIVEIRA, F. A. et al. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, vol. 98, p. 103–108.
- [5] OLIVEIRA, F. A. et al. Gastroprotective Effect of the Mixture of α - and β -Amyrin from *Protium heptaphyllum*: Role of Capsaicin-Sensitive Primary Afferent Neurons. *Planta Medica*, 2004, vol. 70, p. 780–782.

- [6] CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 2010, vol. 643, p. 232–238.

Polymerní filmy s obsahem nesteroidního antiflogistika pro lokální terapii bolesti v ráně

Lenka Vinklárková, Ruta Masteiková

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

Úvod

Bolest je jednou z hlavních charakteristik u akutních i chronických ran. Snížit ji lze šetrným ošetřováním nebo potlačit farmakologickou cestou, která spočívá v systémovém nebo topickém podání analgetik [1]. Systémová terapie má řadu nežádoucích účinků. Výhodnou alternativou je lokální terapie, kde jsou nežádoucí účinky minimální v porovnání s léčbou systémovou. Na současném trhu je jen několik málo přípravků určených k terapii bolestivých ran převážně polotuhého charakteru. Jediné krytí představuje Biatain Ibu – polyuretanová pěna s ibuprofenem [2]. Jeho primární úlohou je sorpce exsudátu, proto je určen převážně pro středně až silně exsudující rány. Pro rány s nízkou tvorbou exsudátu by se více hodilo krytí filmového charakteru, kde k aktivaci uvolňování léčiva je postačující malé množství ranné kapaliny. Filmové krytí je navíc průhledné, umožňující kontrolu průběhu hojení rány bez sejmutí krytí. V současné terapii ran se filmy uplatňují buď k ochraně rány (syntetické polymery) nebo k vytvoření vlhkého prostředí pro suché či jen mírně exsudující rány (hydrogely). Filmy schopné uvolňovat aktivní látku do rány zatím na trhu nejsou.

Karboxymethylcelulosa (CMC) patří mezi polosyntetické polymery s výbornými filmotvornými vlastnostmi. Samotná nebo v kombinaci s dalšími látkami se používá rovněž k výrobě krytí na rány [3], což potvrzuje její kompatibilitu s lidskými tkáněmi. Proto byla zvolena k přípravě filmů s obsahem nesteroidního antiflogistika.

Materiál

Na přípravu filmů byla použita textilní forma sodné soli karboxymethylcelulosity (NaCMC) se stupněm substituce 0,35 (Holzbecher, spol. s r. o. Zlích) jako filmotvorná látka, ibuprofen (Fagron) jako účinná látka, aceton a makrogol 300 (Fagron) jako pomocné látky; polyesterová síťka Sanatyl (Tylex Letovice a. s.) sloužila k zlepšení aplikačních vlastností filmu ve vlhkém stavu.

Metodika

Pro přípravu všech filmů byla použita vodná disperze NaCMC obsahující 1 % NaCMC a 2 % makrogolu 300 jako změkčovadlo. Filmy obsahovaly ibuprofen ve dvou koncentracích – 0,5

mg/cm² nebo 1 mg/cm². Zapracování ibuprofenu proběhlo dvěma způsoby – s použitím roztoku ibuprofenu v acetonu nebo suspendováním ibuprofenu do disperze NaCMC. Vrstvené filmy se připravovaly metodou odpaření rozpouštědla, jako podklad pro vylití filmů sloužily nerezové tácky o rozměrech 11×15 cm.

První krok byl u přípravy všech filmů stejný – na nerezový tácek se nalilo 45 g NaCMC disperze, na povrch se ihned položil Sanatyl o stejných rozměrech, jako tácek, a takto vytvořena vrstva se předsušila v horkovzdušné sušárně při teplotě 70 °C. Následně se na předsušený povrch nalilo 8,25 g 1% resp. 2% roztoku ibuprofenu v acetonu, rozpouštědlo se odpařilo v digestoři, pak se nalilo 60 g NaCMC disperze, vše se nejdříve sušilo 1 hod. v sušárně při teplotě 70 °C a následně při teplotě místnosti po dobu 24 hod. (filmy 0,5-Ibu-1 a 1,0-Ibu-1). U druhého způsobu zapracování ibuprofenu se předem důkladně rozdrobněný ibuprofen suspendoval do NaCMC disperze pomocí homogenizačního přístroje ULTRA-TURRAX[®] T 25 (IKA[®], Německo) – 60 g takové disperze pak obsahovalo 82,5 mg resp. 165 mg ibuprofenu. Ta se nalila na předsušený povrch z prvního kroku a film se usušil stejným způsobem jako předchozí (filmy 0,5-Ibu-2 a 1,0-Ibu-2). Hotové filmy se sundaly z povrchu táček a byly uchovávány v uzavřené nádobě. Pro kontrolu, se stejným způsobem připravily filmy bez účinné látky a pro mikroskopické pozorování struktury i filmy bez Sanatylu.

Hodnocení filmů se provádělo organolepticky, mikroskopicky, stanovením obsahové stejnoměrnosti, povrchového pH a bobtnavosti (obojí na umělém modelu rány s použitím fyziologického tlumivého roztoku o pH 7,2), měřením mechanických vlastností na texturometru a sledováním uvolňování ibuprofenu v čase s použitím Franzových buněk.

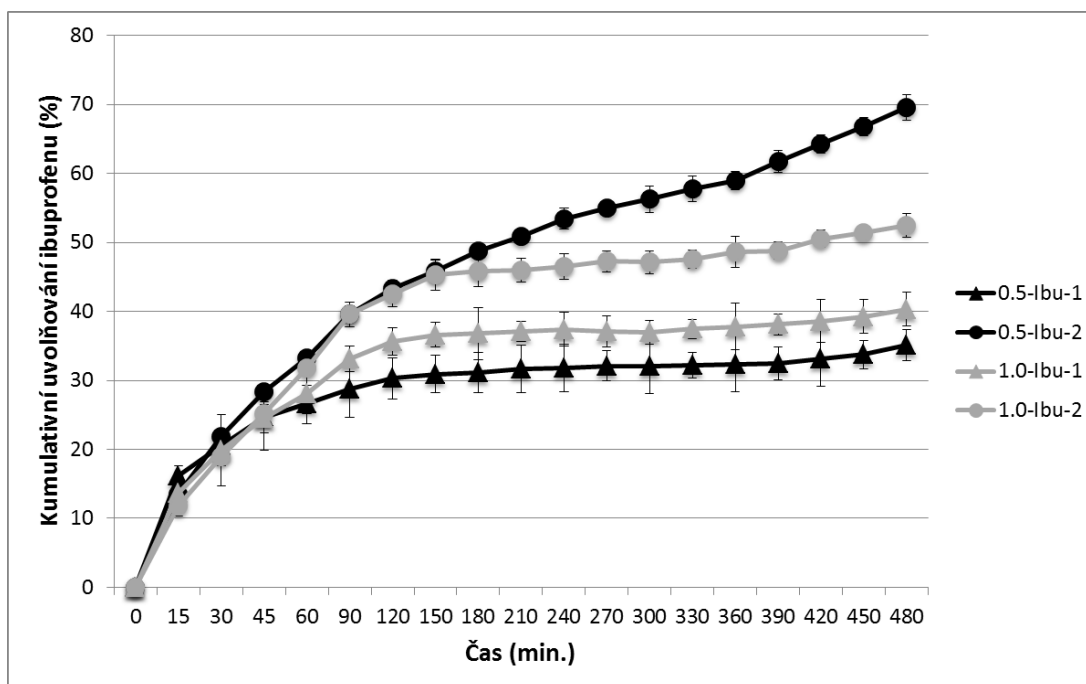
Výsledky

Připravené filmy měly při organoleptickém hodnocení homogenní vzhled, byly pružné a průhledné. Při mikroskopickém pozorování byla zřetelná mikrofibrilární struktura (vlákna částečně substituované NaCMC), což přispělo k zachování soudržnosti filmu po namočení do kapalin imitujících prostředí v ráně. Rovněž bylo zjištěno, že metoda suspendování ibuprofenu do disperze NaCMC (Ibu-2) poskytuje menší částice a jejich rovnoměrnější rozptýlení na rozdíl od zapracování z acetonového roztoku (Ibu-1), kdy vznikají krystaly větší velikosti a jejich shluky.

Při hodnocení povrchového pH v čase se zjistilo, že všechny filmy s ibuprofenem měly hodnoty pH v kyselé oblasti, což vytváří příznivé podmínky pro hojení rány. Lepší vlastnosti z hlediska udržení nižších hodnot pH měly filmy připravené druhým způsobem (Ibu-2).

Z hlediska bobtnavosti nejvyšší hodnoty měly filmy bez léčiva, což poukazuje na to, že v přítomnosti ibuprofenu, který má kyselou povahu, vzniká výměnou iontů nerozpustná matrice kyselé formy CMC, čímž se snižuje bobtnavost a následně to ovlivňuje i uvolňování léčiva.

Zkouška obsahové stejnoměrnosti ukázala, že mnohem kvalitnější filmy vznikají, když je ibuprofen suspendován do disperze NaCMC (Ibu-2). Touto metodou připravené filmy měly rovněž lepší mechanické vlastnosti a průběh uvolňování léčiva, obzvláště 0,5-Ibu-2 (viz obrázek dole) – z něj se v průběhu 8 hodin uvolnilo 70 % ibuprofenu. Patrně to souvisí s menší velikostí částic a rovnoměrnějším rozptýlením ibuprofenu ve filmové matici. Převažujícím mechanismem uvolňování léčiva byla Fickova difúze.



Závěr

Byla vypracovaná technologie přípravy vícevrstvých filmů z mikrofibrilární NaCMC s obsahem nesteroidního antiflogistika ibuprofenu. Ze zkoumaných způsobů nejlepší výsledky, hlavně z hlediska obsahové stejnoměrnosti a průběhu uvolňování léčiva *in vitro* poskytovaly filmy, kde ibuprofen byl zapracován suspendováním do disperze polymeru. Optimální vlastnosti měly filmy s koncentrací ibuprofenu 0,5 g/cm².

Práce byla financována v rámci projektu IGA 53/2014/FAF.

Literatura

- [1] PRICE, P. et al. Managing painful chronic wounds: the Wound Pain Management Model. *Int. Wound J.*, 2007, 4 (Suppl. 1), 4-15.
- [2] FOGH, K. et al. Clinically relevant pain relief with an ibuprofen-releasing foam dressing: Results from a randomized, controlled, double-blind clinical trial in exuding, painful venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.*, 2012, 20, 815-821.

[3] SWEENEY, I.R., MIRAFAT, M. a COLLYER G. A critical review of modern and emerging absorbent dressings used to treat exuding wounds. *Int. Wound J.*, 2012, 9, 601-612.

Studium antimikrobiálních vlastností nově syntetizovaných potenciálních chemoterapeutik

Iveta Zadražilová^{1,2}, Denisa Glósová², Dobromila Mikošková², Šárka Pospíšilová², Valéria Púdelková², Barbora Smičková², Miroslava Valešová², Josef Jampílek¹

Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

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), gramnegativní bakterie produkující betalaktamasy širokého spektra, multirezistentní mykobakteria a další. Jedním z klíčových řešení problému mikrobiální rezistence může být syntéza nových látek s antimikrobiálním účinkem, která se však neobejde bez následného zhodnocení biologické aktivity látek.

V předchozím roce byl proveden screening antimikrobiální aktivity 177 látek¹⁻⁵. Cílem projektu bylo v návaznosti na tyto výsledky u ověřených látek dále rozšířit spektrum hodnocení biologické aktivity o testování schopnosti potencovat účinek stávajících antimikrobiálních látek a studium antimikrobiální aktivity těchto látek v závislosti na čase a koncentraci. V rámci projektu byla rovněž hodnocena biologická aktivita 54 nově syntetizovaných látek, připravených na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty VFU Brno.

Materiál a metodika

Materiál

Byl proveden screening antimikrobiální aktivity celkem 54 nově syntetizovaných *N*-alkoxyfenylamidů hydroxynaftalenkarboxylových kyselin. Veškerá stanovení byla provedena v triplicátech. Aktivita těchto 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 modelový druh k ověření účinku potenciálních chemoterapeutik k léčbě tuberkulózy bylo použito rychlerostoucí *Mycobacterium smegmatis* ATCC 700084 a dále zástupci pomalu rostoucích mykobakterií *Mycobacterium kansasii* DSM 44162 a *Mycobacterium marinum* CAMP 5644. Antimykotický účinek byl testován na kulturách *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 a *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Metodika

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a dále se postupovalo podle standardních metodik CLSI (www.clsi.org). Ke stanovení 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 µg/ml), které byly zaočkovány bakteriálním/fungálním inokulem. Jako referenční antibakteriální látky byly použity ampicilin a ciprofloxacin, jako referenční antifungální látky amfotericin B a 5-fluorocytosin, jako referenční antimykobakteriální látky byly použity isoniazid 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 bylo u zástupců multirezistentních bakterií dále rozšířeno spektrum hodnocení biologické aktivity těchto látek. Schopnost potencovat účinek stávajících antimikrobiálních látek s následným výpočtem indexu frakční inhibiční koncentrace (FIC) byla testována metodou „checkerboard titration technique“ v mikrotitračních destičkách a metodou „time-kill curve“ byl posouzen baktericidní účinek antimikrobiální látky v závislosti na čase (0, 4, 6, 8 a 24 hodin) a koncentraci (1× MIC, 2× MIC a 4× MIC).

Výsledky

N-Alkoxyfenylamidy hydroxynaftalenkarboxylových kyselin (n = 54) neinhibovaly růst *E. coli* (MIC > 256 µg/ml), avšak zajímavá aktivita v závislosti na substituci byla pozorována proti *S. aureus*, stejně tak jako proti klinickým izolátům MRSA. Hodnoty MIC u 8 látek se pro MRSA pohybovaly v rozmezí 2–32 µg/ml. Hodnoty MIC a MBC pro MRSA byly navíc srovnatelné, případně nižší než hodnoty MIC a MBC daných látek pro referenční kmen *S. aureus*. U 2 látek byla zaznamenána velice silná antibakteriální aktivita proti klinickým izolátům VRE (MIC ≤ 2 µg/ml). Přibližně třetina těchto látek (n = 19) vykazovala rovněž i středně silnou antimykobakteriální aktivitu (MIC = 2–32 µg/ml). Antibakteriální účinek *N*-alkoxyfenylamidů hydroxynaftalenkarboxylových kyselin byl převážně baktericidní. Testované látky ve většině případů prakticky nevykazovaly antifungální aktivitu s hodnotami MIC > 128 µg/ml u všech testovaných kmenů.

U celkem 5 látek ze skupiny salicylanilidů a jejich derivátů, u nichž byl v rámci předchozích testů prokázán baktericidní účinek proti MRSA, byla sledována závislost baktericidního účinku látky na čase a koncentraci. U 2 látek ze skupiny diamidů byl pozorován baktericidní účinek již při koncentraci 2× MIC po 6 hodinách inkubace a při koncentraci 4× MIC po 4 hodinách inkubace.

Celkem 6 látek ze skupiny salicylanilidů a jejich derivátů bylo testováno pro ověření možného potencování účinku stávajících antimikrobiálních látek – oxacilinu, ciprofloxacinu, vankomycinu a tetracyklinu. Kombinovaný účinek byl hodnocen proti klinickým izolátům MRSA a VRE. Ve většině případů byl pozorován indiferentní účinek kombinace dvou antimikrobiálně účinných látek. V případě kombinace oxacilinu a látek ze skupiny karbamátů salicylanilidů byl pozorován antagonismus proti jednomu klinickému izolátu MRSA.

Závěr

Z výsledků projektu je patrné, že *N*-alkoxyfenylamidy hydroxynaftalenkarboxylových kyselin 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 směřování dalšího výzkumu Ústavu chemických léčiv v oblasti syntézy potenciálních antimikrobiálních chemoterapeutik. Velice významným zjištěním projektu bylo dále prokázání baktericidního účinku substituovaných *N*-(arylamino-oxo-alkanyl)salicylamidů proti MRSA, což nebylo v literatuře dosud popsáno.

Práce byla financována v rámci projektu IGA 52/2014/FAF.

Seznam literatury:

- [1] KOS, J., ZADRAŽILOVÁ, I., PEŠKO, M. et al. Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 3-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Molecules* 2013, vol. 18, no. 7, 7977-7997.
- [2] GONĚC, T., KOS, J., ZADRAŽILOVÁ, I. et al. Antibacterial and herbicidal activity of ring-substituted 2-hydroxynaphthalene-1-carboxanilides. *Molecules* 2013, vol. 18, no. 8, 9397-9419.
- [3] OTEVŘEL, J., BOBÁL, P., ZADRAŽILOVÁ, I. et al. Antimycobacterial and photosynthetic electron transport inhibiting activity of ring-substituted 4-arylamino-7-chloroquinolinium chlorides. *Molecules* 2013, vol. 18, no. 9, 10648-10670.
- [4] GONĚC, T., KOS, J., ZADRAŽILOVÁ, I. et al. Antimycobacterial and herbicidal activity of ring-substituted 1-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, vol. 21, no. 21, 6531-6541.
- [5] PAUK, K., ZADRAŽILOVÁ, I., IMRAMOVSKÝ, A. et al. New derivatives of salicylamides: Preparation and antimicrobial activity against various bacterial species. *Bioorg. Med. Chem.* 2013, vol. 21, no. 21, 6574-6581.

Editovali:	Doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D. Prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. Prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc.
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	163
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2014

ISBN 978-80-7305-756-5