

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

SBORNÍK

BRNO 2017

Konference Interní grantové agentury VFU Brno 2017

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Farmaceutická fakulta

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2017 financovaných z prostředků účelové podpory
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2017

Editovali:

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

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D.

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.

prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc.

doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2017

ISBN 978-80-7305-795-4

Vážené kolegyně / Vážení kolegové

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

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

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

Děkuji všem

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

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

předsedkyně IGA komise VFU

OBSAH

Příspěvky FVL

Odběr semene a umělá inseminace plazů	2
Prevalence equinního sarkoidu u koní v České republice a zhodnocení rizikových faktorů na jejich vývoj	6
Objasnění vývojového cyklu a identifikace původce intranukleární kokcidiózy želv.....	10
Charakterizace izolátů <i>Escherichia coli</i> z případů kolibacilózy drůbeže	15
Vliv ventilačního režimu při laparoskopii na nitrooční tlak u psů	19
Studium etiopatogeneze laminitídy u dojnic	23
Vliv stáří matek na kvalitu kolostra a na změny hematologických a biochemických parametrů neonatálních kůzlat před a po napití kolostra	27
Ovlivňování říjového cyklu u samic osla domácího pomocí hCG, GnRH a PGF _{2α}	32
Antioxidační stav a koncentrace malondialdehydu (MDA) u dojnic v peripartálním období.....	36
Nové fyziologické funkce kaspáz v osteogenních drahách	41
Intrafolikulární transfer oocytů u mléčného skotu	45
Primoinfekce gamaherpesviru koní a variabilita virů v čase	49
Morfometrická a histologická analýza varlat morčete v průběhu suprese pohlavní aktivity vlivem GnRH agonisty deslorelinu	52
Analýza stresových markerů u laboratorních králíků, užívaných pro výuku předmětu Farmakologie II na VFU Brno	56
Úloha protilátek proti kapsulárnímu polysacharidu v imunitnej reakcii prasačích alveolárných makrofágov na in vitro infekciu rozličnými sérovarmi <i>Haemophilus parasuis</i>	58
Mechanické testování šlach po sutuře nově vyvinutými biomateriály	63

Příspěvky FVHE

Ekotoxicita nanostříbra pro organismy vodních ekosystémů	68
Vliv vybraných antidepresiv na genovou expresi antioxidantních a biotransformačních enzymů u embryí <i>Danio rerio</i>	72
Porovnání toxického účinku stříbrných nanočástic a iontů na embrya dánia pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	75
Optimalizace testu blastické transformace lymfocytů u lososovitých ryb	79
Diagnostika původce proliferativního onemocnění ledvin u lososovitých ryb pomocí molekulárně biologických metod	84
Stanovení ruminální degradovatelnosti aminokyselin a isoflavonů u dvou různě technologicky upravených sójových produktů metodou in sacco	87
Prevalence a patogenita krevních parazitů u evropských netopýrů	91
Ověření autenticity a nutriční kvality vybraných druhů tuňáků.....	95
Charakterizace enterokoků rezistentních k vankomycinu a jejich epidemiologie v České republice.....	100
Možnosti dlouhodobé konzervace spermatu dravců	104
Vliv zimních zásob na rozvoj infekce mikrosporidií <i>Nosema ceranae</i> u včelstev včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)	108
Aeromonády rezistentní k fluorochinolonům v českých chovech ryb	113
Taxonomie všenek rodu <i>Myrsidea</i> vybraných čeledí volně žijících ptáků Latinské Ameriky.....	117
Vliv rozdílného surovinového složení diet na vybrané ukazatele krevního profilu odstavených králíků plemene zakrslý beran	121
Gramnegativní bakterie produkující karbapenemázy z krkavcovitých ptáků v Severní Americe ..	125
Studie vlivu dvou vybraných herbicidů (atrazinu a terbuthylazinu) a jejich metabolitů na vybrané bioindikátory	129
Plazmidy nesoucí geny rezistence k fluorochinolonům u izolátů enterobakterií ze zvířat, člověka a prostředí a role antibiotik v jejich šíření	133
Vliv konzervantů na údržnost vaječných melanží	138
Snížení obsahu soli v pekařských výrobcích: strategie snižování obsahu sodíku a optimalizace technologických postupů	142

Příspěvky FaF

Hodnocení tabletovin a tablet získaných ze společně zpracovaných směsí	148
Izolácia a identifikácia flavonoidov a terpenoidov z <i>Coleus caninus</i> (Roth.) Vatke a <i>Coleus aromaticus</i> Benth	152
Izolace a identifikace obsahových látek <i>Sceletium tortuosum</i> s předpokládanou antiflogistickou aktivitou	157
Stereoselektivní syntéza a biologické hodnocení sloučenin postavených na arylaminoethanolovém strukturním základě.....	162
<i>In vitro</i> hodnocení vaginálních inzertů s obsahem PGE ₂ pro veterinární využití	166
Využití magnesium alumino-metasilikátového nosiče pro snížení burst efektu modelového léčiva s vysokou rozpustností z hypromelosových matric	171
Optimalizace nové <i>in situ</i> syntézy pyrroloimidazolidinonových derivátů prolinu jako potenciálních lokálních anestetik	176
Molekulárně biologické hodnocení nově syntetizovaných nanotransportérů antracyklinových antibiotik	179
Biofyzikální a biochemická charakteristika derivátů hydronaftalenkarboxanilidu	184
Účinky citalopramu na hladiny adipokinů v experimentu	189
Hodnocení bioaktivních látek instrumentálními metodami	192
Hodnocení proapoptotických účinků nových salicylanilidových derivátů na lidských leukemických buňkách THP-1	196
Syntéza derivátů 1,3,5-triazinu obsahujících nové triazolové, piperazinové a další dusíkaté strukturní motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „zelené chemie	201
Stanovení obsahu proanthokyanidinů v nutraceutických přípravcích	205
Totální syntéza Mulberrofuranu Y a jeho analogů jako látek se slibnou protizánětlivou aktivitou	209
Syntéza a charakterizace potenciálních inhibitorů acetylcholinesterázy	213
Zinkem modifikovaný Nanotransportér doxorubicinu pro cílenou léčbu zhoubných nádorů prostaty	217

Příspěvky
Fakulty veterinárního lékařství

Odběr semene a umělá inseminace plazů

Matteo Oliveri, Dita Višková, Pavlína Veverková, Aneta Puskášová

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

Úvod

Jedna pětina všech druhů plazů nyní čelí vyhynutí¹. Možnost šetrného odběru semene, vyšetření spermatu a jeho následné použití k umělé inseminaci představuje jednu z cest, které mohou přispět k zachování genofondu ohrožených druhů plazů.

Materiál a metodika

a) Gekončici, agamy, leguáni

Experimentální zvířata. Odběry semene se prováděly u 10 samců gekončíka nočního (*Eublepharis macularius*), 3 samců agamy bradaté (*Pogona vitticeps*), 5 samců leguána zeleného (*Iguana iguana*). Agamy, gekončici a leguáni byli chováni na experimentálním oddělení Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců v podmínkách přizpůsobených těmto druhům plazů.

Odběr semene. U agam, gekončíků a leguánů se odběr provádí jemnou masáží báze hemipenisů tupou sondou. Zvíře se fixuje ve sternální poloze. Před odběrem je nutné vyvolat defekaci výplachem kloaky fyziologickým roztokem, aby se zabránilo kontaminaci semene. Masáž provádíme krouživým pohybem sondy. Po chvíli dochází k vysunutí hemipenisů a k ejakulaci. Semeno nasáváme do insulinové injekční stříkačky bez jehly. Elektroejakulace byla provedena u dvou samců leguána zeleného. Opět byl proveden výplach kloaky, aby nedošlo ke kontaminaci semene. Pro úvod do anestezie byl použit alfaxalon (5 mg/kg, IV), který se aplikoval do ventrální ocasní žíly. Následně proběhla intubace leguánů a anestezie byla dále vedena isofluranem (3 %). Sonda byla zavedena do kloaky 6–7 cm hluboko, elektrody směřovaly dorsálně. Celková sekvence byla rozdělena na tři části obsahující 2 série o 30 stimulacích 0,5 až 1 voltem. Stimulační cyklus sestával přibližně z 1 sekundy od 0 do požadovaných voltů, následně 2 až 3 sekund na ideální voltáži a pak rychlého návratu na 0 voltů po dobu 3 sekund. Během stimulace byly zaznamenány silné záškuby pánevních končetin.

Ředění ejakulátu a hodnocení motility (Pogona vitticeps). Byla použita tři různá ředidla: fyziologický roztok, TRIS a 3,1% natrium citrát. Všechna ředidla se temperovala na teplotu 38 °C. Na podložní sklíčko byl nanesen jeden díl semene a čtyři díly ředidla, po smíchání jsme preparát přikryli krycím sklem. Motilita byla vyhodnocována subjektivně při zvětšení 200x.

Barvení ejakulátu (Eublepharis macularius). Na barvení ejakulátu byly vybrány tři typy barvení spermií pro morfologické vyšetření: Hemacolor, barvení dle Farellyho a barvení dle Karrase. Pro tyto účely jsme prováděli odběr semene u 10 gekončků nočních, u 7 jedinců se odběr nezdařil. Morfologii jsme v každém vzorku hodnotili u 50 spermií.

b) Hadi

Experimentální zvířata. Bylo použito deset dospělých klinicky zdravých hadů: 1.3 užovky červené (*Pantherophis guttatus*); 1.1 psohlavci orinočtí (*Corallus hortulanus*); 1.1 hroznýši psohlaví (*Sanzinia madagascariensis*) a 1.1 užovky obrovské (*Hydrodynastes gigas*). Všechna zvířata pocházela ze soukromých chovů, kde byla chována v podmínkách přizpůsobených těmto druhům hadů.

Odběr semene masáží. Odběr spermatu začínáme šetrným proplachem kloaky sterilním fyziologickým roztokem, aby se vyvolala defekace a zabránilo se kontaminaci semene. Masáž ventrální části kaudální třetiny těla hada se provádí manuálně, vyvinutím tlaku palce na gastrostézích a přejížděním ruky po těle hada kranio-kaudálním směrem.

Kontrola aktivity vaječnicků pomocí ultrasonografie. Za účelem provedení umělé inseminace ve správném okamžiku byla ovariální aktivita samic (přítomnost pre-ovulačních folikulů) hodnocena použitím ultrasonografického přístroje. V době inseminace všechny samice vykazovaly přítomnost pre-ovulačních folikulů.

Endoskopicky asistovaná inseminace u hadů. V závislosti na velikosti hada byl použit uretroskop (4 mm, 6 °, 43 cm, endoskop Karl Storz, Tuttlingen, Germany) nebo artroskopický teleskop (4 mm, 0 °, 16 cm, Olympus Medical Systems, Tokyo, Japan). Čerstvý vzorek semene byl do vejcovodů samice vpraven pomocí katétru.

Výsledky

Odběr semene. Agama bradatá: u agam č. 1 a 2 byl odběr úspěšný (počet pohyblivých spermií se pohyboval od 20 do 30 %). U agamy č. 3 došlo opakovaně k odběru velmi malého objemu semene a ke kontaminaci uráty, což pravděpodobně vedlo k úmrtí spermií. Gekončík noční: odběr semene se zdařil u tří z deseti jedinců. Leguán zelený: odběr u leguánů nebyl úspěšný při použití masáže, ani v případě elektroejakulace. Hadi: po dvou až třech minutách masáže, při vyvinutí tlaku palcem nad kloakou, se podařilo odebrat několik kapek spermatu do insulinové injekční stříkačky. Odběr semene pomocí masáže se zdařil u všech hadů, veškeré odebrané vzorky obsahovaly pohyblivé spermie a malé množství urátů.

Hodnocení motility dle použitého ředidla:

Tabulka č.1 Průměrná motilita spermií u agam bradatých při použití různých ředidel

Agama	Fyziologický roztok	TRIS	3,1% natrium citrát
1.	30 %	1 %	17,5 %
2.	20 %	5 %	5 %
3.	0 %	-	0 %
průměr	16,7 %	3 %	7,5 %

Barvení na morfologii spermií:

Tabulka č.2 Výsledky morfologického barvení spermií

	Farely				Hemacolor				Karras		
	č. 2	č. 4	č. 5	∅	č. 2	č. 4	č. 5	∅	č. 4	č. 5	∅
Abnormality hlavičky (%)	0	26	12	12,7	52	100	30	60,7	42	64	53
Abnormality krčku (%)	44	6	70	40	28	10	66	34,7	36	98	67
Abnormality bičíku (%)	4	36	2	14	8	14	8	10	0	0	0
Fyziologické spermie (%)	52	32	16	33,3	8	0	2	3,3	22	2	12

Umělá inseminace. Dvě ze tří užovek červených v červnu (dva měsíce po provedení umělé inseminace) nakladly vejce (14 a 16 vajec). Průměrný počet vajec je u tohoto druhu 12–20. Všechna vejce byla oplodněná a k vylíhnutí došlo po dvou měsících. V říjnu (čtyři měsíce po

provedení umělé inseminace) se narodila mláďata psohlavce – dva zdraví a pět slabších jedinců (počet mláďat pro tento druh je velmi variabilní, dle zkušeností autorů je bráno 4 až 14 za normální počet).

Závěr

Nejlepší metodou pro barvení spermií u gekončků se jeví barvení dle Farellyho, kde bylo zaznamenáno 33 % fyziologických spermií, při použití barvení Hemacolor pouze 3 % a v případě barvení dle Karrase 12 %. Po použití barvení Hemacolor a dle Karrase také došlo k výrazným defektům především na hlavičce a krčku. Pro ředění semene je vhodné použít fyziologický roztok. Masáž báze hemipenisů u ještěřů a masáž kaudální třetiny těla hadů jsou vhodné metody k odběru semene. Důvodem neúspěchu při odběru semene u leguánů byla pravděpodobně jejich izolace od samic a stáří jedinců (13 let), což vedlo k potlačení stimulů pro tvorbu spermií. Metoda odběru semene pomocí masáže u samců a endoskopicky asistovaná inseminace u samic může být užitečnou technikou v programech na záchranu některých druhů plazů. Nicméně je zapotřebí dalších studií zaměřených na druhově specifické rozdíly, což by následně mohlo zvýšit úspěšnost umělé inseminace.

Seznam literatury

1. BOHM M, COLLEN B, BAILLIE JEM, BOWELS P et al: The conservation status of the world's reptiles. Biol Conserv 157: 372-385, 2013.
2. CLULOW J, CLULOW S: Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to speed. Reprod Fertil Dev 28: 1116-1132, 2016.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 102/2017/FVL.

Prevalence equinního sarkoidu u koní v České republice a zhodnocení rizikových faktorů na jejich vývoj

Ronen Hoikhman, Petr Jahn

Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická

univerzita Brno

Úvod

Equinní sarkoid, lokálně invazivní fibroblastický kožní tumor, patří mezi celosvětově nejčastější tumory koní (Regland et al. 1966, Marti et al. 1993). Tyto nádory nepříznivě ovlivňují hodnotu a často i pracovní využití koně (Scott et al. 2011, Torrontegui a Reid 1994). Etiopatogeneze equinních sarkoidů není stále přesně známa a je pravděpodobně multifaktoriální (Jandova et al. 2012). V závislosti na geografické lokalizaci je nicméně za kauzální agens obecně považován bovinní papilomavirus (BPV) typ 1 a 2 (Taylor et al. 2012, Knottenbelt et al. 2015). Svou roli v predispozici pro infekci BPV s následným vznikem sarkoidu mohou hrát i genetické faktory, a to buď mechanismy snížené odolnosti organismu k infekci, nebo jeho zvýšené náchylnosti (Staiger et al. 2016, Knottenbelt et al. 2015). Některé studie vyhodnocují plemennou predispozici k infekci BPV a vzniku sarkoidů, přičemž většina se soustředí na určitá plemena (Angelos et al. 1988, Mohammed et al. 1992, Wobeser et al. 2010, Knottenbelt et al. 2015).

Cílem naší studie bylo vyhodnocení prevalence sarkoidů u vybraných plemen koní v České republice se zaměřením na národní plemena (starokladrubský kůň a slezský norik) a získání kožních stěrů pro pozdější průkaz BPV a jeho specifikaci pomocí sekvenování virové DNA metodou PCR (Angelos et al. 1988, Mohammed et al. 1992, in Knottenbelt et al. 2015, Wobeser et al. 2010). Jako rizikový faktor byla posuzována přítomnost chovů skotu v bezprostřední blízkosti vyšetřovaných koní.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Pro dosažení dostatečného počtu koní ke statistickému zpracování bylo každé plemeno posuzováno samostatně a zástupci daných plemen byli vybíráni náhodně. Jednotliví majitelé

dali souhlas k vyšetření a terapii koní v případě, že by vzorky byly pozitivní. Byla odebrána anamnéza a každý kůň byl klinicky vyšetřen na přítomnost sarkoidů, zejména na predilekčních místech. Při záchytu sarkoidů byla pořízena fotodokumentace a následně byly od postižených koní odebrány kožní stěry z postiženého místa, které byly zamrazeny a dále uchovány při teplotě -80°C .

Jako rizikový faktor byla zjišťována přítomnost chovů skotu v bezprostřední blízkosti vyšetřovaných koní.

Statistické vyhodnocení

K získání statisticky dostačujícího vzorku populace byl nejdříve zjištěn celkový počet koní v České republice a počet koní zapsaných pod jednotlivými plemeny. Velikost minimálního počtu zvířat jako reprezentativního vzorku pro jednotlivá plemena koní byla vypočtena podle níže uvedené rovnice s přihlédnutím k předpokládané senzitivitě 95 % a specifitě klinického vyšetření 95% (Cannon 2001).

$$n \cong \frac{(1 - (1 - \alpha)^{1/D})(N - \frac{1}{2}(SeD - 1))}{Se}$$

Výsledky

Celkem bylo klinicky vyšetřeno 524 koní ze 14 různých stájí České republiky. Plemena, která byla prozatím hodnocena, zahrnují starokladrubského koně, anglického plnokrevníka, arabského plnokrevníka, slezského norika, českého teplokrevníka a appaloosu (Tab. 1). Ze získaných dat byla vystavěna pilotní studie indikující počet koní, který bude dostačující pro epizootologickou studii. Tabulka 1 dále sumarizuje procentuální zastoupení koní, u kterých byl zjištěn výskyt sarkoidů a odebrány kožní stěry. Tato čísla byla využita k výpočtům minimálního počtu koní nutného pro správné statistické vyhodnocení. Studie bude dále pokračovat sběrem dat a vzorků (odběr maximálně dosažitelného počtu vzorků).

Chov skotu byl zaznamenán v bezprostřední blízkosti pouze jednoho z vyšetřovaných chovů (chov starokladrubského koně s celkovým počtem 51 koní).

Závěr

Klinickým vyšetřením 524 koní byl zjištěn výskyt sarkoidů u 33 koní (6,09 %). Nejvyšší prevalence byla zaznamenána u plemene arabský plnokrevník (31,57 %). Od koní s klinickým výskytem sarkoidů byly odebrány kožní stěry pro průkaz BPV. Získané výsledky jsou předběžné a studie bude dále pokračovat.

Tabulka 1: Výskyt sarkoidů u jednotlivých plemen koní v České republice.

Plemeno	Celkový počet koní v rámci daného plemene v ČR	Počet klinicky vyšetřených koní v rámci daného plemene (N)	Počet koní se sarkoidy v rámci vyšetřených koní (n)	Průměrný věk koní s nálezem sarkoidů (rok)	Procentuální vyjádření prevalence (%)	Požadované minimální množství vyšetřených koní pro dané plemeno
Starokladrubský kůň	1788	160	4	8.6	2.56	121
Anglický plnokrevník	8780	199	14	10	7.03	44
Arabský plnokrevník	849	19	6	8.8	31.57	9
Český teplokrevník	17835	81	7	12.5	8.64	35
Appaloosa	802	54	2	6	3.7	80
Slezský norik	1220	11	0	?	0	?

Literatura

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

Cannon R.M., 2001. Sense and sensitivity – designing survey based on an imperfect test. *Prevent. Vet. Med.* 49: 141 – 163.

Jandova V., Klukowska-Rötzler J., Dolf G., Janda J., Roosje P., Marti E., Koch C., Gerber V., Swinburne J., 2012. Whole genome scan identifies several chromosomal regions linked to equine sarcoid. *Schweitz. Arch. Tierhielk.* 154: 19 – 25.

Knottenbelt D. C., Patterson –Kate J. C., Snalune K. L. 2015. Sarcoids. In *Clinical Equine Oncology*. Elsevier. Pp 203 – 219.

- Marti E., Lazary S., Antczak D.F. and Gerber H., 1993. Report of the first international workshop on equine sarcoid. *Equine vet. J.* 25: 397 – 407.
- Mohammed H.O., Rebhun W.C. and Antczk D.F., 1992. Factors associated with the risk of developing sarcoid tumours in horses. *Equine. Vet. J.* 24: 165 – 168.
- Regland W. L., Keown G.H. and Gorham J. R., 1966. An epizootic of equine sarcoid. *Nature* 210: 1399.
- Scott D.W. and Miller W. H. J., 2011. Neoplasms, Cysts, Hamartomas and Keratoses. In *Equine Dermatology*. Elsevier. Pp 479 – 488.
- Staiger E. A., Tseng C. T., Miller D., Cassano J. M., Nasir. L., Garrick D., Brooks S. A. and Antczak D. F., 2016. Host genetic influence on Papillomavirus – induced tumors in the horse. *Int. J. Cancer.* 139: 784 – 792.
- Taylor S. and Haldorson G., 2013. A review of equine sarcoid. *Equine vet. Edu.* 25: 210 – 216.
- Torrentegui B. O. and Reid S.W.J., 1994. Clinical and pathological epidemiology of the equine sarcoid in a referral population. *Equine Vet. Edu.* 6: 85 – 88.
- Wobeser B.K., Davies J. L., Hill J. E., Jackson M. L., Kidney B. A., Mayer M. N, Townsend H.G.G., Allen A. L., 2010. Epidemiology of equine sarcoids in horses in western Canada. *Can. Vet. J.*, 51: 1103 – 1108.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 104/2017/FVL.

Objasnění vývojového cyklu a identifikace původce intranukleární kokcidiózy želv

Lada Hofmannová¹, Kristýna Bízková¹, Jana Kvičarová^{2,3}

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

Parazitologický ústav, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích²

Parazitologický ústav, Biologické centrum Akademie věd České republiky, České Budějovice³

Úvod

Fenomén Emerging infectious diseases (EIDs) je celosvětovým problémem ohrožujícím volně žijící i chované druhy exotických zvířat. Mezi významné EIDs u plazů patří intranukleární kokcidióza želv (TINC) (Gibbons & Steffes, 2013), prvně zaznamenaná v roce 1990 jako závažné a letální onemocnění u želv paprscitých (*Geochelone/Astrochelys radiata*) v USA (Jacobson et al., 1994). Infekce byla následně opakovaně detekována jako systémové letální onemocnění želv chovaných v zajetí i u želv pocházejících z volné přírody (Garner et al., 2006). V roce 2008 byl publikován první a dosud jediný záchyt TINC v Evropě, a to v Německu u želv paprscitých odchovaných v zajetí (Schmidt et al., 2008). V souhrnné studii „Emerging infectious diseases of Chelonians“ byla TINC přiřazena mezi nejzávažnější nová infekční onemocnění postihující želvy vč. vysoce ohrožených druhů (Gibbons & Steffes, 2013). Navzdory opakovaným nálezům intranukleárních endogenních stádií za využití elektronové mikroskopie, metod detekce pomocí PCR prakticky ve všech orgánech uhynulých želv a snaze o zavedení antemortem diagnostiky (Innis et al., 2007), nebyl dosud původce TINC a vývojový cyklus včetně cesty přenosu jednoznačně identifikován. Absence těchto informací komplikuje včasnou diagnostiku a účinnou prevenci TINC, mimo jiné především v chovech a populacích ohrožených želv.

Materiál a metodika

Trus klinicky nemocných želv pardálích (*Stigmochelys pardalis*) soukromého majitele byl vyšetřen centrifugačně flotačním vyšetřením (Sheatherův roztokem o spec. hm. 1,3) využitím světelného mikroskopu Olympus BX53 vybaveného pro Nomarskiho diferenciální kontrast (zvětšení 400-1000x) a kamerou Olympus DP73. V něm detekované oocysty byly, změřeny, sporulovány a následně morfologicky profilovány. Tyto vysporulované oocysty byly v dávce

1×10^3 použity k perorální experimentální infekci želv *Testudo horsfieldii*, *T. hermanni*, *T. graeca*, *Geochelone sulcata*. Experimentálně infikovaní klinicky nemocní jedinci byly usmrceni 6-8 týdnů po infekci a jejich tkáně byly podrobeny histopatologickému a PCR vyšetření. Celková DNA byla izolována komerčním kitem a specifická 18S rDNA byla amplifikována pomocí hemi-nested PCR s primery 18F, 1503R a INC-qPCR2R dle metodiky Alvarez et al., 2013. PCR produkty byly oboustranně sekvenovány (Macrogen, Netherlands) a získané sekvence následně analyzovány pomocí BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) a DNASTAR Inc., Madison. Fylogenetické analýzy byly provedeny dle Javanbakht et al., 2015.

V rámci parazitologického screeningu cíleného na standardizaci mol. diagnostiky bylo výše uvedený způsobem koproskopicky a pomocí PCR vyšetřeno dalších 135 vzorků trusu zdravých i nespecifické klinické příznaky vykazujících želv.

Výsledky

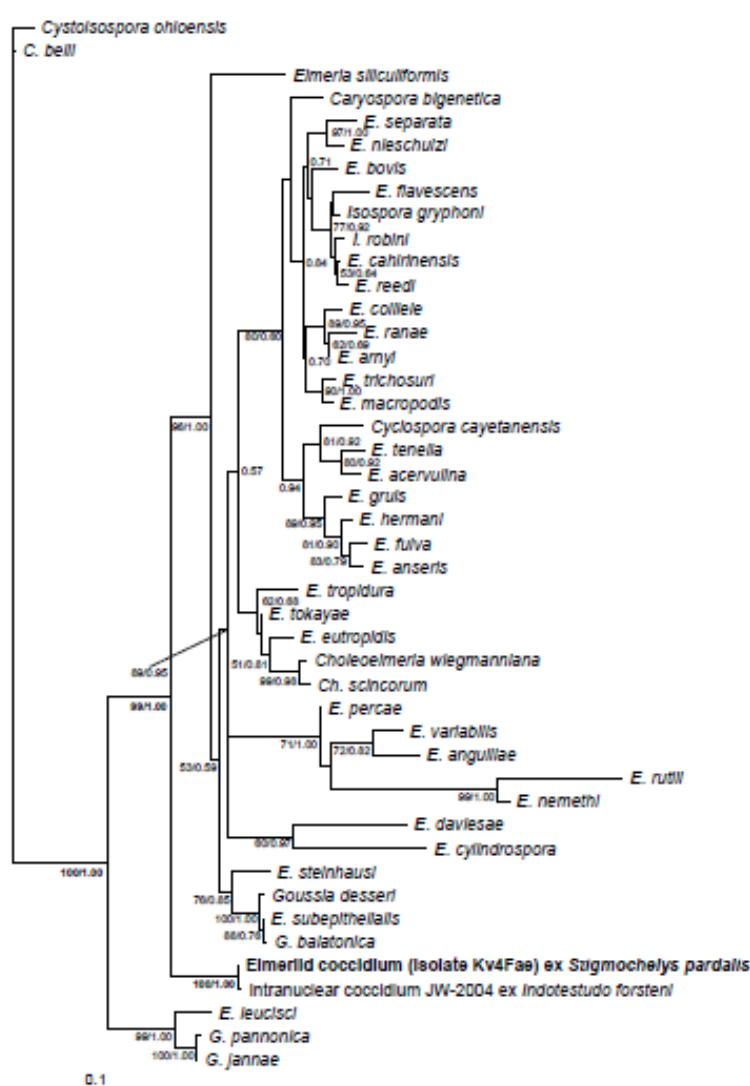
Koproskopické vyšetření želv *S.pardalis* vykazujících příznaky TINC odhalilo sférické nevysporulované oocysty o velikosti $\sim 6-7 \mu\text{m}$. Po sporulaci (min. 3 dny) se tenkostěnné oocysty ukázaly jako eimeriidní, obsahovaly 4 astideální sporocysty a v každé dva sporozoity. Extrémně fragilní oocysty se během několika minut v cukerném roztoku rozpadaly.

Všechny experimentálně infikované želvy byly k infekci vnímavé. Oocysty u nich byly detekovány koproskopicky/PCR (v závislosti na druhu) od 30. do 167. (180.) dne po infekci. Histologické vyšetření ukázalo přítomnost vývojových stádií intranukleárních kokcií ve střevě, játrech, ledvinách a plicích. PCR vyšetření tkání prokázalo přítomnost DNA TINC ve všech orgánech i v krvi. Všechny sekvence spolu korespondovaly. Reprezentativní sekvence (úsek 581 bp 18S rDNA) z původního materiálu byla alignována se 44 vybranými sekvencemi kokcií z databáze GenBank. Fylogenetické analýzy ukázaly jako nejbližší sekvenci intranukleární kokcidie z želvy *Indotestudo forsteni* (AY728896), s kterou naše sekvence vytvořila samostatně separovanou a dobře podpořenou linii lokalizovanou bazálně vůči ostatním eimerioridním kokciím (Obrázek 1).

Vyšetření klinického materiálu (trusu) cílené na standardizace mol. diagnostiky prokázalo TINC v jediném chovu a to u čtyř želv pardálích (klinické příznaky, koproskopie, PCR) a jedné *T. horsfieldii* (bez symptomů, negativní koproskopie, opakovaně pozitivní PCR).

Závěr

Detekce a morfologický popis exogenních stádií TINC, průkaz jejich perorálního přenosu, infekivity pro více druhů želv a fylogenetické zařazení původce jsou zásadními poznatky, které umožní posun nejen ve včasné diagnostice, prevenci a řešení šíření tohoto onemocnění, ale také umožní směřovat další výzkum zaměřený na ochranu ohrožených druhů želv.



Obrázek 1. Fylogenetický strom znázorňující postavení námi izolované sekvenční TINC (tučně) a ostatních kokcií na základě úseku 18S rDNA.

Seznam literatury:

ALVAREZ, W. A., GIBBONS, P. M., RIVERAC S., ARCHER L. L., CHILDRESS A. L., WELLEHAN Jr., J. F.X. Development of a quantitative PCR for rapid and sensitive diagnosis of an intranuclear coccidian parasite in Testudines (TINC), and detection in the critically endangered Arakan forest turtle (*Heosemys depressa*). *Veterinary Parasitology*. 2013, 193, 66-70. ISSN 0304-4017.

GARNER, M. M., GARDINER, C. H., WELLEHAN, J. F. X., JOHNSON, A. J., MCNAMARA, T., LINN, M., TERRELL, S. P., CHILDRESS, A., JACOBSON, E. R. Intranuclear Coccidiosis in Tortoises: Nine Cases. *Veterinary Pathology*. 2006, 43, 311-320. ISSN 0300-9858.

GIBBONS, P. M., STEFFES, Z. J. Emerging Infectious Diseases of Chelonians. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2013, 16(2), 303-317. ISSN 1094-9194

INNIS, C. J., GARNER, M. M., JOHNSON, A. J., WELLEHAN, J. F. X., TABAKA, Ch., MARSCHANG, R. E., NORDHAUSEN, R. W., JACOBSON, E. R. Antemortem diagnosis and characterization of nasal intranuclear coccidiosis in Sulawesi tortoises (*Indotestudo forsteni*). *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 2007, 19, 660-667. ISSN 1943-4936.

JACOBSON, E. R., SCHUMACHER, J., TELFORD Jr, S. R., GREINER, E. C., BUERGELT, C. D., GARDINER, Ch. H. Intranuclear Coccidiosis in Radiated Tortoises (*Geochelone radiata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 1994, 25(1), 95-102. ISSN 1937-2825

JAVANBAKHT, H., KVIČEROVÁ, J., DVOŘÁKOVÁ, N., MIKULÍČEK, P., SHARIFI, M., KAUTMAN, M., MARŠÍKOVÁ, A., ŠIROKÝ, P., Phylogeny, diversity, distribution and host specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palearctic tortoises. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2015, 62, 670–678. ISSN 1550-7408.

SCHMIDT, V., DYACHENKO, V., AUPPERLE, H., PEES, M., KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E., DAUGSCHIES, A. Case report of systemic coccidiosis in a radiated tortoise (*Geochelone radiata*). *Parasitology Research*. 2008, 102, 431-436. ISSN 1432-1955.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 105/2017/FVL.

Charakterizace izolátů *Escherichia coli* z případů kolibacilózy drůbeže

Martina Masaříková, Aneta Papoušková

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

Úvod

Escherichia coli je obecně známá jako komenzál střeva savců a ptáků. Tyto bakterie však mohou získat specifické vlastnosti, které jim umožní přežívat v organismu hostitelů, překonat jejich obranné mechanismy a vyvolat charakteristická střevní nebo mimostřevní onemocnění. Kolibacilóza je častou infekční chorobou, která v důsledku zvýšené nemocnosti a úhynu způsobuje celosvětově značné ekonomické ztráty v chovech intenzivně chované hrabavé drůbeže. Původcem kolibacilózy jsou kmeny *E. coli* patogenní pro ptáky (**Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC**), které vyvolávají různé formy extraintestinálních infekcí drůbeže (sinusitida, aerosakulitida, perikarditida, perihepatitida, peritonitida, koliseptikémie, salpingitida, koligranulomatóza, celulitida, žloutková peritonitida, panoftalmie a synovitida). Patogenita APEC je určována tvorbou různých faktorů virulence, kterých bylo u APEC doposud validováno 29 (Guabiraba and Schouler, 2015). Jedná se zejména o adheziny, protektiny, toxiny, faktory pro získávání železa a další faktory. Kmeny APEC jsou velmi různorodé co do zastoupení sérotypů a kombinací faktorů virulence, které umožňují jejich patogenní uplatnění v organismu hostitele. Jednotlivé faktory virulence jsou determinovány geny, které se mohou v omezeném počtu vyskytovat i u kmenů komenzálních, což komplikuje interpretaci laboratorních výsledků. V posledních několika letech byla ověřena různá diagnostická schémata, která jsou založena na průkazu kombinace vybraných genů, u nichž byla potvrzena vysoká hodnota rozlišení APEC od komenzální *E. coli* (Ewers et al., 2009; Johnson et al., 2008; Schouler et al., 2012). Izoláty APEC bývají současně multirezistentní vůči účinku antimikrobiálních látek (Li et al., 2015), proto podrobnější charakteristika genů kódujících mechanismy jejich antibiotické rezistence je dalším nezbytným krokem laboratorní diagnostiky APEC. Podrobnější charakterizace genetické výbavy izolátů *E. coli* získaných při kultivačním vyšetření klinického a sekčního materiálu z drůbeže se zdá být z výše uvedených důvodů nezbytná k tomu, aby bylo možné získané výsledky použít jako podklad pro cílenou léčbu, prevenci a profylaxi kolibacilózy v postižených chovech drůbeže.

Materiál a metodika

Za účelem podrobné charakterizace bylo z laboratorní sbírky mikroorganismů Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie vybráno celkem 95 *E. coli* izolovaných z orgánů a seróz stejného počtu jedinců kura domácího s diagnózou kolibacilózy. Vyšetřovaný soubor drůbeže tvořila jednodenní kuřata se zánětem žloutkového vaku a sepsí a dále výkrmoví brojleři a nosnice s aerosakulitidou a polyserositidou, nebo peritonitidou. Většina materiálu byla odebrána na 40 různých českých farmách, 8 izolátů pocházelo také ze Slovenska a 10 z Rumunska. Kultivace proběhla za použití výběrově – diagnostických a univerzálních půd za aerobních podmínek, k druhové identifikaci byla použita metoda MALDI – TOF MS.

U 95 izolátů *E. coli* bylo metodou PCR prokazováno celkem osm genů kódujících vybrané faktory virulence (*iss*, *ompT*, *cvaC*, *iroN*, *iutA*, *tsh*, *felA*, *frz*), které byly zvoleny na základě publikovaných údajů o jejich vysoké diskriminační hodnotě pro odlišení APEC od komenzálních *E. coli*. Následovala identifikace fenotypu antimikrobiální rezistence vůči základním skupinám antimikrobiálních látek zahrnujícím beta-laktamy, chinolony, tetracykliny a sulfonamidy diskovým difúzním testem v souladu s metodickými pokyny Institutu pro klinické a laboratorní standardy (CLSI). U izolátů vykazujících fenotyp rezistence alespoň k jednomu antibiotiku byly metodou PCR identifikovány kódující geny rezistence a mobilní genetické elementy figurující v možném horizontálním transferu rezistence, zejména integrony tříd 1 a 2. Molekulárně - geneticky bylo také stanoveno začlenění jednotlivých izolátů do fylogenetických skupin A - F dle Clermontova schématu (Clermont et al., 2013). Polymerázovou řetězovou reakcí jsme dále u 95 izolátů prokazovali přítomnost plazmidů nejvýznamnějších skupin inkompatibility. Všechny izoláty byly také sérotypizovány aglutinací s komerčními antiséry. Genomová DNA třiceti vybraných *E. coli* byla izolována a přečištěna komerčním DNA kitem s cílem sekvenace genomu metodou Next Generation Sequencing (NGS), která byla realizována pracovníky VÚVeL Brno.

Výsledky

U více než 90 % izolátů *E. coli* byl metodou PCR prokázán alespoň jeden z hledaných genů kódujících vybrané faktory virulence, většina (58 %) jich nesla pět až sedm současně. Soubor však obsahoval také 8 izolátů (8 %), u nichž nebyl detekován žádný z nich. Většina izolátů v našem souboru (94 %) vykazovala v diskovém difúzním testu rezistenci alespoň k jednomu antibiotiku, šest izolátů (6 %) bylo citlivých ke všem testovaným antimikrobiálním látkám, naopak 66 izolátů (70 %) bylo multirezistentních. Nejvíce byla zastoupena rezistence

k ampicilinu (83 %) a kyselině nalidixové (65 %). Molekulárně – genetickou analýzou byla u rezistentních izolátů *E. coli* prokázána přítomnost kódujících genů *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *tet*(A), *tet*(B), *sul1*, *sul2* a *sul3*. Fylogenetickou analýzou a za použití kvadruplex PCR jsme mezi 95 vybranými izoláty identifikovali zástupce všech fylogenetických skupin *E. coli* sensu stricto, tedy A, B1, B2, C, D, E a F. Nejvíce jich náleželo k fylogenetické skupině B2 zahrnující izoláty s vyšší virulencí (27 %), na druhém místě byla skupina B1 s převážně komenzálními zástupci (23 %). Pomocí metody PCR jsme u charakterizovaných izolátů dále prokázali přítomnost plazmidů skupin inkompatibility B/O, P, A/C, Y, I1, HI1, HI2, K, X1, FIB, FIA a FIIA. Většina našich izolátů vykazovala plazmidy typu FIB (73 %) a FIIA (92 %). Šedesát sedm izolátů, tedy 71 %, neslo oba tyto plazmidy současně. Rychlou sklíčkovou aglutinací jsme se zaměřili na vyhledání čtyř konkrétních sérotypů asociovaných s vyšší virulencí a to sérotypů O1, O8, O18 a O78. Tímto způsobem se podařilo otypovat 52 % izolátů, 48 % nereagovalo s žádným z použitých antisér. Nejčastěji byla v našem souboru zastoupena séroskupina O1 (32 %), následovaly séroskupiny O8 (14 %), O78 (4 %) a séroskupina O18 (2 %).

Závěr

V rámci této studie byla shromážděna sbírka izolátů *E. coli* z různých kategorií drůbeže a z různých typů projevů infekce tímto patogenem a byla dokumentována jejich velká genetická variabilita. Sbírkou ukazuje, že kmeny způsobující kolibacilózu drůbeže pocházejí z různých fylogenetických skupin a nesou řadu genů virulence v různých kombinacích. Vykazují také značnou míru rezistence k běžně používaným antimikrobiálním látkám. Vysoký výskyt skupin plazmidů, známých svou asociací s determinanty virulence a rezistence, naznačuje, že APEC jsou připraveny tyto determinanty šířit horizontálním transferem, což může představovat komplikaci v terapii kolibacilózy drůbeže a potenciálně i jistou hrozbu pro lidskou populaci. Charakterizované izoláty dále vykazaly rozštěpení do dvou skupin. Izoláty z nejmladších věkových kategorií se vyznačovaly překvapivě vyšší mírou molekulárních znaků virulence. Naopak izoláty z aerosakulitid a septikémií několikátých denních jedinců měly těchto znaků obecně méně, ale vykazovaly vyšší tendenci k rezistenci. Zdá se tedy, že generalizované infekce původem ze žloutkového vřáku způsobují z velké části kmeny, které jsou dobře vybaveny determinanty virulence.

Citovaná literatura

Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 2013;5(1):58-65.

Ewers C., Antao E.M., Diehl I., Philipp H.C., Wieler L.H. Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(1):184-192.

Guabiraba R. and Schouler C. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*. 2015;362(15):fnn118.

Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S.J., Rosenberg S.C., Nolan L.K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(12):3987-3996.

Li Y., Chen L., Wu X., Huo S. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. *Poultry Science*. 2015;94(4):601–611.

Schouler C., Schaeffer B., Brée A., Mora A., Dahbi G., Biet F., Oswald E., Mainil J., Blanco J., Moulin-Schouleur M. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(5):1673-1678.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno č. 107/2017/FVL.

Vliv ventilačního režimu při laparoskopii na nitrooční tlak u psů

Petr Raušer, Markéta Mrázová, Michal Crha, Martina Vychodilová

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

Úvod

Nitrooční tlak (NOT) je tvořen tlakem nitrooční tekutiny na fibrózní vrstvu očního bulbu. Může být ovlivněn řadou faktorů – velikostí zornice (Almeida a kol. 2004), krevním tlakem (Cunningham a Barry 1986), parciálním tlakem oxidu uhličitého v arteriích ($P_a\text{CO}_2$) (Cooper a kol. 1979), použitými medikamenty (Thomson 2007) a dalšími faktory.

Laparoskopie je chirurgická metoda, jejímiž přednostmi jsou miniinvazivita a omezení pooperační morbidity a diskomfortu pacienta (Shariati a kol. 2014). Laparoskopie docílená nitrobřišní insulací CO_2 (tzv. kapnoperitoneem) narušuje pacientovy kardiovaskulární a respirační funkce (Weil 2009) a zvyšuje hladinu $P_a\text{CO}_2$. Toto zvýšení – hyperkapnie může vyvolat choroidální vazodilataci a vzestup NOT (Hvidberg a kol. 1981). Pro udržení fyziologické hladiny $P_a\text{CO}_2$ pacienta je proto obvykle nutná ventilační podpora.

Cílem této studie je posoudit vliv spontánního dýchání a dvou způsobů umělé plicní ventilace na nitrooční tlak u psů při laparoskopii s kapnoperitoneem.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 30 zdravých psů, kteří podstoupili laparoskopii s kapnoperitoneem. Všichni psi byli klinicky zdraví bez očních abnormalit s NOT 10 – 25 mmHg (Renwick 2002). Měření byla prováděna formou dvojité slepé prospektivní klinické studie.

Všichni psi byli premedikováni medetomidinem ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ i.v.; Domitor 1 mg/ml, Orion, Finsko) s butorfanolem ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ i.v.; Butomidor 10 mg/ml, Richter Pharma AG, Rakousko), úvod byl proveden propofolem ($1 - 2 \text{ mg kg}^{-1}$ i.v.; Norofol 10 mg/ml, Norbrook, S. Irsko) a anestezie vedena isofluranem (1,5 %, Isofluran, Torrex Chiesi, Rakousko) ve směsi kyslík – vzduch, vdechovaná frakce kyslíku byla 0,6.

Zvířata byla rozdělena do 3 skupin. Psi skupiny SPO ($n = 10$) dýchali po celou dobu výkonu spontánně. Psi druhé skupiny – skupiny NOR ($n = 10$) byli uměle po celou dobu výkonu ventilováni tlakově kontrolovanou, objemově limitovanou automatickou ventilací s přerušovaným přetlakem (IPPV). Úpravou dechové frekvence a inspiračního tlaku (PIP), který nepřekročil $20 \text{ cmH}_2\text{O}$, byla u psů skupiny NOR ($n = 10$) udržována po celou dobu výkonu normokapnie 35 – 45 mmHg (Moens a Coppens 2007). Tlak na konci exspira (PEEP)

byl 2 cmH₂O. Psi třetí skupiny – skupiny KON (n = 10) byli po celou dobu výkonu uměle ventilováni IPPV s konstantní frekvencí a PIP – dechová frekvence byla 10 dechů/min, PIP 15 cmH₂O a PEEP 2 cmH₂O.

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.

Sledované hodnoty zahrnovaly nitrooční tlak (NOT), velikost zornice (VZ), tepovou frekvenci (TF), systolický a diastolický krevní tlak (TK_{sys}, TK_{dia}), saturaci hemoglobinu kyslíkem (SpO₂), dechovou frekvenci (DF), dechový objem (V_T) a endexpirační koncentraci CO₂ (EtCO₂). Nitrooční tlak byl měřen aplanačním tonometrem (TonoPen XL, Medtronic, Jacksonville, FL USA) vždy na stejném – levém oku pacienta. Při měření NOT byli psi v dorzální horizontální pozici. Velikost zorničky byla měřena zorničkovým měřítkem přiloženým na rohovku. Měření NOT a VZ byla prováděna stejnou osobou (Mrázová).

Srdeční frekvence byla snímána 3 svodovým EKG se svody umístěnými na obou hrudních a levé pánevní končetině pacienta. Krevní tlak byl měřen neinvazivně manžetou na levé hrudní končetině monitorem (Cardel 9401, Midmark, UK). Saturace hemoglobinu kyslíkem byla měřena čidlem napojeným na jazyk pacienta. Dechová frekvence byla měřena společně s EtCO₂ pomocí *side-stream* techniky. Dechový objem a tlaky v dýchacích cestách (PIP, PEEP) byly měřeny spirometrickým kusem napojeným na konec endotracheální rourky pacienta (Pitotova trubice). Hodnoty TF, DF, EtCO₂ a SpO₂ byly zaznamenávány monitorem (Datex Cardiocap II, Datex–Ohmeda, Finland), hodnoty V_T, PIP a PEEP byly zaznamenávány spirometrickým modulem inhalačního anesteziologického přístroje (Venar, Chirana, Slovakia). Všechna měření byla prováděna stejnou osobou (Raušer).

Hodnoty NOT, VZ, TF, TK_{sys}, TK_{dia} a DF byly změřeny a zaznamenány před anestezií. Stejně hodnoty navíc doplněné o SpO₂, V_T a EtCO₂ byly změřeny a zaznamenány 5 minut před insuflací CO₂ (T_{bas}). Po ukončení insuflace CO₂ docílením nitrobřišního tlaku 10 mmHg byly stejné hodnoty měřeny a zaznamenávány vždy v 5 minutových intervalech po dobu 30 minut (T₀ – T₃₀).

Pro statistické zhodnocení byl použit Anderson-Darling test, Bartlett test, ANOVA pro jeden faktor a Dunnet test. Hladina významnosti byla $p < 0,05$.

Výsledky

Z 30 zvířat zahrnutých do studie měli psi ve skupině SPO stáří $3,0 \pm 2,4$ roků (průměr \pm směrodatná odchylka) a tělesnou hmotnost $27,1 \pm 10,6$ kg, psi ve skupině NOR stáří $1,9 \pm 0,9$ roků a tělesnou hmotnost $34,2 \pm 11,3$ kg a psi ve skupině KON stáří $3,0 \pm 2,5$ roků a tělesnou hmotnost $28,8 \pm 9,1$ kg. Signifikantní rozdíl mezi skupinami zaznamenán nebyl.

U žádné ze sledovaných skupin jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v NOT v žádném ze sledovaných časů oproti hodnotám před kapnoperitoneem ani v jednotlivých sledovaných časech mezi skupinami.

U psů skupiny SPO byly v T_{30} zaznamenány vyšší hodnoty VZ než v čase T_{bas} . Jiné rozdíly uvnitř skupin ani mezi skupinami zaznamenány nebyly.

U psů skupiny KON byly v T_{30} zaznamenány vyšší hodnoty TF než T_{bas} . Jiné rozdíly uvnitř skupin ani mezi skupinami zaznamenány nebyly.

U žádné ze sledovaných skupin jsme nezaznamenali signifikantní rozdíly v TK_{sys} a TK_{dia} ani v SpO_2 v žádném ze sledovaných časů oproti hodnotám v čase T_{bas} ani v jednotlivých sledovaných časech mezi skupinami.

Hodnoty DF byly vyšší u psů skupiny NOR ve všech sledovaných časech kapnoperitonea ($T_0 - T_{30}$) oproti psům skupiny KON. Dechová frekvence byla také vyšší u psů skupiny SPO oproti psům skupiny KON v T_{25} a T_{30} . U psů skupiny SPO byla zaznamenána vyšší DF v T_{25} oproti hodnotám v čase T_{bas} .

U psů skupiny SPO byl zaznamenán menší V_T oproti psům skupiny KON v čase T_{bas} a T_{10} . U psů skupiny SPO byl zaznamenán menší VT také oproti psům skupiny NOR v čase T_5 , T_{10} . a T_{15} .

U psů skupiny KON jsme v čase $T_5 - T_{30}$ zaznamenali vyšší $EtCO_2$ oproti hodnotám v čase T_{bas} .

Závěr

U psů podstupující laparoskopii s kapnoperitoneem a nitrobřišním tlakem 10 mmHg během 30 minut při anestezii medetomidin-butorfanol-propofol-isofluran nedochází při spontánním dýchání, při ventilaci udržující normokapnii ani při konstantní ventilaci k výraznějšímu ovlivnění nitroočního tlaku. V průběhu kapnoperitonea dochází v závislosti na ventilačním režimu pouze k odchýlkám v dechové frekvenci, dechovém objemu a endexpirační koncentraci CO_2 . Důvody může být relativně nízký nitrobřišní tlak použitý při laparoskopii nebo kardiovaskulární účinky medetomidinu maskující rozsáhlejší změny.

Seznam literatury

Almeida DE, Rezende ML, Nunes N, Laus JL. Evaluation of intraocular pressure in association with cardiovascular parameters in normocapnic dogs anesthetized with sevoflurane and desflurane. *Veterinary Ophthalmology*, 2004, **7**, 265–269.

Cooper RL, Beale DG, Constable IJ, Grose GC. Continual monitoring of intraocular pressure: effect of central venous pressure, respiration and eye movements on continual recordings of intraocular pressure in the rabbit, dog and man. *British Journal of Ophthalmology*, 1979, **63**, 799–804.

Cunningham AJ, Barry P. Intraocular pressure – physiology and implications for anaesthetic management. *Canadian Anaesthetist's Society Journal*, 1986, **33**, 195–208.

Hvidberg A, Kessing V, Fernandes A. Effect of changes in PCO₂ and body positions on intraocular pressure during general anaesthesia. *Acta Ophthalmologica*, 1981, **59**, 465–475.

Moens Y, Coppens P. Patient monitoring and monitoring equipment. In: Seymour Ch, Duke-Novakovski T (eds): BSAVA manual of small animal anaesthesia and analgesia. 2nd ed. BSAVA, Gloucester, 2007, 62–78.

Renwick P. Glaucoma. In: Petersen–Jones S, Crispin S (eds): BSAVA manual of small animal ophthalmology. 2nd ed. BSAVA, Gloucester, 2002, 185–203.

Shariati E, Bakhtiari J, Khalaj A, Niasari-Naslaji A. Comparison between two portal laparoscopy and open surgery for ovariectomy in dogs. *Veterinary Research Forum*, 2014, **5**, 219–223.

Thomson S. Ophthalmic surgery. In: Seymour Ch, Duke-Novakovski T (eds). BSAVA manual of small animal anaesthesia and analgesia. 2nd ed. BSAVA, Gloucester, 2007, 183–193.

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

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno č. 109/2017/FVL.

Studium etiopatogeneze laminitídy u dojníc

Ivana Šimková¹, Karolína Pišťková², Adriena Lauschmannová³,

Libuše Pačínková³

¹*Klinika chorob prežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství, VFU Brno*

²*Klinická laboratoř pro velká zvířata, VFU Brno*

³*Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno*

Úvod

Výskyt laminitídy – zápal laminárnej škáry paznechtu vedúci k oslabeniu závesného aparátu paznechtnej kosti a k vzniku lézií rohoviny paznechtu nie je u prežúvavcov stále uspokojivo dokázaný¹. Podľa niektorých zdrojov je však laminitída stále označovaná za častú príčinu krívania u dobytká². Subakútna acidóza bachorového obsahu (SARA) je považovaná za hlavný rizikový faktor vzniku laminitídy. Je spojená s uvoľnením endotoxínu, ktorý vedie k systémovej zápalovej reakcii organizmu ale presná patogenézia vzniku a pôsobenia laminitídy nie je stále objasnená^{1,2}.

SARA je ochorenie prevažne vysokoprodukčných dojníc ktoré má negatívny dopad ako na zdravie individuálnych zvierat tak aj na ekonomiku celého stáda³.

Súčasná definícia SARA je založená na hodnote pH bachorového obsahu a však terminológia a popis tohoto ochorenia nie je v literatúre stále jednotná. Obecně sa za SARu označuje prípad, keď dôjde k poklesu pH bachorového obsahu v rozmedzí 5,2 – 6 po dlhšie časové obdobie. Tento pokles pH nastáva v dôsledku akumulácie prchavých mastných kyselín (volatile fatty acids – VFA) v rámci bachoru a to z niekoľkých príčin: a) zvýšená tvorba VFA, d) znížená absorpcia VFA, c) znížené pufrovanie bachorového obsahu slinami. Vzhľadom na značnú variáciu hodnoty pH v rámci bachoru (závislosť na dobe kŕmenia, miesto a spôsob odberu bachorovej tekutiny) nie je jednoduché tento problém v chove diagnostikovať³.

Materiál a metodika

Na sledovanie bola vybraná farma s vysokou prevalenciou krívania a so systematickými záznamami z úpravy paznechtov.

Podľa termínu pôrodu bolo z chovu vyselektovaných 20 dojníc. Do sledovania neboli zahrnuté prvotelky.

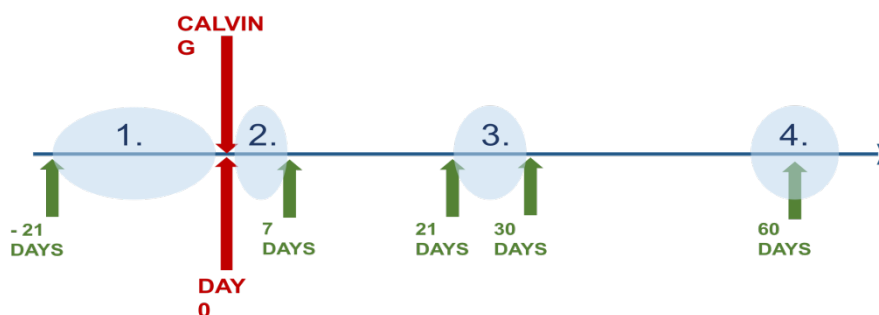
U vybraných kráv sa sledovalo:

1. priebeh puerpéria – SARA (pH BT<5,9), ketóza (BHB >1,2 mmol/l), retencia placenty, mastitis
2. BCS (body condition score) – 5 bodová stupnica⁴
3. výskyt a skóre krívania – 4 bodová stupnica⁵
4. metabolický profil (sérum, bachorová tekutina) zo 4 odberov

5. parametre z mesačných kontrol úžitkovosti v intervale 0 - 100 dní
6. výskyt a typ lézií na paznechtoch zo záznamov z plošnej úpravy paznechtov (Február 2017, Jún 2017, November 2017)

Z uvedených dát sa štatisticky zhodnotia a porovnajú kravy so zaznamenanou SARA s kravami bez SARA.

Schéma 1: Načasovanie odberov krvi a bachorovej tekutiny



Tabuľka 1: Metabolický profil – stanovované parametre

SÉRUM			BACHOROVÁ TEKUTINA - BT		
Total Protein	NEFA	Lactate	pH	Total Acidity	Valeric acid
Albumin	BHB	Histamine	Σ VFA	Acetate	
AST	Ca	Haptoglobin	Propionate	Butyrate	
Urea	Zn	LPS	Lactate	Ammonium	

Tabuľka 2: Počet odobraných vzoriek

	1. ODBER		2. ODBER		3. ODBER			4. ODBER	
	Sérum	BT	Sérum	BT	Sérum	BT	ABR	Sérum	BT
CELKOVO	18	10	20	9	20	10	8	19	10

Výsledky

Tabuľka 3: Klinický priebeh sledovaného obdobia (0 – 60 dní post partum)

DIAGNÓZA	POČET KRÁV	KLINICKÝ STATUS	POČET KRÁV
SARA	9	Zdravé	1
Ketóza	8	1 ochorenie	5
Mastitis	2	2 ochorenia	11
Retencia placenty	6	3 ochorenia	3
Krívanie	11	4 ochorenia	0

Tabuľka 4: Stav paznechtov

DÁTUM NÁVŠTEVY	CELKOVÝ POČET KRAV	KRAVY S LÉZIAMI		KRAVY BEZ LÉZIÍ	
	N	n	%	n	%
Február 2017	214	127	59,35	87	40,65
Jún 2017	251	91	36,25	160	63,75

Tabuľka 5: Priemerné hodnoty vybraných parametrov u SARA+ skupiny v porovnaní so SARA- skupinou

	Počet kráv N	LPS [ng/ml]	Histamin [ng/ml]	Haptoglobin [ng/ml]	Laktát [mmol/l]
SARA +	9	1,1	11,8	0,8	1,0
SARA -	10	1,8	9,5	0,5	1,1
t-test p-hodnota		0,549	0,387	0,421	0,310

Z predbežných výsledkov nami testovaných parametrov nie je zrejma štatistická významnosť medzi SARA+ skupinou s porovnaním so SARA- skupinou. Výsledky sú zatiaľ len čiastkové. Stále však nie sú k dispozícii výsledky dopadu SARA na stav paznechtov. Tieto dáta budú prístupné až po prebehnutí poslednej plošnej úpravy paznechtov v chove, ktorá je naplánovaná na koniec Novembra 2017.

Zoznam literatúry:

- 1 NEWSOME, R. F., et al. A prospective cohort study of digital cushion and corium thickness. Part 1: Associations with body condition, lesion incidence, and proximity to calving. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100.6: 4745-4758.
- 2 DONG, Shu-Wei, et al. Comparative proteomics analysis provide novel insight into laminitis in Chinese Holstein cows. *BMC veterinary research*, 2015, 11.1: 161.
- 3 ABDELA, Nejash. Sub-acute ruminal acidosis (SARA) and its consequence in dairy cattle: A review of past and recent research at global prospective. *Achievements in the Life Sciences*, 2016, 10.2: 187-196.
- 4 EDMONSON, A. J., et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 1989, 72.1: 68-78.
- 5 BARKER, Z. E., et al. Assessment of lameness prevalence and associated risk factors in dairy herds in England and Wales. *Journal of dairy science*, 2010, 93.3: 932-941.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 112/2017/FVL.

Vliv stáří matek na kvalitu kolostra a na změny hematologických a biochemických parametrů neonatálních kůzlat před a po napití kolostra

Zdenka Kazatelová, Ivana Šimková, Ondřej Šmíd, Jakub Záleský

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

Úvod

V posledních desetiletích se u přežvýkavců zkoumal vliv kolostra na zdraví mláďat. Aby byla mláďata zdravá, byla imunitně vybavena a prosperovala, je nutné přijmout dostatečné množství kolostra. Jednou z příčin úhynu neonatálních kůzlat je nedostatečné napojení kolostra, kdy dochází k hypoglykémii, hypotermii až úhynu nebo imunosupresi a mládě je náchylné k infekčním onemocněním. Po příjmu kolostra se do organismu dostanou vitamíny, mikroprvky, makroprvky, hormony a další významné látky, které jsou důležité pro tepelnou rovnováhu, udržení homeostázy organismu, správný růst a rozvoj mláďete. Cílem práce bylo zhodnotit kvalitu kolostra v závislosti na věku matky a získané hodnoty jednotlivých hematologických, biochemických a hormonálních parametrů kůzlat porovnat s věkem matek a zjistit zda má vliv stáří na změnu jednotlivých parametrů.

Materiál a metodika

Materiál

Celkem jsme vyšetřili 14 koz a 20 kůzlat mléčného plemene koza bílá krátkosrstá. Novorozeným kůzlatům byla odebírána krev ihned po porodu před napojením kolostra. Poté se kůzlata nechala matce, aby je očistila, osušila a dala jim napít kolostra. 2 hodiny po napití jim byla znovu odebrána krev jako druhý vzorek. Krev se odebírala z vena jugularis. Na hematologické vyšetření se krev odebírala do zkumavek s EDTA, na vyšetření selenu a GPx do heparinizovaných zkumavek a na biochemické vyšetření do zkumavek typu hemos, kde se nechalo vysrážet sérum. U každého kůzlete bylo provedeno základní klinické vyšetření - zda je vyvinut sací reflex, zda nedošlo při porodu k asfyxii nebo k aspiraci plodové tekutiny. Každé koze (matce) byl po porodu oddojen vzorek kolostra. Kozy byly rozděleny do dvou skupin a to na prvoroďičky (1,5 – 2 leté) a víceroroďičky (3-10leté).

Metodika

Krev a kolostrum bylo po odběru ihned odvezeno do Klinické laboratoře velkých zvířat na VFU ke zpracování. Vzorčky byly zpracovány a vyšetřeny do 24 hodin po odběru. Stanovoval se základní hematologický profil na automatickém hematologickém analyzátoru BC-2800 Vet. Z biochemických parametrů se měřily celková bílkovina, albumin, močovina, kreatinin, P, GMT, GPx a AST fotometricky na biochemickém analyzátoru Konelab 20i – Thermo Scientific. Vitamíny A a E pomocí kapalinového chromatografu Ultimate 3000 DIONEX, hormon T4 se stanovil chemiluminiscenční imunometrickou analýzou na analyzátoru IMMULATE – IMMUNOASSAY ANALYZER. Ca, Mg a Se se stanovovaly pomocí atomové absorpční spektrofotometrie (AAS) SOOLAR Thermo scientific. Glukóza se stanovila na přístroji Epc Blood Analysis System. U mleziva byly stanoveny imunoglobuliny a měrná hmotnost. Imunoglobuliny IgG se měřily pomocí ELISY Goat IgG ELISA Quantitation set Bethyl Laboratories, Inc. a měrná hmotnost se stanovila na digitálním refraktometru PAL-M. Dále se sledoval a vyhodnocoval zdravotní stav novorozených kůzlat v návaznosti na podání kolostra.

Výsledky a závěr

Výsledky hladin IgG a měrné hmotnosti z kolostra jsou znázorněny v tabulce 1. Byl prokázán vliv věku matky na měrnou hmotnost kolostra ($P < 0,05$). Vliv věku matky na hladinu IgG nebyl prokázán. Výsledky biochemických parametrů po napití kolostra jsou znázorněny v tabulce 2 a 3. Vliv věku matky byl prokázán u parametrů celkové bílkoviny ($P < 0,01$), kreatinin ($P < 0,01$), GMT ($P < 0,01$), AST ($P < 0,001$) a vitamínu A ($P < 0,001$). U ostatních parametrů můžeme vidět rozdíly v jednotlivých průměrech, ale hodnoty nebyly statisticky významné. Výsledky hematologických parametrů po napití kolostra jsou znázorněny v tabulce č. 4. Vliv věku matky byl prokázán pouze u leukocytů ($P < 0,01$). Ostatní hematologické parametry věkem ovlivněny nebyly. Novorozená kůzlata po podání kolostra prospívala, neměla žádné zdravotní problémy. Byl pouze jeden úhyn po 7 dnech, kdy pitvou byly zjištěny vývojové vady srdce. Ostatní kůzlata se odstavila od matky ve věku 3 měsíců a i nadále prospívala.

Tab. 1 Vliv věku matky na hladinu IgG a měrné hmotnosti kolostra		
	IgG (mg/ml)	měrná hmotnost (Brix %)
kozy prvorodičky	40,48 ± 13,75 sn	24,47 ± 4,00*
kozy vícerorodičky	34,04 ± 11,61 sn	19,85 ± 3,91*

Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka

Sn –statisticky nevýznamné, * P < 0,05

Tab. 2 Vliv věku matky na biochemické parametry po napití kolostra								
	CB g/l	Albumin g/l	Urea mmol/l	Crea umol/l	GMT ukat/l	AST μmol/l	Vit A μmol/l	Vit E μmol/l
kůzlata od prvorodičky	58,7±9,91**	24,1±2,18	6,85±1,99	96,7±27,62**	11,03±6,36**	1,52±0,43***	0,38±0,04***	0,79±0,79
kůzlata od vícerorodičky	43,9±9,00**	24,6±2,03	8,39±1,36	164,1±28,42**	3,24±2,90**	0,62±0,20***	0,19±0,10***	0,31±0,15

Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka

** P < 0,01 *** P < 0,001

Tab. 3 Vliv věku matky na biochemické parametry po napití kolostra							
	Ca mmol/l	P mmol/l	Mg mmol/l	Se μg/l	GPx μkat/l	Glu mmol/l	T4 nmol/l
kůzlata od prvorodičky	2,75±0,1 7	2,42±0,2 5	1,15±0,2 3	115,5±36,2 7	964,2±628,45	6,8±1,9 9	172,0±133,1 2
kůzlata od vícerorodičky	2,68±0,1 0	2,13±0,3 9	1,03±0,1 2	122,0±35,2 9	1228,7±397,4 9	5,2±2,0 1	266,0±44,22

Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka

Tab. 4 Vliv věku matky na hematologické parametry po napití kolostra				
	WBC *10 ⁹ /l	RBC*10 ¹² /l	HGB g/l	HCT l/l
kůzlata od prvorodičky	11,13±1,08**	9,22±0,88	110,0±16,97	39,6±3,27
kůzlata od vícerorodičky	6,15±2,46**	9,83±1,58	98,8±14,79	37,6±5,39

Data jsou vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka

** P < 0,01

Seznam literatury:

1. Hefnawy, A. E. G., & Tórtora-Pérez, J. L. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Research*, 89(2), 185-192
2. Haenlein, G. F. W., & Anke, M. 2011. Mineral and trace element research in goats: a review. *Small Ruminant Research*, 95(1), 2-19
3. Eldaim, M. A. A., Gaafar, K. M., Darwish, R. A., Mahboub, H. D., & Helal, M. A. 2015. Parturition vitamin A supplementation enhances goat doe health status and kid viability and performance. *Small Ruminant Research*, 129, 6-10
4. Šlosárková, S., Fleischer, P., Skřivánek, M., Doubek, J. 2003. Chladový stres u novorozených jehňat. *Náš chov*, 63(10), 46 – 47
5. Chniter, M., Hammadi, M., Khorchani, T., Sassi, M. B., Hamouda, M. B., & Nowak, R. (2013). Aspects of neonatal physiology have an influence on lambs' early growth and survival in prolific D'man sheep. *Small Ruminant Research*, 111(1), 162-170
6. Blum, J.W., Hammon, H. 2000. Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66, 151 – 159

7. Argüello, A., Castro, N., Capote, J., Tyler, J.W., Holloway, N.M. 2004. Effect of colostrum administration practices on serum IgG in goats kids. *Livestock Production Science*, 90, 235 – 239
8. Mellado, M., Pittroff, W., García, J.E., Mellado, J. 2008. Serum IgG, blood profiles, growth and survival in goat kids supplemented with artificial colostrum on the first day of life. *Trop Anim Health Prod*, 40, 141 – 145
9. Manat, T.D., Chaudhary, S.S., Singh, V.K., Patel, S.B., Puri, G. 2016. Hematobiochemical profile in Surti goats during post-partum period. *Veterinary World* 9(1), 19-24

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 113/2017/FVL.

Ovlivňování říjového cyklu u samic osla domácího pomocí hCG, GnRH a PGF_{2α}

Eliška Horáčková, Miroslava Mráčková, Michal Vyvial, Monika Brádáčová, Markéta Sedlinská

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

Úvod

Asistovaná reprodukce je v dnešní době nevyhnutelnou součástí chovu koní a oslů v České Republice. I přesto, že jsou osli evolučně nejbližší příbuzní koní, mají různé odlišnosti jak v anatomickém utváření reprodukčních orgánů, tak ve farmakokinetice léčiv. Současné studie se věnují prvořadě reprodukci klisen a výzkumy zaměřené speciálně na samice osla domácího jsou velmi omezené. Ovlivňovat říjový cyklus můžeme ve dvou fázích. Podáním hormonálních přípravků lze urychlit jak proces ovulace, tak i zánik žlutého tělíska, čímž zkrátíme dobu meziříjového období. Zpřesnění doby ovulace u oslic je stejně jako v asistované reprodukci klisen esenciálním procesem. Indukci ovulace je možné provádět pomocí hormonálních přípravků s luteinizačním účinkem, mezi které řadíme hCG (humánní choriový gonadotropin) a analogy GnRH (gonadotropin stimulující hormon) lecirelin a buserelin, ale mnoho informací o jejich fungování u oslic nemáme. Carluccio et al. (2007) zabýval aplikaci hCG a lecirelinu a Camillo et al. (2014) studoval účinek buserelinu. Ve všech studiích bylo dosaženo vysokého procenta ovulace do 48 hodin po aplikaci, avšak dávka intravenózně aplikovaného hCG (2500 IU) ve studii Carluccio et al. (2007) je poměrně vysoká a naším cílem tedy bylo ověřit u oslic účinek nižší dávky (1500 IU) dostačující u klisen (Davies Morel et al. 2008). Analogy GnRH se u klisen a skotu běžně aplikují intramuskulárně, zatímco ve studii Carluccio et al. (2007) aplikovali lecirelin intravenózně a Camillo et al. (2014) použili aplikaci buserelinu subkutánní. Obě tyto varianty aplikace léčiv u oslů považujeme za komplikovanější pro horší manipulovatelnost a temperament oslů. A proto jsme ověřovali účinnost analogu GnRH i hCG při intramuskulární aplikaci. K urychlení nástupu dalšího cyklu se běžně používá luteolytikum cloprostenol. Studie na oslicích (Carluccio et al. 2008) popisuje funkční regresi žlutého tělíska po aplikaci nízké dávky cloprostenolu již 3. den po ovulaci. Vzhledem ke snaze zkrátit meziovulační období na minimum, jsme ověřovali účinnost cloprostenolu při aplikaci již 2. den po ovulaci.

Hlavním cílem projektu bylo posoudit u oslic účinnost hormonálních přípravků běžně používaných k ovlivňování říjového cyklu u klisen, jejich dávkování a způsob aplikace. A v neposlední řadě bylo důležitým cílem naší studie efektivní načasování doby ovulace, což přinese pozitivní praktický dopad jak pro terénní veterinární lékaře, tak i pro chovatele oslů.

Materiál a metodika

Pokusná zvířata

Do projektu bylo v průběhu května až srpna zařazeno 11 oslice od soukromých majitelů ve věku 4 – 15 let. Byly ustájeny na Klinice chorob koní, kde projekt probíhal. Oslice byly 3x denně krmeny senem a byl jim umožněn adlibitní přístup k vodě a do venkovního padoku. Byly ustájeny po jedné až dvou oslicích v jednom boxu a měly možnost interakce s dalšími oslicemi ve venkovních padocích. Projekt pokusu byl schválen rozhodnutím Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy pod číslem jednací: MSMT- 11921/2017-5.

Monitorování ováriální aktivity a aplikace hormonálních přípravků

Ovariální aktivita u oslic byla monitorována transrektální ultrasonografií po dobu minimálně dvou říjových cyklů. Oslice byly vyšetřovány jedenkrát denně do velikosti folikulu 3 cm a více. Při této velikosti folikulu bylo oslicím intramuskulárně aplikováno GnRH v dávce 50 μ g pro toto a dále byly vyšetřovány každých 24 hodin až do ovulace. Druhý den po ovulaci byl oslicím intramuskulárně aplikován PGF_{2 α} v dávce 0,125 mg pro toto a oslice byly opět každých 24 hodin vyšetřovány, čímž bylo zajištěno monitorování folikulární aktivity. Při dosažení velikosti folikulu 3 cm a více v druhém cyklu bylo oslicím aplikováno intramuskulárně hCG v dávce 1500 IU. A vyšetřování dále pokračovalo každých 24 hod až do ovulace. Každé vyšetření jsme důkladně zaznamenali. Záznam obsahoval popis zevních genitálií oslice, sonografický nález na vaječnicích i děloze a dále změny v chování samice v závislosti na velikosti folikulu a tedy na estrogenizaci.

Výsledky

Výsledky vyšetření jsou znázorněny v tabulce 1. V prvním cyklu, kdy bylo oslicím aplikováno GnRH, zareagovalo pozitivně na léčbu 8 z 11 oslic. Za pozitivní reakci jsme považovali, když oslice zovulovala do 48 hodin po aplikaci hormonálního přípravku. Za pozitivní reakci na aplikaci PGF_{2 α} jsme považovali zkrácení doby diestru (< 16 dní).

Pozitivně na aplikaci PGF2 α již druhý den po ovulaci zareagovaly 4 oslice z 11. Na aplikaci hCG pozitivně zareagovaly 3 z 11 oslic.

Tabulka č.1: Výsledky transrektálního vyšetření

Oslice (Jméno)	velikost folikulu při aplikaci GnRH	1. ovulace (po aplikaci GnRH)	doba od ovulace do aplikace hCG (reakce na prostglandin, zkrácení diestru)	velikost folikulu při aplikaci hCG	2. ovulace (po aplikaci hCH)
ANNA	32x34	do 96 hod (4 dny)	8 dní	33x33	neovulující foliku po 30dní
HEDVIKA	33x37	do 72 hod	20 dní	33x38	do 48 hod
LADY	33x33	do 48 hod	5 dní	32x32	do 120 hod (5 dní)
MÁRINKA	30x33	do 120 hod (5dní)	18 dní	33x30	neovulující foliku, zmenšil se
MERKÉTA	30x35	do 48 hod	21 dní	30x35	do 72 hod
MADLA	31x30	do 48 hod	26	30x31	do 96 hod (4dny)
ORNEA	31x32	do 24 hod	22 dní	30,5x30	do 48 hod
COBA	32x34	do 48 hod	19 dní	32x34	do 72 hod
FLEUR	33x35	do 24 hod	16 dní	30x32	do 48 hod
BÁRA	32x31	do 48 hod	8 dní	33x31	do 120 hod (5 dní)
JULČA	32x34	do 48 hod	10 dní	34x31	do 96 hod (4dny)
		8/11 zareagovaly	4/11 zareagovaly		3/11 zareagovaly

Závěr

Tato studie ukázala, že jednorázová aplikace analogů GnRH lecirelinu je schopna v průběhu 48 hodin indukovat ovulaci u samic osla domácího. Aplikace GnRH byla v naší studii při indukci ovulace úspěšnější než aplikace hCG. Účinnost hCG bývá navíc často opakovanými aplikacemi snížena kvůli imunogenním vlastnostem proteinů odvozených od člověka, takže použití analogů GnRH se jeví jako lepším řešením při použití v asistované reprodukci. Luteolytický účinek cloprostenolu při aplikaci již 2. den po ovulaci, ve snaze zkrátit meziovulační období na minimum, jsme nepotvrdili.

Seznam literatury:

Camillo F, Vannozzi I, Tesi M, Sabatini Ch, Rota A, Paciolla E, Danq-Nguyen I, Panzani D 2014: Induction of ovulation with buserelin in jennies: In search of the minimum effective dose. Anim Reprod Sci 151: 56 – 60.

Carlucio A, Panzani S, Tosi U, Faustini M, De Amicis I, Veronesi MC 2007: Efficacy of hCG and GnRH for inducing ovulation in the jenny. Theriogenology 68: 914 – 919.

Carlucio A, Panzani S, Tosi U, Faustini M, De Amicis I, Veronesi MC 2008: Luteal function in jennies following PGF₂ α treatment 3 days after ovulation. Theriogenology 70: 121 – 125.

Davies Morel MCG, Newcombe JR 2008: The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. Anim Reprod Sci 109: 189 – 199.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 114/2017/FVL.

Antioxidační stav a koncentrace malondialdehydu (MDA) u dojnic v peripartálním období

Píšťková K., Kazatelová Z., Procházková H., Danielová L.

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

Úvod

V peripartálním období a obzvláště v období po porodu dochází u dojnic k metabolickým změnám z důvodu vyšších nároků na energii. Tyto změny mají za následek zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a organismus se často dostává do tzv. oxidačního stresu^{1,2}. Oxidační stres vyvolaný během tranzitního období je nadále velkým problémem u dojnic a důvodem řady onemocnění, a proto je důležité studie týkající se této problematiky stále prohlubovat^{3,4}. Cílem studie bylo stanovení a vyhodnocení antioxidačních parametrů, markeru oxidačního stresu – malondialdehydu a metabolického profilu u dojnic ante partum a post partum.

Materiál a metodika

V rámci pokusu bylo odebráno celkem 60 vzorků krve od počtu 10 krav Holštýnského skotu v průběhu peripartálního období. Vzorky byly odebrány z vena coccygea media v šesti časových intervalech - 6 týdnů a 3 týdny ante partum (a.p.), bezprodleně po porodu, 1 týden, 3 týdny a 6 týdnů post partum (p.p.). Vzorky krve byly ihned po odběru zpracovány a použity ke stanovení parametrů v laboratoři nebo uskladněny v hlubokomrazícím boxu při -70 °C pro další analýzy. Studie byla provedena na farmě Uherčice, okres Břeclav. Dojnice zastoupené v pokusu byly na 2. a vyšší laktaci. Průměrná hodnota body condition score (BCS) v období před porodem byla 3,80. Složení krmné dávky bylo přizpůsobeno dle antepartálního a postpartálního období. Stanovení jednotlivých parametrů z krevního séra, plazmy a plné krve byla provedena v Klinické laboratoři pro velká zvířata VFU Brno. Koncentrace malondialdehydu (MDA) byla stanovena pomocí dvou různých metod. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) byla provedena za použití systému Ultimate 3000 (Dionex, USA)⁵. Pro spektrofotometrické stanovení byl použit komerční kit BIOXYTECH LPO-586 od firmy OxisResearch, USA. Koncentrace glutathionu (GSH) v plné krvi byla měřena za použití komerčního kitu BIOXYTECH GSH-420 (OxisResearch, USA). Fotometrické stanovení MDA a GSH bylo provedeno pomocí spektrofotometru Evolution 160

(Thermo Scientific, USA). Ke stanovení koncentrace vitamínu A, E a betakarotenu byla využita metoda HPLC – Ultimate 3000 (Dionex, USA). Aktivita enzymu glutathion peroxidázy (GPx) v plné krvi, celková antioxidační kapacita (TAS), koncentrace nenasycených mastných kyselin (NEMK) a beta-hydroxybutyrátu (BHB) v séru byly stanoveny za použití komerčních kitů od firmy Randox Laboratories Ltd, UK. Další biochemické parametry (bilirubin, glukóza, urea, AST, P) byly měřeny za použití komerčních kitů od firmy Biovendor, ČR. Ke stanovení byly použity automatické biochemické analyzátoary Cobas Mira Plus (Roche, Švýcarsko) a Lyasis (AMS, Itálie). Koncentrace selenu v plné krvi a koncentrace minerálních prvků v séru (Ca, Zn, Cu, Mg) byly měřeny pomocí metody atomové absorpční spektrometrie (AAS) – SOLAAR (Thermo Scientific, USA).

Výsledky

Výsledné hodnoty markeru oxidačního stresu a antioxidačních parametrů jsou uvedeny v Tab 1. Nejvyšší střední hodnota koncentrace MDA I (0,276 $\mu\text{mol/l}$) byla naměřena bezprodleně po porodu. Tato hodnota byla významně zvýšená v porovnání s 1. odběrem v 6. týdnu ante partum ($P < 0,01$) a s 6. odběrem v 6. týdnu post partum ($P < 0,05$). Snížená aktivita enzymu GPx byla zaznamenána v období po porodu až do 6. týdnů post partum. Statisticky významný rozdíl byl zaznamenán u aktivity GPx naměřené ihned po porodu (1046,3 $\mu\text{kat/l}$) vůči střední hodnotě v 6. týdnu a.p. ($P < 0,05$), dále u středních hodnot aktivity GPx v 1. týdnu (872,3 $\mu\text{kat/l}$) a 3. týdnu p.p. (792,7 $\mu\text{kat/l}$) ve srovnání s naměřenými hodnotami v 6. týdnu a.p. ($P < 0,001$), v 3. týdnu a.p. ($P < 0,05$; $P < 0,01$) a v 6. týdnu p.p. ($P < 0,01$; $P < 0,001$). Nejnižší střední koncentrace TAS byla stanovena u dojnic bezprodleně po porodu (0,77 mmol/l) a ve srovnání se středními hodnotami v 3. týdnu ($P < 0,05$)

Tab 1: Hodnoty markeru oxidačního stresu a antioxidačních parametrů u dojnic v období 6 týdnů před porodem až 6 týdnů po porodu

odběr		MDA I $\mu\text{mol/l}$	MDA II $\mu\text{mol/l}$	GPx $\mu\text{kat/l}$	GSH $\mu\text{mol/l}$	Se $\mu\text{g/l}$	TAS mmol/l	vit A $\mu\text{mol/l}$	vit E $\mu\text{mol/l}$	β -kar $\mu\text{mol/l}$
1		0,231 ^A	0,701	1168,5 ^{a,a,b}	306,09	162,8	0,83	0,74	7,70	5,21
6 t a.p.	SD	0,045	0,298	139,1	44,20	19,3	0,10	0,22	2,15	2,60
2	x	0,234	0,601	1085,5 ^{β,A}	287,75	156,1	0,80 ^{a,a}	0,75 ^a	6,38 ^a	5,27
3 t a.p.	SD	0,068	0,277	106,2	55,07	16,6	0,09	0,16	1,52	2,40
3	x	0,276 ^{A,α}	0,561	1046,3 ^a	291,37	169,0	0,77 ^{β,b}	0,65 ^{β}	6,45 ^b	5,34
p.p.	SD	0,066	0,388	246,5	38,44	21,1	0,11	0,34	2,15	3,30
4	x	0,265	0,361	872,3 ^{a,β,B}	273,18	155,9	0,86 ^A	0,79	5,37 ^c	4,56
1 t p.p.	SD	0,051	0,236	178,3	50,77	19,8	0,05	0,24	1,49	1,44

5	x	0,272	0,680	792,7 ^{b,A,c}	276,87	159,0	0,94 ^{a,β}	0,85	7,28	4,14
3 t p.p.	SD	0,048	0,285	268,7	32,70	26,1	0,12	0,27	2,34	3,04
6	x	0,248 ^a	0,629	1153,0 ^{B,c}	272,83	169,8	0,98 ^{a,b,A}	1,04 ^{a,β}	12,14 ^{a,b,c}	5,56
6 t p.p.	SD	0,034	0,366	158,5	24,84	24,4	0,12	0,26	3,30	3,63

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v daném sloupci jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α, β – $P < 0,05$; A, B – $P < 0,01$; a, b, c – $P < 0,001$; a.p. – *ante partum*; p.p. – *post partum*; MDA I – malondialdehyd (metoda HPLC); MDA II – malondialdehyd (spektrofotometrické stanovení); GPx – glutathion peroxidáza; GSH – glutathion; Se – selen; TAS – celková antioxidační kapacita; vit A – vitamín A; vit E – vitamín E; β-kar - betakaroten

Tab 2: Hodnoty koncentrací BHB a NEMK u dojnic v období 6 týdnů před porodem až 6 týdnů po porod

odběr		BHB mmol/l	NEMK mmol/l
1	x	0,57	0,14 ^{a,b}
6 t a.p.	SD	0,14	0,08
2	x	0,66	0,13 ^{A,B,c}
3 t a.p.	SD	0,10	0,14
3	x	0,53	0,33 ^{a,A}
p.p.	SD	0,19	0,17
4	x	0,56	0,48 ^{b,c,C}
1 t p.p.	SD	0,18	0,16
5	x	0,63	0,32 ^B
3 t p.p.	SD	0,16	0,20
6	x	0,49	0,27 ^C
6 t p.p.	SD	0,16	0,16

a 6. týdnu p.p. ($P < 0,001$) byla významně snižena. Významně snížená koncentrace vitamínu A (0,65 $\mu\text{mol/l}$) byla naměřena u dojnic bezprodleně po porodu v porovnání se střední hodnotou koncentrace v 6. týdnu po porodu ($P = 0,01$). Nejnižší střední hodnota koncentrace vitamínu E stanovená u dojnic v 1. týdnu post partum (1,49 $\mu\text{mol/l}$) byla signifikantně snižena vůči hodnotě koncentrace v 6. týdnu post partum ($P < 0,001$). U naměřených koncentrací betakarotenu, selenu, glutathionu a MDA II nebyly v průběhu měření zaznamenány žádné signifikantní rozdíly v rámci jednotlivých odběrových skupin.

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v daném sloupci jsou zaznamenány pomocí stejného značení: A, B, C – $P < 0,01$; a, b, c – $P < 0,001$; a.p. – *ante partum*; p.p. – *post partum*; BHB – beta-hydroxybutyrát; NEMK – nenasycené mastné kyseliny

Tab 3: Hodnoty biochemickým parametrů a minerálních prvků u dojnic v období 6 týdnů před porodem až 6 týdnů po porodu

odběr		Bili $\mu\text{mol/l}$	Glu mmol/l	Urea mmol/l	AST $\mu\text{mol/l}$	Ca mmol/l	P mmol/l	Zn $\mu\text{mol/l}$	Cu $\mu\text{mol/l}$	Mg mmol/l
1	x	4,9 ^A	3,1 ^{a,A}	4,57 ^{a,a,b}	0,85 ^{A,a}	2,32 ^a	1,61 ^{a,A}	13,49 ^A	11,96	0,82 ^A
6 t a.p.	SD	1,9	0,3	1,02	0,20	0,11	0,43	1,32	1,99	0,10
2	x	4,0	3,2 ^{β,B}	5,05 ^{A,c,d}	1,02	2,31 ^b	1,71 ^B	13,00 ^a	10,99 ^a	0,98
3 t a.p.	SD	1,8	0,3	0,97	0,31	0,09	0,39	2,19	1,29	0,11
3	x	4,0	3,1	3,20 ^{a,A}	0,99	2,08 ^{a,b,c, d,e}	1,29 ^a	11,42 ^{A,B,α,β}	10,51 ^β	1,05 ^{A, B}
p.p.	SD	1,8	0,6	1,13	0,25	0,20	0,42	2,31	1,40	0,21

4	x	3,0	2,6 ^{α,β}	2,63 ^{a,c}	1,31 ^A	2,29 ^c	1,25 ^{A,B,β,γ}	12,88	12,51 ^{α,β}	0,83 ^B
1 t p.p.	SD	2,3	0,5	1,07	0,31	0,14	0,30	2,07	1,14	0,10
5	x	2,4 ^{A,B}	2,5 ^{A,B}	3,08 ^{b,d}	1,13 ^α	2,31 ^d	1,72 ^β	12,49 ^β	12,51	0,90
3 t p.p.	SD	1,0	0,4	0,77	0,16	0,14	0,55	2,47	1,31	0,10
6	x	5,0 ^B	2,4	3,25	0,82	2,35 ^e	1,49 ^γ	13,39 ^B	11,34	0,97
6 t p.p.	SD	1,2	0,4	0,82	0,40	0,08	0,37	1,15	2,13	0,11

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v daném sloupci jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α, β, γ – $P < 0,05$; A, B – $P < 0,01$; a, b, c, d – $P < 0,001$; a.p. – *ante partum*; p.p. – *post partum*; Bili – bilirubin; Glu – glukóza; AST – aspartátaminotransferáza; Ca – vápník; P – fosfor; Zn – zinek; Cu – měď; Mg – hořčík

Stanovené koncentrace BHB a NEMK u dojnic v průběhu peripartálního období jsou uvedeny v Tab 2. Nejvyšší hodnota koncentrace NEMK byla naměřena střední hodnotou koncentrace v 6. týdnu a 3. týdnu a.p. ($P < 0,001$) a v 6. týdnu p.p. ($P < 0,01$) byla statisticky významně zvýšená. Střední hodnoty koncentrací biochemických parametrů a minerálních prvků jsou uvedeny v Tab 3.

Závěr

Změny koncentrací jednotlivých parametrů prokázaly výskyt oxidačního stresu u dojnic v peripartálním období. Po porodu došlo k signifikantnímu nárůstu koncentrace MDA dle očekávání. Stanovení MDA lze považovat za vhodný marker oxidačního stresu. Z hlediska použití a specifity metod se prozatím jeví jako vhodnější metoda HPLC. Aktivita enzymu GPx, jednoho z hlavních komponentů antioxidačního obranného systému, byla signifikantně snížena v období po porodu, což indikuje stav oxidačního stresu. Snížení koncentrace TAS, vitamínu A (ihned p.p.) a vitamínu E (1 t p.p.) souvisí s vyčerpáním antioxidační aktivity, což opět indikuje oxidační stres. Dojnice v brzkém období po porodu jsou více náchylnější vůči výskytu oxidačního stresu a disponují nízkou antioxidační kapacitou. Pravidelná kontrola antioxidačního obranného systému a suplementace jednotlivými antioxidanty může být nápomocna v ochraně proti řadě onemocnění vyskytujících se v tranzitním období u dojnic.

Seznam literatury

1. Sordillo L. M., Aitken S. L. 2009: Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 104-109
2. Konvičná J., Vargová M., Paulíková I., Kováč G., Kostecká Z. 2015: Oxidative stress and antioxidant status in dairy cows during prepartal and postpartal periods. *Acta Veterinaria* 2015 84: 133-140

3. Castillo C., Hernandez J., Bravo A., Lopez-Alonso M., Pereira V., Benedito J. L. 2005: Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal* 169: 286-292
4. Castillo C., Hernandez J., Valverde I., Pereira V., Sotillo J., Alonso-López M., Benedito J. L. 2006: Plasma malondialdehyde (MDA) and total antioxidant status (TAS) during lactation in dairy cows. *Research in Veterinary Science* 80: 133-139
5. Matějčková J., Samec M., Jaček M., Tůma P. 2011: Monitorování malondialdehydu u pacientek s karcinomem dělohy a vaječníků pomocí HPLC. *Chemické listy* 105: 375-380

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 115/2017/FVL.

Nové fyziologické funkce kaspáz v osteogenních drahách

Petra Bílíková¹, Eva Janečková^{1,2}, Eva Matalová^{1,2}

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

Brno

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

Úvod

Kaspázy, cysteinové proteázy, jsou molekuly dobře známé z oblasti apoptózy a zánětu. Stále častěji se však objevují údaje o jejich významné roli mimo tyto procesy (Shalini et al. 2015). Určitá evidence o nových funkcích kaspáz se týká také osteogeneze, vzniku a vývoje kostí. U savců probíhá dvěma základními mechanismy, endochondrální (typickou pro dlouhé kosti) a intramembranózní (typickou pro kosti lebky) osifikací. Zásadním rozdílem je, že u intramembranózních kostí diferencují osteoblasty přímo z mezenchymových prekursorů, zatímco u endochondrálních existuje chrupavčité stadium. V druhém případě vytvářejí chondrocyty extracelulární matrix, která je oporou pro invazi cév a diferenciaci kostních buněk. Mnohé z chondrocytů podstupují buněčnou smrt, ale jak ukazuje nejnovější výzkum, řada z nich se stává kostními buňkami (Jing et al. 2016), lze u nich tedy očekávat osteogenní potenciál. Je známa celá řada faktorů, které se podílejí na endochondrální osifikaci (e.g. Provot et al. 2004), o neapoptotickém uplatnění kaspáz však v této souvislosti mnoho známo není.

Hlavním cílem výzkumu proto byl přehledný screening osteogenního potenciálu kaspáz na *in vitro* modelu chondrogenese ve vztahu k endochondrální osifikaci.

Materiál a metodika

Mikromasové kultury: Primární buněčné kultury odvozené z končetinových základů, často používaný *in vitro* model chondrogenese ve vztahu k endochondrální osifikaci *in vitro* (e.g. Mello et Tuan, 1999). Odběr tkáně: mikrodisekce myších předních končetin, prenatalní den 12; rozvolnění buněk: mechanicky, enzymaticky (dispáza); příprava spotů: nanesení na kultivační misku, koncentrace 2×10^7 buněk/ml; kultivace: médium (DMEM, sérum, Pen/Strep, výměna po 48 h), 5% CO₂, 37 °C.

Inhibice kaspáz: Pan Caspase FMK inhibitor (R&D Systems, FMK001) rozpuštěný v DMSO, 100 μ M (aplikace do kultivačního média po stabilizaci kultur); kontrolní skupina s aplikací DMSO; paralelní kultivace po dobu 6 dnů, odběr vzorků do lyzačního pufru pro další zpracování.

PCRArrays analýza: Izolace RNA z odebraných vzorků (RNeasy Mini Kit, Qiagen); prepis do cDNA (SuperScript VILO, Invitrogen); Mouse Osteogenic PCRArray (PAMM-026A-24, Qiagen), součástí je program na statistickou analýzu pro tři biologické replikace; výsledky jsou hodnoceny jako rozdíl/násobek exprese kontrola vs. experiment; statistická významnost je hodnocena t-testem.

Výsledky

PCRArrays analýza 84 osteogenních genů prokázala po inhibici kaspáz změnou exprese u několika desítek genů. U devíti z nich byla tato změna více než 5 -ti násobná. Jedná se o CD36 antigen, matrixové metaloproteinázy (Mmp9 a Mmp10), kolageny (Col2a1, Col14a1), sklerostin (Sost), alfa M podjednotku integrinu (Itgam), secernovaný fosfoprotein 1 (Spp 1) a transkripční faktor Gli1. Zvýšení, resp. snížení exprese těchto genů a jeho hodnota jsou uvedeny v tab. 1.

Tabulka 1: Seznam genů se statisticky signifikantním snížením/zvýšením exprese více než 5x po inhibici kaspáz.

Gen/zkratka	Gen/název	Násobek změny
CD36	CD36 antigen	-448,75
Mmp9	Matrix metalloproteinase 9	-26,49
Itgam	Integrin alpha M	-14,43
Gli1	GLI-Kruppel family member GLI1	-9,42
Col14a1	Collagen type XIV, alpha 1	-8,57
Col2a1	Collagen type II, alpha 1	-8,21
Mmp10	Matrix metalloproteinase 10	+7,6

Sost	Sclerostin	-6,94
Spp1	Secreted phosphoprotein 1	+5,02

Diskuse a závěry

Získané výsledky prokázaly účast kaspáz v osteogenních signálních drahách a poukázaly na kandidátní geny související s novými funkcemi kaspáz v chondrogenezi ve vztahu k endochondrální osifikaci. Nejvýraznější změna se týkala exprese genu CD36, markeru hypertrofických chondrocytů (Cecil et al. 2009), je tedy zřejmé, že kaspázy ovlivňují expresní profil těchto buněk. Zapojení CD36 se předpokládá také v resorpci kostí, a to přes c-src signalizaci v osteoklastech (Carron et al. 2000). CD36 je navíc receptorem pro kolageny (Mercier et al. 1995), u kterých byla také zaznamenána změna exprese po inhibici kaspáz a dokresluje impakt kaspáz na tvorbu/skladbu extracelulární matrix. S touto souvisí i změna exprese matrixových metaloproteináz, která byla zvýšena u Mmp10 a snížena u Mmp9. Mmp10 je vázána na osteoklasty v růstové ploténce dlouhých kostí, Mmp9 je klíčová pro invazi osteoklastů do mineralizované matrix a také pro vaskularizaci kostní tkáně (Engsig et al. 2000). Inhibicí kaspáz byla zasažena exprese dalších molekul extracelulární matrix, zejména integrinů. Sklerostin, jehož exprese byla snížena, je markerem osteocytů. Jedná se o antagonistu BMP (bone morphogenetic protein) signalizace, jedné z nejvýznamnějších drah související s osteogenezí; kaspázy tedy zřejmě mohou zasahovat i do těchto stěžejních procesů.

Dosažené výsledky byly ověřeny na orgánových systémech (explantáty ulny), propojeny s časoprostorovým profilem aktivace proapoptotických kaspáz v růstové ploténce a byly přijaty k publikaci v časopise *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (IF=2,5) - Janečková E, Bíliková P, Matalová E: Osteogenic Potential of Caspases Related to Endochondral Ossification (p. 1-12, in press, doi: 10.1369/0022155417739283).

Seznam literatury:

- Carron JA, Wagstaff SC, Gallagher JA, Bowler WB. A CD36-binding peptide from trombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270(3):1124–7. doi:10.1006/bbrc.2000.2574
- Cecil DL, Appleton CT, Polewski MD, Mort JS, Schmidt AM, Bendele A, Beier F, Terkeltaub R. The pattern recognition receptor CD36 is a chondrocyte hypertrophy marker associated with suppression of catabolic responses and promotion of repair responses to inflammatory stimuli. *J Immunol.* 2009; 182(8):5024–31. doi:10.4049/jimmunol.0803603
- Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkildsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J Cell Biol.* 2000; 151(4):879–89. doi:10.1083/jcb.151.4.879.
- Jing Y, Hinton RJ, Chan KS, Feng JQ. Co-localization of cell lineage markers and the tomato signal. *J Vis Exp.* 2016; 118:e54982. doi: 10.3791/54982.
- Mello MA, Tuan RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999; 35 (5):262–9. doi:10.1007/s11626-999-0070-0
- Mercier N, Catimel B, Reck MP, Pellicchia D, McGregor JL. Identification of a functional site on CD36 involved in the interaction between platelets and collagen. *Platelets.* 1995; 6 (3):139–45. doi: 10.3109/09537109509013266.
- Provot S, Schipani E. Molecular mechanisms of endochondral bone development. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328(3):658–65. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.068
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 2015; 22(4):526–39. doi:10.1038/cdd.2014.216

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 117/2017/FVL.

Intrafolikulární transfer oocytů u mléčného skotu

Michaela Andrlíková, Lucie Štenclová, Svatopluk Čech

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

Úvod

Transvaginální ultrasonografická punkce vaječníků nachází v asistované reprodukci u skotu stále širší využití (1, 2, 3). V současnosti se metoda transvaginální ultrasonografické punkce vaječníků začíná používat k injekci oocytů do preovulačního folikulu (intrafollicular oocyte transfer, IFOT) (5, 6). Podstatou IFOT je přenos oocytů získaných od dárce do preovulačního folikulu příjemce a následná inseminace příjemce. Injektované oocyty podstupují *in vivo* maturaci ve folikulu, po ovulaci jsou ve vejcovodu oplozeny a pokračují ve vývoji. Osm dnů po IFOT jsou výplachem dělohy příjemce získána sedmidenní embrya, se kterými lze dále manipulovat. Tento postup obejde proces maturace, fertilizace a kultivace v prostředí *in vitro* a embrya takto získaná mají na rozdíl od IVP embryí vlastnosti shodné s *ex vivo* produkovanými embryi (5). Metoda IFOT však zatím neposkytuje výsledky kvantitativně srovnatelné s IVP a není metodicky zcela zvládnuta. Používané nástroje vyžadují poměrně komplikovanou součinnost několika pracovníků.

Cílem předkládaného projektu bylo vypracovat zcela nové instrumenty, kterými bude možné provádět IFOT v terénních podmínkách bez nutnosti asistence dalšího pracovníka. Vypracování instrumentária k IFOT umožní soustředit se v budoucnosti na modifikace vlastní metodiky IFOT ve smyslu zvýšení kvality a viability získaných struktur a přístup k takto produkovaným embryím rozšíří možnosti studia vlivu závěrečné fáze zrání oocytu ve folikulu na embryo.

Materiál a metodika

Pro IFOT byly zkonstruovány 3 nástroje – aspirátor, aplikátor a injektor. Aspirátor je mikromanipulátor, kterým lze aspirovat oocyty z Petriho misky do aplikátoru. Aplikátor je tvořen inzulinovou injekční stříkačkou, aplikačním nástavcem a injekční jehlou (25G, 0,55x40 mm). Aplikační nástavec je kovový váleček, v jehož luminu je vložena zakrácená inseminační pejeta. Na jeden konec nástavce se připevní inzulinová injekční stříkačka, na druhý konec injekční jehla. Oocyty jsou aspirovány tak, že se nacházejí v samotné špičce jehly. Injektor je instrument umožňující upevnění aplikátoru, jeho zavedení do pochvy příjemce a pohybem táhla zvenčí pod sonografickou kontrolou aplikovat obsah aplikátoru do folikulu.

Experiment 1: Ověření nástrojů k IFOT v laboratoři

K manipulaci byly využity oocyty odebrané z jatečných vaječníků. Jako nosné médium pro IFOT byla využita folikulární tekutina (FT). Aplikátor byl naplněn množstvím 0,05 ml FT. Poté bylo do aplikátoru přitaženo aspirátorem 10 oocytů v minimálním množství FT (10-20 μ l). Aplikátor byl polohován na 3 minuty s cílem zjistit, zda dojde k ovlivnění mechaniky pohybu oocytů. Jedna skupina byla polohována jehlou dolů, druhá jehlou nahoru a třetí ve vodorovné poloze. Obsah každé stříkačky byl vyprázdněn do Petriho misky pro zjištění počtu zpětně získaných oocytů. V průběhu sledování navíc vyplynula nutnost vyhodnotit vliv délky zakrácené inseminační pejety v aplikátoru na počet zpětně získaných oocytů.

Experiment 2: Ověření nástrojů k IFOT *in vivo*

Nejprve byl testován vliv intrafolikulární injekce fyziologického roztoku (IFT) na průběh ovulace u jalovic. Zvířata byla před IFT synchronizována podle ověřeného protokolu (5), IFT byla provedena pomocí nově vyvinutých nástrojů a nástrojů k sonografické transvaginální punkci vaječníků. Za 24 - 30 hodin po IFT byl sonograficky zkontrolován průběh ovulace. Dále byl prováděn samotný IFOT, kdy příprava jalovic byla stejná jako pro IFT, namísto fyziologického roztoku však byly do folikulu injikovány oocyty, které byly předem odebrány z jatečných vaječníků. Do aplikátoru byla aspirátorem nasáta říjová folikulární tekutina a na závěr aspirovány oocyty. Aplikátory byly polohovány v úhlu 45° po dobu 3 minut. Za 16 hodin po IFOT byla provedena intrakornuální inseminace komerčními inseminačními dávkami. Odběr embryí 8 dnů po IFOT byl proveden konvenčním výplachem dělohy jako při transferu embryí. Po odběru embryí byla u jalovic indukována luteolýza aplikací cloprostenolu a po týdenní přestávce byla zahájena další perioda synchronizace. Byla hodnocena úspěšnost intrafolikulární injekce (na základě pozorování dutiny folikulu a jeho další perzistence), vliv intrafolikulární injekce na ovulaci ošetřeného folikulu a počet získaných oocytů/embryí.

Výsledky

Podíl oocytů získaných *in vitro* v závislosti na vlastnostech aplikátoru je uveden v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1: Podíl oocytů získaných *in vitro* v závislosti na délce pejety v aplikátoru

Délka pejety	Aspirováno	Získáno	%	
15 mm	197	104	52,8%	a
18 mm	598	555	92,8%	b***

*** $p < 0,001$

Tabulka 2: Podíl oocytů získaných *in vitro* v závislosti na délce pejety a polohování aplikátoru

Délka pejetý	Oocyty				
	Poloha jehly	Aspirováno	Získáno	%	
15 mm	Vodorovně	107	46	43%	a
	Svisle dolů	90	58	64,4%	b**
	Vodorovně	198	177	89,4%	c
18 mm	Svisle dolů	200	195	97,5%	d**
	Svisle nahoru	200	183	91,5%	c

** p<0,01

Všechny provedené intrafolikulární injekce byla hodnoceny jako úspěšné (18/18, 100%).
Míra ovulace folikulů po IFT/IFOT byla 83,3% (18/15).

Závěr

V experimentu 1 byly testovány nově vyrobené instrumenty pro IFOT *in vitro*. Aspirátor je po nutných úpravách výšky závitů mikrošroubu plně funkční a umožňuje nasát oocyty do aplikátoru ve velmi malém objemu 0,1 ml. Testování jiných objemů proto nebylo nutné. Byla stanovena optimální délka pejetý (18 mm), která je vsunuta do kovového aplikačního nástavce a musí zasahovat až do konce konusu injekční jehly. Pokud je pejeta zkrácena až na délku kovového aplikačního nástavce (15 mm), je zisk oocytů nižší (92,8% vs. 52,8%). Byl prokázán vliv polohování aplikátoru s aspirovanými oocyty před vlastním IFOT na procento znovuzískaných oocytů. Při polohování injekční soustavy jehlou dolů byl zisk oocytů 97,5%, vodorovně 89,4%, nahoru 91,5%. Z námi získaných dat vyplývá, že injekční souprava musí být po celou dobu předcházející vlastnímu IFOT polohována svisle, kdy dochází k sedimentaci oocytů do jednoho shluku. V důsledku adhezivní kumulární buněk se oocyty poté chovají jako celek a jsou vypuzeny naráz. Při polohování injekční soustavy horizontálně zůstávají pravděpodobně oocyty rozprostřeny na větší ploše a dochází k jejich adhezi na povrch injekčního systému.

V experimentu 2 byly testovány instrumenty pro IFOT *in vivo*. Bylo zjištěno, že injektor s vloženým aplikátorem při využití základního vybavení pro transvaginální sonografickou punkci vaječnicků umožňuje provádět spolehlivě IFT/IFOT. Známky proudění tekutiny v ošetřeném folikulu byly pozorovány u všech akcí (100%), folikuly si ponechaly původní tvar a v následných kontrolách perzistovaly na vaječnicích až do ovulace. Míra ovulace ošetřených folikulů je v podstatě stejná (83,3%) jako je běžné u indukovaných říjí. Vliv IFT/IFOT je tedy zanedbatelný, nicméně k plnému potvrzení bude třeba provedení vyššího počtu akcí. Hodnocení zisku získaných oocytů/embryí výplachem dělohy doposud nepodalo jednoznačně interpretovatelné výsledky a plné dokončení metodiky IFOT proto vyžaduje další sledování.

Realizací projektu byly zkonstruovány a ověřeny nové instrumenty umožňující provádění IFOT a vypracována rámcová metodika IFOT prováděného jednoduchým způsobem v terénních podmínkách. Po detailním dopracování bude metodika IFOT využívána ve výzkumu i v terénní produkci embryí.

Seznam literatury

1. Pieterse, M.C. – Kappen, K.A. – Kruip, Th.A.M. – Taverner, M.A.M. (1988): Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30, 751 – 762.
2. Indrova, E. – Dolezel, R. – Novakova-Mala, J. – Pechova, A. – Zavadilova, M. – Cech, S. (2017): Impact of acute metabolic acidosis on the acid-base balance in follicular fluid and blood in dairy cattle. *Theriogenology*, 89, 41 – 46.
3. Kot, K. – Gibbons, J. R. – Ginther, O. J. (1995): A technique for intrafollicular injection in cattle: Effects of hCG. *Theriogenology*, 44, 41 – 50.
4. Mala, J. – Beckers, J. F. – de Sousa, N. M. – Indrova, E. – Lopatarova, M. – Dolezel, R. – Sevelova, H. – Cech, S. (2013): Determination of minimum effective doses of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin for intrafollicular treatment to induce ovulation in dairy heifers. *Acta Vet. Brno*, 82, 375 – 379.
5. Kassens, A. – Held, E. – Salilew-Wondim, D. – Sieme, H. – Wrenzycki, C. – Tefaye, D. – Schjellander, K., Hoelker, M. (2015): Intrafollicular oocyte transfer (IFOT) of abattoir-derived and in vitro-matured oocytes results in viable blastocysts and birth of healthy calves. *Biol. Reprod.*, 92, 150, 1 – 14.
6. Spricigo, J.F.W. – Sena Netto S.B. – Vieira Muterlle, C. – Dias Rodriguez S.A. – Oliveira Leme, L. – Guimaraes A. L. – Costa Caixeta, F. M. – Machain Franco, M. – Pivato, I. – Nunes Dode, M.A. (2016): Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*, 86, 2054 – 2062.

Tato práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno 119/2017/FVL.

Primoinfekce gamaherpesviru koní a variabilita virů v čase

Dobromila Molinková, Petra Kuchařová, Andre Kopecká

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

Úvod

Gamaherpesviru koní (*Equid gammaherpesvirus 2* a *Equid gammaherpesvirus 5*; EHV-2 a EHV-5) se vyskytují v populaci koní na celém světě. Podle výběru testované skupiny zvířat, odebíraných vzorků a použité metody průkazu viru se prevalence pohybuje mezi 30 - 62,8% pozitivních jedinců u EHV-2 a 14,7 - 74% u EHV-5. Koinfekce jednoho hostitele oběma viry je rovněž možná (Rushton et al., 2013; Marenzoni et al., 2014; Back et al., 2015). K primoinfekci dochází i přes přítomnost mateřských protilátek u hříbat ve věku mezi 6. a 10. týdnem života s projevy respiračního onemocnění (Fortier et al., 2010). Lze se však domnívat, že většina koní prodělá primoinfekci bez zjevných příznaků onemocnění.

Klinická manifestace gamaherpesvirových infekcí často nevykazuje specifické symptomy a lze se setkat s inaparentním průběhem infekce, mírným respiračním onemocněním, onemocněním oka a snížením výkonnosti, ale i horečkami, reprodukčními problémy a multinodulární plicní fibrózou (Fortier et al., 2010; Marenzoni et al., 2014; Williams 2014). Vzhledem k faktu, že oba viry infikují kromě epitelálních buňek hlavně B-lymfocyty hostitele, lze předpokládat, že důležitou roli ve variabilitě příznaků hraje u infikovaného jedince stav jeho imunitního systému a imunopatologické procesy. Další možnou příčinou různého klinického průběhu infekce je variabilita gamaherpesvirů, která je mnohem významnější, než je tomu například u alfaherpesvirů. Souvislost mezi změnami v DNA a patogenitou terénních izolátů byla již prokázána (Fortier et al., 2010), ale stále není známo, jaké kmeny obou virů kolují na území České republiky a jak se populace virů mění na našem území v čase.

Materiál a metodika

Byly odebrány nosní výtěry dvaceti hříbatům v chovu Starokladrubského koně ve věku 6 - 30 týdnů. Celková DNA z nich byla vyizolována kitem NucleoSpin DNA Blood (Macherey-Nagel) a pro další použití byla uchovávána zmražením na -80°C. Spolu s dvaceti srovnatelnými vzorky DNA ze stejného chovu od stejné věkové kategorie hříbat odebraných v r. 2009 byly podrobeny diagnostické qPCR na přítomnost gamaherpesvirů koní (Krisová a kol., 2016). Na základě nejvyššího stanoveného počtu virových kopií byly vybrány 4 izoláty

EHV-2 z nových i archivovaných vzorků DNA (2+2) vhodné k sekvenaci genu pro glykoprotein B (gB). Za tímto účelem bylo navrženo 8 párů oligonukleotidových primerů. Sekvence byla provedena Sangerovým sekvenováním (Macrogen, Holandsko) i metodou NGS (new generation sequencing) na přístroji MiSeq, Illumina (Ústav genetiky, VFU Brno). Získané sekvence DNA byly pomocí programu Geneious srovnány s mezinárodní databází GenBank.

Výsledky

Pomocí kvantitativní diagnostické PCR bylo zjištěno, že hříbata v chovu Starokladrubského koně prodělávají primoinfekci EHV-2 bezpříznakově ve věku nejdříve mezi 6. a 12. týdnem (12/20, 60 %), výjimečně později (Tab. 1). Primoinfekce EHV-5 byla posunuta u většiny hříbat až do věku 24. až 30. týdnů (13/20, 65 %), mimořádně dříve (Tab. 1) a rovněž není provázena zřetelnými klinickými příznaky.

V obou sledovaných skupinách hříbat (2009 i 2017) došlo k infekci alespoň jedním z gamaherpesvirů koní ve věku do 30 týdnů u 100 % zvířat.

Tab. 1: Počty hříbat pozitivních na infekci EHV-2/5 v r. 2009 a 2017 vzhledem k věku.

Věk	Pozitivita v qPCR	6. týden 5 koní	12. týden 5 koní	24. týden 5 koní	30 týden 5 koní
2009	EHV-2	3	3	0	0
	EHV-5	0	0	3	5
2017	EHV-2	5	1	0	0
	EHV-5	0	0	0	5

Dále se práce soustředila na sekvenaci glykoproteinu B u EHV-2. Pomocí Sangerova sekvenování byla získána pouze 1 kompletní sekvence kmene EHV-2 a pomocí programu Geneious byla potvrzena její příbuznost s izoláty z Turecka a Velké Británie (GU065278 a EF182700, GenBank).

Ke získání kompletních sekvencí gB u dalších tří pozitivních vzorků bylo použito NGS vzhledem k předpokládané superinfekci více kmeny viru EHV-2. Tato domněnka byla potvrzena, stejně jako fakt, že sekvence kmenů EHV-2 zachycených v r. 2009 se ve variabilní oblasti glykoproteinu B zásadně liší od sekvencí aktuálních kmenů. Přesné sekvence aktuálních kmenů jsou předmětem další bioinformatické a statistické analýzy.

Závěry

Bylo prokázáno, že na území České republiky cirkuluje více kmenů gamaherpesvirů koní, které infikují hříbata již od 6. týdne věku, přičemž věk při vrcholící infekci EHV-2 a EHV-5 se liší. Jejich zastoupení se na našem území mění v čase. Primoinfekce má ve většině případů subklinický průběh. Na vybraném vzorku populace koní z jednoho chovu koní bylo poukázáno na fakt, že vzhledem ke schopnosti herpesvirů navodit stav latence lze předpokládat na našem území vysokou promořenost koní oběma viry. Jejich podíl na patogenезi onemocnění by měl být zvažován zvláště u pacientů s onemocněním dýchacích cest, oka nebo s celkově špatnou kondicí.

Seznam literatury:

Back H., Ullman K., Treiberg Berndtsson L., Riihimäki M., Penell J., Ståhl K., Valarcher J.-F., Pringle J. Viral load of equine herpesviruses 2 and 5 in nasal swabs of actively racing Standardbred trotters: Temporal relationship of shedding to clinical findings and poor performance. *Veterinary Microbiology*. 2015, 179 (30), 142–148.

Fortier G., Erck E.van, Pronost S., Lekeux P., Thiry E. Equine gammaherpesviruses: Pathogenesis, epidemiology and diagnosis. *The Veterinary Journal*. 2010, 186, 148–156.

Krisová S., Molinková D., Tothová K. Význam gamaherpesvirů v etiopatogenезi keratitid a keratokonjunktivitid u koní. *Veterinářství*. 2016, 9, 684-687

Marenzoni, M.L., Sforza M., Stefanetti V., Casagrande Proietti P., Brignone L., Sero A.del, Falcioni F., Orvieto S., Tamantini C., Tiburzi A., Valentini S., Coletti M.T., Peter J., Passamonti F. Detection of Equid herpesvirus type 2 and 5 DNA in uterine flushings of mares with reproductive disorders. *Veterinary Microbiology*. 2014, 174, 570–576.

Rushton J.O., Kolodziejek J., Tichy A., Nell B., Nowotny N.. Detection of equid herpesviruses 2 and 5 in a herd of 266 Lipizzaners in association with ocular findings. *Veterinary Microbiology*. 2013, 164, 139–144.

Williams K.J. Gammaherpesviruses and Pulmonary Fibrosis: Evidence From Humans, Horses, and Rodents. *Veterinary Pathology*. 2014, 51(2), 372-384.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 120/2017/FVL.

Morfometrická a histologická analýza varlat morčete v průběhu suprese pohlavní aktivity vlivem GnRH agonisty deslorelinu

Kristýna Glocová¹, Petr Čížek¹

Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Mezi nejběžněji používané alternativy k ireverzibilní kastraci patří GnRH agonisté. Jedná se o analoga přirozeného GnRH, která působí na receptory GnRH v adenohypofýze. U samců způsobují počáteční hyperstimulaci sekrece FSH a LH (flare-up effect), doprovázenou několik dní trvajícím zvýšením produkce testosteronu (1). Při kontinuálním podávání GnRH agonisty např. u myši (2), psů (3), králíků (4), prasat (5) či frettek (6) následuje desenzibilizace hypofýzo-gonadální osy. Tato alterace je spojená se supresí produkce LH a testosteronu, zmenšením varlat, popř. potlačením spermatogeneze, nežádoucí agrese a značkování. Necitlivost vůči inhibičnímu účinku byla detekována u jelena lesního (7), klokanu damy (8) a opice marmoset (9). U samic morčat byly v průběhu působení GnRH agonistů pozorované mírné znaky proestru a potlačená produkce progesteronu. Naproti tomu koncentrace estradiolu zůstala vysoká a epitelová vaginální membrána, jež uzavírá vchod do pochvy, byla v diestru otevřená déle než v estru (10). Výsledky autorů Kohutova et al. tedy naznačují minimální účinek GnRH analogu na samice morčat. Znalosti o účinku GnRH agonistů na samce morčat však zcela chybí. Hlavním cílem této práce bylo zjistit jejich účinnost u samců morčat domácích (*Cavia aperea porcellus*), popř. jejich využitelnost v klinické praxi.

Materiál a metodika

Experimentální design

Dvacet čtyři pohlavně dospělých, klinicky zdravých samců morčete domácího různých plemen (krátkosrstých – hladká, Rozeta; dlouhosrstých – Angora) ve věku 4 měsíců až 1 roku bylo rozděleno do dvou skupin:

1. Kontrolní skupina (n=4) pocházela od soukromých majitelů, kteří požadovali chirurgickou kastraci. Zvířatům bylo provedeno všeobecné klinické vyšetření následováno odběrem krve, měřením velikosti varlat (délka a šířka) a kastrací v celkové inhalační anestezii.
2. Experimentální skupina (n=20) představovala zvířata ze zájmového chovu. Na počátku šest měsíců trvajících experimentu bylo morčatům provedeno všeobecné klinické vyšetření a odběr venózní krve v celkové inhalační anestezii. Následně byl zvířatům zaveden subkutánní

implantát obsahující deslorelin (Deslorelinum 4,7 mg, Suprelorin, Virbac). Všechna zvířata vždy v měsíčních intervalech podstoupila všeobecné klinické vyšetření, odběr krve v celkové anestezii a měření varlat, přičemž na závěr každé návštěvy byla u 4 zvířat provedena kastrace.

Odběr vzorků krve a stanovení koncentrace testosteronu

Ke stanovení koncentrace testosteronu byla odebírána krev z *v. cava cranialis* do plastových zkumavek. Sérum bylo následně získáno centrifugací (5000 otáček/5 min.) a odesláno k diagnostice (Synlab czech s.r.o; Praha).

Měření velikosti varlat

Prostřednictvím digitálního posuvného měřítka byla naměřena délka (a) a šířka (b) pravého a levého varlete včetně scrota. Velikost varlat (mm^2) byla vypočítána podle rovnice:

$$\text{plocha (mm}^2\text{)} = \frac{1}{2} a * \frac{1}{2} b * \pi$$

Histologické posouzení varlat

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

Statistická analýza

Deskriptivní statistika byla vyjádřena jako průměr, maximum, minimum, SD, rozptyl u nerovnoměrného rozložení dat (viz Tab. 1). Ke statistické analýze byl použit párový t-test k porovnání skupin. Statistická analýza byla provedena v párech u vhodné skupiny zvířat. V rámci statistické analýzy byla stanovena hladina významnosti: statisticky významné ($p < 0.05$), statisticky velmi významné ($p < 0.01$).

Výsledky

První měsíc po aplikaci implantátu byla koncentrace testosteronu (T) zvýšena z $8,79 \pm 8,73$ na $10,47 \pm 7,61$ ng/mL ($p > 0,05$; $n = 20$). Druhý měsíc po implantaci byla hodnota T zvýšena z $9,35 \pm 9,53$ na $11,79 \pm 6,72$ ng/mL ($p > 0,05$; $n = 16$). Třetí měsíc došlo ke zvýšení hladiny T v krevním séru z $8,15 \pm 9,35$ na $10,75 \pm 5,86$ ng/mL ($p > 0,05$; $n = 12$). Čtvrtý měsíc byla redukována z $10,11 \pm 10,94$ na $7,84 \pm 3,90$ ng/mL ($p > 0,05$; $n = 8$) a poslední, pátý měsíc našeho měření následoval opětovný pokles koncentrace T z $12,1 \pm 15,45$ na $6,95 \pm 2,42$ ng/mL ($p > 0,05$; $n = 4$). Základní deskriptivní statistika koncentrace T je popsána v Tab. 1.

Absolutní velikost varlat v mm² byla v prvním měsíci o 15,3% snížena z 188,77 ± 48,81 na 159,87 ± 36,17 (p < 0,01; n = 20). Druhý měsíc došlo ke snížení o 19,5% z 190,45 ± 49,79 na 153,31 ± 26,27 (p < 0,01; n = 16) a třetí měsíc se velikost snížila o 17,03% z 189,71 ± 53,25 na 156,96 ± 21,40 (p < 0,05; n = 12). Čtvrtý byla naměřena hodnota nižší o 22,5% z 212,74 ± 28,74 na 164,95 ± 11,78 (p < 0,01; n = 8). Poslední měsíc byla velikost snížena o 4% z 195,48 ± 25,88 na 187,71 ± 7,81 (p > 0,05; n = 4).

Při histologické analýze příčných řezů semenotvorných kanálků byly u kontrolní skupiny zvířat nejvíce zastoupené (> 66%) kanálky s prodlouženými spermatidami a morčata tak byla zařazena do skupiny G4. První i druhý měsíc po aplikaci implantátu bylo vzezření semenotvorného epitelu totožné (> 59%; > 73,5%) a rovněž tato zvířata byla zařazena do skupiny G4. Třetí měsíc po aplikaci byly v semenotvorných kanálcích u 3 zvířat pozorovány převládající prodloužené spermatidy (skupina G4). Jedno morče vykazovalo znaky potlačení spermatogeneze - nejběžnější byly kanálky se spermatocyty (skupina G1). Čtvrtý a pátý měsíc byla všechna morčata zařazena do skupiny G4.

	I	I + 1	I + 2	I + 3	I + 4	I + 5
Průměr	8,14	10,47	11,79	10,75	7,86	6,95
S.D.	8,10	7,61	6,72	5,86	3,90	2,42
Medián	6,205	9,69	10,52	10,73	7,51	7,58
Maximum	34,08	31,93	23,62	22,05	14,2	8,97
Minimum	0,45	2,37	2,52	2,27	2,94	3,67
Počet zvířat	24	20	16	12	8	4

Tab. 1: Základní deskriptivní statistika stanovení koncentrace testosteronu

Závěr

Porovnání hodnot koncentrace testosteronu jednotlivých morčat bylo prokázáno jako statisticky nevýznamné. Hodnocení velikosti varlat vykazovalo z hlediska statistické pravděpodobnosti individuální responzibilitu. Na základě histologického posouzení bylo 19 zvířat zařazeno do skupiny G4 a jedno morče do skupiny G1. Lze se domnívat, že snížená plodnost tohoto jedince byla způsobena jinou příčinou. Bylo prokázáno, že použití deslorelinu u samců morčete domácího nemá kontraceptivní efekt.

Seznam použité literatury

1. Novotny R, [Cizek P](#), [Vitasek R](#), [Bartoskova A](#), [Prinosilova P](#), [Janosovska M](#), 2012: Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant; *Theriogenology* 78:848-57
2. Kher R, Kalla N.R. 1996: Antifertility effects of an LHRH agonist in male mice; *Contraception* 53:299-306
3. Trigg T.E, Wright P.J, Armour A.F, Williamson P.E, Junaidi A, Martin G.B, Doyle A.G, Walsh J, 2001: Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs; *J Reprod Fertil Suppl* 57:255-261
4. Arlt S, Spankowski S, Kaufmann T, Kostelnik K, Heuwieser W, 2010: Fertility control in a male rabbit using a deslorelin implant. a case report. *World Rabbit Sci* 18:179-182
5. Kauffold J, Rohrmann H, Boehm J, Wehrend A, 2010: Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars. *Theriogenology* 74:733-740
6. Schoemaker N.J, Deijk R, Muijlaert B, Kik M.J.L, Kuijten A.M, Jong F.H, T.E. Trigg T.E, Kruitwagen C.L.J.J, Mol J.A, 2008: Use of a gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustela putorius furo*); *Theriogenology* 70:161-167
7. Lincoln G.A, 1987: Long-term stimulatory effects of a continuous infusion of LHRH agonist on testicular function in male red deer (*Cervus elaphus*); *J Reprod Fertil* 80:257-261
8. Herbert C.A, Trigg T.E, Renfree M.B, Shaw G, Eckery D.C, Cooper D.W, 2004: Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Implant on Reproduction in a Male Marsupial, *Macropus eugenii*; *Biol Reprod* 70:1836-1842
9. Lunn S.F, Dixson A.F, Sandow J, Fraser H.M, 1990: Pituitary-testicular function is suppressed by an LHRH antagonist but not by an LHRH agonist in the marmoset monkey; *J Endocrinol* 125:233-239
10. Kohutova S., Jekl V., Knotek Z., Hauptman K., 2015: The effect of deslorelin acetate on the oestrous cycle of female guinea pigs; *Vet Med-Czech* 60:155-160

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 121/2017/FVL.

Analýza stresových markerů u laboratorních králíků, užívaných pro výuku předmětu

Farmakologie II na VFU Brno.

Eva Kramářová¹, Jan Chloupek¹, Monika Urbanová², Martina Najmanová¹

Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²

Úvod

Cílem studie je změřit vybrané parametry stresové zátěže laboratorních zvířat ne dle klasických stresových modelů, ale změřit zátěž zvířat během standardních zákroků v rámci praktické výuky předmětu Farmakologie II a objektivizovat vliv cvičebních zásahů na úroveň stresu a celkový zdravotní stav pokusných zvířat v daných chovných podmínkách. Žádná objektivní data stresové zátěže laboratorních zvířat při tomto typu výuky dosud nejsou známa, proto výsledky mohou přispět k objektivnímu zjištění úrovně stresové zátěže laboratorních zvířat ve výuce a následně k objektivní diskusi při volbě v jaké míře a jakým způsobem vést praktickou výuku s jejich využitím. Laboratorní králík je druh, který poskytuje velké možnosti pro použití pro výuku i pro výzkum v oblasti farmacie a patří mezi nejvhodnější modely pro dosažení výukových i výzkumných cílů.

Materiál a metodika

Pro studii byla použita zvířata druhu *Oryctolagus cuniculus* (králík domácí), zařazená do výuky předmětu Farmakologie II v počtu 10 kusů. Dalších 10 kusů tvoří kontrolní skupinu, která je chována standardním způsobem v certifikovaném zvířetníku bez manipulace a bez dalších zásahů.

20 vzorků venózní krve z vena auricularis marginalis bylo odebráno do zkumavek s EDTA a s heparinem. Tento odběr proběhl ve 2 týdnů po habituaci, v době, kdy žádná ze skupin nebyla použita pro výuku, poté v 7 týdnů a poslední série bude odebrána ve 12 týdnů semestru. Náročnější zásahy ve výuce spadají do poslední třetiny semestru, proto bylo nezbytné zvolit poslední odběr na konci semestru.

V odebraných vzorcích byly stanoveny biochemické parametry (ALT, AST, LDH, laktát, glukóza, celková bílkovina, albumin), byla zamražena plazma na analýzu kortikosteronu a kortizolu, které budou analyzovány po odběru všech vzorků. Pro analýzu kortikosteronu byl

zakoupen Corticosterone StressXpress EIA Kit firmy Biovendor. Stanovení kortizolu v krevní plazmě bude provedeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS). Příprava vzorku spočívá v extrakci na pevné fázi (SPE). Pro SPE jsou použity kolonky SPEC C₁₈ AR (3 ml, 30 mg, 100Pk). Standard kortizolu stejně tak jako standard kortizolu C₃¹³ byly zakoupeny u Sigma-Aldrich. Detekční limit pro kortizol je 1.5 ng/mL. Variační koeficient je 4.1%.

Průběžné výsledky

Z dosavadních 2 odběrů srovnáním výsledků biochemických parametrů krve kontrolní skupiny a skupiny „zásahové“, která byla podrobena procedurám ve výuce, vyplývají statisticky významné rozdíly: Hodnoty AST stoupají v zásahové skupině (0,357ukat/L) ve srovnání s kontrolou (0,265), zvýšený obsah glukózy v zásahové skupině (7,19mmol/L) ve srovnání s kontrolou (6,52), hodnoty celkové bílkoviny klesají v zásahové skupině (58,89 g/L) ve srovnání s kontrolní skupinou (63,52), všechny hodnoty na hladině významnosti $p < 0.05$. Hodnoty LDH, ALT, laktátu, albuminu po 6 týdnech nejsou statisticky odlišné mezi zásahovou a kontrolní skupinou.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 122/2017/FVL

Úloha protilátok proti kapsulárnemu polysacharidu v imunitnej reakcii prasačích alveolárnych makrofágov na *in vitro* infekciu rozličnými sérovarmi *Haemophilus parasuis*

Katarína Matiašková¹, Martin Faldyna¹

Ústav infekčných chorôb a mikrobiologie, Fakulta veterinárneho lekárstva, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno¹

Úvod

Haemophilus parasuis je gramnegatívna tyčinka z čeľadi *Pasteurellaceae* a je častým komenzálom horných ciest dýchacích u prasiat. Za priaznivých podmienok dokáže prekonať obranné mechanizmy v pľúcach a spôsobiť závažné systémové ochorenie s vysokou morbiditou a mortalitou. V súčasnosti je definovaných 15 sérovarov s rôznou virulenciou (Zhang a kol., 2014). Aby *H. parasuis* vyvolal systémové ochorenie, musí byť schopný uniknúť pred nešpecifickým imunitným systémom pľúc. Ústrednými bunkami prirodzenej imunity v dolných dýchacích cestách prasiat sú alveolárne makrofágy (PAMs), ktoré sprostredkovávajú zabíjanie baktérií ich fagocytózou a reguláciu zápalovej odpovedi hostiteľa uvoľnením rady cytokínov a chemokínov. K zvýšeniu fagocytózy extracelulárnych baktérií môžu prispieť protilátky, ktoré sa viažu na ich povrch. Jedným z hlavných faktorov virulencie a povrchových antigénov *H. parasuis* je kapsulárny polysacharid (Perry a kol., 2013). Preto cieľom našej štúdie bolo určenie role protilátok proti tomuto antigénu v imunitnej odpovedi PAMs na *in vitro* infekciu rozličnými kmeňmi *H. parasuis* opsonizovaných týmito protilátkami.

Materiál a metodika

Príprava prasacích alveolárnych makrofágov

Alveolárne makrofágy boli izolované bronchoalveolárnou lavážou z pľúc získaných bezprostredne po porazení troch klinicky zdravých prasiat v experimentálnom bitúnku Výskumného ústavu veterinárneho lekárstva, v.v.i., Brno. Pred samotnou infekciou boli bunky nasadené na 24 - jamkové mikrodosky v koncentrácii 4×10^5 buniek na jamku a ponechané cez noc v termostate pri 37°C.

Izolácia protilátok

Protilátky IgG boli izolované pomocou kolóny s proteínom A (Protein A IgG Purification Kit, Thermo Scientific) zo sér prasiat vakcinovaných kapsulárnym polysacharidom získaným z kmeňa *H. parasuis* 132.

Príprava baktérií

Na infekciu PAMs boli použité referenčné kmene *H. parasuis* sérovarov 1 (HP1), 6 (HP6), 9 (HP9), 12 (HP12) a terénny kmeň 132 (HP132, sérovar 5) izolovaný z mozgu uhynutého prasaťa. Baktérie boli pred infekciou kultivované cez noc na čokoládových agaroch pri teplote 37 °C a v atmosfére s 5% CO₂. Pred samotnou infekciou boli bakteriálne kmene inkubované s alebo bez protilátok o koncentrácii 180 µg protilátok na 0,6 ml bakteriálnej suspenzie obsahujúcej 4 x 10⁶ CFU po dobu 30 min. pri teplote 37 °C.

Infekcia PAMs

Po 24-hodinovej inkubácii PAMs boli bunky premyté v médiu a infikované pripravenými bakteriálnymi kultúrami inkubovanými s alebo bez protilátok tak, aby multiplicita infekcie (MOI) bola 10:1, čo znamená, že jedna eukaryotická bunka bola infikovaná približne 10 baktériami. Na každej doske boli ponechané 2 jamky neinfikovaných PAMs ako kontroly, do ktorých sa pridalo miesto baktérií médium. Dosky boli inkubované v termostate pri 37°C v atmosfére s 5% CO₂ 1 hodinu, 4 hodiny alebo 24 hodín.

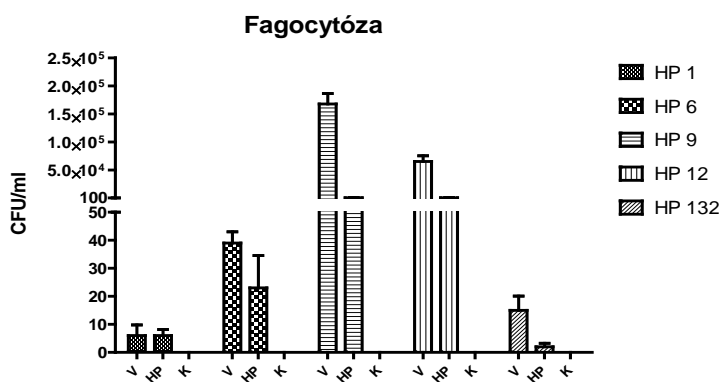
Test fagocytotickej schopnosti PAMs

Po 1- hodinovej inkubácii ne/infikovaných buniek boli tieto bunky 2-krát premyté médiom a inkubované v médiu s gentamicinom (1mg/ml) 30 min. pri 37°C. Po uplynutí inkubačnej doby boli bunky premyté od gentamicinu a lyzované 1% saponínom. Takto uvoľnené baktérie zo zlyzovaných buniek boli následne kultivované na čokoládových agaroch v desiatkovej riediacej rade.

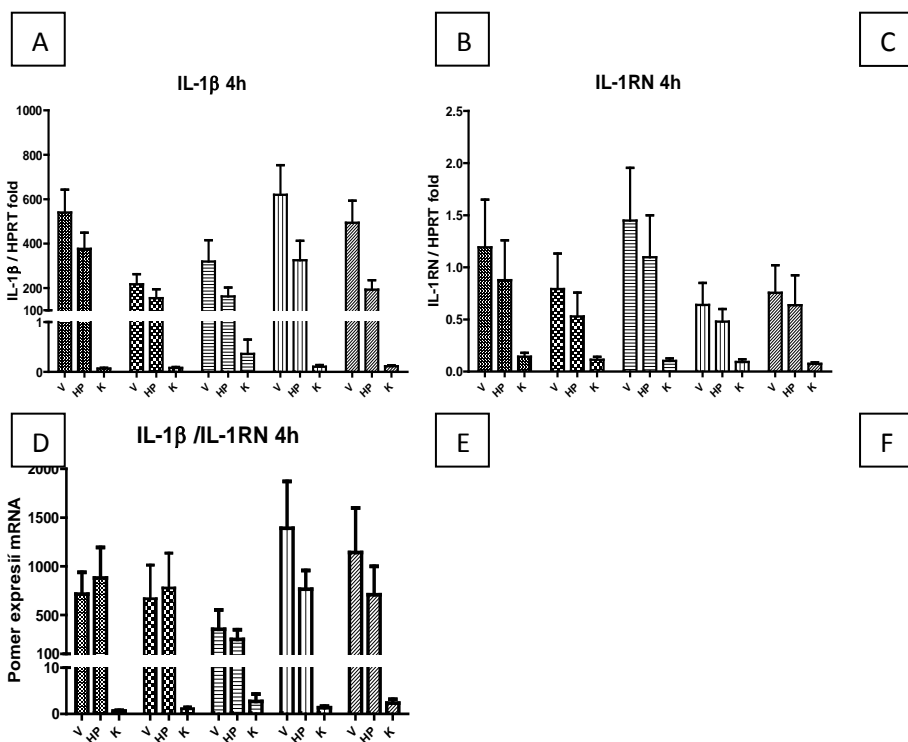
Detekcia imunitnej odpovedi na molekulárne-biologickej úrovni

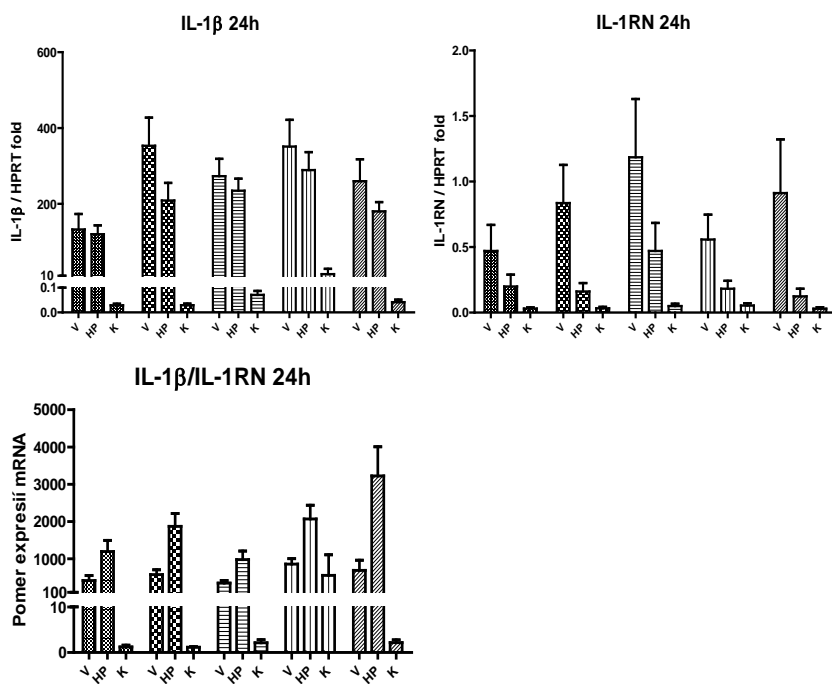
Expresia mRNA pre- a proti-zápalových cytokínov v ne/infikovaných PAMs po 4- alebo 24-hodinovej inkubácii bola meraná pomocou kvantitatívnej real-time PCR (RT-PCR). Po uplynutí príslušnej inkubačnej doby boli bunky lyzované 350 µl RLT pufri (Qiagen). Celková RNA bola získaná pomocou RNeasy Mini Kitu (Quiagen) metodikou podľa doporučenia výrobcu. Pre reverznú transkripciu bola použitá M-MLV transkriptáza (Invitrogen) a oligo-dT primery (Generi Biotech). RT-PCR reakcia prebiehala v zariadení LightCycler 480 II za použitia zmesi QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) a špecifických primerov pre IL-1β, TNFα, IL-8, IL-10, IL-1RN (Generi Biotech). Miera expresie daného génu bola vyjadrená pomerom expresie cieľového génu k expresii referenčného génu použitím metódy 2^{-ΔCT}. Ako referenčný gén bol použitý gén kódujúci hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázu (HPRT).






Výsledky



Graf 1: Prítomnosť baktérie *H. parasuis* rozličných kmeňov v lyzáte alveolárnych makrofágov. V = *H. parasuis* preinkubovaný s IgG, HP = *H. parasuis* bez IgG, K = neinfikované PAMs.





Graf 2: Grafy A, B, D, E znázorňujú expresiu mRNA pre IL-1 β a IL-1Ra po 4h a 24h v PAMs infikovaných rozličnými kmeňmi *H. parasuis* preinkubovaných s IgG (V) alebo bez IgG (HP), vrátane neinfikovaných PAMs (K). Grafy C a F znázorňujú pomer expresii týchto cytokínov.  HP1  HP6  HP9  HP12  HP132

Výsledky fagocytotickej schopnosti alveolárnych makrofágov sú zobrazené na grafe 1. Graf znázorňuje množstvo baktérií vykultivovaných zo zlyzovaných buniek. Z grafu vyplýva, že prítomnosť protilátok proti kapsulárnemu polysacharidu zvýšila schopnosť makrofágov baktérie fagocytovať. Výsledky expresie mRNA pre IL-1 β ako zástupcu pre-zápalových cytokínov a IL-1Ra ako antagonistu receptoru pre IL-1 β a zástupcu proti-zápalových cytokínov meraných v PAMs sú znázornené na grafe 2. Z grafu (graf 2 A, B, D, E) je viditeľná zvýšená expresia mRNA pre tieto cytokíny v PAMs infikovaných kmeňmi *H. parasuis* preinkubovaných s protilátkami oproti expresie v PAMs infikovaných kmeňmi preinkubovaných bez prítomnosti protilátok v oboch časoch. Z pomeru expresii týchto dvoch cytokínov (graf 2 C, F) vyplýva zvýšená expresia pre-zápalového cytokínu po 4 hodinách súvisiaca s pravdepodobne silnejšou včasnou imunitnou reakciou makrofágov vďaka prítomnosti protilátok opsonizujúcich *H. parasuis*. Zároveň v prítomnosti protilátok túto včasnú imunitnú reakciu vystrieda po 24 hodinách zvýšená expresia mRNA antagonistu receptoru pre IL-1 β , ktorý inhibuje negatívne účinky predtým produkovaného pre-zápalového IL-1 β na okolité tkanivá v pľúcach. Zvýšená expresia mRNA v PAMs infikovaných *H. parasuis* v prítomnosti protilátok bola pozorovaná aj u ďalších pre-zápalových (TNF α , IL-8) a proti-zápalových (IL-10) cytokínov (výsledky nie sú zobrazené).

Záver

Z výsledkov vyplýva, že protilátky proti kapsulárnemu polysacharidu sú schopné rozličné kmene *H. parasuis* opsonizovať a uľahčiť tak ich fagocytózu alveolárnymi makrofágmi v podmienkach *in vitro*, ktorá spolu s včasnou expresiou pre-zápalových cytokínov týmito bunkami vedie pravdepodobne k rýchlejšiemu a účinnejšiemu zničeniu patogéna. Zároveň sú protilátky schopné zvýšiť expresiu i proti-zápalových cytokínov, čím umožňujú rýchlejšie zníženie negatívnych účinkov pre-zápalových cytokínov na okolité prostredie.

Zoznam literatúry:

Perry, M. B., MacLean, L.L., Gottschalk, M., Aragon, V., Vinogradov, E. (2013): Structure of the capsular polysaccharides and lipopolysaccharides from *Haemophilus parasuis* strains ER-6P (serovar 15) and Nagasaki (serovar 5). *Carbohydrate Research*, 378, 91-97.

Zhang, B., Tang, Ch., Liao, M., Yue, H. (2014): Update on the pathogenesis of *Haemophilus parasuis* infection and virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 168, 1-7.

Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 123/2017/FVL.

MECHANICKÉ TESTOVÁNÍ ŠLACH PO SUTUŘE NOVĚ VYVINUTÝMI BIOMATERIÁLY

Robert Srnec¹, Karolína Michalčáková², Andrea Nečasová², Robert Snášil³, Alois Nečas¹
Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹

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

*Doktorský studijní program (postgraduální student), Klinika chorob psů a koček, Fakulta
veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³*

Úvod

Poranění šlach je ve veterinární medicíně u malých zvířat relativně časté a z velké části je spojeno s řeznými ranami flexorů prstů v palmární/plantární oblasti metakarpů nebo metatarzů jako následek nášlapu na ostrý předmět. Další častou oblastí poranění šlach u psů je společná patní šlacha (tendo calcaneus communis) – Achillova šlacha (Butler 1965). V lidské medicíně analogicky nejvíce poranění šlach vzniká na horních končetinách při práci s ostrými předměty a na dolních končetinách v souvislosti s poraněním Achillovy šlachy. Chirurgická rekonstrukce šlach u lidí spoléhá na úzkou spolupráci pacienta – dobrá pooperační péče, lepší mechanická ochrana sutury pacientem, rehabilitační spolupráce. I přes aplikaci obdobných postupů sutury šlach do oblasti veterinární péče, je pooperační spolupráce pacienta omezená. Tím se do popředí dostává zejména dokonalá mechanická ochrana sutury a podpora rychlosti hojení šlachy. Sutury jsou často doplněny o řadu systémů dočasné stabilizace. Stejně tak i na samotnou suturu jsou zohledněny požadavky na mechanickou pevnost. Mechanická pevnost sutury je ovlivněna zejména výběrem vhodného stehu, technikou provedení sutury, tloušťkou šicího vlákna a vhodným šicím materiálem. Mezi mechanickou pevností sutury a mírou poškození šlachy suturou jsou velmi pevné vztahy (Savage 2014). Na pracovišti autorů článku se kolektiv výzkumných pracovníků již několik let věnuje výzkumu v oblasti nových materiálů a taktéž mechanickým testováním náhrad vazů a šlach (Fedorová 2014, Fedorová 2015, Harazinová 2016). Získané poznatky z těchto studií byly v této práci obohaceny a rozšířeny, zejména se zaměřením na vývoj nového vlákna vhodného pro sutury šlach. Nové materiály mohou pak přispět k lepší rovnováze mezi dostatečnou mechanickou pevností sutury a podporou biologické stránky hojení šlachy.

Materiál a metodika

Studie mechanických vlastností sutury šlach byla provedena jako *ex vivo* experiment na modelech šlach extenzorů/flexorů prstů hrudní a pánevní končetiny získaných z mladých jatečných prasat. Z čerstvě poražených zvířat byl odebrán segment šlachy přibližně 10cm dlouhý a byl v gáze vlhčené NaCl uložen při -20°C až do doby měření. Tím byly získány modelové preparáty šlach s uniformními vlastnostmi. Po rozmražení vzorků při pokojové teplotě byla imitována totální ruptura šlachy ostrým přetnutím celého průměru šlachy v centrální části skalpelem. Následně byla šlacha reparována chirurgickou rekonstrukcí suturou jedním typem stehu se čtyřmi longitudinálními segmenty (Adelaide) splétaným potahovaným polyesterem (Ethibond, Ethicon, Johnson and Johnson) a dvou typů nových vláken na bázi polyamidu 6 (PA6). První vlákno bylo vytvořeno jako koncept nevstřebatelného jádra z polyesteru (PES hedvábí) opleteného vstřebatelnými PA6 nanovláknými. Podobná koncepce materiálu byla již v našich studiích testována (Harazinová 2016) a nyní byla modifikována ke zlepšení mechanických vlastností. Bylo provedeno hustější a těsnější opletení jádra nanovláknými s jiným typem použitých adheziv. Druhé vlákno bylo vytvořeno spletením jednoho PES hedvábného vlákna a dvou viskózních přízí s PA6 nanovláknými v kompozitní šicí materiálu. Testované šicí materiály byly totožného průměru 2/0 (3metric). Součástí studie bylo také sledování pevnosti sutury jiných stehů s více longitudinálními segmenty (McLarney, Adelaide, Savage) při stejném typu materiálu a velikosti šicího vlákna (Ethibond 3/0, Ethicon, Johnson and Johnson), vliv tvaru hrotu jehly na pevnost ukotvení sutury ve tkáni šlachy (Silon 3/0 s řeznou jehlou a Silon 3/0 s kulatou jehlou) a dále byl sledován vliv zajištěné matracové peritendinózní sutury (Prolene 5/0, Ethicon, Johnson and Johnson) na mechanickou podporu sutury jádra šlachy. V každé testovací skupině bylo měřeno 10 vzorků. Sutura byla testována v tahu na trhacím stroji FP 10 s postupným zatěžováním až do selhání sutury. Byly sledovány kritické body selhání sutury a sledována dosažená hodnota maximálního zatížení sutury v tahu až do jejího selhání. Získaná data byla statisticky vyhodnocena základní deskriptivní statistikou a z hlediska významnosti posouzena neparametrickým Wilcoxon (Mann-Whitney) testem pro nepárová data (KyPlot version 2.0 beta 15 – 32 bit).

Výsledky

V případě sutury materiálem Ethibond 3/0 různým typem stehu byl nejméně pevným steh McLarney-4core (průměrná dosažená síla $68,8 \pm 18,7$ N). Pevnějším stehem ($P \leq 0,05$) byl steh Adelaide-4core (průměrná dosažená síla $83,6 \pm 11,2$ N). Nejpevnějším stehem byla 6core sutura Savage (průměrná dosažená síla $147,4 \pm 22,7$ N) s vysokou statistickou průkazností ($P \leq 0,001$).

Při testování vlivu typu jehly byl u sutury Silon 3/0 stehem Adelaide pozorován statisticky významný rozdíl ($P \leq 0,05$) mezi jehlou s kulatým hrotem (průměrná dosažená síla $72,0 \pm 7,0$ N) a jehlou s obráceným řezným hrotem (průměrná dosažená síla $63,3 \pm 9,6$ N).

Peritendinózní sutura byla provedena zamčeným matracovým stehem Prolene 5/0 u core sutury McLarney a Adelaide. V případě sutury McLarney se statisticky významně ($P \leq 0,01$) zvýšila pevnost sutury. Samotná nosná sutura dosahovala průměrné síly $68,8 \pm 18,7$ N. V kombinaci s epitendinózním stehem se průměrná dosažená síla zvýšila na $100,6 \pm 31,8$ N tj. o 46,2%. Obdobně u sutury Adelaide se statisticky velmi významně ($P \leq 0,001$) zvýšila pevnost sutury a to o 48,3%. Samotný steh Adelaide dosahoval průměrné síly $83,6 \pm 11,2$ N a v kombinaci s epitendinózní suturou byla průměrná dosažená síla $123,9 \pm 11,1$ N.

Vlákno koncipované jako PES jádro s PA6 nanovláčným opletením vykazovalo při sutuře stehem Adelaide menší pevnost (průměrná dosažená síla $28,5 \pm 5,2$ N) než vlákno splétané (průměrná dosažená síla $45,7 \pm 6,7$ N) při vysoké statistické významnosti ($P \leq 0,001$). Obě nově vyvinutá vlákna však nedosahují pevnosti stejně silného nevstřebatelného splétaného materiálu Ethibond (průměrná dosažená síla $100,3 \pm 19,1$ N) při vysoké statistické významnosti ($P \leq 0,001$).

Závěr

K sutuře jádra šlachy se z pohledu mechanické odolnosti jeví vhodnější použití složitějších sutur s více longitudinálními segmenty. Epitendinózní sutura pak může ještě výrazně posílit základní nosnou core suturu. Obdobné výsledky poukazují i literární zdroje (Justan 2010). Zaznamenali jsme u stejného materiálu a stehu i nezanedbatelný vliv profilu jehly na výslednou pevnost celé sutury. U námi vyvinutých materiálů se ukazuje jako

mechanicky i prakticky výhodnější koncepce splétání vstřebatelných nanovláken s nosným nevstřebatelným vláknem. I když mechanická pevnost je nižší než u komerčně dostupných nevstřebatelných vláken, předpokládáme protiváhou výhody na straně biologické podpory v hojení šlachy. Navíc mohou být nanovláčna využita jako nosič biologických substancí a terapeutických látek. Na základě získaných poznatků, lze předpokládat další možné zlepšení mechanických vlastností nově vyvinutého biomateriálu, změnou materiálu nosného nevstřebatelného vlákna.

Seznam literatury:

1. Butler HC 1965: Tendons, muscles, and fascia. In: Archibald J: Canine surgery. 1st ed. American Veterinary Publications, INC, California, pp. 726-743.
2. Fedorová P, Srnec R, Pěňčík J, Schmid P, Amler E, Urbanová L, Nečas A 2014: Mechanical testing of newly developed biomaterial designed for intra-articular reinforcement of partially ruptured cranial cruciate ligament: ex vivo pig model. Acta Vet Brno 83(1): 55-60
3. Fedorová P, Srnec R, Pěňčík J, Dvořák M, Krbec M, Nečas A 2015: Intra-Articular Reinforcement of a Partially Torn Anterior Cruciate Ligament (ACL) Using Newly Developed UHMWPE Biomaterial in Combination with Hexalon ACL/PCL Screws: Ex-Vivo Mechanical Testing of an Animal Knee Model. Acta Chir Ortop Traumatol Czech 82(3): 222-228
4. Harazimová K 2016: Hodnocení mechanických vlastností sutury šlachy. Odborná práce, VFU Brno, 56 p.
5. Justan I, Veselý J, Bistoni G 2010: Současný pohled na suturu flexorů ruky. Acta Chir Ortop Traumatol Czech 77(1): 65-69
6. Savage R 2014: The search for the ideal tendon repair in zone 2: strand number, anchor points and suture thickness. J. Hand. Surg. Eur. 39E (1): 20-29.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 124/2017/FVL.

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Ekotoxicita nanostříbra pro organismy vodních ekosystémů

Daniela Hlávková, Barbora Havelková, Miroslava Beklová

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

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Stříbrné nanočástice se dnes používají v široké škále produktů především z důvodu jejich antibakteriálního účinku. Zaujímají významné místo v lékařství, kosmetice, farmacii, textilním průmyslu, elektrotechnice a další (1, 2). V medicíně se používají k potlačení infekcí při léčbě popálenin, dezinfekci chirurgických nástrojů nebo vody (3). Zvyšující se využívání nanočástic však současně představuje rizika. Předpokládá se, že se environmentální koncentrace stříbra ve vodním prostředí pohybuje v rozmezí od 0,03–1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (4). Vzhledem k tomu, že neznáme spolehlivou odpověď na otázku, zda stříbrné částice nepředstavují zvýšené nebezpečí pro jednotlivé složky životního prostředí, je potřeba získat spolehlivé informace o jejich vlivu nejen na lidské zdraví, ale i biotickou složku vodních a terestrických ekosystémů. V popředí zájmu vědeckého zkoumání je objasnění potenciální toxicity nanočástic stříbra zejména na organismy vodního prostředí.

Materiál a metodika

Cílem projektu bylo objasnit vliv nanostříbra pro organismy vodního prostředí. Pro posouzení toxického působení stříbra byla stanovena akutní toxicita koloidního stříbra o různých velikostech nanočástic a toxicita dusičnanu stříbrného. Pro provádění testů bylo zakoupeno koloidní stříbro o koncentraci 20 ppm od výrobce Koloidní stříbro s.r.o., dusičnan stříbrný p.a. od firmy Sigma-Aldrich a přístroj na výrobu koloidního stříbra od firmy Silver medic, kterým lze vyrobit nanočástice o velikosti 100 nm. Na Ústavu chemie a biochemie AF Mendelovy univerzity v Brně byly vyrobeny nanočástice stříbra o velikosti částic 0,7–2,7 nm a 6,5–18,2 nm.

Pro posouzení vlivu stříbra na vodní organismy byly zvoleny testy akutní toxicity na sladkovodních řasách *Pseudokirchneriella subcapitata*, na sladkovodních korýších *Daphnia magna* a na mořských světélkujících bakteriích *Vibrio fischeri*. Metodicky se postupovalo dle příslušných norem (ČSN EN ISO 8692, ČSN EN ISO 6341 a ČSN EN ISO 11348). Testy byly

vybrány tak, aby byla zastoupena trofická úroveň producenta (*Pseudokirchneriella subcapitata*), konzumenta (*Daphnia magna*) i destruenta (*Vibrio fischeri*).

Princip testu inhibice růstu řas *Pseudokirchneriella subcapitata* spočívá v jejich kultivaci v živném médiu, které obsahuje testovanou látku v různých koncentracích. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice růstové rychlosti v porovnání s kontrolními kulturami v čistém živném roztoku. Výpočet hodnoty $72hErC_{50}$ byl proveden s využitím programu TOXICITA 3.1 (VÚV Ostrava, Česká republika), který pracuje pomocí regresní analýzy dat s 95 % intervaly spolehlivosti.

Akutní test na perloočkách *Daphnia magna* spočívá ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované látky a v kontrole. Následně byla ve 24hodinovém intervalu sledována inhibice pohybu perlooček a zaznamenání jak uhynulí, tak imobilizovaní jedinci. Ze získaných hodnot byla stanovena 24h a 48 h EC_{50} probitovou analýzou pomocí počítačového programu (PROBITY VÚRH Vodňany).

Principem bakteriálního bioluminiscenčního testu toxicity je změna luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* vyvolaná negativním působením toxického vzorku. Pomocí přístroje LUMISTox 300 byla změřena intenzita jejich světla a vypočtena hodnota EC_{20} nebo EC_{50} . Měření bylo prováděno ve zkušebních kyvetách s různými koncentracemi testované látky. Intenzita luminiscence bakterií byla měřena po 15 a 30 minutách.

Na základě hodnot EC_{50} (ErC_{50}) byl vyhodnocen toxický účinek nanočástic stříbra z hlediska jejich velikosti.

Výsledky

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

Tab. 1: Hodnoty EC₅₀ pro dafnie; ErC₅₀, ErC₂₀ pro řasy a EC₅₀ pro bakterie

Testovací organismus	Nanočástice stříbra – velikost nm				AgNO ₃
	0,7 – 2,7	6,5 – 18,2	100	10 – 100**	
<i>D. magna</i>	23,38 µg.l ⁻¹	1,68 µg.l ⁻¹	14,78 µg.l ⁻¹	1,47 µg.l ⁻¹	1,96 µg.l ⁻¹
<i>P. subcapitata</i>	1,97 µg.l ⁻¹ *	43,45 µg.l ⁻¹	24,88 µg.l ⁻¹ *	4,48 µg.l ⁻¹	36,65 µg.l ⁻¹
<i>V. fischeri</i>	9,09 mg.l ⁻¹	1,26 mg.l ⁻¹	2,50 mg.l ⁻¹	2,10 mg.l ⁻¹	16,49 mg.l ⁻¹

*(ErC₂₀)

** Zakoupené koloidní stříbro s velikostí nanočástic (10–100 nm) deklarovaných výrobcem.

Nejnižší toxicita u všech zkoumaných vzorků nanočástic i AgNO₃ byla zaznamenána u *Vibrio fischeri*. Naměřené hodnoty EC, které způsobily 50% (EC₅₀) inhibici emise světla ve srovnání s kontrolou byly řádově vyšší (mg.l⁻¹) než u ostatních testovacích organismů, kdy zjištěné hodnoty EC byly v µg.l⁻¹. Tato skutečnost souvisí zřejmě s tím, že *Vibrio fischeri* je mořská bakterie vyžadující salinitu prostředí, která je zajišťována chloridem sodným, který reaguje se stříbrnými ionty za tvorby sraženiny. Vysrážené stříbro tak vykazuje nižší toxicitu pro *V. fischeri*. Nejvyšší toxicitu pro *V. fischeri* vykazovaly nanočástice o velikosti 6,5–18,2 nm, kdy byla efektivní koncentrace, která způsobila 50% inhibici luminiscence oproti kontrole EC₅₀ 1,26 mg.l⁻¹.

Testy akutní toxicity testovaných vzorků stříbra prokázaly vyšší citlivost *D. magna* ve srovnání s citlivostí *P. subcapitata*. Akutní toxicita dusičnanu stříbrného pro perloočky činila 1,96 µg.l⁻¹ pro řasy 36,65 µg.l⁻¹. Vyšší toxicita stříbrných nanočástic pro perloočky byla zaznamenána i na základě hodnot střední efektivní koncentrace stanovených pro nanostříbro dle velikosti částic. Toxicita nanočástic o velikosti 6,5–18,2 nm byla na základě hodnoty 48hEC₅₀ pro perloočky 1,68 µg.l⁻¹, pro řasy na základě 72hErC₅₀ 43,45 µg.l⁻¹. Obdobné výsledky byly dosaženy i u ostatních skupin zkoumaných nanočástic.

Na základě dosažených výsledků nelze jednoznačně vyvodit, že čím menší částice stříbra, tím je vyšší jejich toxicita a naopak.

Závěr

Nízké hodnoty EC_{50} (ErC_{50}) potvrzují silné baktericidní a algicidní účinky nanočástic stříbra. Naše zjištěné hodnoty EC_{50} (ErC_{50}) v případě dafnií a řas se blíží zaznamenaným koncentracím nanočástic stříbra ve vodním prostředí. Dá se předpokládat, že se v dohledné době tato kontaminace látek bude nadále zvyšovat, z důvodu jejich stále se narůstající produkce. Je tedy možno říci, že nanočástice stříbra pro dafnie představují v závislosti na zjištěných environmentálních koncentracích akutní ekotoxikologické riziko. V případě mořských bakterií *Vibrio fischeri* je hodnota EC_{50} pro nanočástice stříbra značně vysoká. V reálném vodním prostředí se takto vysoké koncentrace těchto nanočástic nevyskytují. Naše výsledky ukazují, že baktericidní vlastnosti závisí i na velikosti nanočástic. Nelze však jednoznačně říci, že platí, čím menší nanočástice, tím větší baktericidní schopnost.

Seznam literatury

- 1) ASGHARI S., JOHARI S. A., LEE J. H., KIM Y. S., JEON Y. B., CHOI H. J., MOON M. CH., YU I. J. (2012) Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *Journal of Nanobiotechnology*. Vol. 10, p. 1–11.
- 2) GOPINATH P. M., RANJANI A., DHANASEKARAN D., THAJUDDIN N., ARCHUNAN G., AKBARSHA M. A., GULYÁS B., PADMANABHAN P. (2016) Multi-functional nano silver: A novel disruptive and theranostic agent for pathogenic organisms in real-time. *Scientific Reports* 6 (34058) p. 1–16.
- 3) PANÁČEK A., KVÍTEK L., PRUCEK R., KOLÁŘ M., VEČEŘOVÁ R., PIZÚROVÁ N., SHARMA V. K., NEVĚČNÁ T., ZBOŘIL R. (2006) Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *American Chemical Society*. Vol. 110, p. 16248–16253.
- 4) TIEDE K., HASSELLOV M., BREITBARTH E., CHAUDHRY Q., BOXALL A. (2009) Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *J Chromatograph A*. 1216(3):503–9.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 222/2017/FVHE.

Vliv vybraných antidepresiv na genovou expresi antioxidantních a biotransformačních enzymů u embryí *Danio rerio*

Pavla Sehonová^{1,2}, Zdeňka Svobodová¹, Přemysl Mikula², Nikola Hodkovicová¹, Lenka Večerková¹

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

²Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Stejně jako u ostatních skupin léčiv, psychoaktivní látky nejsou zcela metabolizovány v lidském organismu, ale částečně se vylučují z těla buď nezměněné, nebo ve formě metabolitů (Heberer, 2002). Nízká účinnost odstranění léčiv v čistírnách odpadních vod je následně příčinou výskytu těchto látek v podzemních a povrchových vodách. I když se rezidua těchto látek vyskytují v odpadních a povrchových vodách v poměrně nízkých koncentracích (okolo 300 ng/l pro amitriptylin a venlafaxin – Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013), jedná se o bioaktivní látky, které mohou mít nezanedbatelné účinky na organismy vodního prostředí. Cílem studie bylo posoudit vliv tricyklického antidepresiva amitriptylinu (AMI) na embrya dánia pruhovaného (*Danio rerio*).

Materiál a metodika

Čerstvě oplozené jikry *D. rerio* v počtu 1 500 kusů byly náhodně rozprostřeny do Petriho misek (50 jiker v každé misce). První skupina jiker (10 Petriho misek, 500 jiker) byly exponovány AMI (Sigma Aldrich, Česká republika, čistota ≥ 98 %) v environmentálně-relevantní koncentraci 300 ng/l, druhá skupina jiker (500 ks) byla exponována AMI o koncentraci 30 μ g/l. Kontrolní skupina (500 ks jiker) byla exponována pouze v ředící vodě, která byla připravena dle normy ISO 7346 (ISO, 1996). Po 24 hodinách po oplození jiker (hpf) bylo z každé experimentální i kontrolní skupiny odebráno 80 mg vzorku. Toto množství bylo rozděleno do 8 zkumavek, přičemž bylo 10 mg vzorku v každé zkumavce (celkově 24 zkumavek – 2 experimentální a 1 kontrolní skupina). Do zkumavek byly přidány 2 ml RNA lateru (ThermoFisher Scientific, Německo) za účelem fixace RNA, vzorky byly následně uloženy v teplotě + 4°C po dobu 12 hodin a následně uloženy při teplotě – 80 °C až do analýzy. Stejný postup byl rovněž zopakován 48, 96 a 144 hpf. Následně byla ze vzorků izolována RNA pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen, Německo) a získaná RNA byla použita pro hodnocení genové exprese vybraných genů – CYP1A1, GST p2, GPx 4b, SOD 2, CAT a EF 1 α pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Statistická analýza byla provedena v programu Unistat 5.6. pro Excel pomocí dvoufaktorové analýzy rozptylu.

Výsledky

CYP

	24 hpf	48 hpf	96 hpf	144 hpf
Kontrola	0,30±0,02 ^{a,z}	0,37±0,01 ^{a,z}	1,43±0,11 ^{a,x}	1,26±0,08 ^{a,y}
300 ng/l	0,36±0,04 ^{a,z}	0,46±0,03 ^{a,z}	1,32±0,14 ^{a,x}	1,32±0,08 ^{a,y}
30 µg/l	0,32±0,02 ^{a,z}	0,45±0,03 ^{a,z}	1,60±0,19 ^{a,x}	1,51±0,17 ^{a,y}

Tabulka 1: Koncentrace mRNA CYP v závislosti na koncentraci AMI a délce expozice. (a, b, c indikují statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi; x, y, z indikují statisticky významný rozdíl v případě délky expozice).

SOD

	24 hpf	48 hpf	96 hpf	144 hpf
Kontrola	0.59±0.07 ^{a,y}	0.75±0.04 ^{a,y}	1.57±0.07 ^{a,x}	0.91±0.07 ^{a,y}
300 ng/l	0.61±0.03 ^{a,z}	0.72±0.06 ^{a,y,z}	1.74±0.20 ^{a,x}	1.06±0.14 ^{a,y}
30 µg/l	0.58±0.07 ^{a,y}	0.62±0.05 ^{a,y}	1.56±0.07 ^{a,x}	1.01±0.07 ^{a,y}

Tabulka 2: Koncentrace mRNA SOD v závislosti na koncentraci AMI a délce expozice. (a, b, c indikují statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi; x, y, z indikují statisticky významný rozdíl v případě délky expozice).

CAT

	24 hpf	48 hpf	96 hpf	144 hpf
Kontrola	0.29 ± 0.04 ^{a,z}	0.68 ± 0.04 ^{a,z}	2.42 ± 0.11 ^{a,x}	1.44 ± 0.04 ^{b,y}
300 ng/l	0.30 ± 0.03 ^{a,z}	0.63 ± 0.04 ^{a,z}	2.31 ± 0.07 ^{a,x}	1.44 ± 0.07 ^{b,x}
30 µg/l	0.23 ± 0.03 ^{a,y}	0.99 ± 0.27 ^{a,y}	2.32 ± 0.08 ^{a,x}	2.03 ± 0.32 ^{a,x}

Tabulka 3: Koncentrace mRNA CAT v závislosti na koncentraci AMI a délce expozice. (a, b, c indikují statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi; x, y, z indikují statisticky významný rozdíl v případě délky expozice).

GPx

	24 hpf	48 hpf	96 hpf	144 hpf
Kontrola	0.81±0.05 ^{a,y}	0.86±0.04 ^{a,y}	2.00±0.11 ^{a,x}	1.07±0.10 ^{a,y}
300 ng/l	0.81±0.04 ^{a,y}	0.83±0.07 ^{a,y}	1.59±0.11 ^{a,x}	1.15±0.11 ^{a,y}
30 µg/l	0.74±0.03 ^{a,y}	0.96±0.90 ^{a,y}	1.62±0.07 ^{a,x}	1.38±0.18 ^{a,y}

Tabulka 4: Koncentrace mRNA GPx v závislosti na koncentraci AMI a délce expozice. (a, b, c indikují statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi; x, y, z indikují statisticky významný rozdíl v případě délky expozice).

	GST			
	24 hpf	48 hpf	96 hpf	144 hpf
Kontrola	0.39±0.02 ^{a,z}	1.08±0.04 ^{a,y}	2.22±0.11 ^{a,x}	0.89±0.02 ^{a,y}
300 ng/l	0.40±0.02 ^{a,z}	1.01±0.08 ^{a,y}	2.10±0.11 ^{a,x}	0.85±0.03 ^{a,y}
30 µg/l	0.34±0.01 ^{a,z}	1.17±0.09 ^{a,y}	1.96±0.03 ^{a,x}	1.19±0.20 ^{a,y}

Tabulka 5: Koncentrace mRNA GST v závislosti na koncentraci AMI a délce expozice. (a, b, c indikují statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi; x, y, z indikují statisticky významný rozdíl v případě délky expozice).

Závěr

Cílem studie bylo posoudit vliv tricyklického antidepresiva amitriptylinu na genovou expresi vybraných antioxidantních a biotransformačních enzymů. mRNA koncentrace CAT byla 144 hpf statisticky významně vyšší ve skupině exponované 30 µg/l AMI ve srovnání s kontrolou. Dále byly rozšířeny poznatky o schopnosti indukce antioxidantních a biotransformačních enzymů u raných vývojových stádií ryb.

Seznam literatury:

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

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

ISO, 1996. ISO 7346 – Water Quality –Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] –Part 1: Static method; Part 2 – Semi-Static Method: 11.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 202/2017/FVHE.

Porovnání toxického účinku stříbrných nanočástic a iontů na embrya dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Hana Čaloudová¹, Nikola Hodkovicová¹, Jana Berlinská¹, Blahoslav Maršálek², Aleš Panáček³, Zdeňka Svobodová¹

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

² Botanický ústav AV ČR, pracoviště Brno

³ Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Univerzita Palackého v Olomouci

Úvod

Stříbrné nanočástice se řadí mezi nejčastěji používané nanočástice, jejich roční produkce je celosvětově odhadována na 320 tun za rok, a to díky jejich vlastnostem, jakými jsou vysoká elektrická a tepelná vodivost, nelineární optické chování a zejména antibakteriální, antivirotická a antimykotická aktivita (Nowack et al., 2011). Využití nacházejí například v průmyslu a zemědělství jako desinfekce, dále ve zdravotnictví, potravinářství, stavebnictví či při výrobě široké řady spotřebního zboží, od oděvů po tapety (SCENIHR, 2014). S jejich vzrůstající výrobou a spotřebou lze očekávat i jejich zvýšený výskyt v životním prostředí, kde mohou představovat riziko pro necílové druhy, jakými jsou ryby, které představují vrchol potravního řetězce ve vodním prostředí. Předpokládané koncentrace nanočástic stříbra v evropských řekách se pohybují v rozmezí 0,03-0,08 µg/l (Mueller et al., 2008). Proto byly provedeny testy embryonální toxicity dle modifikované metodiky OECD 236, které jsou vhodnou alternativou k akutnímu testu toxicity na rybách OECD 203 (Belanger et al., 2013).

Materiály a metodika

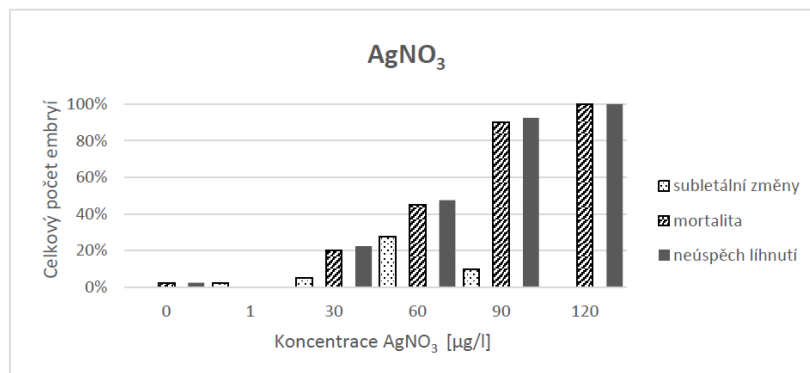
Modifikovaný test akutní toxicity byl proveden na embryích dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Byla provedena selekce oplozených, správně se vyvíjejících embryí ve stádiu blastuly 4 hodiny po fertilizaci. Testy byly prováděny v mikrotitračních deskách semistatickou metodou, s výměnou lázně každých 24 hodin. Embrya byla inkubována 96 hodin při teplotě 26 °C s využitím světelného cyklu 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Mortalita a subletální změny byly zaznamenávány každých 24 hodin. Test byl proveden v triplikátu, v každé kontrolní i expoziční skupině bylo použito 12 embryí. K expozičním byl použit dusičnan stříbrný v koncentracích 1-120 µg/l a dva druhy stříbrných nanočástic (AgNP). Prvním z nich byly stříbrné nanočástice syntetizované Regionálním centrem pokročilých technologií a materiálů s velikostní distribucí $30,7 \pm 0,6$ nm stabilizované 0,01% roztokem maltózy a želatiny v koncentracích 0,01–10 mg/l. Tyto stříbrné nanočástice se vyznačují žlutým zabarvením s absorpčním maximem 408 nm, které je specifické pro tuto velikost nanočástic, proto byla využita optická spektrometrie k ověření stability nanočástic. Další nanočástice byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich,

jejich deklarovaná velikost byla < 100 nm, ke stabilizaci byl použit polyvinylpyrrolidon (PVP). Testovány byly v koncentracích 1–100 mg/l.

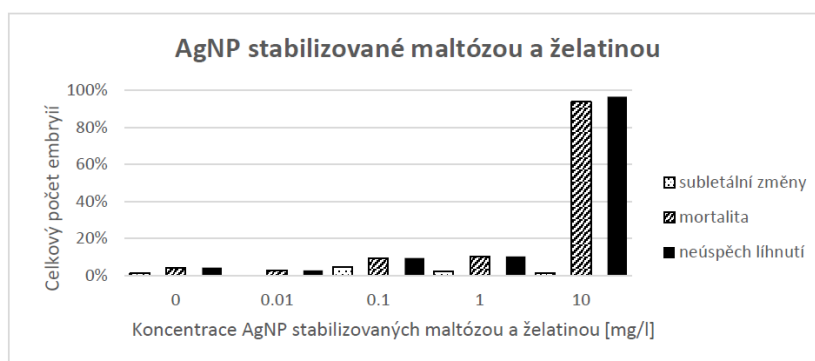
Výsledky

Výsledkem testů bylo stanovení hodnot LC50. Pro dusičnan stříbrný byla stanovena hodnota 96hLC50 56,50 µg/l, pro stříbrné nanočástice stabilizované maltózou a želatinou hodnota 96hLC50 téměř stonásobně vyšší, 5,16 mg/l. Nejméně toxické byly nanočástice stabilizované PVP, jejich 96hLC50 byla vyšší než 100 mg/l. Dusičnan stříbrný navíc kromě významně nižší hodnoty LC50 vyvolal také více subletálních změn. Přítomny byly edémy srdce a žloutkového váčku a deformace páteře. Expozice dusičnanu stříbrnému vedla ve větší míře také k zaostávání ve vývoji, kdy namísto fyziologického hrudního postavení ve vodním sloupci a únikové reakci na podnět (jemný dotyk jehlou) embryo leželo na boku a neprojevovalo žádnou reakci.

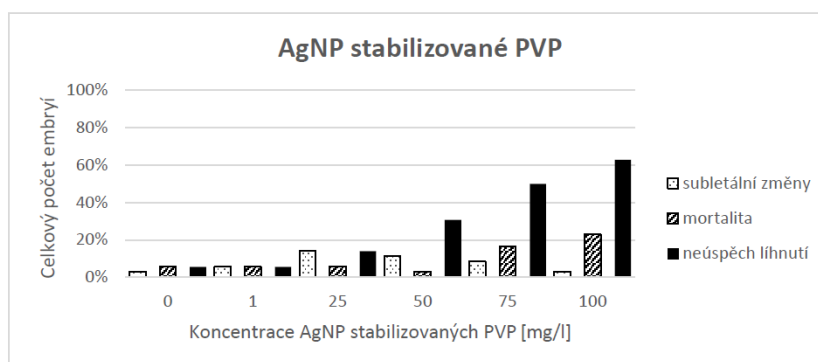
Graf č. 1: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných AgNO₃



Graf č. 2: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných stříbrným nanočásticím stabilizovaným maltózou a želatinou



Graf č. 3: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných stříbrnýmnanočástečím stabilizovaným polyvinylpyrrolidonem (PVP)



Neúspěšnost líhnutí ve skupinách exponovaných dusičnanu stříbrnému a nanočásticím stabilizovaných maltózou a želatinou korelovala s mortalitou embryí, ve skupině exponované nanočásticím stabilizovaným PVP míra neúspěšnosti líhnutí převyšovala mortalitu.

U embryí exponovaných dusičnanu stříbrnému v koncentracích převyšujících 30 $\mu\text{g/l}$ byla pozorována depozice stříbra na povrchu a také uvnitř chorionu, a to i v případě, kdy se embryo vyvíjelo bez dalších změn. V případě nanočástic stabilizovaných PVP byla depozice stříbra na povrchu chorionu pozorována v koncentracích převyšujících 25 mg/l, v případě nanočástic stabilizovaných maltózou a želatinou v koncentracích vyšších než 1 mg/l.

Získané výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou, podle které je toxicita iontů zpravidla vyšší než toxicita nanočástic (Griffitt et al., 2008; Ribeiro et al., 2014). Hodnoty LC50 pro stříbrné nanočástice se v literatuře pohybují v širokém rozmezí hodnot – od desítek mikrogramů po desítkymiligramů (Bilberg et al., 2012; Katuli et al., 2014). Rozdíly v toxicitě vysvětluje skutečnost, že na stříbrné nanočástice nelze nahlížet jako na jedinou chemickou látku, jako je tomu v případě dusičnanu stříbrného, ale spíše jako na celou skupinu látek. Výrazný vliv na toxicitu nanočástic má jejich velikost a tvar. Větší částice bývají zpravidla méně toxické, neboť mají menší povrch při stejné koncentraci roztoku a na jejich povrchu se tedy nachází méně atomů, které mohou interagovat s organismy, zároveň dochází k menší disoluci iontů z povrchu. Významně odlišné může být setrvávání nanočástic v suspenzi – rychlost a míra agregace, aglomerace, nebo ionizace. Dalším kritériem je přítomnost nebo nepřítomnost povrchové úpravy – coatingu a reakce s dalšími ionty a ligandy obsaženými v roztoku (Angel et al., 2013).

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že stříbrné nanočástice jsou pro ryby méně toxické než dusičnan stříbrný a při zohlednění environmentálních koncentrací v současné době nepředstavují akutní riziko narušení zdraví ryb.

Literatura:

ANGEL, Brad M., Graeme E. BATLEY, Chad V. JAROLIMEK a Nicola J. ROGERS, 2013. The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*. 93(2), 359-365. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.04.096.

BELANGER, Scott E., Jane M. RAWLINGS a Gregory J. CARR, 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute fish toxicity to chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32(8), 1768-1783. DOI: 10.1002/etc.2244.

BILBERG, Katrine, Mads Bruun HOVGAARD, Flemming BESENBACHER a Erik BAATRUP, 2012. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology*. 1-9. DOI: 10.1155/2012/293784.

GRIFFITT, Robert J., Jing LUO, Jie GAO, Jean-Claude BONZONGO a David S. BARBER, 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27(9), 1972-1978. DOI: 10.1897/08-002.1.

KATULI, Kheyrollah Khosravi, Andrey MASSARSKY, Ali HADADI a Zahra POURMEHRAN, 2014. Silver nanoparticles inhibit the gill Na⁺/K⁺-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 106, 173-180. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.001.

MUELLER Nicole. C., NOWACK Bernd, 2008: Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*. 42(12): 4447-4453. DOI: 10.1021/es7029637

NOWACK, Bernd, Harald F. KRUG a Murray HEIGHT, 2011. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology*. 45(4), 1177-1183. DOI: 10.1021/es103316q.

RIBEIRO, Fabianne, Julián Alberto GALLEGU-URREA, Kerstin JURKSCHAT, Alison CROSSLEY, Martin HASSELLÖV, Cameron TAYLOR, Amadeu M.V.M. SOARES a Susana LOUREIRO, 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of The Total Environment*. 466-467, 232-241. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.06.101.

SCENIHR – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 2014: Opinion on Nanosilver: safety, health and environmental effects and role in antimicrobial resistance.

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU 203/2017/FVHE.

Optimalizace testu blastické transformace lymfocytů u lososovitých ryb

Hana Minářová^{1,2}, Miroslava Palíková¹, Eva Jelínková¹, Petra Ondráčková², Jan Mareš³, Martin Faldyna²

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno¹, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.², Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova univerzita v Brně³

Úvod

Vzhledem k celosvětovému rozvoji akvakultury a vzrůstající poptávce po rybím mase se zvyšují i požadavky na diagnostiku a prevenci chorob a chorobných stavů. Aplikovaných imunologických metod je mnoho, velice vhodné jsou však funkční testy, které nám zobrazí nejen aktuální stav složek imunitního systému, ale i jejich schopnost aktivně reagovat na podněty. Jedním z těchto testů je i test blastické transformace lymfocytů. Jeho principem je stimulace pomocí mitogenů, čímž dochází k přeměně lymfocytů na lymfoblasty (Scapigliati 2013). Mitogeny selektivně stimulují T-buňky (PHA, ConA), B-buňky (LPS) nebo oba typy lymfocytů (PWM) (Kehrer et al. 1998). Tento test může sloužit jako ukazatel reakce organismu ryb na negativní faktory (Ottinger et al. 2014) či na profylaktické a terapeutické zásahy v chovu. Je tedy například možné pozorovat sníženou proliferaci lymfocytů v případě imunosuprese. Mezi jednotlivými druhy ryb (a často také mezi individuálními rybami v rámci druhu) však nacházíme výrazné rozdíly, což je nutné během diagnostiky zohlednit. Metodika se mezi jednotlivými autory liší – je třeba zjistit optimální typ vzorku, séra, vhodné mitogeny a jejich koncentraci, délku inkubace, inkubační teplotu a další parametry.

Materiál a metodika

Ryby a podmínky chovu

Pstruzi duhový (*Oncorhynchus mykiss*) o průměrné hmotnosti $194,77 \pm 68,44$ g a celkové délce $24,14 \pm 2,64$ cm byli odchováni ve třech nádržích o objemu 1000 litrů a jedné nádrži o objemu 1270 l (Mendelova univerzita v Brně). Voda byla nasycena kyslíkem na průměrnou hodnotu 8,11 mg/l (tj. 87,1 %), průměrná teplota byla 17,6 °C, pH 7,10, N-NH₄⁺ 0,36 mg/l a Cl⁻ 140,40 mg/l. Byl použit biofiltr Nexus 310 a UV-C lampa. Ryby byly krmeny dvakrát denně krmivem BioMar EFICO Enviro 920 (standardní extrudované krmivo pro chov lososovitých ryb).

Odběr vzorků, izolace mononukleárních buněk

Odebrané vzorky zahrnovaly orgány (hlavová ledvina, slezina) a krev odebranou z ocasní žíly za použití různých antikoagulancií (heparin, EDTA). Orgány byly nastříhány, mechanicky protlačeny sítkem (monofil) a dvakrát propláchnuty odstředěním v PBS (fosfátový pufr; 10 min, 450 g). Krev byla naředěna médiem RPMI-1640 v poměru 1:2 (s tímto ředěním byly zaznamenány nejlepší výsledky). Mononukleární buňky byly následně izolovány centrifugací na denzitním gradientu (Histopaque 1077 g/ml; 40 min, 800 g). Nad denzitním médiem se po odstředění oddělil prstenec buněk (lymfocyty a malé množství monocytů), které byly odebrány a několikrát propláchnuty dalším odstředěním v PBS (10 min, 450 g), spočítány (Mindray) a resuspendovány v kultivačním médiu (L-15) na požadovanou koncentraci (2×10^5 buněk/jamku).

Počet tímto způsobem izolovaných buněk byl srovnán s počtem buněk získaných hemolýzou destilovanou vodou; rovněž byla provedena kontrola pomocí průtokového cytometru (BD LSRFortessa) a test fagocytární aktivity (pohlcování částic – zymosan AF 488, Texas Red).

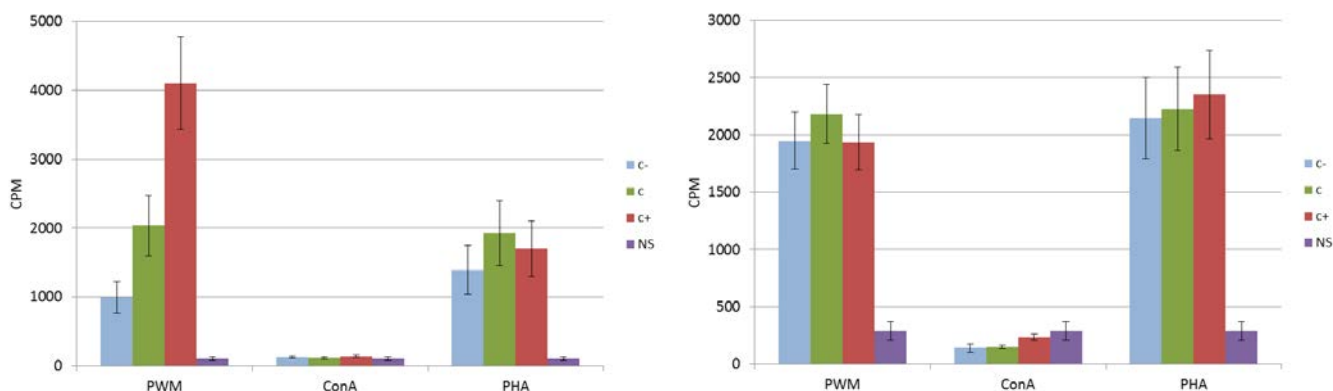
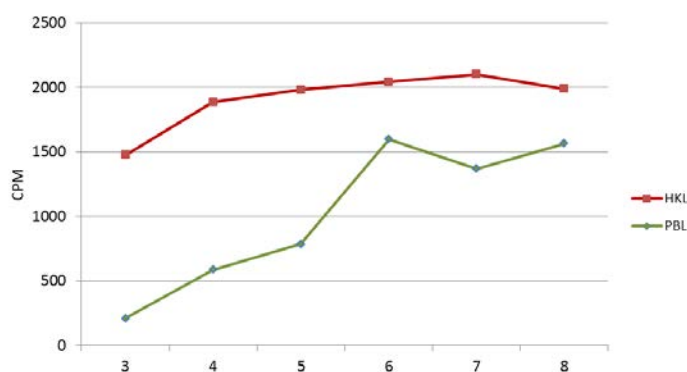
Test blastické transformace lymfocytů

Buněčná suspenze (180 μ l) byla společně s inaktivovaným sérem (20 μ l; FBS/pstruží sérum) a příslušným mitogenem (20 μ l) napipetována v triplicátech do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Použité mitogeny zahrnovaly PWM (pokeweed mitogen; 5, 10 a 50 μ g/ml), ConA (konkanavalin A; 1, 10 a 20 μ g/ml), PHA (fytohemaglutinin; 25, 50 a 100 μ g/ml) a LPS (lipopolysacharid; 1, 50 a 100 μ g/ml). Po uplynutí inkubační doby (2–8 dnů, 10–20 °C) byl do jamek přidán thymidin značený radioaktivním izotopem vodíku (3 H), který byl zakomponován do nově vznikající DNA, a za dalších 20 h byly buňky sklizeny pomocí harvesteru (Packard) na filtrační papír. Po aplikaci scintilačního roztoku jsme pomocí přístroje pro kapalnou scintilaci (Packard) získali výsledky v podobě CPM (počty záblesků za minutu).

Výsledky

Nejvyšší hodnoty proliferace byly pozorovány po 6 dnech inkubace s lymfocyty periferní krve (= PBL) a 7 dnech inkubace s lymfocyty hlavové ledviny (= HKL; Obr. 1). V jiných studiích přitom bývá inkubační doba kratší (Harford et al. 2007, Müller et al. 2009). U PBL byly naměřeny nejlepší výsledky s PWM (50 μ g/ml), zatímco HKL byly lépe stimulovány PHA (100 μ g/ml) než ostatními mitogeny (rozdíly však nebyly příliš výrazné, v dalším experimentu navíc byly u HKL zjištěny nejlepší výsledky za použití PWM 10 μ g/ml). Nejnižší hodnoty byly zaznamenány s ConA (Obr. 2). V důsledku nedostatečného množství izolovaných buněk bylo nutné provést experiment s LPS samostatně. Podobně jako u heparinizované krve byla EDTA dobře stimulována PWM (50 μ g/ml),

stimulace PHA (100 µg/ml) však neměla na buňky žádný efekt. Nálezů jiných autorů se od našich liší (Chilmonczyk 1978, Tillitt et al. 1988, Agbede et al. 2005). Navzdory opačným zkušenostem některých autorů (DeKoning et al. 1991) jsme stimulaci buněk zaznamenali pouze s FBS (fetální bovinní sérum) (Obr. 3). Nejlepší výsledky byly u PBL získány při teplotě 15 °C (Obr. 4), u HKL byly naměřeny méně výrazné rozdíly mezi inkubačními teplotami. Optimálním vzorkem byla heparinizovaná krev, která poskytovala nejlepší výsledky (Obr. 5). Slezina nemohla být vyšetřena kvůli velmi nízkému počtu izolovaných buněk. Izolace na denzitním gradientu měla vyšší výtěžnost než izolace hemolýzou (čas potřebný k dokonalé hemolýze = 10 s).



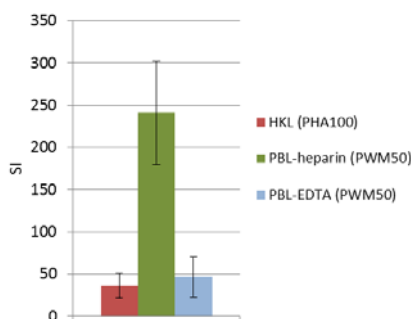
Obrázek 1. Délka inkubace (3–8 dnů; HKL/PBL-heparin, 15 °C, PWM10, FBS; n = 4/5).

Obrázek 2. Mitogeny – standardní (c), nižší (c-) a vyšší (c+) koncentrace (PBL-heparin – vlevo, HKL – vpravo; 7 dnů, 15 °C, FBS; n = 8/6). NS = nestimulované buňky.



Obrázek 3. FBS, autologní a homologní pstruží sérum (HKL, 7 dnů, PHA100, 15 °C; n = 8/HS 6). NS = nestimulované buňky.

Obrázek 4. Teplota (PBL-heparin, 7 dnů, PWM50, FBS; n = 8). Stimulační index (SI) = stimulované/nestimulované buňky.



Obrázek 5. HKL, PBL-heparin a EDTA (7 dnů, 15 °C, FBS; n = 9). Stimulační index (SI) = stimulované/nestimulované buňky.

Závěr

Optimálním vzorkem pro test blastické transformace byla v našem experimentu heparinizovaná krev. Při manipulaci s rybími buňkami je zásadní dodržování správné teploty a je také třeba vzít v úvahu přirozenou variabilitu. Tento test byl optimalizován a bude využit v dalším výzkumu i v praxi k vyšetření zdravotního stavu lososovitých ryb (především pstruha duhového).

Seznam literatury:

- Agbede, S.A., Adedeji, O.B., Adeyemo, O.K. 2005. Proliferative Responses of Tilapia T-Like Lymphocytes to Stimulation by Concanavalin A. *African Journal of Biomedical Research*, 8: 151–155.
- Chilmonczyk, S. 1978. In vitro stimulation by mitogens of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Annales d'Immunologie*, 129(1): 3–12.
- DeKoning, J.J., Kaattari, S.L. 1991. Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 27: 381–386.
- Harford, A.J., O'Halloran, K., Wright, P.F.A. 2007. Effect of *in vitro* and *in vivo* exposures on the immune functions of Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(8): 1649–1656.

- Kehrer, S.R., Hannan, C.M., Raison, R.L. 1998. Identification of a subpopulation of leucocytes from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) responsive to pokeweed mitogen. *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 477–487.
- Müller, C., Ruby, S., Brousseau, P., Cyr, D., Fournier, M., Gagné, F. 2009. Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150(3): 390–394.
- Ottinger, C.A., Honeyfield, D.C., Densmore, C.L., Iwanowicz, L.R. 2014. *In vitro* immune functions in thiamine-replete and -depleted lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Fish & Shellfish Immunology*, 38: 211–220.
- Scapigliati, G. 2013. Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*, 41: 200–208.
- Tillitt, D.E., Giesy, J.P., Fromm, P.O. 1988. In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89(1): 25–35.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 216/2017/FVHE.

Diagnostika původce proliferativního onemocnění ledvin u lososovitých ryb pomocí molekulárně biologických metod

Eva Syrová (Jelínková), Veronika Kováčová, Hana Minářová, Iva Papežiková, Miroslava Palíková

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

Úvod

Tetracapsuloides bryosalmonae je původcem proliferativního onemocnění ledvin (PKD) u lososovitých ryb. Toto onemocnění působí ztráty jak v chovech lososovitých ryb, tak i ve volných vodách. Bylo zjištěno, že mezi lososovitými druhy ryb existují určité rozdíly ve vnímavosti k tomuto onemocnění (1). Vzniká tak snaha najít vhodný lososovitý druh pro chov z hlediska odlonosti vůči PKD, a tím minimalizovat ztráty způsobené tímto onemocněním. Cílem této studie bylo molekulárně biologických metod identifikovat původce ve tkáních lososovitých ryb z intenzivního chovu v České republice. Na základě výskytu původce a srovnáním s patologicko-anatomickým nálezem jsme zjistili rozdíly ve vnímavosti různých druhů a linií chovaných ryb v daném recirkulačním systému.

Materiál a metodika

Odběr vzorků

Vzorky byly získány z intenzivního chovu lososovitých ryb v České republice. V roce 2015 bylo v intenzivním chovu lososovitých ryb (recirkulační akvakulturní systém - RAS) odebráno 50 vzorků ledvin od lososovitých ryb: siven americký (*Salvelinus fontinalis*) dvouroček – 10 vzorků, kříženec sivena amerického a sivena arktického (*Salvelinus alpinus*) dvouroček – 10 vzorků, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*) – 30 vzorků ročků a dvouročků (dvouročci chovaní na RAS 1. a 2. rok). V roce 2017 bylo z tohoto chovu odebráno dalších 50 vzorků ledvin od těchto druhů ryb: siven americký (*Salvelinus fontinalis*), původ Itálie – 10 vzorků, siven americký (*Salvelinus fontinalis*), původ Dánsko – 10 vzorků, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), původ Irsko – 10 vzorků, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), původ Dánsko – 10 vzorků, pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*), původ Dánsko, mladší věková kategorie – 10 vzorků. Ryby byly usmrceny, byly posouzeny patologicko-anatomické změny a odebrány vzorky pro vyšetření.

Izolace DNA a polymerázová řetězová reakce

V laboratoři Ústavu ekologie a chorob zvířet, ryb a včel bylo odebráno malé množství tkáně (do 25 µg) ze všech vzorků ledvin (z roku 2015 i 2017) pro homogenizaci a extrakci DNA pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu (QIAGEN) na základě protokolu od výrobce. Získaná DNA byla využita do polymerázové řetězové reakce (PCR) pro kvalitativní otestování přítomnosti *T. bryosalmonae*. U některých vzorků odebraných v roce 2015 PCR zatím není dokončeno. Dále bylo provedeno kvantitativní vyšetření přítomnosti tohoto parazita pomocí qRT-PCR – dokončuje se. K vizualizaci produktů PCR byla použita gelová elektroforéza (1, 2).

Výsledky

Výsledky patologicko-anatomického nálezu a PCR u 50 vzorků ledvin odebraných z ryb z RAS v roce 2015 shrnuje Tabulka 1. Nejvyšší procento pozitivních vzorků bylo na základě PCR zjištěno u skupiny jednoletého *O. mykiss*, u této skupiny byly rovněž pozorovány výrazné patologicko – anatomické změny. Výsledky PCR ukazují rozdíly ve vnímavosti vyšetřovaných druhů ryb vůči PKD. Výsledky patologicko-anatomického nálezu a PCR u 50 vzorků ledvin odebraných z ryb z RAS v roce 2017 shrnuje Tabulka 2.

Předběžné výsledky qRT-PCR ukazují kvantitativní variabilitu patogena v ledvinné tkáni.

Druh ryby, původ	Patologicko-anatomické změny	Prevalence změn	PCR – procento pozitivních vzorků
<i>S. fontinalis</i> , dvouroček	-	0 %	89 %, n = 9
<i>S. fontinalis</i> x <i>S. alpinus</i>	-	0 %	80 %, n = 10
<i>O. mykiss</i> , dvouroček, 2. rok na RAS	+	70 %	13 %, n = 8
<i>O. mykiss</i> , dvouroček, 1. rok na RAS	++	100 %	0 %, n = 4
<i>O. mykiss</i> , roček	+++	100 %	100 %, n = 6

Tabulka 1. Patologicko-anatomické změny a PCR u ryb odebraných z RAS v roce 2015

Druh ryby, původ	Patologicko-anatomické změny	Prevalence změn	PCR – procento pozitivních vzorků
<i>S. fontinalis</i> , původ Itálie	-	0 %	80 %
<i>O. mykiss</i> , původ Dánsko, mladší věk. kat.	-	0 %	100 %
<i>S. fontinalis</i> , původ Dánsko	+	20 %	100 %
<i>O. mykiss</i> , původ Irsko	++	70 %	100 %
<i>O. mykiss</i> , původ Dánsko	+++	100 %	100 %

Tabulka 2. Patologicko-anatomické změny a PCR u ryb odebraných z RAS v roce 2017

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že výsledky PCR potvrdily rozdíly v druhové i liniové odolnosti lososovitých ryb k onemocnění PKD. Výrazné patologicko- anatomické změny byly zachyceny v různém rozsahu u pstruha duhového. Jako odolnější se jeví pstruh duhový původem z Irska. Ryby, které se s patogenem setkaly podruhé, měly výrazně menší patologicko-anatomický nález. U sivena amerického byly zachyceny nevýrazné změny v ledvinách pouze u dvou kusů, ale PCR potvrdila přítomnost parazita v roce 2017 téměř u všech kusů. Z těchto výsledků je vidět, že i když je parazit *T. bryosalmonae* v těle ryby přítomen, nemusí se nemoc klinicky projevit.

Seznam literatury:

1. KUMAR, G. et al. Fate of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) after infection of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, vol. 107, p. 9-18.
2. ABD-ELFATTAH, A. et al. Persistence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) in chronically infected brown trout *Salmo trutta*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2014, vol. 111, p. 41-49.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno219/2017/FVHE.

Stanovení ruminální degradovatelnosti aminokyselin a isoflavonů u dvou různě technologicky upravených sójových produktů metodou in sacco

Zuzana Němcová, Ludmila Křížová

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

Úvod

Sója je důležitou složkou výživy přežvýkavců. Z hlediska nutriční hodnoty je podstatným zdrojem aminokyselin (Radivojević et al. 2011). Obsahuje však i další významné látky, např. isoflavony (IF), které vykazují silné estrogenní účinky (Flachowsky et al. 2011). Nejčastějšími sójovými isoflavony jsou daidzein, glycitein a genistein. Stravitelnost isoflavonů a dalších látek se mění v závislosti na technologickém zpracování sóji. Ke zkrmování se využívá tepelně upravených sójových komponentů, z nichž nejčastěji používaným je sójový extrahovaný šrot a extrudovaná sója (Radivojević et al. 2011). Ruminální degradovatelnost je důležitým ukazatelem výživové hodnoty krmiv (Belanche et al. 2014). Při jejím stanovování je použití bachorové tekutiny nenahraditelné, stejně jako proměnlivé prostředí bachoru, které nelze vytvořit in vitro metodami (Schadt et al. 2014). Stále se proto využívá in sacco metod (Homolka et al. 2007).

Materiál a metodika

Vzorky

Stanovení degradovatelnosti aminokyselin a isoflavonů bylo provedeno u sójového šrotu (S) a sójového extrahovaného šrotu (SEŠ). Vzorky byly pomlety na mlýnku přes síto s velikostí otvorů 2 mm a následně naváženy po 2 g do nylonových sáčků (o rozměrech 5x14 cm s velikostí pórů 42 µm).

Zvířata

Pro stanovení degradovatelnosti byly použity dvě ruminálně kanylované ovce. Všechny zákroky na zvířatech byly prováděny v souladu s platnou legislativou (projekt pokusu č. 28987/2017-MZE-17214). Ovce byly krmeny dvakrát denně a měly volný přístup k pitné vodě. Jejich denní krmná dávka sestávala ze sena (0,95 kg) a doplňkové krmné směsi (0,65 kg). Složení doplňkové krmné směsi bylo následující: ječmen 20 %, sladový květ 10 %, extrahovaný šrot slunečnicový neloupaný 30 %, úsušek vojtěškový 30 %, klíčky obilní 3 %, melasa 0,5 %, krmná sůl 0,5 %, vápenec 2,5 %, melasa 0,5 %, krmná sůl 0,5 %, vápenec 2,5 %.

MCP 2 %, premix stopových prvků a vitamínů 0,3%, PROBIOSTAN E10 1,2%. Na krmnou dávku byly ovce adaptovány více než dva týdny před zahájením inkubace.

Sáčky s krmivem byly inkubovány v prostředí bachoru po dobu 0, 2, 4, 8, 16 a 24 hodin. Po inkubaci v bachoru byly sáčky 1 min propírány od hrubých nečistot pod tekoucí studenou vodou, dále byly propírány v automatické pračce po dobu 10 min bez odstředování. Sáčky s 0 h inkubace nebyly inkubovány v bachoru, ale namočené v teplé vodě (37 °C) po dobu 10 min a poté propírány stejným způsobem jako ostatní sáčky. Po vyprání byly všechny sáčky sušeny při teplotě 60 °C po dobu 48 hod. Rezidua krmiv byla analyzována na obsah sušiny, NL, aminokyselin a isoflavonů.

Z výsledků analýz byla vypočtena degradovatelnost jednotlivých isoflavonů, aminokyselin, sušiny a NL dle rovnice podle Ørskov a McDonald (1979). Při výpočtu byly zohledněny ztráty při praní vzorků.

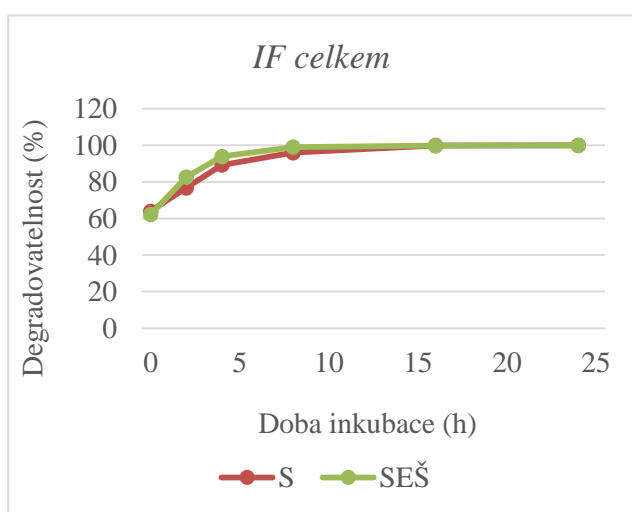
Výsledky

U obou testovaných krmiv byla zjištěna vysoká ruminální degradovatelnost sušiny a NL (Němcová, Křížová, 2017). Vyšší hodnoty byly zaznamenány vždy u S ve srovnání se SEŠ. Hodnoty degradovatelnosti aminokyselin po 16 hod inkubace jsou uvedeny v tabulce č. 1. U skupiny S se degradovatelnost aminokyselin pohybovala v rozmezí od 90,45 % (methionin) do 95,90 % (arginin). Degradovatelnost aminokyselin u SEŠ nabývala hodnot od 74,23 % (methionin) a nepřesahovala 88,51 % (kyselina glutamová).

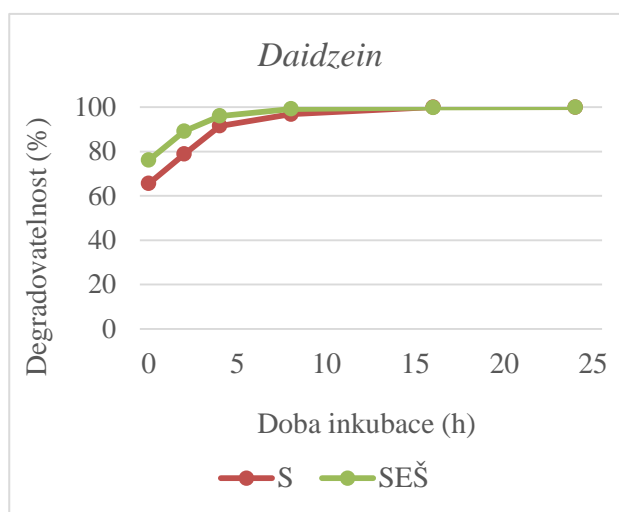
Parametr	Jednotky	S	SEŠ
Asp	%	95,66	86,12
Thre	%	95,56	83,27
Ser	%	95,11	84,50
Glu	%	95,49	88,51
Pro	%	94,75	84,75
Gly	%	93,86	83,30
Ala	%	95,35	83,18
Val	%	95,30	82,96
Met	%	90,45	74,23
Iso	%	95,19	83,45
Leu	%	95,38	83,73
Tyr	%	95,79	83,57
Phe	%	95,56	84,89
His	%	94,05	85,85
Lys	%	95,68	85,86
Arg	%	95,90	88,14

Tabulka 1 Degradovatelnost aminokyselin (%) po 16 hod inkubace

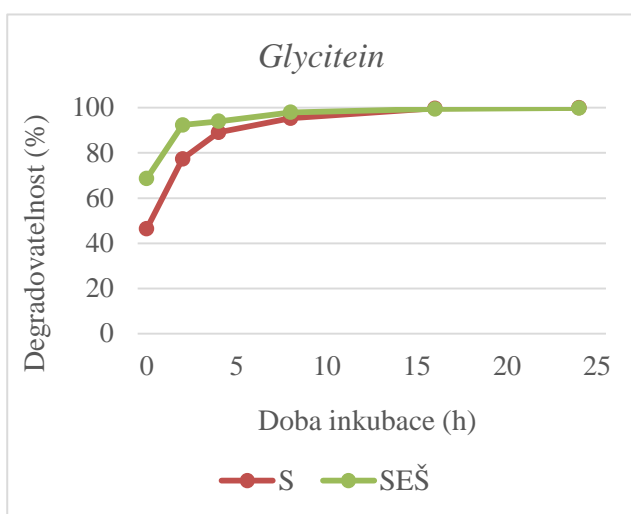
Degradovatelnost isoflavonů u S a SEŠ je znázorněna v grafech č. 1 - 4. S rostoucí inkubační dobou vždy rostla i ruminální degradovatelnost celkových isoflavonů, v čase 24 hod se blížila téměř 100 % (99,99 % u S a 99,95 % u SEŠ). Při porovnávání hodnot obou sójových krmiv byly zjištěny největší rozdíly v časech 2, 4 a 8 hod, kdy degradovatelnost jednotlivých isoflavonů u SEŠ nabývala vyšších hodnot než u S. Po 16 hod inkubace byly hodnoty degradovatelnosti jednotlivých isoflavonů u obou sledovaných krmiv obdobné. Při porovnání degradovatelnosti jednotlivých isoflavonů se u S ve všech inkubačních časech ukázal jako nejlépe degradovatelný daidzein. Obdobné výsledky byly zjištěny i u SEŠ, s výjimkou 2 hod inkubace, kdy byla zjištěna nejvyšší degradovatelnost u glyciteinu.



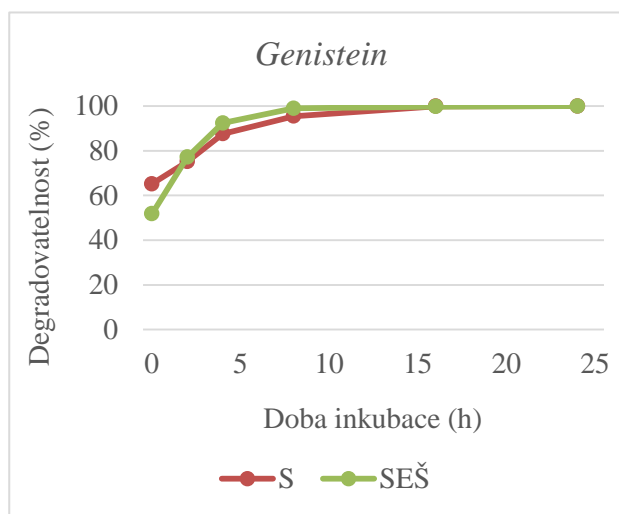
Graf 1 Degradovatelnost IF u sójového šrotu (S) a sójového extrahovaného šrotu (SEŠ)



Graf 2 Degradovatelnost daidzeinu u sójového šrotu (S) a sójového extrahovaného šrotu (SEŠ)



Graf 3 Degradovatelnost glyciteinu u sójového šrotu (S) a sójového extrahovaného šrotu (SEŠ)



Graf 4 Degradovatelnost genisteinu u sójového šrotu (S) a sójového extrahovaného šrotu (SEŠ)

Závěr

Zjistili jsme, že ruminální degradovatelnost sušiny, dusíkatých látek a aminokyselin byla vyšší u sójového šrotu ve srovnání se sójovým extrahovaným šrotem. Naproti tomu degradovatelnost jednotlivých isoflavonů po 2, 4 a 8 hod inkubace byla vyšší u sójového extrahovaného šrotu než u sójového šrotu, ale po 16 hod inkubace byly hodnoty degradovatelnosti jednotlivých isoflavonů u obou sledovaných krmiv obdobné. Nejvyšší degradovatelnost byla zaznamenána u daidzeinu.

Seznam literatury:

Belanche, A., Weisbjerg, M.R., Allison, G.G., Newbold, C.J., Moorby, J.M. 2014. Measurement of rumen dry matter and neutral detergent fiber degradability of feeds by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 97(4): 2361–2375.

Flachowsky, G., Hünerberg, M., Meyer, U., Kammerer, D.R., Carle, R., Goerke, M., Eklund, M. 2011. Isoflavone concentration of soybean meal from various origins and transfer of isoflavones into milk of dairy cows. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 6(4), 449-456.

Homolka, P., Harazim, J., Třináctý, J. 2007. Nitrogen degradability and intestinal digestibility of rumen undegraded protein in rapeseed, rapeseed meal and extracted rapeseed meal. *Czech Journal of Animal Science*, 52(11): 378–386.

Němcová, Z. Křížová L. 2017. Ruminální degradovatelnost suché hmoty a hrubého proteinu v neupraveném a rozpouštědlem extrahovaném sójovém šrotu. In: Proceedings of International PhD Students Conference MendelNet 2017, Mendel University in Brno, Czech Republic, 8–9 November 2017, in press.

Ørskov, E. R., McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science*. 92(2): 499–503.

Radivojević, M., Grubić, G., Dordević, N., Šamanc, H., Adamović, M. 2011. Heat treated soybeans in the nutrition of high producing dairy cows. *African Journal of Biotechnology*, 10(19): 3929–3937.

Schadt, I., Mertens, D.R., Van Soest, P.J., Azzaro, G., Licitra, G. 2014. Stage of lactation and corresponding diets affect in situ protein degradation by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(12): 7995–8007.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 206/2017/FVHE.

Prevalence a patogenita krevních parazitů u evropských netopýrů

Petr Linhart, Hana Bandřouchová, Vojtech Baláž, Ehdad Eltayeb Eltigani Abdelsalam, Jana Sedláčková, Kateřina Binderová, Jiří Pikula

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

Úvod

Parazitizmus představuje životní strategii, kdy parazit žije na úkor svého hostitele. Jejich vztah charakterizuje jistá míra rovnováhy mezi oběma zúčastněnými, kdy strategií parazita je se co nejefektivněji šířit na další hostitele. Stav, kdy dochází k přemnožení parazita a jeho přítomnost negativně působí na hostitele je následkem selhání regulačních mechanismů hostitele (Chauvin et al., 2009). Mírná parazitární infekce je tedy obecně u volně žijících živočichů zcela běžná a nepůsobí ve většině případů hostiteli závažnější zdravotní problémy.

Netopýři představují velmi specifickou skupinu savců, a to nejen z hlediska způsobu života a fyziologických adaptací, ale rovněž z pohledu patogenů. Nejenže jsou považováni za rezervoár a původní hostitele celé řady virů (Calisher et al., 2006), ale v současné době se předpokládá, že jsou i původními hostiteli trypanosom podrodu *Schizotrypanum* (Hamilton et al., 2012). Co se týče dalších krevních parazitů, existují pouze anekdotické zmínky o jednotlivých nálezech převážně neidentifikovaných babesií a hemosporidií. Kryptický život netopýrů a jejich míra ochrany v Evropě je zřejmě hlavní příčinou absence informací týkajících se výskytu krevních parazitů, jejich patogenity a přenosu prostřednictvím vektorů u evropských netopýrů.

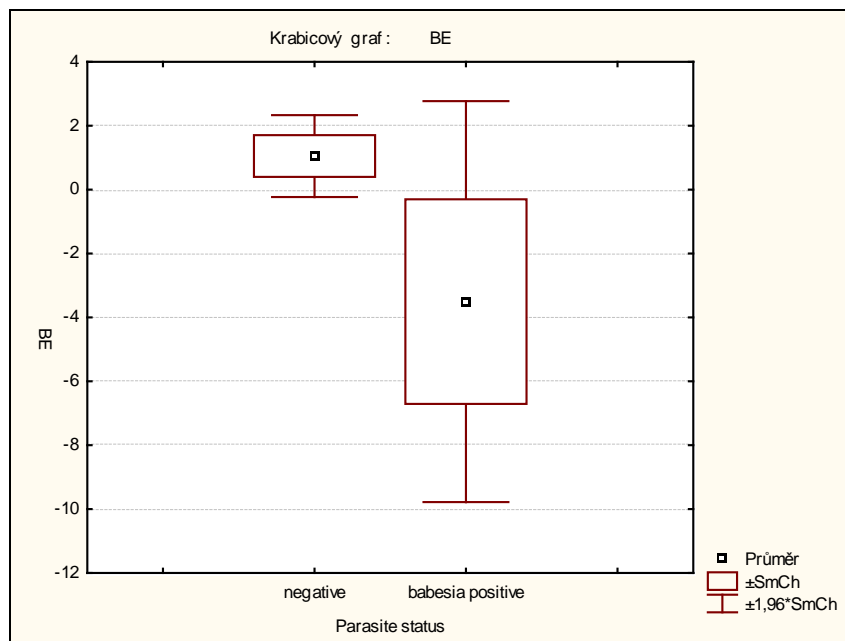
Materiál a metodika

V rámci projektu byly zpracovány vzorky krve 113 netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*), kteří byli na začátku zimování předáni pracovníkům záchranné stanice z důvodu narušení hibernakula, nebo byli odchyceni pomocí nárazových sítí v rámci plánovaných odchytů, které provedli pracovníci Ústavu biologie obratlovců AV ČR (povolení AOPK ČR č.j. 01662/MK/2012 S/00775/MK/2012, č.j. 866/JS/2012). Netopýrům byla odebrána krev z v. saphena a místo odběru bylo ošetřeno tkáňovým lepidlem, aby nedošlo k nechtěným ztrátám krve. Před vypuštěním byly netopýrům doplněny tekutiny a energie perorální aplikací roztoku glukózy. Zvířatům, která byla zimována v umělém hibernakulu, byla začátkem února a na konci hibernace odebrána krev na hematologii a biochemii. Vzorky krve byly zpracovány analyzátory iSTAT a VetScan (Abaxis, USA). Část krevního vzorku byla použita na izolaci DNA a nested PCR diagnostiku babesíí. Pozitivní vzorky byly odeslány na sekvenaci. Byly rovněž analyzovány vzorky krve získané od mláďat jedné pozitivní samice.

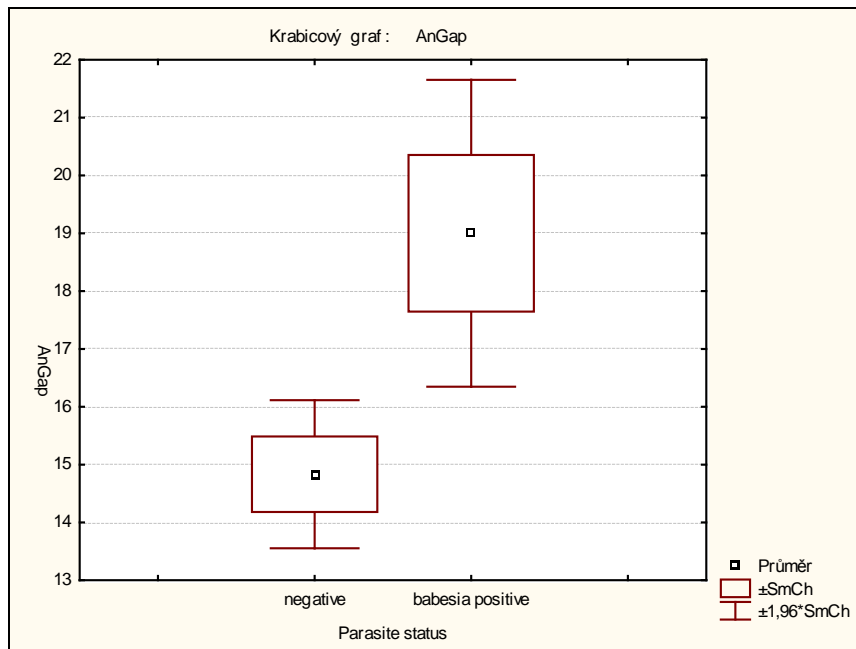
Výsledky

V rámci této studie byly odebrány vzorky krve od celkem 113 netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*), a od 2 mláďat babesia-pozitivní samice. Celková prevalence babesíí u netopýrů rezavých (*Nyctalus noctula*) zjištěná pomocí nested PCR je 5,31% (113/6), v rámci hibernace byla prevalence výskytu trypanosom v krvi 6,98% (86/6) a u zvířat normotermických, odchycených během swarmingu nebyla zjištěna přítomnost babesíí v krevních vzorcích (27/0). Na základě sekvenace byly všechny námi vyizolované babesie u netopýrů rezavých z ČR určeny jako *Babesia vesperuginis*. Obě mláďata babesia-pozitivní samice byla na PCR negativní. V rámci studie byly stanovovány rovněž hematologické a biochemické parametry krve. Při statistické analýze získaných dat byly zjištěny statisticky průkazné rozdíly u parametrů acidobazické rovnováhy. Tyto změny byly průkazné pouze u vzorků ze začátku února, na konci hibernace už nebyly žádné rozdíly mezi krevními parametry babesia-pozitivních a negativních zvířat.

Graf 1: Srovnání hodnot BE (base excess) u babesia-pozitivních a negativních netopýřů rezavých (*Nyctalus noctula*)



Graf 2: Srovnání hodnot AnGap (anion gap) u babesia-pozitivních a negativních netopýřů rezavých (*Nyctalus noctula*)



Závěr

V rámci této studie byla poprvé pomocí PCR na evropském kontinentu potvrzena *Babesia vesperuginis* v krvi netopýrů. Dřívější zmínky o výskytu babesií u evropských netopýrů jsou založeny pouze na základě nálezů v krevních nátěrech. Dříve byl molekulárně biologickými metodami tento druh potvrzen v krvi netopýrů pouze ve Velké Británii a to u *Pipistrellus* spp. (Cancannon et al., 2005). Oproti dříve studovaným trypanosomám jsme v případě babesií zjistili výrazně nižší prevalenci. Tento nález ukazuje na vyšší patogenitu tohoto parazita pro netopýry. Pro toto tvrzení svědčí i zjištěné rozdíly v hematologických hodnotách, konkrétně acidobazické rovnováhy. Trend těchto změn je shodný se změnami zjištěnými u psů trpících klinickou babesiosou (Leisewitz et al., 2001). Zajímavé je, že efekt přítomnosti babesií jsme zaznamenali pouze u vzorků od jedinců z hluboké hibernace, zatímco na konci už tyto rozdíly mezi pozitivními a negativními zvířaty u krevních parametrů zjištěny nebyly. Toto může být způsobeno tím, že na konci hibernace se postupně zvýší metabolismus a babesie jsou imunitním systémem potlačeny a omezí se tak i jejich negativní vliv na organismus.

Seznam literatury

1. Calisher C. H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important Reservoir Hosts of Emerging Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006, vol. 19, issue 3, Pp. 531-545, doi:10.1128/CMR.00017-06
2. Concannon R., Wynn-Owen K., Simpson V., Birtles, R. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. *Parasitology*. 2005, vol. 131, issue 4, Pp. 489-496, doi:10.1017/S0031182005008097
3. Chauvin A., Moreau E., Bonnet S., Plantard O., Malandrin L. Babesia and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 2009, vol. 40, issue 37, Pp. 1-18, doi: <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020>
4. Hamilton P.B., Cruickshank C., Stevens J.R., Teixeira M.M.G., Mathews F. Parasites reveal movement of bats between the New and old Worlds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012, vol. 63, issue 2, Pp. 521-526, doi: 10.1016/j.ympev.2012.01.007
5. Leisewitz A.L., Jacobson L.S., de Moraes H.S.A, Reyers F. The mixed acid-base disturbances of severe canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2001, vol. 15, issue 5, Pp. 445-452, doi: 10.1111/j.1939-1676.2001.tb01573.x

Práce byla financována v rámci projektu IGA 230/2017/FVHE.

Ověření autenticity a nutriční kvality vybraných druhů tuňáků

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

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

Úvod

Ověřování autenticity potravin patří k zásadním otázkám v oblasti bezpečnosti potravin. Podle Nařízení Rady (EHS) 1536/1992 se tuňáci rozdělují na pravé tuňáky a nepravé tuňáky *bonita*, přičemž název druhu tuňáka musí být uveden na obalu výrobku. Vzhledem k nárůstu poptávky a spotřeby tuňákových produktů a vysokým nákladům na výrobu může docházet k záměně jednotlivých druhů tuňáků rozdílné kvality, což může vést ke klamání spotřebitele. Detekce DNA živočišného druhu patří mezi základní postupy pro odhalení způsobů falšování potravin spočívajících v záměně jednotlivých druhů ryb rozdílné nutriční hodnoty i komerční ceny (Espineira et al., 2009). DNA je však vlivem technologických procesů používaných v potravinářství degradována na menší fragmenty (Lockley and Bardsley, 2000), jejichž velikost je limitujícím faktorem pro následnou PCR (Mackie et al., 1999). Cílem projektu bylo najít vhodné sekvence pro rozlišení čtyř druhů tuňáků a bonit nejčastěji dostupných na českém trhu a dále provést základní chemickou a nutriční analýzu těchto druhů a výrobků.

Materiál a metodika

Příprava vzorků

Vzorky tuňáků byly zakoupeny na českém trhu. Jednalo se o chlazené steaky na ledu-svalové tkáni tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*) a tuňáka pruhovaného (*Katsuwonus pelamis*), a celé čerstvé ryby chlazené na ledu pelamidy obecné (*Sarda sarda*) a tuňáka makrelovitého (*Auxis rochei*). Tyto vzorky sloužily jednak pro ověření autenticity, tak i k chemické analýze. Pro každý druh byla připravena ředící řada (10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 ng/μl). Dále bylo na českém trhu zakoupeno k vyšetření několik komerčních výrobků k ověření druhu (shoda/neshoda) a k porovnání chemické analýzy s deklarací na obale.

Dna izolace

Izolace DNA byla provedena pomocí komerčně dostupné extrakční metody: DNeasy mericon Food Kit (Qiagen, Německo). Izolace probíhala podle návodu výrobce.

PCR analýza

Pomocí online dostupného programu na internetu Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) byly navrženy dva systémy PCR (polymerázová řetězová reakce) k odlišení čtyř dostupných druhů tuňáků. Jedná se o konvenční PCR pro *Thunnus albacares* a *Auxis* spp. a real-time PCR

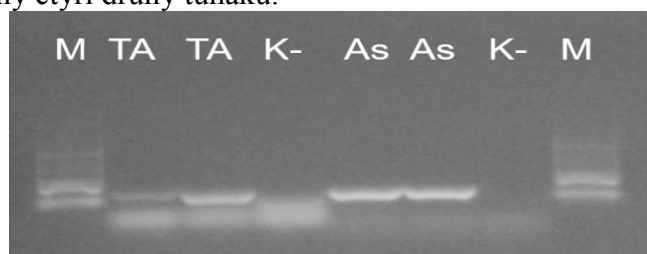
pro *Katsuwonus pelamis* a *Sarda* spp. Reakční směs pro konvenční PCR se skládala z celkového objemu 20 µl: 10 µl Master mixu, 4 µl PCR vody, 10 pmol každého primeru a 4 µl templátové DNA. Součástí analýzy je rovněž pozitivní a negativní kontrola. Amplifikace byla provedena s úvodní denaturací 3 min 95 °C, následovanou 34 cykly 30 s 95 °C, 20 s při 65 °C (pro *T. albacares*) a 67 °C (pro *Auxis* spp.) a 60 s při 72 °C, s finální extenzí při 72 °C po dobu 5 min a konečné zchlazení na 12 °C. Vizualizace PCR produktů byla provedena elektroforeticky v 1,5 % agarózovém gelu v 0,5 X TBE pufru s obsahem 8 µl gel greenu. Jako marker byl použit 50 bp Ladder. Reakční směs pro real-time PCR se skládala z celkového objemu 20 µl: 10 µl LC Probe, 0,2 µl uracyl DNA enzymu, 0,1 µl každého primeru, 0,05 µl sondy, 4,55 µl PCR vody a 5 µl teplátové DNA. PCR analýza je prováděna na přístroji LightCycler 480 II (Roche, Dánsko) s úvodní denaturací 95 °C 7 min, následovanou denaturací se 45 cykly 95 °C 10 s, elongací 60 °C 30 s a extenzí 72 °C 1 s a konečné zchlazení 40 °C 10 s. Výstupem tohoto systému jsou amplifikační křivky pro dané druhy.

Chemická analýza

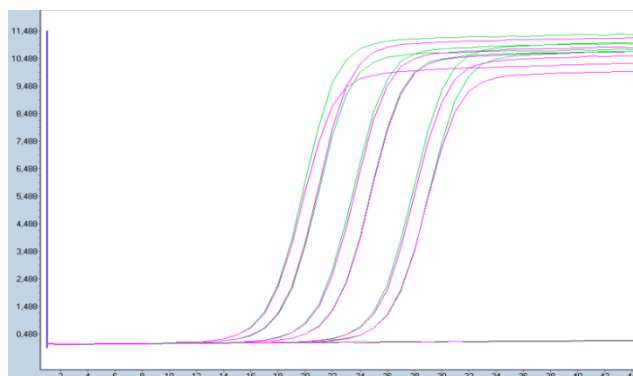
Chemický profil spočíval ve stanovení obsahu tuku, mastných kyselin n-3 a n-6 a celkového obsahu bílkovin. Chemická analýza byla provedena jednak na syrových vzorcích a jednak po procesu konzervace na stejných vzorcích ve vlastní šťávě za definovaných podmínek (121 °C, tlaku 200 kPa po dobu 15 minut) z důvodu technologického vlivu na potenciální nutriční změnu. Dále bylo zakoupeno 7 vzorků tuňákových konzerv ve vlastní šťávě k následné analýze a porovnání s deklarací na obale. Tuk a mastné kyseliny byly vyšetřeny dle standardních operačních postupů akreditovanou laboratoří v Praze (ALS Czech Republic, s.r.o.). Tuk byl stanoven pomocí metody NMR (nukleární magnetická rezonance). Mastné kyseliny byly stanoveny metodou plynové chromatografie s FID detekcí (plamenový ionizační detektor). Celkový obsah bílkovin byl stanoven pomocí přístroje Kjeltec 2300 (Foss, Švédsko) na Ústavu hygieny a technologie masa VFU Brno.

Výsledky

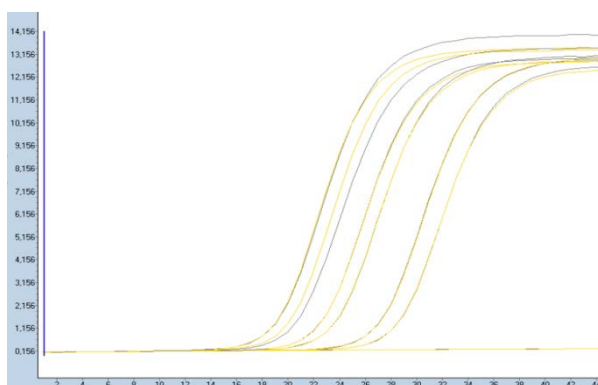
Na obrázku 1 je uvedena detekce *Thunnus albacares* (81 bp) a *Auxis* spp. (80 bp), které následně sloužily jako pozitivní kontrola k dalším analýzám. Na obrázcích 1 a 2 jsou znázorněny amplifikační křivky ředící řady pro detekci *Katsuwonus pelamis* a *Sarda* spp. (10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05 ng/ul). Tabulka 1 shromažďuje vyšetření 15 komerčních vzorků na shodu či neshodu pro všechny čtyři druhy tuňáků.



Obrázek 1: *Thunnus albacares* (TA), *Auxis* spp. (As)



Obrázek 2: *Katsuwonus pelamis* (ředicí řada)



Obrázek 3: *Sarda* spp. (ředicí řada)

Tabulka 1: Vyšetření komerčních výrobků

Číslo vzorku	Druhov \acute{a} deklarace	q PCR		Konvenční PCR	
		<i>K. pelamis</i>	<i>Sarda</i> spp.	<i>T. albacares</i>	<i>Auxis</i> spp.
1	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
2	<i>K. pelamis</i>	-	-	-	-
3	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
4	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
5	<i>K. pelamis</i>	+	+	-	-
6	<i>K. pelamis</i>	+	+	-	-
7	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
8	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
9	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
10	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
11	<i>K. pelamis</i>	+	-	-	-
12	<i>K. pelamis</i>	+	-	+ -	-
13	<i>T. albacares</i>	+ -	-	+	-
14	Tuňák	-	-	-	-
15	<i>T. albacares</i>	+	-	+	-

Co se týká chemické analýzy, tak v tabulce 2 jsou znázorněny průměrné hodnoty pro celkové bílkoviny, obsah tuku a mastné kyseliny vyšetřených vzorků syrových a později tepelně opracovaných vzorků. Z tabulky vyplývá, že procesem sterilováním se hodnoty navyšují.

V tabulce 3 uvádíme chemickou analýzu 7 komerčních výrobků zakoupených na českém trhu. V porovnání s uvedením na obalu se hodnoty nejvíce lišily u vzorků 1, 3 a 6.

Tabulka 2: Průměrné hodnoty vyšetřených vzorků pro celkové bílkoviny, tuky a mastné kyseliny

Druh	Opracování	Celkové Bílkoviny		Obsah tuku [%]		Mastné kyseliny [g /	
		Syrové	Konzerva	Syrové	Konzerva	Syrové	Konzerva
<i>Thunnus albacares</i>		25,5	27,7	0,4	0,8	631	511
<i>Katsuwonus pelamis</i>		20,5	21	0,2	0,2	450	438
<i>Sarda sarda</i>		24,8	24,9	13,3	15,8	673	652
<i>Auxis rochei</i>		27,1	27,5	2,2	2,4	442	500

Tabulka 3: Vyšetření komerčních výrobků na bílkoviny a tuky

Číslo vzorku	Druh konzervy ve vlastní štěpě	Deklarace na obale		Stanovené hodnoty			
		BK	Tuky	BK	Tuky	n-3 MK	n-6 MK
1	Tuňák drcený	23	1,1	19	0,28	< 0,10	< 0,10
2	Tuňák kousky	27	0,8	26	0,86	0,19	0,19
3	Tuna steak	26	1,5	21	0,44	0,16	< 0,10
4	Tuna in brine	24	0,5	24	0,35	0,12	< 0,10
5	Tonno al Naturale	17	1,8	18	1,86	0,65	< 0,10
6	Tunish drcený	17	2	27	1,10	0,29	< 0,10
7	Tuňák kousky	22	0,2	20	0,47	0,15	< 0,10

Závěr

Tuňáci patřící do čeledě makrelovitých jsou si velmi geneticky podobní a najít odlišné sekvence genů pro jednotlivé druhy je obtížné. Nými stanovené PCR systémy určily základní odlišení čtyř druhů tuňáků. Screening komerčních výrobků ukázal ve většině případů shodu s deklarací uvedenou na obale. Avšak metoda bude nadále optimalizována a validována, proto je zapotřebí stále vyvíjet metody schopné detekce velmi příbuzných druhů. Na základě chemické analýzy jsme určily tuňáky pravé za velmi nízkotučné ryby. Bonita obsahují zase více tuků a tím pádem i více nenasyceným mastných kyseliny. Všechny druhy tuňáků jsou vysokým zdrojem plně stravitelných živočišných bílkovin. Z hlediska nutriční kvality jsou tuňáci praví, nepraví, ale i konzervované tuňákové výrobky považovány za plnohodnotné a ceněné potraviny pro lidskou stravu.

Seznam literatury

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

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

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

Nařízení Rady (EHS) 1536/1992, kterým se stanoví společné obchodní normy pro konzervované tuňáky a bonita.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno č. 214/2017 FVHE.

Charakterizace enterokoků rezistentních k vankomycinu a jejich epidemiologie v České republice

Veronika Oravcová¹, Daniel Opletal¹

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

Úvod

Enterokoky so získanou rezistenciou k vankomycínu (VRE) sú zodpovedné za vážne ochorenia ľudí a za nozkomialne infekcie, čo predstavuje významný medicínsky problém (Simjee et al., 2006). S ich výskytom sa ale stretávame aj u hospodárskych zvierat (napr. hydina a ošípané), môžu sa dostávať do životného prostredia či kolonizovať voľne žijúce zvieratá (napr. Oravcova et al., 2013), a vytvárať tak rezervoár VRE mimo nemocničné prostredie.

Výsledky z EARS-Net preukazujú, že v mnohých krajinách dochádza k významnému nárastu závažných enterokokových infekcií. V Českej republike sa zvýšil výskyt vankomycín rezistentných *Enterococcus faecium* z 3,8 % (v roku 2006) na 11,5 % v roku 2012 (<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobialresistance/database/Pages/graphreports.aspx>, navštívené dňa 15/11/2016). V minulosti bol výskyt VRE v Európe dávaný do súvislosti s niekdajším používaním avoparcínu ako stimulátoru rastu u hospodárskych zvierat (Bager et al., 1997). V súčasnosti sa VRE často objavujú aj v nemocniciach, a to najmä kvôli významnému nárastu spotreby vankomycínu na liečbu klostrídiových kolitíd a infekcií spôsobených meticilín rezistentným *Staphylococcus aureus*.

U enterokokov bolo popísaných 9 rôznych génov (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* a *vanN*) zodpovedných za rezistenciu k vankomycínu. Z nich klinicky najvýznamnejšie sú *vanA* a *vanB*, ktoré sú najrozšírenejšie a sú schopné sa horizontálne šíriť (Kristich et al, 2014). Rezistencia k vankomycínu býva asociovaná s klinicky významnými sekvenčnými typmi (ST), ako je napríklad ST17, ST18 a ST78 u *E. faecium* a ST6 u *E. faecalis*, pričom výskyt rezistencie k vankomycínu je omnoho častejší u druhu *E. faecium*. Okrem klonálnej dynamiky však významnú úlohu zohráva aj horizontálne šírenie plazmidov nesúcich gény rezistencie k vankomycínu, a zároveň gény významné pre efektívnu

kolonizáciu, zvýšenú virulenciu či perzistenciu. Rezistencia k vankomycínu býva najčastejšie spôsobená rozšírením transpozónu Tn1546 (*vanA* genotyp) a Tn1549 (*vanB* genotyp), ktoré sa obvykle vyskytujú na plazmidoch, zvyčajne zo skupiny RepA_N (deriváty pRUM a pLG1), Inc18 a pHT β , čo potvrdzuje promiskuitu tohto transpozónu ovplyvňujúcu jeho rozšírenie naprieč populáciou enterokokov (Freitas et al., 2013).

K pochopeniu a objasneniu ciest šírenia VRE v Českej republike by významne prispela detailná molekulárno-biologická charakterizácia takýchto kmeňov získaných z rôznych zdrojov jednej lokality, ako aj štúdium ich mobilných genetických elementov. Aktuálnosť a naliehavosť tematiky globálneho rozšírenia epidemiologicky významných klonov VRE je daná predovšetkým komplikáciami v liečbe nimi spôsobených infekcií, obzvlášť v nemocničnom prostredí a v liečebniach dlhodobo chorých.

Materiál a metodika

Do projektu bolo zahrnutých vyše 100 selektívne získaných VRE z reprezentatívneho súboru vzoriek (>1500 vzoriek) z prečistenej odpadovej vody vytekajúcej z čistiarne odpadových vôd (ČOV), zo skládky komunálneho odpadu, od ľudí z komunity, nemocničné kmene, hospodárske, domáce a voľne žijúce zvieratá, lovná zver zo severnej Moravy (prevažne v okolí Přerova), odobrané v roku 2012/2013. Získané izoláty boli druhovo identifikované pomocou MALDI-TOF MS. Následne bola stanovená citlivosť izolátov k 14 antibiotikám pomocou diskovej difúznej metódy (ampicilín, streptomycín, erytromycín, tetracyklín, vankomycín, chloramfenikol, teikoplanín, quinupristín/dalfopristín, rifampicín, gentamycín, tigecyklín, linezolid, nitrofurantoin, ciprofloxacín) a minimálna inhibičná koncentrácia (MIC) vankomycínu. Bola testovaná prítomnosť génov rezistencie k vankomycínu a k ostatným antibiotikám pomocou PCR [*vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3*, *erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *tet(M)*, *tet(L)*, *tet(O)*, *tet(K)*] a výskyt génov virulencie pomocou PCR (*esp*, *asa1*, *gelE*, *cylA*, *hyl*). Epidemiologická príbuznosť izolátov bola stanovená pomocou pulznej gélovej elektroforézy (restrikčné štiepenia pomocou enzýmu *SmaI*) a následne softvérovo analyzovaná (BioNumerics). Izoláty *E. faecium* boli zaradené do klonálnych komplexov pomocou analýzy MLST – "multilocus sequence typing" (aplifikácia a sekvenovanie génov *adk*, *atpA*, *ddl*, *gdh*, *gyd*, *purK*, *pstS*). Porovnanie s medzinárodnou databázou, vyhodnotenie ST typov, eBURST analýza, zaradenie ST do BAPS skupín). Plazmidy boli charakterizované na základe prítomnosti génov kódujúcich replikázy (*rep1-22*),

relaxázy a génov zodpovedných za stabilitu plazmidov (toxín-antitoxín systémy). Transpozónu Tn1546 nesúci *vanA* gén bol typizovaný pomocou PCR mapovania 10 na seba nadväzujúcich úsekov.

Výsledky

Celkom bolo získaných 121 izolátov vankomycín rezistentných enterokokov zo severnej Moravy, z nich 55 pochádzalo z ČOV Přerov – Henčlov, 36 z havranov zimujúcich v okolí Přerova, 4 z lesnej zveri, 1 bol získaný od psa, 20 izolátov bolo z nemocnice v Olomouci a 5 z hydinarskej farmy. Okrem dvoch izolátov *E. faecalis* z lesnej zveri, patrili všetky izoláty k druhu *E. faecium*.

Získané izoláty vykazovali MIC vankomycínu vyššiu ako 32 mg/l až do 1024mg/l. Všetky izoláty *E. faecium* boli multirezistentné s rezistenciou k päť a viac antibiotikám. Rezistencia k vankomycínu bola kódovaná génom *vanA*, k erytromycínu génom *erm(B)*, k tetracyklínu génmi *tet(M)* a/alebo *tet(L)* a ku gentamicínu génmi *aac(3)-IIIa* a/alebo *aac(6')-aph(2'')*. 95 % izolátov *E. faecium* z nemocnice (19/20) nieslo gény virulencie *esp* a/alebo *hyl*, zatiaľčo u ustatných vzoriek sa tieto gény vyskytovali iba sporadicky (10 %, 10/99). Oba izoláty *E. faecalis* niesli gény virulencie *gelE*, *cylA*, *esp* a *asaI*.

Na základe MLST analýzy boli izoláty *E. faecium* zaradené do sekvenčných typov (ST). Všetky izoláty z Olomouckej nemocnice patrili k ST549, izoláty z havranov patrili do ST5, ST18, ST38, ST92, ST273 a ST640. Všetky izoláty z ČOV boli na základe PFGE analýzy epidemiologicky veľmi príbuzné (CS > 95 %) a patrili k ST273. Jeden izolát z hydiny bol ST18 a ostatné patrili k novému sekvenčnému typu príbuznému ST10, izolát z psa patrili k ST64.

Izoláty získané z havranov niesli plazmidy skupiny rep20_{p_{LG1}} (67 %), rep21_{p_{VEF1/2}}, rep2_{p_{RE25}} (oba po 61 %) a rep14a_{p_{RI}} (42 %). Najčastejšie sa u nich vyskytovala relaxáza rel_{p_{EF1}} (97 %) a rel_{p_{LG1}} (33 %). Len 17 % izolátov nieslo ϵ - ζ a 6 % *axe-txe* toxín antitoxín systémy. Až 61 % izolátov z havranov nieslo *vanA* gén na transpozóne Tn1546 typu A a 25 % na type D, ostatné typy transpozónov Tn1546 boli zastúpené iba minoritne. Naopak, u všetkých vzoriek z nemocnice sa vyskytovali plazmidy z rodiny rep17_{p_{RUM}} a rep21_{p_{VEF1/2}}, frekventne boli zastúpené aj plazmidy typu rep2_{p_{RE25}}, rep18c_{p_{200b}} (oba po 90 %), rep18a_{p_{EF418}} (75 %). Všetky tiež niesli relaxázu rel_{p_{CI22}} a toxín

antitoxín systém *axe-txe*. Všetky izoláty z ČOV niesli plazmidy typu rep21_{pVEF1/2} a rep2_{pRE25}, zatiaľčo rep17_{pRUM} boli zastúpené len u 14 % týchto izolátov. Všetky izoláty obsahovali relaxázu rel_{pEF1}, *axe-txe* systém sa vyskytoval u 29 % izolátov. U izolátov z hydiny sa vyskytovali iba plazmidy typu rep21_{pVEF1/2} a rep2_{pRE25} a relaxázu rel_{pRE25}. Izolát z psa obsahoval rep17_{pRUM}, rep20_{pLG1} aj rep2_{pRE25} plazmid, relaxázy rel_{pRE25}, rel_{pRUM}, rel_{pLG1}, rel_{pCIZ2} aj *axe-txe* systém. Aj medzi izolátmi z nemocnice a z ČOV dominoval výskyt *vanA* génu na transpozóne Tn1546 typu A a/alebo D.

Záver

V lokalite Přerov sa VRE dlhodobo vyskytujú, u havranov sme preukázali opakovanú kolonizáciu epidemiologicky príbuznými kmeňmi (po dvoch rokoch) s príbuznými plazmidmi a typmi Tn1546 transpozónov. PFGE analýza nepreukázala jednoznačný zdroj VRE v rámci tejto lokality. Na základe MLST analýzy sa ako epidemiologicky príbuzne javia vybrané izoláty získané z havranov a z ČOV. U izoláty z havranov dominovali rep20_{pLG1} megaplazmidy, ktoré sa u ostatných izolátov nevyskytovali. Naprieč všetkými prostrediami sme preukázali prítomnosť transpozónu Tn1546 typu A a D, čo potvrdzuje ich vysokú promiskuitu a rozšírenie v populácii enterokokov ako aj u rôznych typov plazmidov.

Zoznam literatúry

- Bager, F., Madsen, M., Christensen, J., and Aarestrup, F.M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Prev Vet Med* 31, 95-112.
- Freitas, A.R., Novais, C., Tedim, A.P., et al. (2013). Microevolutionary events involving narrow host plasmids influences local fixation of vancomycin-resistance in *Enterococcus* populations. *PLoS One* 8.
- Kristich, C.J., Rice, L.B., and Arias, C.A. (2014). Enterococcal Infection-Treatment and Antibiotic Resistance. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary).
- Oravcova, V., Ghosh, A., Zurek, L., Bardon, J., Guenther, S., Cizek, A., and Literak, I. (2013) Vancomycin resistant enterococci in rooks (*Corvus frugilegus*) wintering throughout Europe. *Environ Microbiol* 15: 548-556.
- Simjee, S., Jensen, L.B., Donabedian, S.M., and Zervos, M.J. (2006) Enterococcus. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Aarestrup, F.M. (ed). Washington, DC: ASM Press, pp. 315–323.

Táto práca vznikla za finančnej podpory IGA VFU Brno č. 201/2017/FVHE.

Možnosti dlouhodobé konzervace spermatu dravců

Vladimír Piaček, Veronika Kováčová, Paulína Smatanová, Jiří Pikula

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

Úvod

V posledních letech vzrůstá v ČR snaha o záchranu ohrožených druhů volně žijících dravců a sov. S rozvojem osobitých postupů v umělém odchovu těchto na stres náchylných zvířat se zvyšuje potřeba dlouhodobého skladování spermatu, zejména z důvodu nemožnosti synchronizování pohlavního cyklu (Berry, 1972). V mnohých chovech dravců a sov nastává situace, kdy je možné odebrat semeno od samců až několik týdnů po ukončení sezónní pohlavní aktivity samic. Primárním cílem chovu dravců v zajetí je vypouštění nových generací těchto ohrožených druhů do volné přírody. Pomocí přirozeného odchovu není možné v krátkém časovém úseku odchovat dostatečné množství vhodných jedinců pro vypouštění. Při využití imprintovaných jedinců a umělé inseminace se počet odchovů několikanásobně zvyšuje (Boyd, 1983). Někdy je však odchov mláďat dravců a sov možný pouze za předpokladu umělé inseminace (Weaver, 1991). Cílem projektu bylo posouzení možností dlouhodobého skladování spermatu dravců. Dílčí cíle byly: 1. Provedení klinického vyšetření, včetně biochemického a hematologického rozboru krve dárce, 2. Posouzení účinnosti metod používaných k uchování spermatu savců na ptačí spermie, vliv dlouhodobého skladování na kvalitu inseminační dávky.

Materiál a metodika

Před samotným odběrem spermatu bylo provedeno kompletní klinické vyšetření odebíraných jedinců, včetně hematologického a biochemického vyšetření krve. Byly zhotoveny výtěry z dutiny zobákové, trachey a kloaky, které byly podrobeny mikrobiologickému vyšetření. Až po vyhodnocení konkrétního jedince jako zdravého byl proveden odběr ejakulátu. Využívání byli samci orla skalního (*Aquila chrysaetos*) a sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*) pocházející z umělého odchovu. Odběr probíhal dvěma způsoby, dobrovolnou kopulací a masáží. U orlů skalních byla ve všech případech využita dobrovolná kopulace. U sokolů stěhovavých byl prováděn odběr i za pomoci manuální masáže.

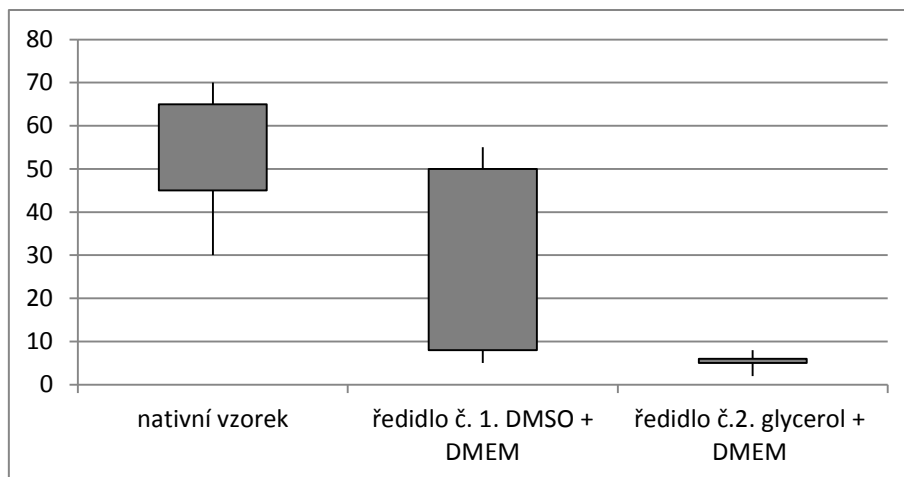
Kompletnímu klinickému vyšetření byli podrobeni celkem 4 orlí skalní, a 3 sokolí stěhovaví. Z testované skupiny byli ze zdravotních důvodů vyřazeni celkem dva jedinci, po jednom z obou druhů, z důvodu enterokolitidy způsobené *Clostridium perfringens*. Celkově bylo vyšetřeno 39 vzorků ejakulátu od tří orlů skalních a dvou sokolů stěhovavých. Objem jednotlivých dávek byl v rozmezí 30-120 μ l.

Ejakulát byl neprodleně podroben kompletnímu makroskopickému a mikroskopickému vyšetření na temperované podložce. Po vyhodnocení semene jako vhodného k dalšímu zpracování byl ejakulát naředěn dvěma druhy ředidel vytvořených kombinací buněčných médií a kryoprotektiv. Jako ředidlo č.1. bylo použito DMSO-free Cryopreservation Medium a buněčné médium DMEM F12, ředidlo č. 2. tvořil glycerol a buněčné médium DMEM F12. Ejakulát bez příměsí byl naředěn jednotlivými ředidly v poměru 1:1,5. Po naředění byl nasán do pejet o objemu 0,1 ml, které byly zataveny a umístěny do termoboxu. Zde byla provedena equilibrace při teplotě 20 °C, po dobu šesti hodin. Pejety byly vloženy do termoboxu o teplotě 5 °C, kde se dále equilibrovaly po dobu dvaceti minut a poté byly pozvolna zmrazovány v parách dusíku s poklesem teploty 5 °C za minutu až do dosažení teploty -80 °C. Poté byly ponořeny do tekutého dusíku o teplotě -195 °C. Vzorky byly rozmrazovány v intervalu dvou měsíců. Samotnému rozmrazení ve vodní lázni o teplotě 38 °C předcházelo ohřátí pejety na vzduchu při pokojové teplotě po dobu deseti sekund. U jednotlivých vzorků bylo neprodleně po rozmrazení provedeno vyšetření motility a obarvení eosin/nigrosinem pro stanovení míry životaschopnosti spermií po dlouhodobém skladování.

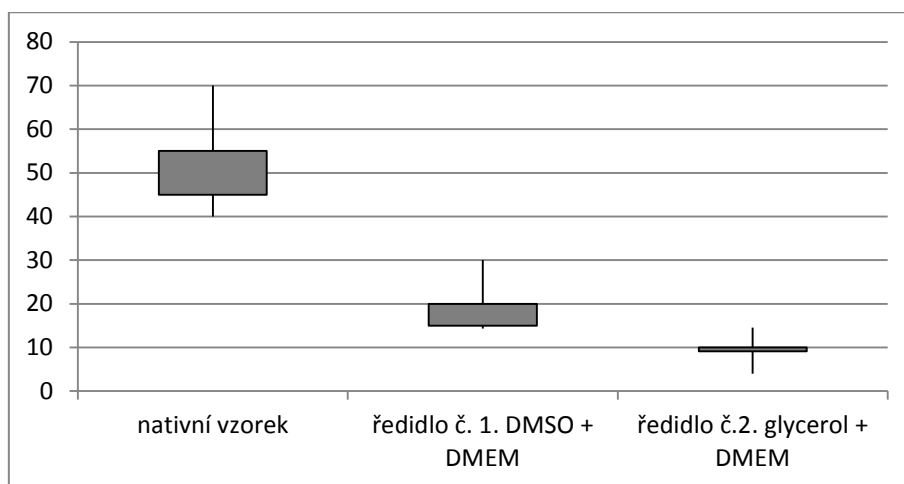
Výsledky

Pro zmrazení bylo vhodných celkově 28 vzorků, 16 vzorků od orlů skalních, zbytek vzorků pocházel od sokolů stěhovavých. Vyšetřený nativní ejakulát od sokolů stěhovavých vykazoval průměrné hodnoty koncentrace 100×10^6 /ml, celkového počtu $3,5 \times 10^6$ v dávce a motilitu 52,92%. U orlů skalních byla průměrná koncentrace 330×10^6 /ml, celkový počet $16,5 \times 10^6$ v dávce a motilita 52,81%.

Motilita u zmražených vzorků spermií klesala po rozmrazení za použití média DMSO + DMEM u orla skalního průměrně na 38,87% vzhledem k výchozímu procentu pohyblivosti. U sokola stěhovavého to bylo na 18,26%. Při použití media složeného z glycerolu a DMEM tomu bylo u orla skalního na 7,41% a u sokola stěhovavého na 9,37%.



Graf č. 1. Porovnání motility spermií nativního vzorku a vzorků po kryokonzervaci za použití různých ředidel u orla skalního (*Aquila chrysaetos*).



Graf č. 2. Porovnání motility spermií nativního vzorku a vzorků po kryokonzervaci za použití různých ředidel u sokola stěhovavého (*Falco peregrinus*).

Naproti standardnímu postupu pro mražení savčích spermií byla upravena teplota a čas equilibrace. Při equilibraci ptačích spermií se teplota v termoboxu zvýšila ze 7°C na 20°C a čas ze 4 hodin na 6. Bylo tak zvýšeno přežívání spermií. Bylo zjištěno, že při krátkodobém skladování vzorků ejakulátu, tj. 2-3 hodiny, je daleko příznivější teplota v rozmezí 20-23°C, na rozdíl od savčích pohlavních buněk, kde je ve většině případů optimum teplotního rozmezí pro krátkodobé skladování 5-7°C.

Závěr

Při porovnání vybraných ředidel jsme zjistili, že ředidlo č.1 DMSO + DMEM je pro dlouhodobé skladování spermií dravců daleko vhodnější než použití ředidla č. 2. Glycerol + DMEM. U orla skalního je ředidlo č. 1. vhodné ke kryokonzervaci semene vzhledem k tomu, že průměrná motilita po rozmražení činí 38,87% (tab.č. 1.). Je známo, že bovinní ID se považuje za plnohodnotnou při motilitě 35-36%. Lze tedy předpokládat, že orlí ID v takovéto procentu motility bude fertility schopná. Ředidlo č. 2. na bázi glycerolu, nelze k tomuto účelu doporučit. U sokola stěhovavého, bylo v obou případech zaznamenáno nízké procento motility spermií (tab.č.2.). Do budoucna bude proto u tohoto druhu potřebné pozměnit složení a koncentraci jednotlivých složek použitých medií. Při krátkodobém skladování a také při equilibraci vyžadují spermie dravců vyšší teplotu než je tomu u savčích pohlavních buněk. Vhodné rozmezí teplot je 20-23°C, to je nutné zohlednit již při samotném odběru a přepravě vzorků.

Pro odběr ejakulátu se používají pouze zdraví jedinci v plné fyzické kondici, bez náznaku narušeného zdravotního stavu. V průběhu toku, který probíhá od února do dubna, je nutné zdravotní stav pravidelně kontrolovat. V případě jeho narušení, přestává být ejakulát vhodný k dalšímu zpracování.

Odběr spermií od dravců za využití dobrovolné kopulace je efektivnější vzhledem k menší kontaminaci vzorku kyselinou močovou, nebo jinou složkou trusu, jak tomu bývá při manuálním odběru. Odpadá také stresová zátěž jedince.

Seznam literatury

- 1) BERRY RB, (1972): *Reproduction by artificial insemination in captive American goshawks*. Wiley, 1283-1288 pp. DOI: 10.2307/3799265.
- 2) BOYD, LL, SCHWARTZ CH, (1983): *Training imprinted semen donors*, Weaver JD, Cade TJ, eds. *Falcon Propagation: A Manual of Captive Breeding*. Boise, ID: The Peregrine Fund Inc; 24–31 pp. DOI: [10.1647/2003-16](https://doi.org/10.1647/2003-16)
- 3) BURROWS WH, QUINN JP, (1935): *A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl*. Beltsville Research Center, Maryland, 251-253 pp. DOI: 10.3382/ps.0140251
- 4) LIERZ M, REINSCHMIDT M, MÜLLER H, WINK M, (2013): *A novel method for semen collection and artificial insemination in large parrots (Psittaciformes)*. *Sci. Rep.* 3, 2066, DOI: [10.1038/srep02006](https://doi.org/10.1038/srep02006)
- 5) WEAVER, JD, CADE TJ, (1991): *Falcon Propagation: A Manual of Captive Breeding*. Boise, ID: The Peregrine Fund Inc, ISBN 10: 9999589545

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 232/2017/FVHE.

Vliv zimních zásob na rozvoj infekce mikrosporidii *Nosema ceranae* u včelstev včely medonosné (*Apis mellifera*)

Ivana Papežíková, Eva Jelínková, Anna Zachová, Miroslava Palíková

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

Úvod

Nosematóza je onemocnění dospělých včel, způsobované mikrosporidii *Nosema apis* a/nebo *Nosema ceranae*. Původním parazitem včely medonosné (*Apis mellifera*) je druh *N. apis*. V posledních letech je však tento druh po celém světě vytlačován druhem *N. ceranae*, který pochází od včely východní (*A. cerana*) (Gisder a kol., 2010). Oba druhy mikrosporidii napadají žaludeční epitel a způsobují jeho destrukci. Výsledkem jsou poruchy trávení, podvýživa a zkrácení života infikovaných včel. Mladé včely kojičky nejsou schopny dokonale trávit proteiny, což vede k atrofii hltanových žláz, produkujících mateří kašičku, nezbytnou pro výživu larev. Důsledkem infekce je zhoršená kondice včelstev, pomalý jarní rozvoj, nedostatečné využití dostupné pastvy a snížení medného výnosu (Goblirsch a kol., 2013).

Jedním z faktorů, ovlivňujících kondici včelstev a náchylnost k chorobám je výživa - během sezóny pylová a nektarová pastva a v průběhu zimování zásoby krmiva, poskytnutého v podletí včelařem. Většina včelařů v České republice používá k doplnění zásob před zimováním cukerný roztok (řepný cukr s vodou v poměru 3 : 2). V poslední době získávají stále větší oblibu invertní cukry - sirupy, získané hydrolýzou sacharózy nebo škrobu. Hlavní příčinou jejich stoupající oblíbenosti je fakt, že se tato krmiva nekazí - včelám lze podat jednorázově velké množství sirupu, což snižuje nároky na lidskou práci. Vliv těchto krmiv na kondici a zdravotní stav včelstev je předmětem diskusí mezi odborníky i mezi praktickými včelaři. Na trhu jsou k dispozici invertory různé kvality. U některých invertů představuje potenciální riziko vysoký obsah HMF (hydroxymethylfurfuralu), který je toxický pro včely (Zirbes a kol., 2013). Dalším problémem může být vysoký obsah nestravitelných složek, především vyšších cukrů, které se během zimování ukládají ve výkalovém váčku. Přehněný výkalový váček a nemožnost proletu během zimování vede ke kálení v úle a k promořování úlového prostředí původci chorob, mimo jiné i sporami mikrosporidii rodu *Nosema*.

Hlavním cílem tohoto projektu bylo srovnání intenzity a prevalence infekce *N. ceranae* u včelstev, zimujících na medu, na cukru, na sacharózovém invertu a na škrobovém invertu a vyhodnocení jejich kondice po přezimování a medného výnosu. Dalším cílem bylo sledování sezónní dynamiky infekce *N. ceranae*.

Materiál a metodika

Experiment byl proveden na dvaceti včelstvech o srovnatelné síle, umístěných na společném stanovišti. Ve včelstvech byly mladé matky shodného původu (všechny matky byly dcerami jedné inseminované matky). Po vytočení posledního medu byly ze všech včelstev odebrány vzorky včel a mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost mikrosporidií rodu *Nosema*. Kromě mikroskopického vyšetření byla provedena i PCR analýza smíšeného vzorku z celé včelnice a druhové určení přítomné mikrosporidie. Poté byla včelstva rozdělena do čtyř skupin po pěti. U první skupiny byl k doplnění zásob před zimováním použit květový med, u druhé skupiny cukerný roztok, u třetí sacharózový invert (Apiinvert) a u čtvrté škrobový invert (Apifood).

Ze všech včelstev byly ve tříměsíčních intervalech odebírány dělnice (na jaře a v létě létavky, nachytané na česně, na podzim včely, setřesené z okrajových plástů zimního chumáče a v zimě mrtvolky, nalezené na dně úlu. Odebrané včely byly vyšetřeny na přítomnost spor *N. ceranae*. U každého včelstva (a u každého odběru) bylo provedeno hromadné mikroskopické vyšetření 50 včel. Dále bylo u každého včelstva provedeno individuální mikroskopické vyšetření 30 včel, pomocí kterého bylo zjištěno procento infikovaných včel ve vzorku.

Byla sledována síla včelstev po přezimování (počet obsednutých plástů) a další ukazatele kondice - počet vystavěných a zakladených stavebních rámků, počet vystavěných mezistěn a medný výnos.

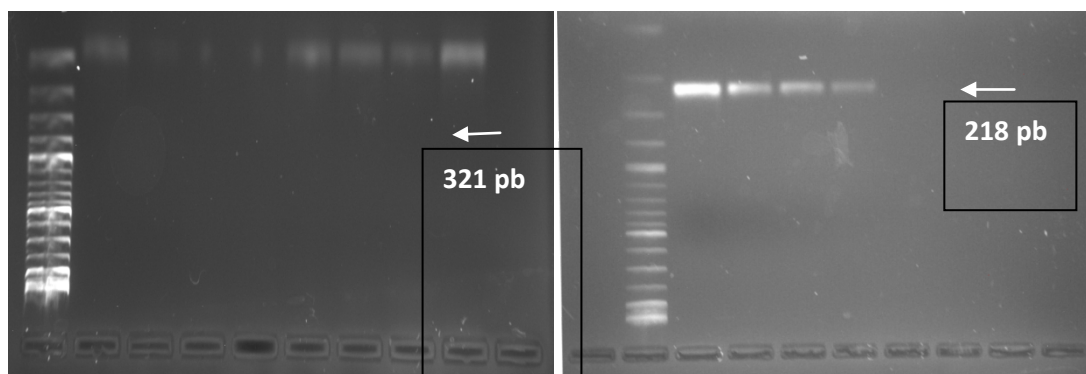
Včelstva byla sledována po dobu dvou let. Postup krmení, odběru vzorků a vyšetřování byl ve druhém roce stejný jako v prvním roce.

K analýze dat byla použita jednofaktorová ANOVA; k hodnocení statisticky významných rozdílů byl použit Tukeyův post-hoc test.

Výsledky a diskuze

Ani jedno ze sledovaných včelstev v průběhu experimentu neuhynulo a ani u jednoho nedošlo k výměně matky. Na stanovišti byla na počátku experimentu zjištěna 100% prevalence nosematózy.

Přítomná mikrosporidie byla pomocí PCR identifikována jako *N. ceranae*, nebyla zjištěna infekce *N. apis* (Obrázek 1A, 1B).



Obrázek 1A, 1B: Analýza získaných spor pomocí PCR. 1A: *N. apis*, 1B: *N. ceranae*.

Mezi skupinami včelstev, krmenými různými krmivy byly zjištěny rozdíly v intenzitě a prevalenci nosematózy (Obrázek 2A, 2B) i rozdíly v kondici včelstev. Jako nejvhodnější krmivo se ukázal med, který je pro včely přirozenou potravou, následoval sacharózový invert (Tabulka 1, Tabulka 2). Rozdíly mezi experimentálními skupinami však ve většině případů nebyly statisticky významné. Vliv použitého krmiva se statisticky významně projevil pouze v prvním experimentálním roce u parametru % napadených včel. U skupiny, krmené cukerným roztokem bylo toto procento statisticky významně nižší než u ostatních tří skupin.

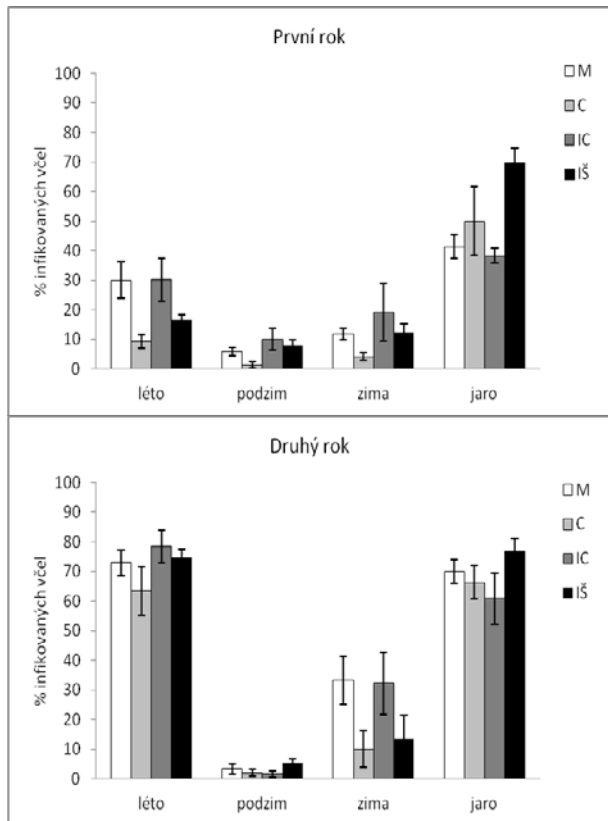
	Síla včelstev (počet obsednutých rámků na jaře)	Počet vystavených stavebních rámků	Počet vystavených mezistěn	Medný výnos (kg)
Med	7,7 ± 0,27	3,6 ± 0,22	8,2 ± 0,77	20,2 ± 4,54
Cukr	7,1 ± 0,54	2,2 ± 0,38	6,2 ± 1,10	11,4 ± 3,87
Invert sacharózový	7,4 ± 0,54	3,6 ± 0,31	8,2 ± 0,78	14,2 ± 3,69
Invert škrobový	7,3 ± 0,51	3,0 ± 0,38	5,8 ± 0,72	9,6 ± 3,52

Tabulka 1. Kondiční parametry v prvním roce sledování. Data představují průměry ± SEM

	Síla včelstev (počet obsednutých rámků na jaře)	Počet vystavených stavebních rámků	Počet vystavených mezistěn	Medný výnos (kg)
Med	7,7 ± 0,27	1,8 ± 0,33	5,6 ± 0,61	11,0 ± 1,85
Cukr	7,1 ± 0,54	1,8 ± 0,31	4,0 ± 0,86	9,6 ± 2,39
Invert sacharózový	7,4 ± 0,54	1,8 ± 0,40	5,0 ± 0,70	11,0 ± 2,45
Invert škrobový	7,1 ± 0,54	1,6 ± 0,20	3,6 ± 0,48	8,6 ± 0,83

Tabulka 2. Kondiční parametry ve druhém roce sledování. Data představují průměry ± SEM.

Byl zjištěn vysoký stupeň korelace ($R^2 = 0,736$) mezi výsledky hromadného a individuálního vyšetření (počet spor na včelu x % infikovaných včel), proto jsou dále uvedeny pouze výsledky individuálního vyšetření. Byla pozorována výrazná sezónní dynamika infekce *N. ceranae*, která byla podobná u všech experimentálních skupin, ale mírně se lišila v prvním a ve druhém roce sledování (Obrázek 2A, 2B).



Obrázek 1A, 1B. Prevalence infekce *N. ceranae* ve včelstvech a sezónní dynamika choroby. M: krmení medem; C: krmení cukerným roztokem; IC: krmení sacharózovým invertem; IŠ: krmení škrobovým invertem. Data představují průměr \pm SEM ze získaných hodnot.

Zjištěná sezónní dynamika infekce *N. ceranae* se výrazně lišila od popisované dynamiky původního patogenu *N. apis* (Mussen, 2011). Zatímco infekce *N. apis* vrcholí v předjaří a v létě obvykle vymizí, v tomto experimentu byla nejvyšší prevalence infekce (% napadených včel ve včelstvu) zjištěna na jaře a v létě. Na podzim došlo u všech včelstev k výraznému snížení prevalence. Toto ozdravení pravděpodobně souviselo s obměnou generací ve včelstvu. Ve druhé polovině léta se začínají líhnout dlouhověké zimní včely, které jsou nákazy prosté (Suwannapong a kol., 2010); krátkověké letní včely (mezi nimiž je velký podíl infikovaných)

postupně hynou. K úhynu dochází obvykle venku v terénu, takže uhynulé infikované včely nekontaminují prostředí úlu.

Mezi procentem infikovaných včel v létě a následující rok na jaře nebyla zjištěna významná korelace ($R^2 = -0,00274$; $R^2 = 0,028$). Podle míry napadení v podletí tedy nelze usuzovat na míru napadení v následující sezóně. Ani v jedné sezóně nebyla zjištěna významná korelace mezi procentem napadených létavek při jarním odběru a mezi medným výnosem ($R^2 = -0,164$; $R^2 = 0,0196$). Včelstva jsou tedy schopna se s infekcí do značné míry vyrovnat.

Závěr

Byla zjištěna výrazná sezónnost infekce *N. ceranae*, zcela odlišná od sezónnosti, popisované u mikrosporidie *N. apis*. Nejvyšší počty spor i nejvyšší počty infikovaných včel ve včelstvech byly zjištěny na jaře a v létě, na podzim došlo k útlumu infekce. Mezi experimentálními skupinami, krmenými různými krmivy, nebyly zjištěny významné rozdíly v kondici anebo v medném výnosu a u většiny odběrů ani v průběhu infekce *N. ceranae*. Všechna testovaná krmiva se tedy ukázala jako vhodná.

Citovaná literatura je k dispozici u autorů.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 217/2017/FVHE.

Aeromonády rezistentní k fluorochinolonům v českých chovech ryb

Monika Dolejská¹, Kateřina Řeháková¹, Andrea Koutníková¹, Marie Komárková¹, Alois Čížek²

¹*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

Česká republika je tradičním producentem tržních ryb, především kapra obecného chovaného pro domácí spotřebu i export v tradičním rybníkářství s extenzivním nebo polointenzivním typem chovu. Chinolony jsou důležitou skupinou antimikrobiálních látek pro terapii infekčních onemocnění člověka i zvířat. Bakteriální rezistence k těmto látkám však celosvětově narůstá a zároveň se zvyšuje výskyt mechanismů rezistence k chinolonům přenášených plazmidy. Aeromonády jsou významnými oportunními patogeny člověka a dalších teplokrevných i studenkrevných živočichů, u kterých způsobují řadu onemocnění.¹ Informace o prevalenci plazmidy kódované rezistence (zkráceně PMQR, z angl. plasmid-mediated quinolone resistance) k fluorochinolonům u aeromonád v chovech tržních ryb pro potravinové účely jsou omezené a v České republice tato data doposud chybí. Cílem práce bylo prokázat prevalenci této rezistence ve sbírce izolátů *Aeromonas* spp. a zhodnotit dopady použití antibiotik v chovech kaprovitých a lososovitých ryb na selekci aeromonád rezistentních ke klinicky významným skupinám antimikrobiálních látek.

Materiál a metodika

Bakteriální izoláty a průkaz genů PMQR

Do vyšetření byl zahrnut soubor 400 izolátů *Aeromonas* spp. ze stěrů kůže, dutiny tělní, střev a žeberní drtě užitkových ryb (kaprů obecných, pstruhů duhových a sivenů amerických). Izoláty pocházely z chovných rybníků a farmových chovů z různých oblastí ČR. Izoláty byly selektivně kultivovány na krevním agaru s ciprofloxacinem (0,05 mg/l) a do dalších analýz byly zařazeny pouze izoláty rostoucí na tomto médiu a tedy vykazující sníženou citlivost k fluorochinolonům. Byla provedena detekce genů *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *oqxAB* a *aac(6′)-Ib-cr* za využití polymerázové řetězové reakce (PCR) a sekvenování.² Chromozomální mechanismy rezistence k fluorochinolonům jako mutace gyráz a topoizomeráz nebyly sledovány. Do dalšího vyšetření byly zahrnuty pouze izoláty s genem

PMQR, které byly následně identifikovány do druhu MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií a fylogenetickou analýzou sekvencí genu *rpoB* v programu MEGA.³

Citlivosti k antimikrobiálním látkám a průkaz genů rezistence a virulence

Byla stanovena citlivosti k oxytetracyklinu, florfenikolu, kyselině oxolinové a flumekvinu za využití mikrodiluční metody. K detekci genů rezistence, integronů a 7 faktorů virulence byla použita PCR a sekvenování.^{2,4}

Stanovení klonální příbuznosti izolátů a průkaz plazmidů

Příbuznost kmenů byla stanovena restričním štěpením genomové DNA enzymem *SpeI* a její separací metodou pulzní gelové elektroforézy s následnou analýzou makrorestričních profilů a tvorbou dendrogramů softwarem BioNumerics 6.6.² Byly vybrány reprezentativní izoláty, u kterých byla provedena multilokusová sekvenční analýza (MLST) založená na PCR detekci housekeeping genů s cílem zařadit tyto izoláty k sekvenčním typům (ST).⁴ Přítomnost plazmidů byla u izolátů ověřována PCR detekcí replikonů.²

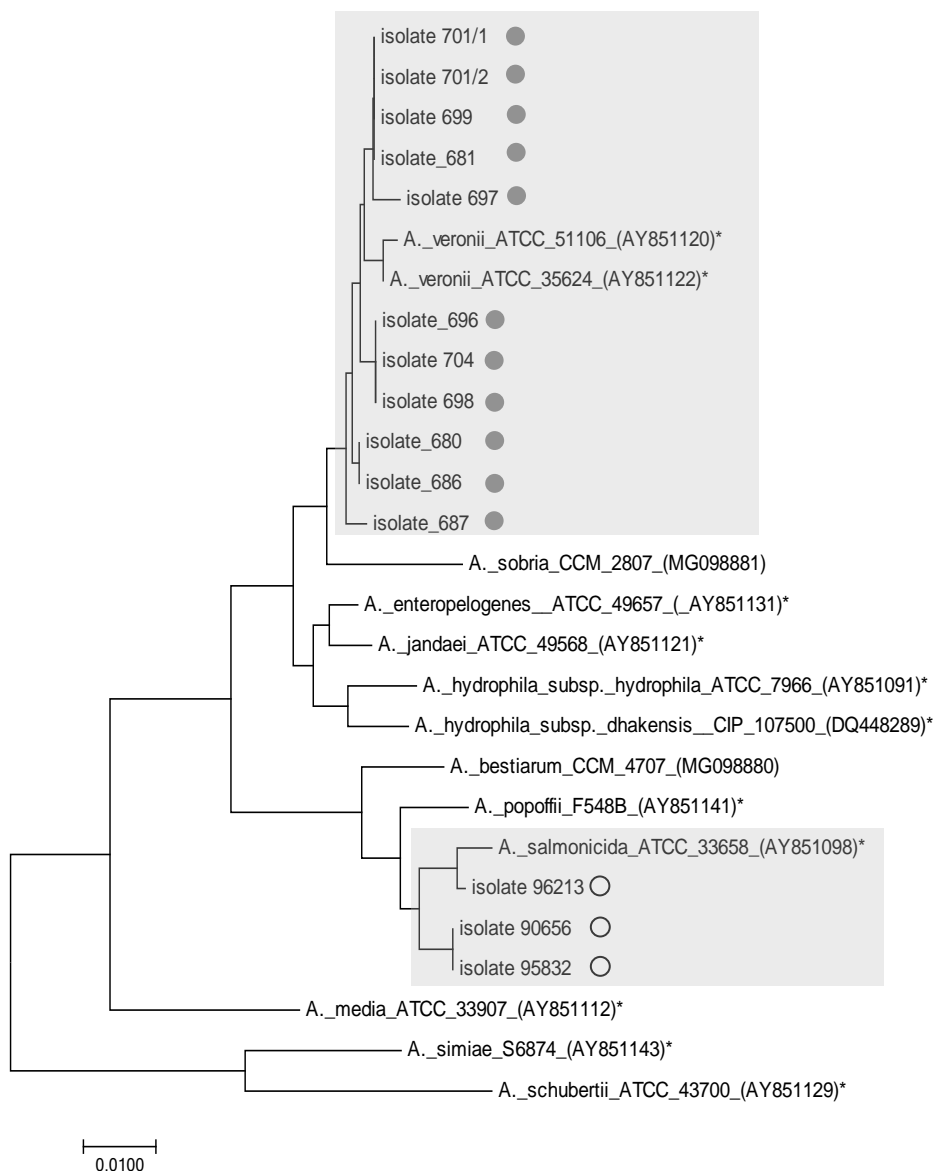
Výsledky

Celkem 257 (64 %, n=400) izolátů vykazovalo sníženou citlivost k fluorochinolonom, 212 (65 %, n=327) pocházelo z kaprovitých ryb a 45 z lososovitých ryb (62 %, n=73). U těchto izolátů byla provedena PCR detekce a sekvenování genů PMQR, která ukázala na přítomnost genu *qnrS2* u 36 izolátů. V případě kaprovitých ryb byl tento gen prokázán u 11 izolátů (5 %, n=212), zatímco v souboru z lososovitých bylo zastoupení výrazně vyšší a bylo získáno 25 izolátů aeromonád (56 %, n=45) s genem *qnrS2*. Všechny izoláty z lososovitých ryb byly identifikovány jako *Aeromonas salmonicida*, zatímco izoláty z kaprovitých ryb jako *Aeromonas veronii* (Obr. 1). Metoda sekvenování *rpoB* vykazovala vyšší přesnost identifikace v porovnání s MALDI-TOFF.

Většina izolátů aeromonád nesoucích gen *qnrS2* vykazovala rezistenci k několika testovaným antimikrobiálním látkám; nejčastěji se vyskytovala rezistence ke kyselině oxolinové (100 %), následovala rezistence k flumekvinu (86 %) a oxytetracyklinu (67 %). K florfenikolu byly všechny izoláty citlivé. Izoláty *A. veronii* rezistentní k tetracyklinu nesly gen *tetE*, zatímco u rezistentních izolátů *A. salmonicida* byl prokázán výhradně gen *tetA*. Integrony byly detekovány pouze u 13 izolátů *A. salmonicida* a vykazovaly identickou strukturu s genovou kazetou *dfrA14* pro rezistenci k trimetoprimu a genem *sull* v konzervované oblasti tohoto mobilního elementu pro rezistenci k sulfonamidům. U všech izolátů byly prokázány alespoň dva z následujících faktorů virulence: Act (kódující cytotoxický enterotoxin), Eno (povrchový glykolytický enzym enoláza), AsvC (sekrečním

systemu 3), AexT (ADP-ribosylační toxin) a Aahh1 (hemolyzin). Gen pro cytotoxický enterotoxin Alt nebyl prokázán a gen pro hemolyzin byl zjištěn pouze u *A. salmonicida*.

Restrikční analýza genomové DNA ukázala na vysokou diverzitu izolátů *A. veronii*, které náležely k 6 různým PFGE profilům s celkovou podobností >62 %. Izoláty *A. salmonicida* vykazovaly pouze 3 odlišné restrikční profily a všechny náležely ke klonální linii ST511. Izoláty *A. veronii* byly metodou MLST netypovatelné s výjimkou jednoho izolátu. Celkem 33 (92 %, n=36) testovaných izolátů s *qnrS2* neslo plazmid skupiny inkompatibility U.



Obrázek 1. Fylogenetická analýza sekvence genu *rpoB* u vybraných izolátů *Aeromonas* spp. s genem *qnrS2* pocházejících z lososovitých (○) a kaprovitých (●) ryb a srovnání s referenčními a typovými kmeny.

Závěry

Fluorochinolony jsou významnou skupinou antimikrobiálních látek humánní i veterinární medicíny a jsou rovněž využívány pro terapii infekčních onemocnění ryb chovaných pro potravinové účely. Ve vyšetřených chovech kaprovitých i lososovitých ryb z ČR byla prokázána vysoká prevalence patogenních kmenů aeromonád se sníženou citlivostí k této skupině antibiotik včetně plazmidy nesené rezistence k fluorochinolonům. Současná rezistence těchto izolátů také k tetracyklinu a potencionálním sulfonamidům ukazuje na riziko použití různých skupin antimikrobiálních látek na selekci izolátů s geny *qnrS2* v chovech ryb. Testování klonální příbuznosti *A. salmonicida* prokázalo vysokou uniformitu genotypových profilů a významnou úlohu šíření dominantních kmenů aeromonád mezi lososovitými rybami ve vyšetřených chovech. Pro udržení citlivosti bakterií způsobujících onemocnění v akvakulturách je důležité ve všech zemích zavést regulaci používání antimikrobiálních látek, sjednotit metodiky pro chov ryb, zajistit diagnostiku původce onemocnění, testování citlivosti a správnou indikaci léčiv.

Seznam literatury:

1. ALCAIDE, Elena, BLASCO, Mari-Dolores, ESTEVE, Consuelo. Mechanisms of quinolone resistance in *Aeromonas* species isolated from humans, water and eels. *Research in Microbiology*. 2010, **161**(1): 40-45.
2. DOBIASOVA, Hana, KUTILOVA Iva, PIACKOVA, Veronika, VESELY, Tomas, CIZEK, Alois, DOLEJSKA, Monika. Ornamental fish as a source of plasmid-mediated quinolone resistance genes and antibiotic resistance plasmids. *Veterinary Microbiology*, 2014, **171**(3-4): 413-421.
5. SHIN, Hee Bong, YOON, Jihoon, LEE, Yangsoon, KIM, Myung Sook, LEE, Kyungwon. Comparison of MALDI-TOF MS, housekeeping gene sequencing, and 16S rRNA gene sequencing for identification of *Aeromonas* clinical isolates. *Yonsei Medical Journal*. 2015, **56**(2): 550-555.
6. MARTINO, Maria Elena, FASOLATO, Luca, MONTEMURRO, Filomena, ROSTEGHIN, Marina, MANFRIN, Amedeo, PATARNELLO, Tomaso, NOVELLI, Enrico, CARDAZZO, Barbara. Determination of microbial diversity of *Aeromonas* strains on the basis of multilocus sequence typing, phenotype, and presence of putative virulence genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, **77**(14): 4986-5000.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 227/2017/FVHE

Taxonomie všenek rodu *Myrsidea* vybraných čeledí volně žijících ptáků Latinské

Ameriky

Stanislav Kolenčík, Ivan Literák

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

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Rod *Myrsidea* Waterston, 1915 lze charakterizovat jako jeden z nejdiferenzovanějších rodů v rámci řádu Phthiraptera, s více než 350 popsánymi druhy, přičemž téměř 200 druhů parazituje na ptácích Neotropické oblasti. Přes neustále se zvyšující množství výzkumů věnujících se této oblasti, jsou tyto počty ještě pořád jen fragmentem skutečné diverzity rodu *Myrsidea* (Valim & Weckstein 2013). Sběry všenek (Phthiraptera) u ptáků Neotropické oblasti byly provedeny pracovníky Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat FVHE VFU Brno v letech 2004-2014 na celkem na 19 lokalitách 5 států (Brazílie, Honduras, Kostarika, Paraguay, Peru), přičemž bylo vyšetřeno 3013 ptáků (Sychra *et al.* 2006, 2007, 2010; Kolenčík *et al.* 2016, 2017). Cílem práce bylo blíže se věnovat všenkám rodu *Myrsidea* získaných z hostitelů z čeledě Formicariidae, Furnaridae, Pipridae, Thamnophilidae, Tityridae a Tyrannidae, což jsou poslední čeledě, která chyběly k doplnění našich výsledků z výše zmíněných sběrů.

Materiál a metodika

Sběr materiálu

Na různých lokalitách v pěti zemích neotropické oblasti – Brazílie, Honduras, Kostarika, Paraguay, Peru – byly použity nárazové sítě na odchytení volně žijících ptáků, kteří byli následně vyšetřeni na přítomnost všenek.

Tvorba preparátů

Pro tvorbu preparátů byl zvolen standardní preparační proces podle Palmy (1978), který byl modifikován následovně: (1) minimálně 5 hodin v KOH, (2) pitva všenky pod stereomikroskopem pro odstranění nestrávených zbytků z důvodu lepší vizualizace morfometrických znaků (Obr. 1), (3) 30 minut v H₂O, (4) 30 minut v CH₃COOH, (5) 30 minut v 50% etanole, (6) 30 minut v 70% etanole, (7) 30 minut v 96% etanole, (8) nejméně 24

hodin v hřebíčkovém oleji. Preparáty byly zhotoveny za pomoci krycích a podložných sklíček a kanadského balzámu.

Taxonomie

Preparáty všenek byly následně podrobeny morfometrické analýze za použití mikroskopu, přičemž jsme použili metodiku počítání štětin podle práce Valim & Weckstein (2013). Taxonomie a nomenklatura ptáků byla použita podle práce Clements *et al.* (2016) a všenky byly určovány podle relevantní literatury.

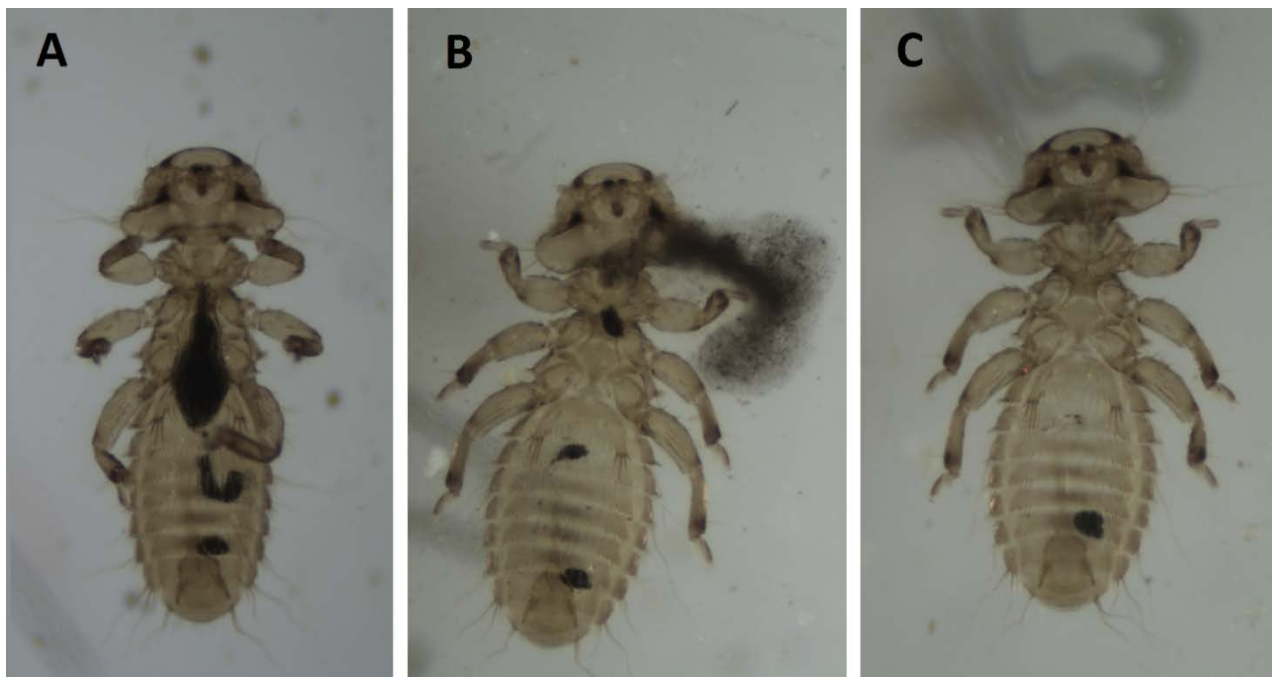
Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 848 ptáků 124 druhů z podřádu křikaví (Tyranni, Suboscines). 151 ptáků (18%) z 35 druhů bylo parazitováno 813 všenkami (průměrná intenzita = 5,4 všenek na ptáka) patřících do 25 druhů rodu *Myrsidea* (Tab. 1). Prevalence druhů *Myrsidea* byla v rozsahu od 4 % do 100 %, průměrná intenzita napadení 1–17 a průměrná abundance 0,4–10,3.

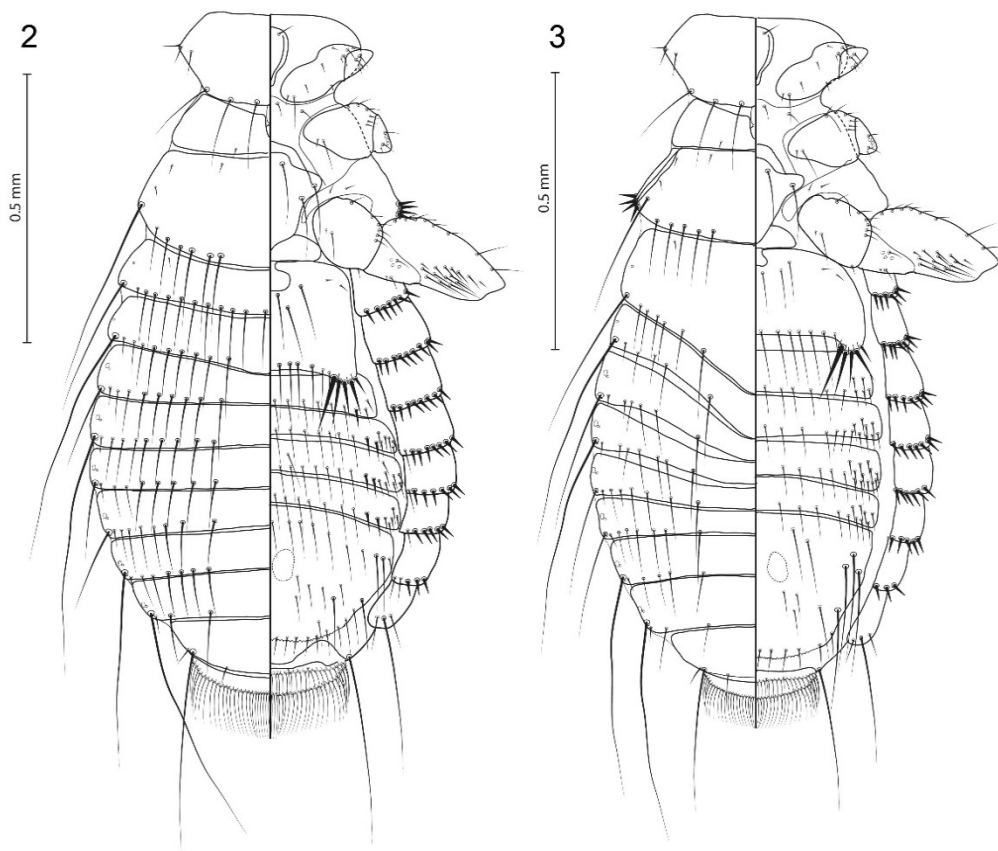
V rámci získaných výsledků bylo také popsáno osm nových druhů všenek rodu *Myrsidea* (Obr. 2) z hostitelů *Automolus leucophthalmus* (Wied, 1821), *Furnarius rufus* (Gmelin, J. F., 1788), *Chiroxiphia caudata* (Shaw, 1793), *Leptopogon superciliaris* Tschudi, 1844, *Pachyramphus polychopterus* (Vieillot, 1818), *Philydor rufum* (Vieillot, 1818), *Pyriglena leucoptera* (Vieillot, 1818) a *Sclerurus scansor* (Menetries, 1835). Pět dalších druhů bylo určeno pouze do rodu kvůli nedostatku odpovídajícího materiálu.

	Vyšetřeny		Parazitovány				Počet všenek	Průměrná intenzita napadení
	Počet ptáků	Počet druhů	Počet ptáků	(%)	Počet druhů	(%)		
Formicariidae	5	1	3	60	1	100	16	5,3
Furnariidae	214	45	18	8	12	27	106	5,9
Pipridae	216	11	20	9	3	27	102	5,1
Thamnophilidae	67	17	7	10	5	29	29	4,1
Tityridae	12	3	4	33	1	33	13	3,3
Tyrannidae	334	47	99	30	13	28	547	5,5
SPOLU	848	124	151	18%	35	28%	813	5,4

Tabulka 1 Souhrn výskytu všenek rodu *Myrsidea* na ptácích z podřádu křikaví z naší studie.



Obrázek 1. Pitva všenek rodu *Myrsidea*. A – před pitvou, B – odstraňování nestrávených zbytků, C – po pitvě.



Obrázek 2. Ukázka ilustrace nově popsaných druhů rodu *Myrsidea* z *Automolus leucophthalmus* (2) a z *Philydor rufum* (3).

Seznam literatury:

- Clements, J.F., Schulenberg, T.S., Iliff, M.J., Roberson, D., Fredericks, T.A., Sullivan, B.L., & Wood, C.L. (2016) The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2016. Downloaded from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>
- Kolencik, S., Sychra, O., Valan, M. & Literak, I. (2016) New data on the taxonomy and distribution of ten Neotropical chewing lice of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae), including the description of a new species. *Zootaxa*, 4085, 233–247.
- Kolencik, S., Sychra, O., Papousek, I. & Literak, I. (2017) Where are the species limits? Morphology versus genetics in Neotropical chewing lice of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae), with description of three new species. *Zootaxa*, 4324, 161–179.
- Palma, R.L. (1978) Slide mounting of lice: a detailed description of the Canada balsam technique. *New Zealand Entomologist*, 6, 432–436.
- Sychra, O., Literák, I., Čapek, M. & Havlíček, M. (2006) Chewing lice (Phthiraptera) from typical antbirds and ground antbirds (Passeriformes: Thamnophilidae, Formicariidae) from Costa Rica, with descriptions of three new species of the genera *Formicaphagus* and *Myrsidea*. *Zootaxa*, 1206: 47–61.
- Sychra, O., Literák, I., Čapek, M. & Havlíček, M. (2007) Chewing lice (Phthiraptera) from buntings, cardinals and tanagers (Passeriformes: Emberizidae, Cardinalidae, Thraupidae) from Costa Rica, with descriptions of two new species of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae). *Zootaxa*, 1631, 57–68.
- Sychra, O., Najer, T., Kounek, F., Čapek, M. & Literák, I. (2010) Chewing lice (Phthiraptera) on manakins (Passeriformes: Pipridae) from Costa Rica, with description of a new species of the genus *Tyranniphlopterus* (Phthiraptera: Philopteridae). *Parasitology Research*, 106: 925–931.
- Valim, M.P. & Weckstein, J.D. (2013) A drop in the bucket of the megadiverse chewing louse genus *Myrsidea* (Phthiraptera, Amblycera, Menoponidae): ten new species from Amazonian Brazil. *Folia Parasitologica*, 60, 377–400.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 223/2017/FVHE.

Vliv rozdílného surovinového složení diet na vybrané ukazatele krevního profilu odstavených králíků plemene zakrslý beran

Vlastimil Šimek¹, Lenka Kudělková¹, Karel Tvrdoň², David Zapletal¹

¹Ústav zootechniky a zoohygieny, *Fakulta veterinární hygieny a ekologie*, ²student MSP,
Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

V podmínkách zájmového chovu králíků jsou rozšířeni především zakrslí králíci, přičemž mezi veřejností vykazují nejvyšší popularitu zejména plemena zakrslý barevný a zakrslý beran (González-Redondo a Contreras-Chacón, 2012). Ověřování praktického využití alternativních krmných komponent pro výrobu králíčích pelet bylo dosud intenzivně studováno výhradně u brojlerových králíků (Volek a Marounek, 2009). V nedávné době bylo zjištěno, že dietární začlenění lupinových semen vykazovalo zdravotní benefity ve vybraných ukazatelích lipidového metabolismu u pokusných, experimentálně chovaných zvířat (Marchesi et al., 2008; Fontanari et al., 2012). Mimoto, dietární začlenění glycerolu u brojlerových králíků nevykazovalo žádný nepříznivý vliv na jejich reprodukci a růst (Iñigo et al., 2011). Vliv dietárního začlenění semen lupiny bílé na širší profil ukazatelů krve u králíků byl dosud studován pouze omezeně, přičemž nejsou známa data z prací na pet králíčích chovaných v běžných chovatelských podmínkách. Vliv dietárního začlenění glycerolu na krevní ukazatele králíků nebyl vůbec studován. Cílem této studie bylo zhodnotit vliv začlenění celých semen lupiny bílé a rozdílného pojidla v dietách na vybrané krevní ukazatele mladých rostoucích zakrslých králíků.

Materiál a metodika

Zvířata

Studie byla provedena na celkem 36 králíčích plemene zakrslý beran. Tito králíci pocházeli z běžného chovu zaměřeného na výstavnickou činnost. Všichni králíci byli ustájeni a ošetřováni za shodných podmínek. Experimentální procedury související s odběrem biologických materiálů byly schváleny Komisí pro ochranu zvířat VFU Brno (č. 66/2016/2230/FVHE).

Design experimentu a diety

V rámci jednotlivých vrhů byli mladí králíci po narození náhodně rozděleni do dvou dietárních skupin (kontrolní skupina, n=12 a experimentální skupina, n=24). Mladí králíci v obou skupinách byli do věku 8 týdnů ustájeni společně s králicemi. Mladí králíci

v experimentální skupině přijímali společně s králicemi experimentální před-odstavovou kompletní dietu do 8. týdne jejich věku. Poté byl realizován odstav a mláďata byla ustájena po dvou v kotci. Odstavení králíci z experimentální skupiny byli rovnoměrně rozděleni do dvou po-odstavových dietárních skupin M a G (12 králíků ve skupině), přičemž králíci přijímali tyto diety až do věku 15 týdnů. S ohledem na fyziologii trávení králíků byl proveden jednotýdenní pozvolný přechod z předodstavové diety na po-odstavové typy diet. Králíci v kontrolní skupině přijímali po celou sledovanou dobu kompletní dietu pro zakrslé králíky zahraniční provenience Berkel-Futter Light 6008. Všechny použité experimentální diety obsahovaly významný podíl šrotu z celých semen lupiny bílé. Surovinové složení obou experimentálních po-odstavových diet bylo stejné, s výjimkou pojidla (skupina M – melasa, skupina G – glycerol). Všichni králíci přijímali diety v množství zhruba 20 – 30 g na kg živé hmotnosti a den. Luční seno bylo předkládáno třikrát týdně. Králíci měli neomezený přístup k pitné vodě.

Odběr krve a laboratorní vyšetření

Odběr krve byl realizován ve věku 15 týdnů. Těsně před odběrem byl zhodnocen zdravotní stav králíků, přičemž tito nevykazovali klinické příznaky nemoci. Vzorky krve (cca 2 ml) byly odebrány mezi 9. – 10. hodinou ranní z *vena saphaena lateralis*. Krev byla přemístěna do vzorkovnic s heparinem a transportována do laboratoře. Hematologické vyšetření bylo realizováno manuálně v laboratoři Ústavu zootechniky a zoohygieny FVHE VFU Brno. V rámci hematologického profilu byly stanoveny následující ukazatele: počet erytrocytů (RBC), počet leukocytů (WBC), hematokritová hodnota (HCT) a koncentrace hemoglobinu (HGB). Posléze byly vypočteny vybrané erytrocytární ukazatele: střední objem erytrocytu (MCV) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). V rámci biochemického panelu byly v krevní plazmě determinovány základní ukazatele: celkový protein, albumin, glukóza, celkový cholesterol, triacylglyceroly (TAG), kreatinin, močovina, katalytické aktivity alkalické fosfatázy (ALP), alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) a rovněž obsah vápníku, anorganického fosforu, sodíku, draslíku a chloridů. Mimoto, byl kalkulován poměr albumin:globulin.

Statistická analýza

Statistické zhodnocení rozdílů mezi skupinami (vliv použité diety) bylo provedeno jednofaktorovou Anovou v programu Statistica CZ, verze 10. Pro následné testování

průkaznosti mezi průměry byl použit Tukeyův test. Statisticky průkazné rozdíly jsou značeny jako $P < 0,05$. Statisticky vysoce průkazné rozdíly jsou značeny jako $P < 0,01$.

Výsledky

Výsledky hematologického a biochemického vyšetření krve jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Živá hmotnost a ukazatele hematologického a biochemického vyšetření krve u mladých králíků plemene zakrslý beran ve věku 15 týdnů.

Ukazatel (jednotky)	Dietární skupina						P
	K (n=12)		M (n=12)		G (n=12)		
	x	SEM	x	SEM	x	SEM	
Živá hmotnost (g)	1075,42 ^{A,a,b}	28,21	1321,75 ^{B,b}	55,74	1167,58 ^{A,B,a}	20,1	**
<i>Hematologické vyšetření</i>							
RBC ($\times 10^{12}/L$)	5,89	0,21	5,34	0,31	5,62	0,19	ns
HCT (L/L)	0,39	0,01	0,37	0,01	0,37	0,01	ns
HGB (g/L)	126,88	3,75	131,87	2,85	130,60	4,36	ns
MCV (fL)	66,21	1,00	72,72	5,00	66,35	2,79	ns
MCHC (g/L)	334,28	12,05	353,61	4,80	355,32	9,58	ns
WBC ($\times 10^9/L$)	6,77	0,60	4,98	0,53	4,58	0,42	ns
<i>Biochemické vyšetření</i>							
Celk. protein (g/L)	56,82	1,43	55,33	1,39	54,76	1,26	ns
Albumin (g/L)	31,29 ^b	1,32	27,00 ^a	0,97	27,73 ^a	0,71	*
A/G	1,33 ^b	0,14	0,99 ^a	0,06	1,05 ^{a,b}	0,05	*
Glukóza (mmol/L)	6,77	0,31	6,64	0,25	6,93	0,18	ns
Celk. cholesterol (mmol/L)	0,99	0,12	0,97	0,09	0,86	0,07	ns
TAG (mmol/L)	1,12	0,13	0,78	0,11	0,74	0,07	ns
Kreatinin ($\mu\text{mol}/L$)	85,87	5,28	85,43	2,22	84,35	3,10	ns
Močovina (mmol/L)	5,48	0,43	6,16	0,26	6,03	0,29	ns
ALP ($\mu\text{kat}/L$)	1,96	0,21	2,20	0,33	2,47	0,26	ns
ALT ($\mu\text{kat}/L$)	1,17 ^B	0,20	0,46 ^A	0,03	0,41 ^A	0,03	**
AST ($\mu\text{kat}/L$)	0,75	0,12	0,83	0,13	0,68	0,09	ns
Ca (mmol/L)	3,09 ^b	0,05	2,91 ^{a,b}	0,06	2,84 ^a	0,07	*
P _i (mmol/L)	1,77	0,16	1,89	0,15	1,87	0,19	ns
Na (mmol/L)	145,13	1,50	143,70	0,71	143,96	0,63	ns
K (mmol/L)	4,72	0,12	4,55	0,07	4,47	0,07	ns
Cl (mmol/L)	108,20	1,08	111,81	0,72	110,34	1,50	ns

^{a,b}: $P < 0,05$,*; ^{A,B}: $P < 0,01$,**; K, kontrolní skupina; M, skupina s melasou; G, skupina s glycerolem; x, aritmetický průměr; SEM, střední chyba průměru; A/G, poměr albumin:globulin

Nejvyšší živou hmotnost vykazovali králíci ve skupině M oproti králíkům z kontrolní skupiny ($P < 0,05$). Všechny zjištěné hodnoty hematologického a biochemického profilu byly v referenčních rozmezích pro zdravé králíky (Wesche, 2014). Statisticky významné rozdíly mezi sledovanými dietárními skupinami byly nalezeny pouze u vybraných ukazatelů biochemického vyšetření, konkrétně u koncentrace albuminu, v poměru albumin:globulin, v aktivitě ALT a v obsahu vápníku. Přestože se obsah celkového proteinu statisticky

významně neodlišoval mezi sledovanými skupinami, koncentrace albuminu byla již dietou ovlivněna. Nejvyšší koncentraci albuminu vykazovali králíci z kontrolní skupiny oproti králíkům v obou experimentálních skupinách. Což také i signifikantně ovlivnilo proporcionalitu hlavních bílkovinných frakcí. Statisticky průkazné snížení v katalytické koncentraci ALT bylo zaznamenáno u obou experimentálních diet oproti kontrolní skupině. Signifikantní snížení plasmatického vápníku bylo nalezeno u králíků skupin B vůči kontrolní skupině, což může souviset s vlastním obsahem tohoto makroelementu v celých semenech lupiny bílé.

Závěr

Na základě našich zjištění lze konstatovat, že začlenění šrotu z celých semen lupiny bílé v dietách pro zakrslé králíky mělo signifikantní vliv na koncentraci albuminu, poměr albumin:globulin, aktivitu ALT a obsah Ca v krevní plazmě sledovaného genofondu králíků. Zdá se, že vyvážené začlenění semen lupiny bílé v kompletních dietách vedlo k zdravotně prospěšným tendencím v ohledu převážně proteinového metabolismu králíků. Použití glycerolu jakožto alternativního pojidla nemělo průkazný vliv na sledované ukazatele vnitřního prostředí zakrslých králíků, a proto jej lze v množství 30 g/kg diet doporučit pro výrobu peletovaného krmiva pro zakrslé králíky. K ověření specifických vlastností lupiny bílé na metabolismus králíků bude nezbytné provedení dalších rozšiřujících studií.

Seznam literatury

- GONZÁLEZ-REDONDO P, CONTRÉRAZ-CHACÓN GM (2012). Perceptions among university students in Seville (Spain) of rabbit as livestock and as companion animal. *World Rabbit Sci* 20: 155-162.
- FONTANARI GG, BATISTUTI JP, da CRUZ RJ, SALVIDA PHN, ARÊAS JAG (2012). Cholesterol-lowering effect of whole lupin (*Lupinus albus*) seed and its protein isolate. *Food Chem* 132: 1521-1526.
- IÑIGO MA, de BLAS JC, CACHALDORA P, GARCÍA-REBOLLAR P (2011). Effect of starch substitution with crude glycerol on growing rabbit and lactating doe performance. *World Rabbit Sci* 19: 67-74.
- MARCHESI M, PAROLINI C, DIANI E, RIGAMONTI E, CORNALLI L, ARNOLDI A, SIRTORI CR, CHIESA G (2008). Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in rabbit model. *Br J Nutr* 100: 707-710.
- VOLEK Z, MAROUNEK M (2009). Whole white lupin (*Lupinus albus* cv. Amiga) seeds as a source of protein for growing-fattening rabbits. *Anim Feed Sci Tech* 152: 322-329.
- WESCHE P (2014). Clinical pathology. In: Meredith A, Lord B (Eds). *Rabbit Medicine*. Gloucester: BSAVA p. 124-137.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 207/2017/FVHE.

Gramnegativní bakterie produkující karbapenemázy z krkavcovitých ptáků v Severní Americe

Iva Kutilová^{1,2}, Martina Masaříková^{2,3}, Adam Valček¹, Darina Čejková⁴, Costas C. Papagiannitsis^{1,5}, Jaroslav Hrabák^{1,5}, Alois Čížek^{2,3}, Ivan Literák^{1,2}, Monika Dolejská^{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; Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno³; Výzkumný ústav veterinárního lékařství⁴; Biomedicínské centrum, Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Plzni, Univerzita Karlova⁵

Úvod

Karbapenemy jsou širokospektrální beta-laktamová antibiotika, která patří mezi rezervní antimikrobiální látky humánní medicíny. Zvyšující se výskyt rezistentních bakterií produkujících karbapenemázy, enzymy hydrolyzující beta-laktamový kruh antibiotika, představuje jednu z největších hrozeb současné medicíny. Mezi významné geny kódující karbapenemázy řadíme serinové karbapenemázy (zejména KPC, skupina OXA-48) a metallo-beta-laktamázy (VIM, IMP, NDM). Tyto geny jsou obvykle lokalizovány na plasmidech, které umožňují jejich snadné horizontální šíření mezi bakteriemi¹. Záchyt multirezistentních kmenů s produkcí karbapenemáz je charakteristický pro nemocničním prostředí. Ve veterinární medicíně nejsou karbapenemy povoleny, proto je výskyt enterobakterií produkujících karbapenemázy u zvířat alarmující^{1,2}. Vlivem antropogenního znečištění jsou rezidua antimikrobiálních látek a rezistentní bakterie nalézány např. v odpadních vodách a na skládkách odpadů. Volně žijící zvířata, získávající potravu v blízkosti lidských obydlí a zemědělských oblastí, mohou být těmito bakteriemi kolonizována. U synantropních volně žijících ptáků, jako například krkavcovitých, je riziko následného šíření klinicky významných rezistentních bakterií do vzdálených zeměpisných lokalit, z důvodu schopnosti těchto ptáků uletět velké vzdálenosti³.

Cílem studie bylo stanovení prevalence gramnegativních bakterií produkujících karbapenemázy a následná molekulární typizace získaných izolátů ze vzorků trusu krkavcovitých ptáků v Severní Americe.

Materiál a metodika

Byl vyšetřen soubor 1039 vzorků trusu krkavcovitých ptáků (*Corvus brachyrhynchos*, *Corvus corax*) v různých lokalitách v USA a Kanadě³. Vzorky trusu byly pomnoženy v peptonové vodě a selektovány na MacConkey agaru s meropenemem (0,125 mg/l) a ZnSO₄ (100 mg/l) pro získání izolátů se sníženou citlivostí ke karbapenemům. Izoláty byly druhově identifikovány metodou MALDI-TOF MS a testovány metodou PCR a sekvenování na přítomnost genů karbapenemáz (*bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, skupina *bla*_{OXA-48} a *bla*_{VIM})⁴.

U izolátů s genem rezistence ke karbapenemům byla stanovena karbapenemázová aktivita spektrofotometrickou metodou HRC assay (BioVendor) a určen fenotyp rezistence k 14 antimikrobiálním látkám⁵. Příbuznost izolátů byla stanovena metodou pulzní gelové elektroforézy (PFGE)⁴ za použití enzymu *Sfi*I. Počet, velikost plazmidů a lokace genů karbapenemáz byly stanoveny metodou PFGE⁴ za použití nukleázy S1 a hybridizací⁶. Horizontální přenos genů karbapenemáz byl testován konjugací do *E. coli* MT102⁴.

Z celogenomové DNA bakteriálních izolátů byla připravena knihovna kitem QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN) nebo Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) a sekvenována na přístroji MiSeq nebo NextSeq (Illumina). Data byla zpracována programy Trimmomatic-0.36, IDBA-UD 1.1.1, BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), Geneious software 9.0.5. a dalšími volně dostupnými bioinformatickými nástroji (ResFinder 3.0; PlasmidFinder 1.3; MLST 1.8; <http://www.genomicepidemiology.org>).

Výsledky

Získáno bylo 277 izolátů z USA a 242 izolátů z Kanady se sníženou citlivostí ke karbapenemům. Geny odpovědné za produkci karbapenemáz byly detekovány u 11 izolátů *Providencia rettgeri* (gen *bla*_{IMP-27}), 1 izolátu *Klebsiella pneumoniae* (gen *bla*_{KPC-2}) a 1 izolátu *Enterobacter aerogenes* (gen *bla*_{KPC-3}). Všechny izoláty s detekovanými geny karbapenemáz vykazovaly pozitivní karbapenemázovou aktivitu.

Izoláty *P. rettgerii* byly na základě PFGE rozděleny do dvou skupin, v rámci kterých se příbuznost restričních profilů pohybovala v rozmezí 89 – 100 %. Izoláty z první skupiny pocházely ze dvou geograficky rozdílných míst v USA, nesly gen *lnu*(F) pro rezistenci k linkosamidům a plazmid o velikosti 40-60 kb (Tabulka č. 1). Pro izoláty druhé skupiny byl charakteristický 120 kb plazmid, původ ze stejné lokality v USA a nepřítomnost genu *lnu*(F). Plazmidy nepatřily do žádné ze známých skupin inkompatibility. Hybridizace se specifickou sondou, konjugační experiment a detailní analýza genetického okolí ukázaly, že gen *bla*_{IMP-27} byl u všech izolátů lokalizován na chromozómu jako genová kazeta integronu třídy 2.

Izolát *K. pneumoniae* 680m/10 byl zařazen do sekvenčního typu ST258 a jeho charakteristiky jsou uvedeny v Tabulce č. 2. Horizontální přenos genu *bla*_{KPC-3} nebyl úspěšný.

Charakteristiky izolátu *Enterobacter aerogenes* 4382/m1 jsou shrnuty v Tabulce č. 2. Horizontálním přenosem genu *bla*_{KPC-3} byli získáni dva transkonjuganti, kteří nesli tento gen na plazmidu skupiny IncFII_K odlišné velikosti (90 kb nebo 120 kb). Transkonjugant s větším plazmidem navíc obsahoval geny rezistence *bla*_{OXA-2} a *aadB*.

Tabulka č. 1 – Molekulární charakterizace a fenotyp rezistence izolátů *P. rettgeri*

Izolát	Původ vzorku*	PFGE **	HRC assay	Geny rezistence	Plazmidy [kb]	Fenotyp rezistence***
<i>P. rettgeri</i> 715m/4	NY	1a	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	60	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 727m	NY	1b	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	40	AMP,TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 586mA	CA	1c	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	60	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 657m	CA	1c	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	60	AMP,TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 663m/7	CA	1c	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	60	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 665m/5	CA	1c	+	<i>bla</i> _{IMP-27} , <i>lnu</i> (F)	60	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 592m/8	CA	2a	+	<i>bla</i> _{IMP-27}	120	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 504mA	CA	2a	+	<i>bla</i> _{IMP-27}	120	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 594m/10B	CA	2a	+	<i>bla</i> _{IMP-27}	120	TE,KF
<i>P. rettgeri</i> 640m	CA	2a	+	<i>bla</i> _{IMP-27}	120	AMP,S,S3,TE,SXT,C,KF
<i>P. rettgeri</i> 593m	CA	2b	+	<i>bla</i> _{IMP-27}	120	AMP,TE,KF

*NY – New York, USA; CA – Kalifornie, USA. ** Kmeny s příbuzností PFGE profilů $\geq 85\%$ jsou zařazeny do stejné skupiny značené číslem (1, 2). Kmeny ze stejné skupiny s příbuzností PFGE profilů $< 100\%$ jsou označeny písmeny (1a, 1b,...). *** Testovaná antibiotika a jejich zkratky: AMP, ampicilin; S, streptomycin; S3, sulfonamidy; TE, tetracykliny; SXT, trimetoprim-sulfametoxazol; C, chloramfenicol; KF, cefalotin; NA, kyselina nalidixová; CAZ, ceftazidim; CN, gentamicin; AMC, amoxicilin-klavulanová kyselina; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; MEM, meropenem; šedá barva značí intermediální fenotyp

Tabulka č. 2 – Geny rezistence a plazmidy izolátu nesoucí gen *bla*_{KPC}

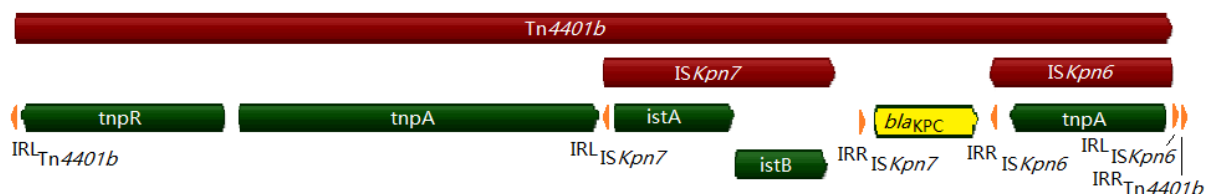
Geny rezistence	<i>K. pneumoniae</i> 680m/10	<i>E. aerogenes</i> 4382m1
Beta-laktamy	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{TEM-1A-like}	<i>bla</i> _{KPC-3} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1}
Chinolony	<i>oqx</i> A, <i>oqx</i> B	<i>qnr</i> B1, <i>aac</i> (6')-Ib-cr
Aminoglykosidy	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>aac</i> (6')-Ib, <i>aad</i> A2	<i>aac</i> (3)-IIa, <i>aac</i> (3)-IId, <i>aad</i> B, <i>str</i> A, <i>str</i> B
Chloramfenikol	<i>cat</i> A1-like	<i>cat</i> B3
Trimetoprim	<i>dfr</i> A12	<i>dfr</i> A30
Tetracykliny	-	<i>tet</i> (B)
Fosfomycin	<i>fos</i> A-like	-

Makrolidy	<i>mph(A)</i>	-
Sulfonamidy	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>
Plazmidy	35 kb, 100 kb, 200 kb	100 kb, 300 kb
Replikony	IncFIB(pQil), ColRNAI, IncFIB(K), IncX3	IncHI1B, IncFIB _{Mar} a IncFII _K
Fenotyp rezistence*	AMP,S3,SXT,C,KF,NA,CAZ,CN,AMC,CIP,IPM,MEM	AMP,S,S3,TE,SXT,KF,NA,CAZ,CN,AMC,IPM,MEM,ATM
Původ izolátu	Kalifornie, USA	Nové Skotsko, Kanada

* viz Tabulka č. 1 - Fenotyp rezistence***

U obou izolátů nesoucích gen *bla_{KPC}* bylo zjištěno jeho typické začlenění do struktury transpozonu *Tn4401b* (Obrázek č. 1).

Obrázek č. 1 - Schéma začlenění genu *bla_{KPC}* do transpozonu *Tn4401b*



Závěr

Ve studii byly detekovány kmeny gramnegativních bakterií produkující karbapenamázy z volně žijících ptáků v Severní Americe. Prevalence těchto kmenů byla nízká, přesto byly zachyceny klinicky významné multirezistentní bakterie rozšířené v nemocnicích v Severní Americe. Vysoká příbuznost izolátů *P. rettgeri* nesoucích gen *bla_{IMP-27}* naznačuje jejich stejný zdroj. Studie poukazuje na význam krkavcovitých ptáků jako možných vektorů rezistentních bakterií ke kriticky významným antibiotikům.

Seznam literatury:

¹EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards). Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. *EFSA Journal*, 2013, **11**(12):3501, 70 pp.

²Woodford, N. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterob. from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother.* 2014, **69**(2): 287–91.

³Jamborova, I. et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and quinolones in *Escherichia coli* from American crows in the USA. *Environ Microbiol*, 2017, **19**(5):2025-2036.

⁴Dolejska, M. et al. High prevalence of *Salmonella* and IMP-4-producing Enterobacteriaceae in the silver gull on Five Islands, Australia. *J Antimicrob Chemother.* 2016, **71**(1): 63–70.

⁵CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. CLSI doc. M100-S25. Wayne, PA, USA, 2015; **35**: 1-236.

⁶Studentova, V. et al. Complete Nucleotide Sequences of Two NDM-1-Encoding Plasmids from the Same Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015, **59**(2): 1325–1328.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 225/2017/FVHE.

Studie vlivu dvou vybraných herbicidů (atrazinu a terbuthylazinu) a jejich metabolitů na vybrané bioindikátory

Barbora Havelková, Daniela Hlávková

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

Úvod

Používání pesticidů všeobecně a herbicidů zvláště má celou řadu výhod, ale i nevýhod. Herbicidy jako cizorodé látky působí negativně na jednotlivé složky životního prostředí a narušují biologickou rovnováhu v přírodě. Zanechávají rezidua v rostlinách a v půdě, mohou znečišťovat povrchové a podzemní vody atd. (1).

Cílem studie bylo navázat na poskytnuté výsledky chemického rozboru skapových vod z Amatérské jeskyně (2015–2016) CHKO Moravským krasem. Skapová voda je voda, která prosákla nadložními horninami do volného jeskynního prostředí. Je proměnlivá jak ve složení, tak ve vydatnosti (2). V těchto vodách byl zaznamenán nadlimitní výskyt pesticidů a to především atrazinu a terbuthylazinu a jejich derivátů. Celková suma detekovaných pesticidů byla také nadlimitní. Výsledky chemických analýz jsou překvapivé, vzhledem k předpokládané čistotě krasových vod.

Materiál a metodika

Pro posouzení vlivu vybraných herbicidů a jejich metabolitů na vodní a půdní biocenózu byly zvoleny testy akutní toxicity na sladkovodní řase *Pseudokirchneriella subcapitata*, na sladkovodním koryši *Daphnia magna*, na mořské světélkující bakterii *Vibrio fischeri* a na okřehku menším *Lemna minor*. Dále byly provedeny testy chronické toxicity se zástupcem půdních bezobratlých rouspíci *Enchytraeus crypticus*. Metodicky se postupovalo dle příslušných norem (OECD 201, OECD 202, ISO 11348-2, OECD 221, OECD 220). Testy s vodními organismy byly vybrány tak, aby byla zastoupena trofická úroveň producenta, konzumenta i destruenta. Princip testu inhibice růstu řas *Pseudokirchneriella subcapitata* spočívá v jejich kultivaci v živném médiu, které obsahuje testovanou látkou v různých koncentracích. Účinek testované látky na řasovou kulturu se projeví jako inhibice růstové rychlosti v porovnání s kontrolami v čistém živném roztoku. Akutní test na perloočkách *Daphnia magna* spočívá ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované látky při expozici 24 a 48 hodin. Principem bakteriálního bioluminiscenčního testu

toxicity je změna luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* vyvolaná negativním působením toxického vzorku. V testu s okřehkem menším se sleduje inhibice rychlosti růstu biomasy okřehku za 168 hodin. Principem zkoušky s roupici *Enchytraeus crypticus* je vystavení deseti zdravých dospělých jedinců s viditelným opaskem (clitellum) působení směsi zkoušeného vzorku s umělou půdou. 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. Koncentrační řada vybraných pesticidů a jejich derivátů byla stanovena na základě analýzy reálných vzorků skapové vody. Koncentrační řady vybraných pesticidů (Atrazin, Terbutylazin) a jejich metabolitů (Atrazin-desethyl, Atrazin-desisopropyl, Terbutylazin-desethyl) byly následující: pro okřehek a řasy (0,1; 1; 10; 25; 50 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$), pro dafnie (5; 50; 125, 250, 375 a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) a bakterie (0,195; 0,391; 0,78; 1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25 a 50 mg.L^{-1}). Skapová voda byla odebrána v Amatérské jeskyni CHKO Moravský kras v prostoru Rozlehlé chodby (jaro, léto a podzim 2017), která je situovaná pod zemědělsky obhospodařovanou půdou. Vzorky byly odebrány do 500 ml PE láhvi a bezprostředně převezeny k chemické analýze do akreditované analytické laboratoře ALS ČR v Brně a k biologickým zkouškám toxicity na VFU Brno. Ke stanovení sledovaných analytů byla využita ultra-čistá kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrofotometrií (ALS). Pro biologickou zkoušku s autotrofními organismy byly připraveny dva vzorky skapové vody. Jeden vzorek byl obohacen živinami ve stejném množství, jako se přidává do živného roztoku a druhý vzorek byl bez přídavku živin. Obohacení živinami bylo proto, abychom vyloučili inhibici růstu, z důvodu absence živin.

Výsledky

Vzorky skapové vody byly podrobeny vyšetření na cca 350 látek (účinných látek a vybraných metabolitů). Bylo nalezeno 6 pesticidní látek nad limitem stanovitelnosti, všechny tyto látky patří do skupiny triazinových pesticidů (Tab. 1). Z analýzy je patrné, že koncentrace triazinových herbicidů nepřekročila limit nejvyšší mezní hodnoty jednak pro sumu pesticidních látek, tak i pro jednotlivé pesticidy v pitné vodě (Vyhláška č. 252/2004 Sb.).

Tabulka 1: Přehled výsledků chemických analýz vybraných pesticidů ze vzorků skapové vody.

Testovaná látka/období	květen 2017	červenec 2017	říjen 2017
Atrazin	0,011 µg.L ⁻¹	0,010 µg.L ⁻¹	0,014 µg.L ⁻¹
Atrazin-2-hydroxy	0,013 µg.L ⁻¹	0,010 µg.L ⁻¹	0,015 µg.L ⁻¹
Atrazin-desethyl	0,020 µg.L ⁻¹	0,020 µg.L ⁻¹	0,034 µg.L ⁻¹
Atrazin-desisopropyl	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹
Terbuthylazin	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹
Terbuthylazin-desethyl	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹	< 0,010 µg.L ⁻¹
Suma pesticidů a metabolitů	0,1 µg.L ⁻¹	0,1 µg.L ⁻¹	0,1 µg.L ⁻¹

Tabulka 2: Výsledky biologické zkoušky skapové vody (I_μ – inhibice rychlosti růstu řas/okřehku oproti kontrole, I_B – inhibice hmotnosti biomasy okřehku oproti kontrole).

<i>P. subcapitata</i>	květen 2017 (I _μ)		červenec 2017 (I _μ)		říjen 2017 (I _μ)	
vzorek skapové vody	36,05 %		30,37%		26,83%	
vzorek skapové vody + živiny	-47,62 %		-26,75%		-6,36%	
<i>Lemna minor</i>	I _μ	I _B	I _μ	I _B	I _μ	I _B
vzorek skapové vody	38,59 %	46,30 %	32,63 %	22,08 %	38,27 %	46,30 %
vzorek skapové vody + živiny	8,85 %	12,14 %	0,73 %	1,02 %	12,17 %	12,14 %

Inhibice růstu řas i okřehku ≥ 30 % byla u vzorku skapové vody pravděpodobně způsobena pouze nedostatkem živin. Což nám potvrdila výrazná stimulace růstu po obohacení vzorku živinami. Výsledek biologické zkoušky toxicity skapové vody (s použitím *D. magna*, *V. fischeri* *E. crypticus*) byl negativní, tzn., že nedošlo ke změnám v chování a ve stavu organismů ve srovnání s kontrolou. Lze tedy předpokládat, že skapová voda neobsahovala toxické látky ve škodlivých nebo letálních koncentracích. Nicméně kumulace v prostředí a chronická toxicita není vyloučena.

Výsledky testů s vybranými pesticidy a jejich metabolity jsou uvedeny v tabulce 3. Přestože *D. magna* patří mezi nejcitlivější vodní organismy k většině cizorodých látek, prokázána je zejména vysoká citlivost k reziduím organofosfátů, akutní toxicita sledovaných pesticidů nebyla stanovena. Nízká toxicita sledovaných pesticidů i jejich metabolitů byla zjištěna pro bakterie. V provedených zkouškách nebyla prokázána inhibice světelné emise bakterií vyšší než 20 % při expozici 15 minut ani při expozici 30 minut. U pesticidu terbuthylazinu byly pro řasu i okřehky prokázány inhibiční účinky. Akutní toxicita vyjádřena hodnotou 72hErC50_μ i 168h ErC50_μ činila shodně 99,99 µg.l⁻¹. Jako nejcitlivější ukazatel se jeví inhibice biomasy *L. minor*. Vyšší toxicita byla zjištěna u terbuthylazinu (168hEC50_B 9,34 µg.l⁻¹) než u atrazinu (168hEC50_B 25,64 µg.l⁻¹).

Tabulka 3: Souhrn výsledků testů toxicity (a – nestanoveno).

	Atrazin	Atrazin-desethyl	Atrazin-desisopropyl	Terbuthylazin	Terbuthylazin-desethyl
<i>P. subcapitata</i> 72hErC20 μ 72hErC50 μ $\mu\text{g.l}^{-1}$	98 a	a a	a a	a 99,99	a a
<i>L. minor</i> 168hErC50 μ 168hEC50 _B $\mu\text{g.l}^{-1}$	a 25,64	a 8,75	a 28,2	99,99 9,34	a 37,8
<i>V. fischeri</i> EC20 15' EC20 30' mg.l^{-1}	10,39 10,01	23,625 a	a 0,055	6,425 3,775	a 20,81

Závěr

Aplikace pesticidů je v současné době velmi rozšířená, a jak je vidět z našich výsledků lze je detekovat i v oblastech zvláště chráněných území, kde v důsledku dlouhodobého hospodaření s pesticidy dochází k jejich přetrvávání v prostředí a následné kontaminaci podzemních vod. I když námi stanovené hodnoty vypovídající o akutní toxicitě sledovaných pesticidů a jejich metabolitů jsou řádově mnohonásobně vyšší než zjištěné reálné environmentální koncentrace, je vzhledem k nezbytnosti zachování zranitelných jeskynních ekosystémů eliminovat zdroje znečištění a i nadále sledovat trend výskytu a transformace pesticidních látek.

Seznam literatury:

- 1) KOUBOVA D. Funkce půdy ve vztahu k fytotoxicitě herbicidů. *Agrochémia*. 2006, 9(3), s. 10–13.
- 2) MUSGROVE M., BANNE, J.L. Controls on the spatial and temporal variability of vadose dripwater geochemistry: Edwards Aquifer, central Texas. *Geochim Cosmochim Ac.* 2004, 68(5), s. 1007–1020.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 228/2017/FVHE.

Plazmidy nesoucí geny rezistence k fluorochinolonům u izolátů enterobakterií ze zvířat, člověka a prostředí a role antibiotik v jejich šíření

Ivo Papoušek, Adam Valček, Monika Dolejská, Petra Potěšilová, Marco Minoia, Tomáš Nohejl

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

Úvod

Významnou roli v rostoucí prevalenci bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám hraje efektivní horizontální přenos mobilních genetických elementů, zejména plazmidů, nesoucích determinanty antibiotické rezistence. Díky širokému spektru účinku a výborným farmakokinetickým vlastnostem patří mezi nejvýznamnější antimikrobiální látky současnosti fluorochinolony a také rezistence gramnegativních bakterií k této skupině antibiotik ve světě prudce narůstá (Rodríguez-Martínez et al., 2016). Jedním z mechanismů této rezistence je tzv. plazmidově kódovaná rezistence k chinolonům (PMQR), epidemiologicky velmi významná vzhledem k snadnému šíření mezi bakteriemi horizontální cestou (Jacoby et al., 2014). Navzdory tomu však není dosud zcela jasná případná vazba PMQR genů na specifické linie plazmidů, jejich případné sdružování s rezistencí k dalším skupinám antibiotik, dezinfekčním látkám, s faktory virulence a vliv antibiotik na dynamiku jejich přenosu. Cílem práce bylo charakterizovat soubor plazmidů nesoucích geny rezistence k fluorochinolonům u izolátů enterobakterií ze širokého spektra zdrojů a různého geografického původu, determinovat schopnost těchto plazmidů přenášet geny rezistence k dalším skupinám antibiotik, stanovit primární nukleotidovou sekvenci vybraných plazmidů a zhodnotit vliv koncentrace fluorochinolonů, fáze růstu a teploty na schopnost horizontálního přenosu těchto plazmidů v bakteriálních populacích.

Materiál a metodika

Studován byl soubor 72 plazmidů nesoucích PMQR geny, které byly získány z izolátů bakterií čeledi Enterobacteriaceae charakterizovaných v našich předchozích studiích. Tyto izoláty pocházely z různých hostitelů (hospitalizovaní pacienti, zdravá humánní populace, potravinová zvířata, zvířata chovaná ze záliby, volně žijící ptáci), prostředí (odpadní vody, čistírny odpadních vod) a geografických oblastí (Austrálie, ČR, Německo, Paraguay, Polsko, Slovensko, Španělsko).

Plazmidy byly nejprve zařazeny do skupin a podskupin inkompatibility (Inc) pomocí metod „PCR-based replicon typing“ (Carattoli et al., 2005) a pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) genu *taxC* (Johnson et al., 2012). Jeden plazmid skupiny inkompatibility IncI byl dále charakterizován pomocí metody „Plasmid Multi-locus Sequence Typing“ (pMLST) (García-Fernández et al., 2008). Příbuznost plazmidů v rámci jednotlivých podskupin inkompatibility IncX byla studována pomocí restriční analýzy s použitím enzymů *HincII* a *PstI* a pulzní gelové elektroforézy (PFGE). Přítomnost vybraných genů rezistence k dalším antibiotikům mimo fluorochinolony byla zjišťována pomocí PCR a Sangerova sekvenování.

Z homologických skupin plazmidů bylo vybráno devět reprezentativních plazmidů IncX a jeden plazmid IncI, u nichž byla stanovena primární struktura pomocí nové generace sekvenování na přístroji Illumina MiSeq a následným zaplněním mezer pomocí PCR a Sangerova sekvenování. Kompletní sekvence plazmidů byly sestaveny a anotovány pomocí bioinformatických nástrojů Geneious 9.1.7 a volně dostupných databází (GenBank, RAST, ISFinder, aj.). Získané sekvence plazmidů byly vloženy do databáze GenBank.

U těchto vybraných devíti plazmidů IncX byla zjišťována frekvence horizontálního přenosu konjugací z donorového kmene *Escherichia coli* TOP10 do recipientního kmene *E. coli* A15 definovaná jako počet kolonií transkonjuganta na počet kolonií recipienta, a byl ověřen vliv různých fází růstu (logaritmická, exponenciální, stacionární) na frekvenci konjugace. U vybraných dvou zástupců dominantních plazmidových linií byl rovněž sledován vliv různých teplot (25, 30, 37 °C) a různých koncentrací ciprofloxacinu (v subinhibičních až inhibičních koncentracích 0,001; 0,05; 0,5; 2 mg/L) na frekvenci konjugace.

Výsledky

Studované plazmidy nesoucí geny rezistence k chinolonům byly zařazeny do skupin inkompatibilit I1 (1), X1 (45), X2 (19), X2-I1 (2), X3 (4) a X3-N (1). Metodou pMLST byl plazmid IncI1 zařazen do sekvenčního typu ST136. Plazmidy skupin IncX při restriční analýze vykazovaly celkem 23 různých restričních profilů odpovídajících vysoce příbuzným homologickým skupinám plazmidů. Na plazmidech byly nalezeny geny rezistence k beta-laktamům [*bla*_{TEM-1} (45 plazmidů), *bla*_{TEM-52b} (2), *bla*_{TEM-135} (1), *bla*_{TEM-176} (4), *bla*_{SHV-12} (4)], karbapenemům [*bla*_{NDM-4} (1), *bla*_{IMP-4} (1)], aminoglykosidům [*aacA4* (1), *aadA1* (3), *aadA2* (4)], amfenikolům [*floR* (2), *catB3* (1)], sulfonamidům [*sul1* (1), *sul3* (3)], makrolidům [*mph(A)* (1)], kvartérním amoniovým sloučeninám [*qacG2* (1)] a tetracyklinům [*tetA(A)* (11)]. Na základě těchto charakteristik byly definovány ve zkoumaném vzorku dvě dominantní linie plazmidů. První linie zahrnovala 36 plazmidů skupiny inkompatibility

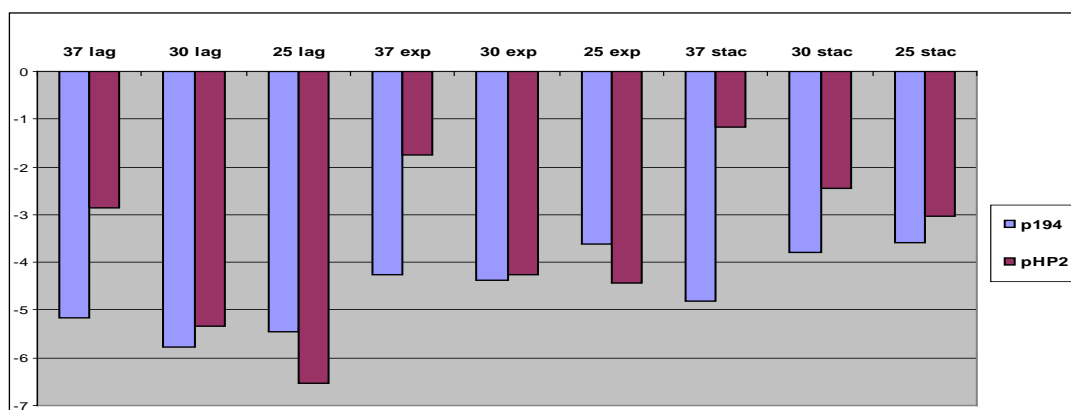
IncX1, stejného restričního profilu a nesoucích geny rezistence *qnrS1* a *bla_{TEM-1}*. Tyto plazmidy byly nalezeny v širokém spektru izolátů z volně žijících, zájmových a potravinových zvířat a z odpadních vod v Austrálii, České republice, Španělsku a Polsku. Jako reprezentativní zástupce této skupiny pro další analýzy byl vybrán plazmid **pHP2**. Druhá linie, do které patřilo devět plazmidů z volně žijících zvířat v České republice a Polsku s identickým restričním profilem, které patřily do skupiny inkompatibility IncX2 a nesly geny rezistence *qnrS1* a *tet(A)*. Reprezentativním zástupcem této skupiny byl plazmid **p194**.

Deset vybraných plazmidů bylo kompletně sekvenováno (Tab. 1) a byla u nich zjišťována frekvence horizontálního přenosu konjugací. Nejvyšší frekvenci konjugace ve všech fázích růstu bakterií vykazoval plazmid pHP2. V lag fázi růstové křivky byla frekvence horizontálního přenosu u všech testovaných plazmidů výrazně nižší než v exponenciální a stacionární fázi (Tab. 1).

plazmid	Inc	RFLP profil	velikost (bp)	geny AR	lag	exp	stac
pHP2	X1	A1	47,686	<i>qnrS1, bla_{TEM-1}</i>	$1,41 \times 10^{-3}$	$1,76 \times 10^{-2}$	$6,98 \times 10^{-2}$
pCE1551	X1	A5	56,600	<i>qnrS1, bla_{TEM-1}, aadA1, floR, sul3</i>	$7,59 \times 10^{-5}$	$4,00 \times 10^{-3}$	$8,04 \times 10^{-3}$
pCE780h4	X1	B	60,848	<i>qnrS1, bla_{TEM-1}, aadA1, floR</i>	$6,42 \times 10^{-5}$	$3,70 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-2}$
p194	X2	a1	39,584	<i>qnrS1, tetA(A)</i>	$7,11 \times 10^{-6}$	$5,35 \times 10^{-5}$	$1,53 \times 10^{-5}$
p615cip	X2	c2	31,584	<i>qnrB19</i>	$1,19 \times 10^{-5}$	$4,08 \times 10^{-5}$	$4,71 \times 10^{-5}$
pHP103	X2	d	35,056	<i>qnrS2</i>	$3,14 \times 10^{-5}$	$6,67 \times 10^{-5}$	$4,60 \times 10^{-5}$
pHE40	X2	b2	45,484	<i>qnrS1, bla_{TEM-1}, aadA2</i>	$1,41 \times 10^{-8}$	$2,43 \times 10^{-7}$	$3,45 \times 10^{-7}$
pCE1594	X2	e2	43,897	<i>qnrS1, bla_{TEM-176}</i>	$5,34 \times 10^{-9}$	$1,82 \times 10^{-7}$	$3,47 \times 10^{-8}$
p1456h8	X3	δ	45,645	<i>qnrS1, bla_{SHV-12}</i>	$3,19 \times 10^{-8}$	$4,32 \times 10^{-8}$	nt
pEc42	I1	nt	112,530	<i>qnrB2, bla_{IMP-4}, aacA4, catB3, sul1, mphA, qacG2</i>	nt	nt	nt

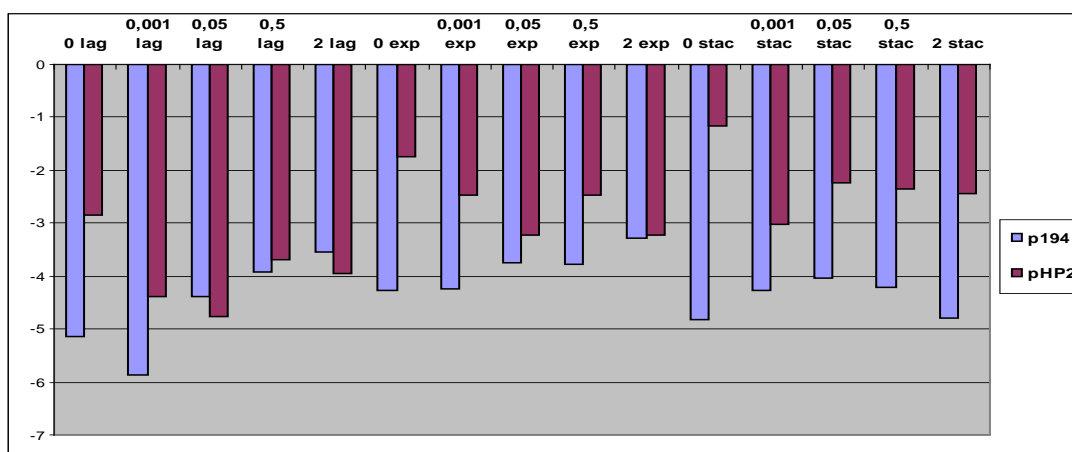
Tabulka 1: Základní charakteristiky sekvenovaných plazmidů. lag, exp, stac - frekvence konjugace v lag fázi, exponenciální fázi a stacionární fázi růstové křivky. nt - netestováno

U dvou plazmidů z dominantních linií (p194, pHP2) byl dále studován vliv teploty a různých koncentrací ciprofloxacinu na frekvenci horizontálního přenosu. U plazmidu p194 byl patrný pozitivní vliv nižší teploty na frekvenci konjugace, zejména ve stacionární a částečně v exponenciální fázi. U plazmidu pHP2 byl vliv teploty opačný, nejvyšší frekvence konjugace byla zjištěna při nejvyšší testované teplotě 37 °C (Obr. 1).



Obrázek 1: Vliv teploty na frekvenci horizontálního přenosu testovaných plazmidů.

S rostoucí koncentrací ciprofloxacinu se frekvence konjugace u plazmidu p194 zvyšovala (zejména v lag a exponenciální fázi), zatímco u plazmidu pHP2 spíše snižovala (Obr. 2). Souhrnně tedy lze říci, že u plazmidu p194 ze skupiny IncX2 působení stresových faktorů vedlo ke zvýšení frekvence přenosu, zatímco u plazmidu pHP2 ze skupiny IncX1 byl trend spíše opačný.



Obrázek 2: Vliv koncentrace fluorochinolonů na frekvenci horizontálního přenosu testovaných plazmidů.

Závěry

V rámci práce jsme úspěšně charakterizovali rozsáhlý soubor plazmidů nesoucích PMQR geny, prokázali jsme jejich vazbu s geny rezistence k dalším skupinám antibiotik. Prozkoumali jsme primární strukturu vybraných plazmidů a zjistili jsme, že stresové faktory (teplota, koncentrace antibiotik) mají na jejich schopnost horizontálního přenosu významný vliv.

Seznam literatury:

- CARATTOLI, Alessandra, BERTINI, Alessia, VILLA, Laura, FALBO, Vincenzo, HOPKINS, Katie L. a THRELFALL, E. John. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. 2005, **63**(3), s. 219-228.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, Aurora, CHIARETTO, Giuseppina, BERTINI, Alessia, VILLA, Laura, FORTINI, Daniela, RICCI, Antonia a CARATTOLI, Alessandra. Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008, **61**(6), s. 1229-1233.
- JACOBY, George A., STRAHILEVITZ, Jacob a HOOPER, David C. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology Spectrum*. 2014, **2**(5), s. 1-42.
- JOHNSON, 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**, s. 43-50.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, José M., MACHUCA, Jesús, ELIECER CANO, María, CALVO, Jorge, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, Luis a PASCUAL, Alvaro. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resistance Updates*. 2016, **29**, s. 13-29.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 226/2017/FVHE.

Vliv konzervantů na údržnost vaječných melanží

Lenka Necidová¹, Šárka Bursová¹, Haruštiaková Danka², Veronika Polková¹, Jan Strejček¹

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

Úvod

Vejsce jsou z hlediska výživy člověka jednou z nejdůležitějších potravin, protože jsou bohaté na vitamíny, minerály, mastné kyseliny a bílkoviny. V posledních letech je v potravinářském průmyslu preferováno použití pasterovaných vaječných produktů, jako jsou tekuté vaječné melanže, tekutý bílek nebo žloutek (Ratu et al., 2017). U vaječných melanží je pasterací redukována bakteriální mikroflóra a prodlužována trvanlivost těchto produktů (Nistor et al., 2016). Potravinová aditiva, zahrnující i konzervanty, která je možno používat v potravinách, jsou uvedena v nařízení (EU) 1129/2011. Výrobci vaječných melanží jsou často omezeni požadavky odběratelů a zákazníků, kteří odmítají stabilizátory potravin na chemické bázi.

Cílem této studie bylo zhodnotit efekt různých typů konzervantů na mikrobiologickou kvalitu a údržnost pasterovaných vaječných melanží skladovaných při 4 °C.

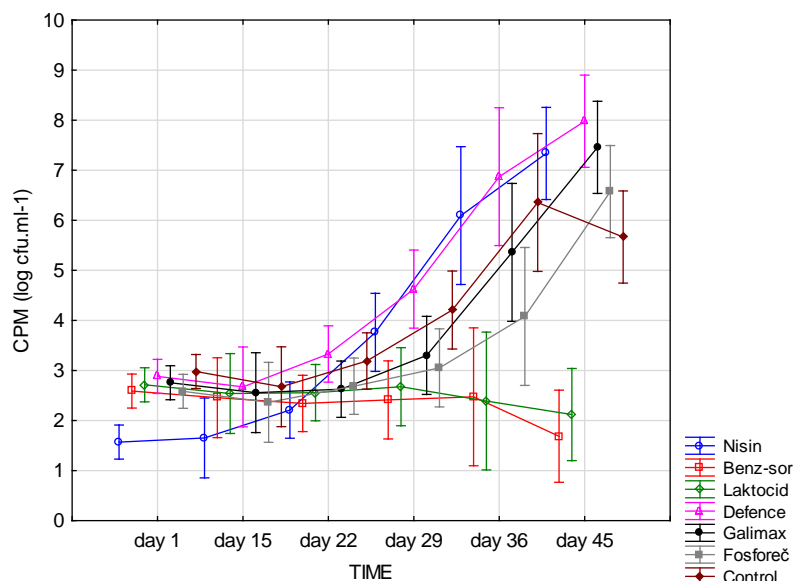
Materiál a metodika

Byly použity pasterované vaječné melanže (65 °C po dobu 3,5 min) s přidavkem tradičních nebo alternativních konzervantů. Vzorky byly dodány výrobcem vaječných melanží z ČR, a to v 5ti výrobních šarží pro každý konzervant včetně kontrolních vzorků (bez konzervantů). Vaječné melanže byly skladovány ve 4 °C po dobu 45 dnů. Mikrobiologické analýzy jednotlivých vzorků probíhaly 1., 15., 22., 29., 36. a 45. den skladování. Jako konzervanty byly použity: benzoan sodný (E211) ve směsi se sorbanem draselným (E202) v koncentraci 2 g + 2,5g/kg melanže, dále pak trifosfát (E451) (10 g na kg melanže). Alternativními druhy konzervantů byly nisin (E234; 0,25 g/kg), Laktocid (20 g/kg), Defence (2 g/kg) a Galimax Flavor V50 (14 g/kg). Mikrobiologické analýzy byly zaměřeny na stanovení celkového počtu mikroorganismů dle ISO 4833-1 (2014), bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-2; 2006), počtů bakterií mléčného kvašení (ISO 15214; 2000) a počtů kvasinek a plísní (ISO 21527-2; 2009).

Výsledky

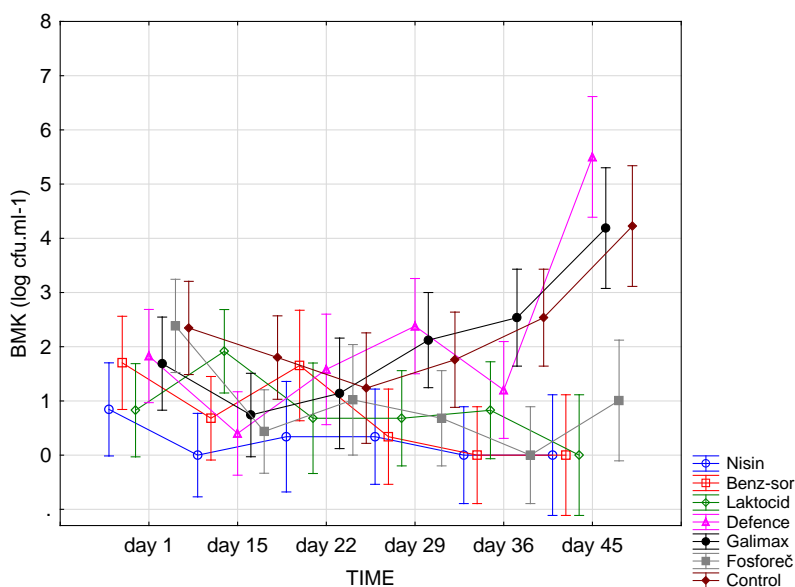
Výsledky v Grafu 1 ukazují vývoj celkového počtu mikroorganismů (CPM) (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty. Vliv vybraných konzervantů na počty CPM během jednotlivých odběrů 1. – 45. den (ANOVA pro opakovaná

měření, konzervant $P < 0,001$, čas $P < 0,001$, čas*konzervant $P < 0,001$). Počty CPM se významně lišily a dosahovaly nejnižších počtů u konzervantů benzoan-sorban a Laktocid.



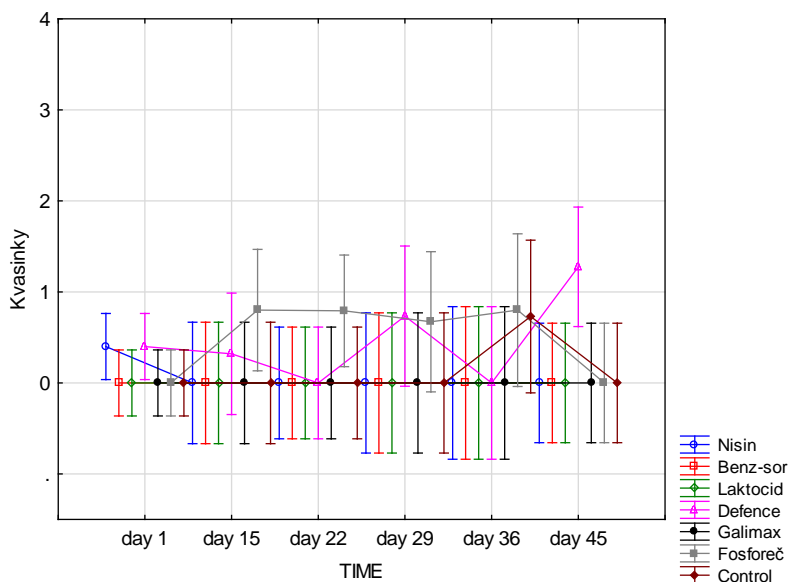
Graf 1 Celkový počet mikroorganismů (CPM) (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty

Výsledky v Grafu 2 ukazují vývoj počtu bakterií mléčného kvašení (BMK) (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty. Vliv konzervantů na počty BMK během jednotlivých odběrů 1. – 45. den (ANOVA pro opakovaná měření, konzervant $P < 0,001$, čas $P < 0,001$, čas*konzervant $P < 0,001$). Počty BMK na konci experimentu (45. den) ve vzorcích s benzoanem-sorbanem, Lactocidem, Defence a fosforečnany byly nižší než počty u ostatních vzorků a rozdíl byl významný.

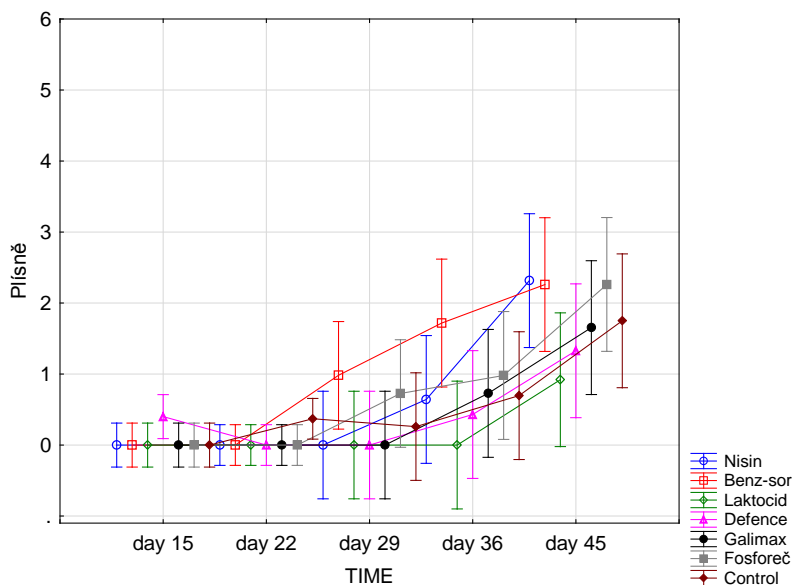


Graf 2 Počty bakterií mléčného kvašení (BMK) (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty

Výsledky v Grafu 3 ukazují vývoj počtu kvasinek (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty. Vliv konzervantů na počty kvasinek během jednotlivých odběrů 1. – 45. den (ANOVA pro opakovaná měření, konzervant $P = 0,027$, čas $P = 0,986$, čas*konzervant $P = 0,789$). Analýza vzorků z hlediska počtu kvasinek na konci experimentu nepotvrdila rozdíly v počtech u jednotlivých konzervantů.



Graf 3 Počet kvasinek (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty



Graf 4 Počet kvasinek (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty

Výsledky v Grafu 4 ukazují vývoj počtu plísní (průměr ± směrodatná odchylka) ve vaječných melanžích s různými konzervanty. Vliv konzervantů na počty plísní během jednotlivých odběrů 1. – 45. den (ANOVA pro opakovaná měření, konzervant $P = 0,072$, čas $P < 0,001$, čas*konzervant $P = 0,460$). Analýza vzorků z hlediska počtu plísní na konci experimentu nepotvrdila rozdíly v počtech u jednotlivých konzervantů.

Závěr

Výsledky studie ukázaly, že vliv konzervantů se projevil především na CPM a počtech BMK. Počty kvasinek a plísní nebyly použitými konzervanty ovlivněny. Jako nejvíce účinné se projevíly konzervanty benzoan-sorban a Laktocid (směs kyseliny mléčné a octové). S ohledem na prodloužení údržnosti vaječných melanží lze Laktocid doporučit jako alternativní konzervant.

Seznam literatury:

- 1) COMMISSION REGULATION (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union*, 2011, L 295, p. 1–177.
- 2) ČSN ISO 15214. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30 °C. Czech Standards Institute, 2000.
- 3) ČSN ISO 21527-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. Czech Standards Institute, 2009.
- 4) ČSN ISO 21528-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: Colony count method. Czech Standards Institute, 2006.
- 5) ČSN EN ISO 4833-1. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique. Czech Office for Standards, Metrology and Testing, 2014.
- 6) NISTOR, A.C., NISTOR (COTFAS), L.I., DUMINICĂ, C.G., USTUROI, M.G. Contributions to the knowledge of microbiological quality of pasteurized melange produced in Romania. *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 2016, vol. 72, no. 1, p. 139–142.
- 7) RATU, R.N., USTUROI, M.G., SIMEANU, D., SIMEANU, C., USTUROI, A., DOLIS, M.G. Research regarding dynamics of chemical content from pasteurized egg melange stored in polyethylene type packing. *Materiale Plastice*, 2017, vol. 54, no. 2, p. 368–374.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 212/2017/FVHE.

Snížení obsahu soli v pekařských výrobcích: strategie snižování obsahu sodíku a optimalizace technologických postupů

Martin Král¹, Martina Ošťádalová¹, Jana Pokorná¹, Dominika Kollárová, Michaela Lukášová,
Jana Procházková, Jana Zhejbalová

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

Úvod

Sůl hraje důležitou roli při vytváření specifického chuťového profilu potravy (Liemn a kol., 2011). Pozitivně ovlivňuje skladovatelnost, strukturu lepku a zpracovatelnost kynutých produktů. Účinek soli má přímý vliv na vlastnosti struktury těsta jako je konzistence, modul pružnosti, tažnost apod. (Beck a kol., 2012; Noort a kol. 2012). Sůl zpomaluje produkci plynu, aktivitu kvasinek a také má kontrolní účinek na fermentaci, která ovlivňuje barvu produktu (Noort a kol., 2012).

Sůl je jednou ze čtyř základních složek chleba a kynutých produktů a vyvolává velké obavy ohledně vážných zdravotních důsledků spojených s vysokým příjmem sodíku (Miller a Jeong, 2014). Podle zprávy SACN (2003) jsou hlavním zdrojem (téměř 40%) sodíku ve stravě produkty z obilovin, zejména chléb, sušenky, snídaňové cereálie, pečivo a koláče. Sodík ve stravě představuje důležitý prvek multifaktoriálních onemocnění. Světová zdravotnická organizace doporučuje denní příjem soli méně než 5 g (World Health Organization 2007).

Cílem této práce bylo studovat strukturu a účinek SODA-LO, stolních a mořských solí na parametry reologie těsta a vývoj plynových buněk při přípravě těsta.

Materiál a metodika

Komerčně vyráběné bílé pšeničné mouky typu "special 00 extra" byly zakoupeny od společnosti Mlýn, Havlíčkův Brod (Česká republika). Pšeničná mouka použitá při výrobě těsta měla 14,5% vlhkosti, 12,0% bílkovin, 3,0% vlákniny, 1,5% tuku a méně než 0,01% soli.

V našich studiích byly použity 3 různé soli:

- I: stolní sůl (solné mlýny Olomouc, Česká republika),
- II: mořská sůl GEMMA DI MARE (Compagnia, Itálie),
- III: SODA-LO Fine Salt TM (Tate & Lyle Company).

Byly studovány následující koncentrace přidaných solí: A: 0,40 %, B: 0,30 %, C: 0,25 % a D: 0,15 % z podílu mouky.

Příprava těsta

Modelové těsto bylo složeno z 52,06 % pšeničné mouky, 24,67 % vody, 10,27 % vajec, 6,17 % cukru, 4,36 % oleje a 2,47 % kvasinek.

Složky byly zváženy a smíchány ve spirálovém hnětači (Vorwerk Thermomix TM 31, Vorwerk & Co. Thermomix, GmbH, Wuppertal, Německo) a potom byla postupně přidána voda a těsto bylo hněteno po dobu 6 minut (3 min při nízké a 3 min při zvýšené rychlosti). Poté byla přidána sůl a složky byly hněteny po dobu dalších 4 min (2 min při nízké teplotě a 2 min při zvýšené rychlosti). Těsto odpočívalo 30 minut při pokojové teplotě (22 ± 2) zakryté fólií, aby se zabránilo vysychání na povrchu. Těsto se umístilo do fermentační komory (RV: 80%, $T = 32^\circ \text{C}$) po dobu 60 minut. Měření struktury a analýza obrazu byly prováděny na vzorcích těsta po míchání a 30 minutách odpočinku (T0); po dalších 30 minutách (T30) a 60 minut (T60) fermentace v komoře.

Analýza struktury soli

Struktura a velikost zkoumaných solí byla hodnocena pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) (VEGA-3, TESCAN ORSAY HOLDING, Česká republika).

Tvrдость těsta

Analýza tvrdosti těsta byla provedena pomocí TA.XTplus Texture Analyzer (Stable Micro Systems, UK) s použitím hliníkové sondy o průměru 45 mm (P / 45). Část těsta s tloušťkou 8 mm byla rozřezána na kotouče o průměru 55 mm. Tři disky každé formulace byly testovány a stlačeny až na 60 % jejich původní výšky rychlostí 1 mm / s podle Armero a Collar (1997).

Lepivost těsta

Připravené těsto bylo hodnoceno za použití Chen-Hoseney Cough-Stickness Rig, za použití 25 mm sondy s válcovou hlavou (P / 25P) a SMS / Chen-Hoseney tělové lepivosti (A / DSC) (Hoseney a Smewig, 1999).

Obrazová analýza těsta

Vzorky byly umístěny do Petriho misek. Pro snímání vzorků těsta byla použita kamera EOS 600D (Canon, Japonsko). Aby se zabránilo zkreslení dat, byly vybrány čtverečky o rozměrech 4 cm x 4 cm ve středu misky. Analýza obrazu těsta zahrnovala procentní podíl celkových

plynových buněk a celkovou plochu těsta a také procentní podíl plynových buněk rozdělených podle velikosti (v cm^2) do pěti různých tříd: (třída 1: 0-0.001; třída 2: 0,001-0,01; třída 3: 0,01-0,1; třída 4: 0,1-1 a třída 5:> 1).

Statistická analýza

Pro statistickou analýzu byl použit statistický software SPSS 20 (IBM Corporation, Armonk, USA).

Výsledky

Struktura zkoumaných solí je jedinečná a výrazně se od sebe liší. Stolní sůl je kubická se zaoblenými hranami, stejnou morfologií popisuje (Aquilano a kol., 2009; Ferreira a kol., 2005). Gemma - mořská sůl se vyznačuje ostrými hranami. Morfologie a velikost krystalů mořských solí je ovlivněna výrobní metodou používanou při jejich výrobě (Drake a Drake, 2011). SODA-LO má charakteristickou kulatou, dutou morfologii s relativně hladkým povrchem a toto zjištění je v souladu s tvrzením výrobce Tate a Lyle. Typ a morfologie jsou důležité faktory ovlivňující rychlost rozpouštění soli v médiích (Quilaqueo a Aguilera, 2015). Velikost krystalů byla přibližně 320 μm pro stolní sůl, 600 μm pro mořskou sůl a 20 μm pro SODA-LO.

Hodnoty tvrdosti těsta s použitím stolní soli v koncentraci A byly více než dvakrát vyšší než hodnoty SODA-LO. Stolová sůl vykazovala vyšší tvrdost těsta ve srovnání se všemi testovanými recepturami těsta s výjimkou SODA-LO, koncentrace C v T0 a T60.

S ohledem na množství soli byla pozorována vyšší hodnota lepivosti pro specifický čas fermentace u všech testovaných receptů těsta s výjimkou TaT0_C a D; GeT0_A; GeT60_A; a SoT0_D ve srovnání s koncentrací A. Absorpce vody se zvyšuje v těstě s vyššími koncentracemi soli, což vede ke snížení lepivosti těsta.

Procentuální podíl plynových buněk byl v rozmezí 5 % až 25 % u všech testovaných vzorků. Vysoký podíl plynových buněk byl zaznamenán v těstech s koncentrací C u stolní soli ve všech fázích fermentace. Na druhé straně byly zjištěny nízké hodnoty při těstě s mořské soli - Gemma B koncentraci a SODA-LO koncentraci A. Největší zastoupení plynových buněk bylo ve třídě 0-0.001, co představuje nejmenší velikostní třídu. Tato třída pokryla více než 50 % celkového množství plynu ve všech zkoumaných vzorcích a u SODA-LO v některých případech představovala až 86 %. Tyto výsledky odpovídají tvrzením Balestra a kol. (2015), který použil analýzu obrazu k vyhodnocení plynových buněk v těstech připravených různými způsoby fermentace. Zvýšení koncentrace soli nejpodstatněji ovlivnilo

třídy 0-0.001 a 0,001-01. Ve všech zkoumaných cestách je patrná korelace: větší velikostní třída - nižší množství plynových buněk.

Seznam literatury:

ARMEO, E., COLLAR, C. Texture properties of formulated wheat doughs. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und –Forschung A*, 1997, vol. 204, p. 136–145

AQUILANO, D., PASTERO, L., BRUNO, M., RUBBO, M. {100} and {111} forms of the NaCl crystals coexisting in growth from pure aqueous solution. *Journal of Crystal Growth*, 2009, vol. 311, p. 399–403.

BALESTRA, F., PINNAVAIA, G.G., ROMANI, S. Evaluation of the effects of different fermentation methods on dough characteristics. *Journal of Texture Studies*, 2015, vol. 46, no. 4, p. 262–271.

BECK, M., JEKLE, M., BECKER, T. Impact of sodium chloride on wheat flour dough for yeast leavened products. I. Rheological attributes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2012, vol. 92, p. 585–592.

DRAKE, S.L., DRAKE, M.A. Comparison of salty taste and time intensity of sea and land salts from around the world. *Journal of Sensory Studies*, 2011, vol. 26, p. 25–34.

FERREIRA, A., FARIA, N., ROCHA, F., FEYO de AZEVEDO, S., LOPES, A. Using image analysis to look into the effect of impurity concentration in NaCl crystallization. *Chemical Engineering Research and Design*, 2005, vol. 83, p. 331–338.

HOSENEY, R.C., SMEWING, J.O. Instrumental measurement of stickiness of doughs and other foods. *Journal of Texture Studies*, 1999, vol. 30, p. 123–136.

LIEM, D.G., MIREMADI, F., KEAST, R.S.J. Reducing sodium in foods: The effect on flavor. *Nutrients*, 2011, vol. 3, p. 694–711.

MILLER, R.A., JEONG, J. Sodium reduction in bread using low-sodium sea salt. *Cereal Chemistry*, 2014, vol. 91, p. 41–44.

NOORT, M.W., BULT, J.H., STIEGER, M. Saltiness enhancement by taste contrast in bread prepared with encapsulated salt. *Journal of Cereal Science*, 2012, vol. 55, p. 218–225.

QUILAQUEO, M., AQUILERA, J.M. Dissolution of NaCl crystals in artificial saliva and water by video-microscopy. *Food Research International*, 2015, vol. 69, p. 373–380.

SACN report, Salt and health. Scientific advisory committee on nutrition. The Stationary Office, 2003, Norwich, UK.

World Health Organization, Reducing Salt Intake in Populations: Report of a WHO Forum and Technical Meeting. 2007 *WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.*

Tato práce byla financovaná grantem IGA 215/2017/FVHE.

Příspěvky
Farmaceutické fakulty

Hodnocení tabletovin a tablet získaných ze společně zpracovaných směsí

Pavλίna Vodáčková, Aleš Franc, Jana Hořínková

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

Úvod

Optimálními vlastnostmi společně zpracovaných směsí (CPE), určených k přímému lisováním tablet, jsou zejména jejich dobré tokové, lisovací a zředňující schopnosti, nutné pro zajištění bezproblémové a rychlé výroby výlisků o lékopisné kvalitě (1). Směsi musí navíc zůstat chemicky a fyzikálně stálé, odolné proti působení zvýšené teploty, vlhkosti a mechanickému poškození. Tokové vlastnosti záleží především na velikosti, hustotě a tvaru částic. Lisovací vlastnosti se odvíjejí od deformovatelnosti a schopnosti zahuštění, a zředňovací vlastnosti (schopnost kompenzovat vliv účinných látek) od hustoty, měrného povrchu a tvaru jednotlivých CPE. Vedle toho je důležitá i fyziologická indiferentnost a kompatibilita CPE s účinnými látkami (2). Z tohoto důvodu by bylo velmi užitečné jak pro výrobce, tak pro výzkumné pracovníky, získat reprodukovatelné fyzikálně-chemické charakteristiky komerčně dostupných CPE. Tyto parametry je ovšem nutné poříditi stejnou metodikou na identických měřicích přístrojích, jelikož doposavad publikované studie často neposkytují srovnatelné výsledky (3-5). Rovněž se setkáváme s výrobky, u nichž tato nezávislá experimentální srovnání zcela chybí nebo jsou nedostatečná. Výsledky získané komplexní a nezávislou analýzou ze směsí i tablet umožní výrobcům výběr vhodné směsi CPE z nabízené škály produktů, které plánují použít pro výzkum či výrobu lékových forem s konkrétním léčivem.

Cílem projektu bylo experimentálně srovnat tzv. „společně zpracované“ směsí (CPE) pro přípravu tablet metodou přímého lisování. Výrobci tablet musí při jejich vývoji obvykle vycházet pouze z literárních údajů dostupných od jednotlivých výrobců CPE, které ovšem nemusí být vzájemně srovnatelné.

Materiál a metodika

Celkově bylo hodnoceno 10 nejčastěji komerčně vyráběných plniv od 6 různých výrobců řadou zkoušek. Z těchto směsí byly následně vylisovány metodou přímého lisování tablety, které byly taktéž testovány zejména na lékopisné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jmenovitě se jednalo o: Advantose[®] FS 95, Compressol[®] SM (SPI Pharma, USA); Avicel[®] CE 15, Avicel[®] DG a Avicel[®] HFE 102 (FMC Health Nutrition, USA); F-Melt[®] C (Fuji, Japan); Ludipress[®]

LCE (BASF, Germany); Microcelac[®] 100 (Meggle, Germany); Xylitab[®] 100, Xylitab[®] 200 (DuPont Nutrition & Health, USA).

Hodnocení CPE směsí

Avizované CPE směsi byly prve hodnoceny na běžné lékopisné fyzikální veličiny, které se používají ve farmaceutické technologii. Jednalo se o *sítovou analýzu, mikroskopickou analýzu, sypný a setřesný objem, zdánlivou a pravou hustotu* a z nich vyplývající veličiny jako *Hausnerův poměr a Carrův index stlačitelnost, rychlost vytékání otvorem, sypný úhel a úhel skluzu*. Vedle lékopisných zkoušek byly CPE směsi hodnoceny na další fyzikálně chemické veličiny, a to *vlhkost, hygroskopicitu, rozpustnost, pH výluhu a elektrostatický náboj, DSC, elektronová mikroskopie, měření distribuce velikosti částic na suché cestě a specifický měrný povrch metodou BET*. Fyzikálně lékopisné charakteristiky byly hodnoceny dle ČL 2009. Nelékopisné metodiky jsou uvedeny v odborných publikacích (6, 7).

Příprava tabletoviny a tablet

Celkem 100 g CPE obsahující 1 % stearylfulmarátu sodného jakožto kluzné látky se prošlo přes síto o velikosti ok 0,250 µm. Pomocí homogenizačního zařízení Turbula se vzniklá směs nechala mísit po dobu 5 min rychlostí 40 ot/min. Lisování tablet z tabletoviny probíhalo na výstředníkovém tabletovacím lisu. Bylo použito razidlo vytvářející tablety plochého tvaru o průměru 7 mm, požadovaná hmotnost tablet byla 200 mg a lisovací síla 3 kN.

Hodnocení tablet

Výlisky tablet z jednotlivých CPE směsí byly hodnoceny na běžné lékopisné fyzikální veličiny dle metodiky ČL 2009, které se používají ve farmaceutické technologii. Jedná se o hmotnostní stejnoměrnost, rozpad, mechanickou odolnost oděrem a mechanickou pevnost. Dále byla externě provedena elektronová mikroskopie.

Výsledky

Výsledky většiny jednotlivých měření směsí i výlisků shrnuje tabulka 1 a 2 a jsou součástí odborných publikací (6, 7). Tyto hodnoty mohou posloužit výrobcům tablet k tomu, aby mohli, skrze srovnání vlastností jednotlivých CPE, zvolit odpovídající formulaci s konkrétní účinnou látkou. Hodnoty byly získány vždy stejnou metodikou, a proto mají větší vypovídající hodnotu než ty, které uvádějí jednotliví výrobci či odborné publikace, kdy bylo

často užito metod odlišných. Práce navíc uvádí i hodnoty, jako jsou *hygroskopicitu, rozpustnost, pH výluhu a elektrostatický náboj směsí, které zatím u těchto směsí nebyly hodnoceny.*

CPE směsi	Advan- tose FS95	Avicel CE 15	Avicel DG	Avicel HFE 102	Compre- ssol SM	F-Melt C	Ludipress LCE	Microce- Lac 100	Xylitab 100	Xylitab 200
Fw [g.s ⁻¹]	28.37	NA	NA	11.2	18.25	16.86	20.94	13.51	27.4	27.03
θ_r [°]	31.38	NA	NA	30.67	26.52	23.22	36.05	24.66	22.88	29.25
θ_s [°]	11.82	39.00	40.67	37.33	8.90	8.26	9.57	31.67	11.64	11.48
HR	1.143	1.24	1.33	1.24	1.14	1.15	1.15	1.15	1.10	1.11
CI	12.55	19.46	24.98	19.19	12.18	13.30	12.67	13.23	8.63	10.15
DB [g.ml ⁻¹]	0.58	0.50	0.3	0.41	0.50	0.54	0.51	0.49	0.60	0.59
DT [g.ml ⁻¹]	0.67	0.62	0.50	0.51	0.57	0.63	0.59	0.56	0.66	
DP [g.ml ⁻¹]	1.61	1.40	2.86	1.58	1.48	1.52	1.52	1.57	1.53	1.48
MPS [μm]	296.4	111.77	123.00	145.00	138.32	156.09	196.77	158.3	258.57	326.75
D₁₀ [μm]	122.17	21.55	22.55	41.93	63.67	62.54	36.80	42.46	79.15	140.02
D₅₀ [μm]	278.55	99.73	74.38	132.16	134.00	147.45	160.57	153.39	237.30	334.26
D₉₀ [μm]	502.44	221.06	276.8	267.37	210.81	261.58	427.73	269.83	468.67	499.66
SSA [m ² .g ⁻¹]	0.30	0.50	1.20	0.60	0.90	0.80	0.10	1.00	0.20	0.20
M [%]	0.37	4.66	3.35	3.28	0.11	0.78	0.66	1.14	0.21	0.11
UF₃ [%]	0.32	0.98	0.92	0.95	0.29	0.59	0.35	0.62	0.30	0.27
UF₂₄ [%]	0.22	0.26	0.65	0.89	0.02	0.41	0.13	0.44	0.06	0.04
pH	6.79	5.52	7.19	6.99	7.54	7.83	7.68	6.69	7.32	7.22

Tabulka 1: Výsledky hodnocení CPE směsí

Fw - sypnost; θ_r - sypný úhel (tg α); θ_s - úhel kluzu; HR – Hausnerův poměr; CI – index stlačitelnosti; DB - sypná hustota; DT - setřesná hustota; DP - pyknometrická hustota; MPS – střední průměr částic; D₁₀, D₅₀, D₉₀ - distribuce velikosti částic 10, 50 a 90 % z měřených; SSA - specifický měrný povrch; M – vlhkost; UF₃ - nerozpustná frakce po 3 min; UF₂₄ - nerozpustná frakce po 24 hodinách; pH (2% roztok); N/A – neměřitelné

Tablety	Advan- tose FS95	Avicel CE 15	Avicel DG	Avicel HFE 102	Compr e-ssol SM	F- Melt C	Ludipre ss LCE	Microc e-Lac 100	Xylita b 100	Xylita b 200
UM [mg]	198.89	199.7 5	200.4 6	200.97	198.89	201.0 2	198.80	199.78	199.9 2	199.8 4
DI [min]	10.17	2.15	0.28	4.03	3.55	0.22	0.75	0.27	0.75	3.78
FR [%]	1.03	2.56	0.10	0.01	0.90	0.26	6.53	0.33	0.66	0.71
ST [mPa]	1.58	0.74	3.54	5.62	1.00	1.68	0.34	1.57	1.69	1.08

Tabulka 2: Výsledky hodnocení tablet

UM - hmotnostní stejnoměrnost; DI - rozpad; FR - oděr; ST - pevnost

Seznam literatury

- 1) Gohel, M.C.: A review of co-processed directly compressible excipients. *J Pharm Pharmaceut Sci.* 2005, 8(1), 76-93.
- 2) Goyanes, A., Souto, C. a Martínez-Pacheco, R. Co-processed MCC-Eudragit[®] E excipients for extrusion–spheronization. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2011, 79(3), 658-663.
- 3) Chauhan, S. I., Nathwani, S. V., Soniwala M. M. a Chavda J. R.. Development and Characterization of Multifunctional Directly Compressible Co-processed, Excipient by Spray Drying Method. *AAPS PharmSciTech.* 2017, 18(4), 1293-1301.
- 4) Nachaegari S.K. a Bansal A.K.: Co-processed excipients for solid dosage forms. *Pharm. Technol.* 2004, 28, 52-64.
- 5) Chowdary, K.P.R. a Ramya K.: Preparation, characterization and evaluation of a new co-processed excipient as directly compressible vehicle in tablet formulation. *JGPTS.* 2013, 4(4), 1322-1328.
- 6) Vodáčková, P., Franc, A. a Kubalák, R. Co-processed excipients for direct compression of tablets. *Pracovní den Sekce technologie léků České farmaceutické společnosti ČLS JEP Pokroky v lékových formách, Brno, 7. 9. 2016.*
- 7) Vodáčková, P., Vraníková, B., Svačinová, P., Franc, A., Elbl, J., Muselík, J., Kubalák, R. a Solný, T. Evaluation and comparison of three types of spray dried co-processed excipients Avicel[®] for direct compression. *BioMed Research International* (v recenzním řízení)

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 301/2017/FaF.

Izolácia a identifikácia flavonoidov a terpenoidov z *Coleus caninus* (Roth.) Vatke a *Coleus aromaticus* Benth

Sabína Jurkaninová, Renata Kubínová

Ústav prírodných liečiv, Farmaceutická fakulta, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Rod *Coleus* (*Lamiaceae*) zahŕňa viac ako 300 druhov rastlín pochádzajúcich z tropických a subtropických oblastí juhovýchodnej Ázie a Afriky. Rastliny tohto druhu oplývajú širokou škálou farieb a rôznym tvarom listov. Pestujú sa ako okrasné rastliny v Európe.

Druhy rodu *Coleus* sú hojne využívané v ľudovom liečiteľstve, medzi najúčinnšie patrí *Coleus aromaticus* Benth. Jeho extrakty sa používajú hlavne v južnej Amerike v terapii bakteriálnych, zápalových a nádorových ochorení [1]. U druhu *Coleus caninus* (Roth.) Vatke sa štúdie zameriavajú na antimikrobiálnu a antiflogistickú aktivitu vysvetľujúce jeho tradičné využitie v liečbe prechladnutia a infekcie kože, zubov a ďasien [2]. Tieto rastliny sú bohatými zdrojmi biologicky aktívnych látok prevažne zo skupiny fenylypropanoidov, flavonoidov a terpenoidov.

Materiál a metodika

Extrakcia, separácia a identifikácia

Rastlinný materiál bol získaný zo skleníka ÚPL FaF VFU v Brne. Nadzemné časti rastliny *C. aromaticus* Benth. (100g) a *C. caninus* (Roth.) Vatke (200g) boli extrahované metanolom. Zahustené extrakty boli rozpustené v metanole a separované. Izolácia jednotlivých látok prebiehala pomocou preparatívnej HPLC a stĺpcovej chromatografie.

NMR spektrá boli zaznamenávané použitím Bruker DRX-400 (400 MHz) (BRUKER, USA) v CDCl_3 . HPLC/DAD/MS analýza sa prevádzala pomocou zariadenia Agilent technologies 1100 na kolóne Supelcosil ABZ+Plus 150 x 4,6mm; veľkosť častíc 3 μm , gradientovou elúciou. Prietok 1 ml/min. Nástrek 10 μl . MS-ESI – negatívny mód. Semipreparatívna HPLC bola prevádzaná na kolóne Ascentis 25 x 2,5 cm, veľkosť častíc 5 μm , gradientovou elúciou. Prietok 4 ml/min. Nástrek 30 μl . Stĺpcová chromatografia bola vykonávaná v sklenenej kolóne s použitím silikagélu. Eluovala sa zmesou chloroformu

s metanolom so vzrastajúcou polaritou. Jednotlivé aktivity boli merané čítačkou mikrotitračných platničiek READER-om (BioTekSynergy HT, USA).

Stanovenie antioxidačnej aktivity

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

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

Stanovenie anti-hyaluronidázovej aktivity

Anti-hyaluronidázová aktivita bola testovaná Morgan-Elsonovou metódou [4] s menšími modifikáciami. Absorbancia zmesi sa stanovovala v 3 opakovaniach a bola meraná pri 585 nm. Slepá vzorka obsahovala namiesto enzýmu pufor, kontrola obsahovala methanol. Enzymová aktivita (%) bola počítaná podľa vzorca: $\% = [1 - ((A_{\text{vzorka}} - A_{\text{slepá}}) / A_{\text{kontrola}})] * 100$

Stanovenie anticyklooxygenázovej aktivity

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

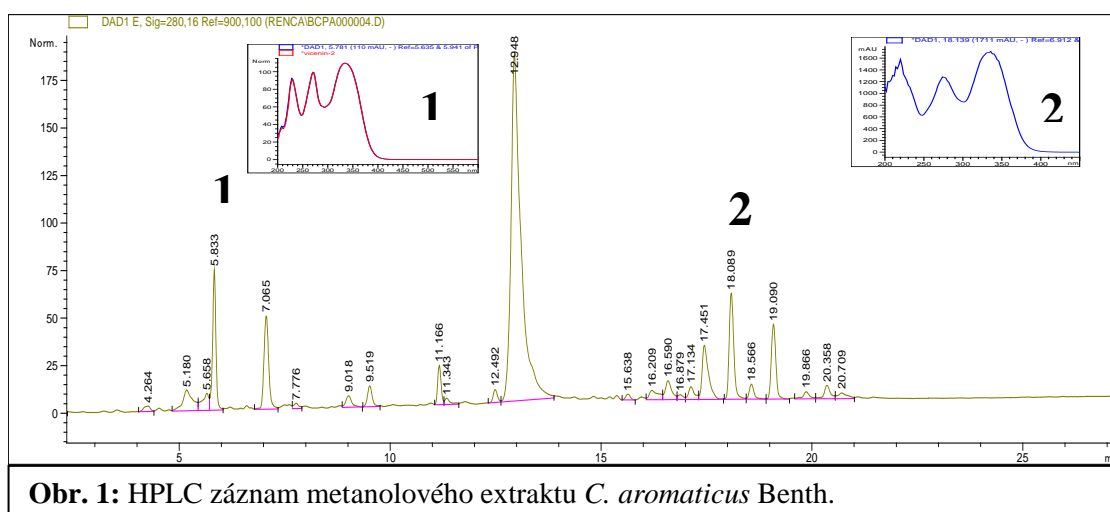
Stanovenie xantínoxidázovej inhibičnej aktivity

Xantínoxidázová inhibičná aktivita bola testovaná spektrofotometricky meraním produkcie kyseliny močovej z xantínu (1mM). Bola počítaná hodnota EC₅₀. Absorbancia zmesi sa stanovovala v troch opakovaniach a bola meraná pri 295 nm. Allopurinol bol použitý

ako štandard, metanol ako kontrola. Enzymová aktivita bola počítaná podľa vzorca: % = $[(A_{\text{vzorka}} - A_{\text{slepá}})/A_{\text{kontrola}}] * 100$

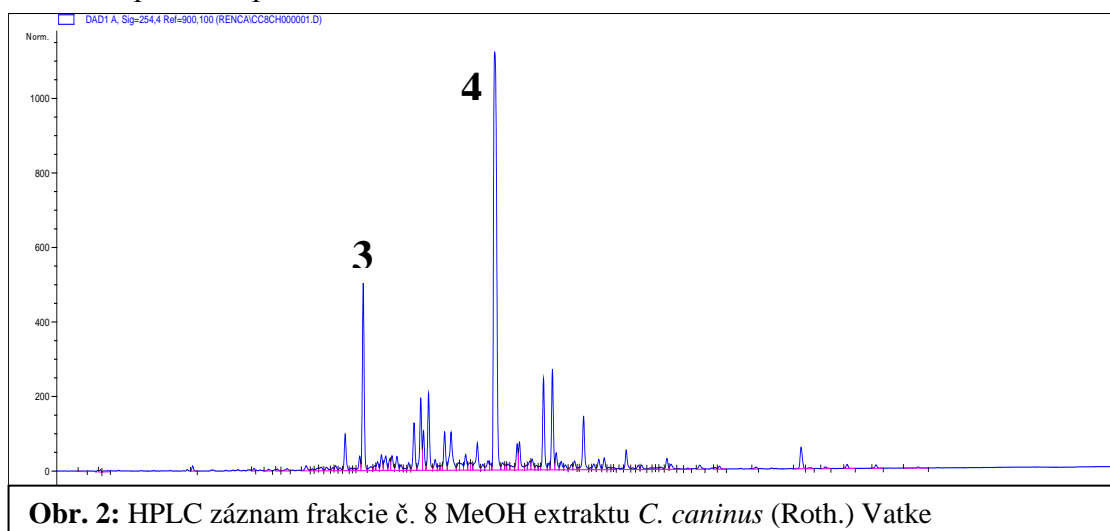
Výsledky

Z metanolového extraktu *C. aromaticus* Benth. (Obr. 1) sa nám semipreparatívnu HPLC podarilo vyizolovať dve látky, vicenín-2 (**1**) a cirsimaritin (**2**). Identifikácia prebehla porovnaním so štandardmi, pomocou MS spektroskopie a porovnaním s literatúrou. Ostatné obsahové látky tohto extraktu už boli izolované, identifikované a testované v rámci projektu IGA 305/2016/FAF.



Obr. 1: HPLC záznam metanolového extraktu *C. aromaticus* Benth.

Z frakcie č. 8 metanolového extraktu *C. caninus* (Roth.) Vatke (Obr. 2) sa nám podarilo semipreparatívnu HPLC vyizolovať dve látky; 3,12-bisdeacetylcoleon R (**3**) a 12-deacetylcoleon R (**4**). Frakcia č. 8 bola získaná stĺpcovou chromatografiou. Identifikácia týchto zlúčenín prebehla pomocou HPLC/DAD/MS a NMR.



Obr. 2: HPLC záznam frakcie č. 8 MeOH extraktu *C. caninus* (Roth.) Vatke

Jednotlivé látky boli podrobené testovaniu antioxidačnej aktivity (Tab. 1), inhibície voči enzýmom hyaluronidáze, xantínoxidáze a cyklooxygenáze (COX-1 a COX-2) (Tab. 2).

Tab. 1: Antioxidačná aktivita

Látky (60 μ M)	Peroxylový radikál (%)	Peroxynitrit (%)	Peroxid vodíka (%)	Superoxid (%)
vicenín-2	62,6 \pm 1,4	22,6 \pm 3,4	nezháša	10,6 \pm 1,4
cirsimaritin	23,9 \pm 3,8	28,5 \pm 0,9	47,1 \pm 4,9	68,9 \pm 5,4
3,12-bisdeacetylcoleon R	41,2 \pm 4,7	66,0 \pm 1,9	86,1 \pm 1,4	63,5 \pm 3,7
12-deacetylcoleon R	33,9 \pm 1,4	25,3 \pm 5,4	66,7 \pm 2,5	42,2 \pm 0,2

Tab. 2: Inhibícia enzýmov. Indometacin, kvercetin a allopurinol boli použité ako štandard. Látky sú v koncentrácii 200 μ M pre hyaluronidázu a 100 μ M pre COX a xantínoxidázu

Látka	COX-1 (%)	COX-2 (%)	hyaluronidáza (%)	xantínoxidáza (%)
vicenín-2	17,8 \pm 1,8	NI	33,7 \pm 4,8	7,9 \pm 2,4
cirsimaritin	NI	10,2 \pm 6,7	22,9 \pm 5,4	18,0 \pm 1,9
3,12-bisdeacetylcoleon R	22,1 \pm 8,5	3,2 \pm 2,9	18,6 \pm 4,2	25,5 \pm 3,6
12-deacetylcoleon R	23,0 \pm 1,8	8,1 \pm 6,1	11,4 \pm 2,9	22,2 \pm 3,4
indometacin	99,6 \pm 3,6	99,4 \pm 3,4		
kvercetin			89,5 \pm 0,7	
allopurinol				93,6 \pm 2,8

Záver

V rámci našej štúdie sa nám podarilo z *C. aromaticus* Benth. izolovať a identifikovať po prvýkrát z tohto druhu dva flavonoidy, cirsimaritin, a vicenín-2. Druh *C. caninus* (Roth.) Vatke obsahuje vo svojich listoch žlté žľazy, ktoré sú bohatým zdrojom acetylovaných coleonov. Nám sa podarilo izolovať a identifikovať 12-deacetylcoleon R a po prvýkrát z rastlinného materiálu 3,12-bisdeacetylcoleon R, ktoré sú len miernymi inhibítormi testovaných enzýmov. Dôvodom je acetylácia hydroxylových skupín viazaných na skelet abietánu, ktorá potláča ich inhibičnú účinnosť.

Zoznam literatúry:

1. NIRMALA DEVI, K. – PERIYANAYAGAM, K.: In vitro anti inflammatory activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng by Hrbc membrane stabilization. In *Int J Pharm Studies Res.*2010, vol.1, p.26-29.
2. BORGES, G.A. et al.: Cytotoxic effect of *Plectranthus neochilus* extracts in head and neck carcinoma cell lines. In *Afr J Pharm Pharmacol.* 2016, vol.10,p.157-163.
3. YEUNG, S.Y. et al. Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxylradicals. In *Food Chem Toxicol.* 2002, vol.40, no.10, p.1403-1413.
4. RAHMAN, A. – CHOUDHARY, M. I. – THOMSEN, W. J . *Bioassay Techniques for Drug Development.* Harwood Academic Publishers, 2001. 139p. ISBN 90-5823-051-1.

Táto práca bola financovaná grantom IGA VFU Brno 303/2017/FAF

Izolace a identifikace obsahových látek *Sceletium tortuosum* s předpokládanou antiflogistickou aktivitou

Alice Sychrová¹, Veronika Rjašková¹, Markéta Mrzenová¹, Jan Hošek², Marie Pokorná¹, Emil Švajdlenka¹, Karel Šmejkal¹

*Ústav přírodních léčiv¹, Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie²,
Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Sceletium tortuosum (Aizoaceae) je jihoafrická sukulentní rostlina tradičně užívaná pro mírně analgetické a náladu pozměňující účinky.^{1,2} Doposud známé obsahové látky *S. tortuosum* patří mezi alkaloidy mesembrinového typu. Některé z alkaloidů jsou inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (mesembrin, mesembrenol) nebo fosfodiesterázy 4A a 4B (mesembrenon)^{3,4}. Novější studie zmiňuje jako primární mechanismus antidepresivního účinku spíše uvolnění monoaminů než inhibici zpětného vychytávání serotoninu^{1,5}.

V předchozím projektu jsme u lipofilní frakce methanolického extraktu *S. tortuosum* zjistili slibnou protizánětlivou aktivitu. Tři z těchto frakcí byly separovány sloupcovou chromatografií. Cílem tohoto projektu byla izolace a identifikace látek ze získaných subfrakcí, které by mohli být potenciálně odpovědné za protizánětlivou aktivitu.

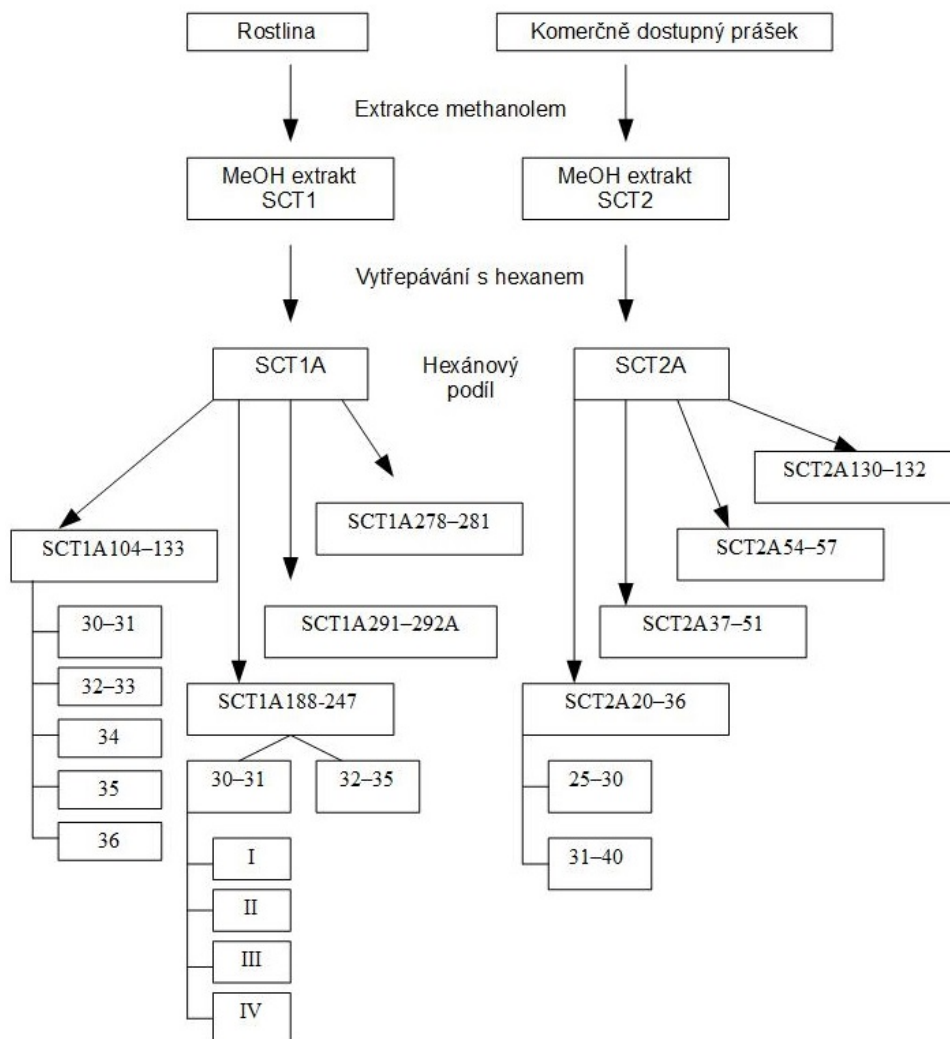
Materiál a metodika

K izolaci látek byly použity frakce získané separací methanolického extraktu *S. tortuosum* (zpracováno v rámci projektu IGA č. 320/2016/FaF). Z důvodu finanční náročnosti kitů na testování protizánětlivé aktivity a časové náročnosti izolace látek byla protizánětlivá aktivita otestována

jen u některých subfrakcí. Další separace byla provedena u frakcí SCT1A104–133, SCT1A188–247

a SCT2A20–36 sloupcovou chromatografií a ze získaných podílů byly izolované látky pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie (viz obr. č. 1). Protizánětlivá aktivita byla otestována u frakcí SCT1A278–281, SCT1A291–292A, SCT2A37–51, SCT2A54–57 a SCT2A130–132.

Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel hexan-chloroform-methanol v různých poměrech. Jako stacionární fáze byl použit u sloupcové chromatografie silikagel o velikosti zrn 40–63 μm , u preparativní tenkovrstvé chromatografie byly použity skleněné desky se silikagelem 60 F, 20×20 cm, 500 μm (Merck), u analytické tenkovrstvé chromatografie desky Silikagel 60 F₂₅₄, 20×20 cm, 0,2 mm (Merck).



Obr. č.1 Schéma separace vzorků

Na testování protizánětlivé aktivity byl použit COX Colorimetric Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA), který měří aktivitu peroxidázového komponentu COX kolorimetricky na základe přítomnosti oxidovaného N,N,N',N'-tetramethyl-*p*-fenylendiaminu při 590 nm. Jako standard byl použit indometacin. Procento inhibice bylo stanoveno při koncentraci extraktů 20 $\mu\text{g/ml}$.

Identifikace látek byla provedena NMR spektroskopii a hmotnostní spektroskopii. Byl použit NMR spektrometr Jeol ECZR 400 MHz.

Výsledky

Separací frakce SCT1A104–133 bylo získáno 36 frakcí. Frakce 30–31, 32–33, 34, 35 a 36 budou ještě dočištěny pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie.

Separací frakce SCT1A188-247 bylo získáno 36 frakcí. Z frakce 30–31 byly preparativní tenkovrstvou chromatografií získány celkem 4 látky, z nichž jenom jedna byla získána v množství postačujícím k identifikaci. Frakce 32–35 byla shledána dostatečně čistou k identifikaci.

Separací frakce SCT2A20–36 bylo získáno celkem 51 frakcí. Frakce 25–30 byla shledána dostatečně čistou k identifikaci. Z frakce 31–40 budou izolovány dvě látky pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie.

V současné době ještě probíhá identifikace izolovaných látek a vyhodnocování naměřených údajů.

Tab.č.1 Izolované látky, jejich hmotnost a vlastnosti

Látka	Hmotnost [mg]	Vlastnosti
SCT1A188–247/30–31/I	14	Bílý prášek, rozpustný v chloroformu
SCT1A188–247/30–31/II	2	Bílý prášek, rozpustný v chloroformu
SCT1A188–247/30–31/III	1,6	Bílý prášek, rozpustný v chloroformu
SCT1A188–247/30–31/IV	1,3	Bílý prášek, rozpustný v chloroformu
SCT1A188–247/32–35	93	Bílé lesklé krystalky, rozpustné v chloroformu
SCT2A20–36/25–30	168,5	Bílý prášek, rozpustný v chloroformu

Z pěti frakcí, u kterých byla testována protizánětlivá aktivita, nevykazovala žádná frakce schopnost významně inhibovat cyklooxygenázu 2 (tab. č.2). Frakce SCT2A54–57 a SCT2A130–132 byly z měřených frakcí nejaktivnější vůči cyklooxygenáze 1. Nicméně pro dosažení protizánětlivého efektu je esenciální právě inhibice COX2, která zodpovídá za tvorbu prozánětlivých cytokinů a mediátorů bolesti, kdežto COX1 plní řadu fyziologických funkcí. Proto selektivní inhibice COX1 není žádoucí. Můžeme tedy soudit, že v námi

testovaných extraktech se nenachází látky s protizánětlivou aktivitou vázanou na cyklooxygenázu.

Tab.č.2 Výsledky testování protizánětlivé aktivity metodou inhibice COX

Extrakt	% inhibice COX-1	SD [%]	% inhibice COX-2	SD [%]
SCT1A278–281	4,9	± 6	-2	± 5
SCT1A291–292 A	5,6	± 11	5	± 2
SCT2A54–57	15,35	± 11	6	± 8
SCT2A37–51	11,9	± 5	-7	± 4
SCT2A130–132	23,7	± 12	11	± 21

Závěr

Sloupcovou chromatografií byly rozděleny celkem tři frakce získané v předchozím projektu. Ze získaných subfrakcí bylo preparativní tenkovrstvou chromatografií izolováno celkem 6 látek, z toho tři v dostatečném množství a čistotě potřebné k identifikaci. V současnosti probíhá jejich identifikace. Pět extraktů bylo otestováno na protizánětlivou aktivitu metodou inhibice COX. Žádný z testovaných extraktů neprokázal významnou inhibici COX2, dva extrakty prokázaly mírnou inhibici COX1. Z naměřených údajů usuzujeme, že v testovaných extraktech se nenacházejí látky s protizánětlivou aktivitou. Byla však testována jenom inhibice cyklooxygenázy. V rozvoji zánětu se kromě cyklooxygenázy uplatňuje i lipooxygenáza a různé prozánětlivé cytokiny, jako interleukiny, tumor nekrotizující faktor nebo interferon gama. Vliv obsahových látek *S. tortuosum* na tyto mediátory, jejich syntézu a uvolňování zatím nebyl objasněn.

Seznam literatury:

- [1] Gericke N., Viljoen A.: Sceletium – A review update. In Journal of Ethnopharmacology 2008, 119, 653–663.
- [2] Krstenansky John L.: Mesembrine alkaloids: Review of their occurrence, chemistry, and pharmacology. In Journal of Ethnopharmacology 2017, 195, 10–19.
- [3] Scott, G. and Springfield, E. P. (2004). Pharmaceutical monographs for 60 South African plant species used as traditional medicines. South African National Biodiversity Institute

(SANBI) Plant Information. [cit. 2015-12-3] Dostupné z:
<http://www.plantzafrica.com/medmonographs/scelettort.pdf>

[4] Harvey A. L., Zoung L. C., Viljoen A. M., Gericke N. P.: Pharmacological actions of the South African medicinal and functional food plant *Sceletium tortuosum* and its principal alkaloids. In *Journal of Ethnopharmacology* 2011, 137, 1124–1129.

[5] Coetzee Dirk D., López, V., Smith C.: High-mesembrine *Sceletium* extract (Trimesemine™) is a monoamine releasing agent, rather than only a selective serotonin reuptake inhibitor. In: *Journal of Ethnopharmacology* 2016, 177, 111–116.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 307/2017/FAF.

Stereoselektivní syntéza a biologické hodnocení sloučenin postavených na arylaminoethanolovém strukturním základě

David Švestka, Alexander Jurík, Kamila Světlíková, Jan Otevřel

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

Úvod

Enantiomerně obohacené nitroaldolové adukty jsou rozmanitými syntetickými intermediáty, které lze poměrně snadno transformovat na celou řadu synteticky zajímavých sloučenin

(Schéma 1). I když počet prací využívajících aryl-nitroaldoly jako výchozí látky při syntéze stále roste, nejrozšířenější jsou metody popisující redukcí nitroaldolů na příslušné aryl-aminoalkoholy. Značný zájem řady farmaceutických společností a výzkumných skupin o molekuly obsahující vicinální aryl-aminoalkoholovou skupinu je pravděpodobně dán jejím prakticky všudypřítomným zastoupením v rámci biologicky

aktivních sloučenin, a tedy poměrně slibným farmakoforickým potenciálem (Obr. 1). Všechny vicinální aryl-aminoalkoholy mají ve své struktuře alespoň jedno stereogenní centrum a na základě jeho konfigurace obvykle vykazují značně odlišnou biologickou aktivitu. Konfigurace stereogenu může být označena jako (*S*)- nebo (*R*)- a sledujeme-li závislost dané aktivity na prostorové konfiguraci, tak většinou můžeme jeden stereoizomer aryl-aminoalkoholu označit jako eutomer a druhý jako distomer. Z tohoto důvodu je nezbytné podrobit biologickému testování nejen racemický vzorek, ale také oba příslušné enantiomery. Vývoj nových a efektivnějších metod pro asymetrickou syntézu je proto kritickým a dlouhodobým záměrem. Katalytická asymetrická Henryho reakce představuje vhodnou a účinnou metodu k přípravě předešle zmíněných sloučenin. Navzdory

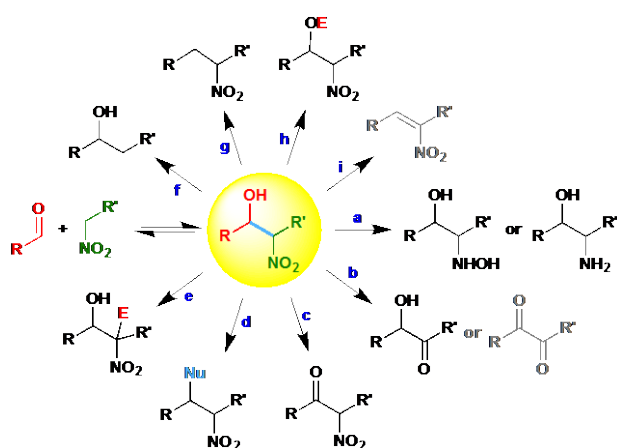
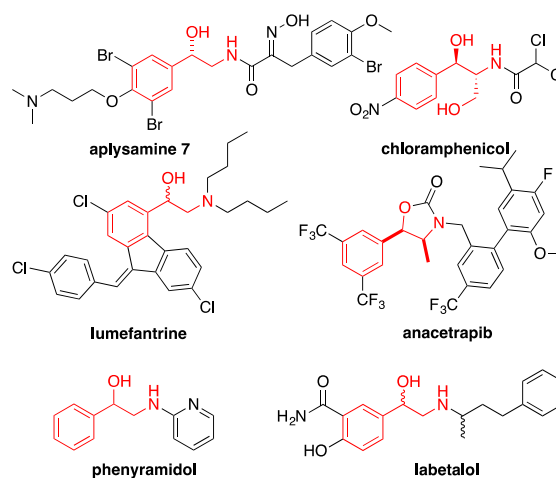


Schéma 1 Transformace funkčních skupin produktů Henryho reakce.



Obr. 1 Biologicky aktivní molekuly obsahující arylaminoethanolový fragment.

tomu, že tato reakce byla popsána belgickým chemikem Luisem Henrym již v roce 1895,^[1] její katalytické enantioselektivní verze využívající lanthanidových komplexů BINOLu a první organokatalyzovaná verze s chirálními guanidinovými katalyzátory byly objeveny Najerovou a Shibasakim až téměř o sto let později.^[2] Enzymaticky katalyzovaná Henryho reakce byla popsána Purkanhoferem dokonce až r. 2006.^[3]

Překotný vývoj v oblasti organokatalytických reakcí přinesl konečně v r. 2006 synteticky využitelné thiomocovinové organokatalyzátory pro asymetrické Henryho reakce aromatických a α -větvených alifatických aldehydů popsané v pracích Hiemstry a Nagasawy. Právě skupina chirálních donorů vodíkových vazeb patří v současnosti k nejvýznamnějším organokatalyzátorům nitroaldolových reakcí.^[4]

Také v naší laboratoři probíhá vývoj organokatalyzátorů stereoselektivní Henryho transformace. V r. 2016 se nám úspěšně podařilo zjednodušit design stávajících katalyzátorů a s výhodou využít chirální bifenylový skelet. Kombinací vhodných reakčních podmínek a báze jsme dosáhli poměrně významné enantioselektivity a *syn*-diastereoselektivity. Při vývoji druhé generace katalyzátoru jsme implementovali bazickou funkci přímo do struktury multifunkční molekuly a u řady aromatických substrátů se nám podařilo dosáhnout dosud nejvyšší popsané enantioselektivity. Pomocí kinetických a spektroskopických měření jsme u katalyzátorů objasnili řadu zajímavých mechanistických otázek.^[5]

Materiál a metodika

První část našeho projektu se soustředila na ověření robustnosti stereoselektivní syntézy na vybraných vzorových sloučeninách. Cílem bylo identifikovat a vyřešit problémy související s potenciální racemizací vzorků vlivem různých reakčních podmínek. Jako výchozí syntony byly zvolené aryl-nitroaldolové adukty, které byly připravené pomocí katalytické asymetrické Henryho adice. Získané aryl-nitroaldoly se v navazujícím stupni syntézy zredukovaly na příslušné vicinální aryl-aminoalkoholy, jež lze, dle našeho zjištění, jako hydrochloridy dočistit

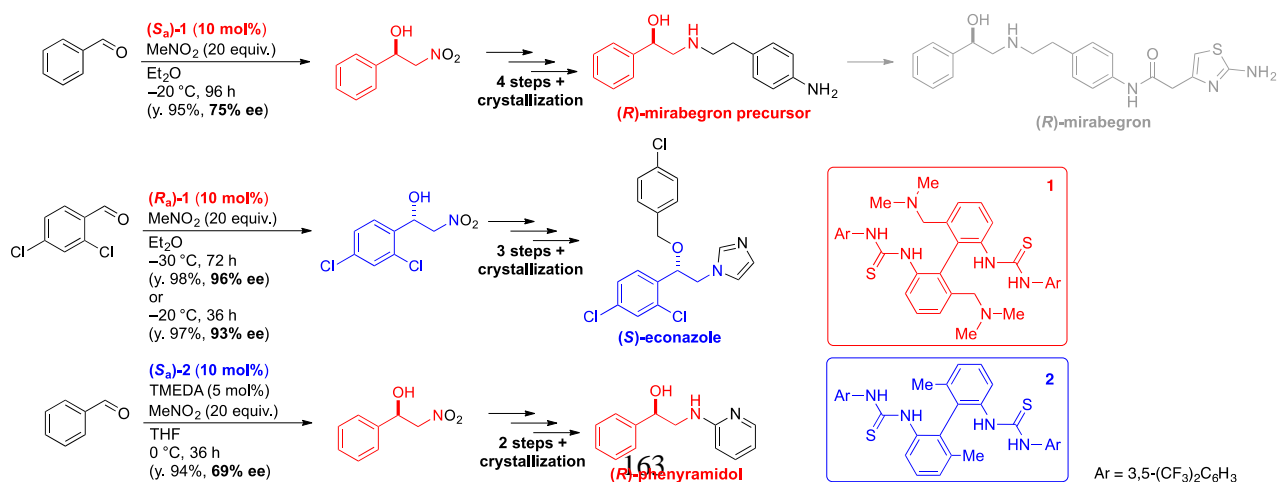


Schéma 2 Ověření syntetické metodiky v první fázi projektu.

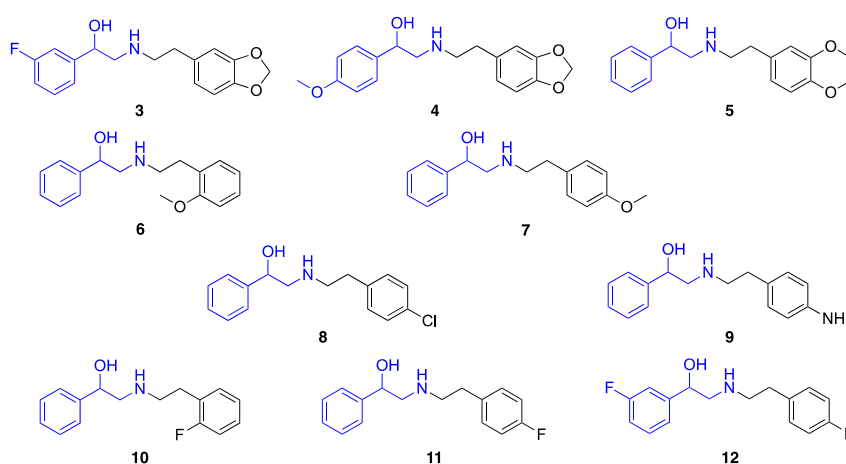
krystalizací do 100% enantiomerního přebytku. Příslušné aryl-hydroxyalkylaminy se využily pro přípravu třech modelových sloučenin: β_3 -adrenomimetika (*R*)-mirabegronu, antimykoticky účinného (*S*)-ekonazolu a analgeticky a myorelaxačně účinného (*R*)-fenyramidolu. Všechny tři uvedené sloučeniny byly kompletně strukturně charakterizované a připravené jako racemáty i jako příslušné homochirální molekuly ve > 99% ee. Tyto výsledky nám potvrdily, že lze námi testované způsoby přípravy prakticky beze změn aplikovat i na syntézy analogických sloučenin s potenciální biologickou aktivitou (Schéma 2).

Druhá fáze projektu se soustředila na přípravu sloučenin ze skupiny vicinálních arylaminoethanolů pomocí výše zmíněné metodiky a připravené látky byly charakterizované dostupnými fyzikálně-chemickými metodami (Obr. 2).

V závěrečné fázi projektu byly nově připravené sloučeniny poskytnuty k testování vybraných typů biologické aktivity.

Výsledky

V rámci tohoto projektu byla ověřena metodika syntézy homochirálních biologicky aktivních molekul pomocí asymetrické katalytické Henryho reakce s použitím multifunkčních chirálních neracemických bis(thiomocovinových) katalyzátorů. Výsledky této části projektu byly publikovány již v průběhu jeho řešení.^[5b] Pomocí vyvinuté metodiky bylo nasyntetizováno také celkem 10 látek ze skupiny *N*-aralkyl substituovaných vicinálních arylaminoalkoholů, které byly kompletně fyzikálně-chemicky charakterizované pomocí teplotání, optické otáčivosti, IR a NMR spektroskopie a HR-MS spektrometrie (Obr. 2).



Obr. 2 Struktury nově připravených látek ze skupiny *N*-aralkyl substituovaných vicinálních arylethanolaminů.

Tyto sloučeniny byly primárně poskytnuty k biologickému testování antibiotické, antimykobakteriální a fungicidní aktivity, kde se ale jejich účinnost neprokázala (IC > 256 μ M). V současné době se uvedené sloučeniny testují na antimalarickou aktivitu, kde by dle našich předpokladů mohl arylaminoethanolový fragment vykazovat slibné působení (jako je tomu např. u antimalaricky účinného lumefantrinu, WR 30090, synkarpamidu aj.).

Seznam literatury

[1] L. Henry, *Compt. Rend.* **1895**, 120, 1265–1268. [2] a) H. Sasai, T. Suzuki, S. Arai, T. Arai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4418–4420; b) R. Chinchilla, C. Nájera, P. Sánchez-Agulló, *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, 5, 1393–1402. [3] T. Purkarthofer, K. Gruber, M. Gruber-Khadjawi, K. Waich, W. Skranc, D. Mink, H. Griengl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 3454–3456. [4] a) S. Kitagaki, T. Ueda, C. Mukai, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 4030–4032; b) Y. Nakayama, Y. Hidaka, K. Ito, *Synlett* **2013**, 24, 883–885; c) D. Uraguchi, S. Sakaki, T. Ooi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 12392–12393; d) J. V. Alegre-Requena, E. Marqués-López, R. P. Herrera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358, 1801–1809. [5] a) J. Otevrel, P. Bobal, *Synthesis* **2017**, 49, 593–603; b) J. Otevrel, P. Bobal, *J. Org. Chem.* **2017**, 82, 8342–8358.

Tato práce byla financovaná grantem IGA č. 308/2017/FaF.

***In vitro* hodnocení vaginálních inzertů s obsahem PGE₂ pro veterinární využití**

Jan Elbl, Jan Muselík, Veronika Tkadlečková, Kateřina Kubová

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

Úvod

Pyometra psů je zánětlivé onemocnění dělohy fen vyskytující se v uzavřené a otevřené formě. V medikamentózní terapii se využívají injekčně podávané prostaglandiny. Ty zvýšením kontraktility dělohy a podpořením relaxace děložního hrdla usnadňují vyloučení hnisu vaginální cestou. Mezi závažné nežádoucí účinky injekčně podaných prostaglandinů patří salivace, zvracení, defekace a hyperpnoe. Tyto nežádoucí účinky jsou však téměř eliminovány při vaginálním podání prostaglandinů (1). Jako ideální léková forma umožňující vaginální podání prostaglandinu (konkrétně PGE₂) se jeví vaginální inzert.

Významným terapeutickým faktorem je obsahová stejnoměrnost léčiva a rychlost jeho uvolňování z inzertu, který je tvořen nerozpustným polymerem. K posuzování těchto parametrů se nejčastěji využívá disoluční zkouška, kterou je nutno upravit v zájmu přiblížení se podmínkám *in vivo*. Dále je třeba optimalizovat analytickou metodu pro stanovení nízkých koncentrací uvolněné aktivní látky (řádově desetiny miligramu denně). Jako vhodná metoda pro stanovení koncentrace PGE₂ se jeví HPLC s UV-VIS případně fluorescenční detekce, která se prokázala jako účinná při stanovení obsahu prostaglandinů v různých materiálech (2,3).

Cílem projektu bylo navržení a optimalizace analytických metod pro *in vitro* hodnocení matricových vaginálních inzertů a aplikací těchto metod zhodnotit kvalitativní parametry v rámci projektu připravených vaginálních inzertů s obsahem PGE₂ pro terapii pyometry u psů s vhodnou dávkou léčiva.

Materiál

Jako mobilní fáze pro HPLC byl využit acetonitril a roztok kyseliny fosforečné (SIGMA-ALDRICH, CZ). Při testování extrakce byl použit aceton, toluen, xylen a n-hexan (SIGMA-ALDRICH, CZ). Pro vytvoření matrice vaginálních inzertů byl použit zdravotnický silikon DDU-4840 vhodný pro *in vivo* testování (Trelyst, USA). PGE₂ (Cayman Chemical Company, USA) byl používán ve formě zásobního roztoku v 96% ethanolu (SIGMA-ALDRICH, CZ). Pro zpracování roztoku API do silikonu byl jako emulgátor přidán sorbitan oleát (SIGMA-ALDRICH, CZ). Jako porogeny modifikující uvolňování léčiva byly testovány glukosa, laktosa, sacharosa a xylitol (SIGMA-ALDRICH, CZ).

Metodika

Jako výchozí analytická metoda pro testování obsahové stejnoměrnosti a hodnocení disoluční zkoušky byla zvolena vysokotlaká kapalinová chromatografie na přístroji HP Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, USA). Po prvotním stanovení PGE₂ nastříkovaném v čisté mobilní fázi byla metoda optimalizována pro plánované disoluční médium (vaginální simulant o pH 5,5).

Pro třídenní testování disoluce byl vzhledem k vysoké ceně léčiva zvolen obsah 2 mg PGE₂. Kroužky byly připravovány smísením 100 mg zásobního roztoku PGE₂ v 96% ethanolu o koncentraci 20 mg·g⁻¹ s 30 mg sorbitan oleátu, odpovídajícím množstvím porogenní látky a dvousložkového silikonu DDU-4840 do celkové hmotnosti 1630 mg. Směs byla vytvarována do 3D tištěné formy ve tvaru mezikruží o vnějším průměru 30 mm, vnitřním průměru 15 mm a výšce 2 mm. Tuhnutí silikonu probíhalo po dobu 24 hodin. Od každého typu byly připraveny a testovány nejméně 3 vzorky.

Tabulka 1 uvádí složení inzertů, u kterých byla provedena disoluční zkouška v podmínkách simulujících vaginální prostředí ženy (39 °C, pH 5,5) po dobu 3 dnů.

Označení	PGE ₂ (mg)	Ethanol (mg)	Sorbitan (mg)	Další pomocná látka			Pomocných látek celkem (%)
				Typ	Množství (mg)	Množství (%)	
PG2	2	100	30	Glukosa	326	20	28
PX2	2	100	30	Xylitol	326	20	28
PG3	2	100	30	Glukosa	489	30	38
PG3m	2	100	30	Glukosa (< 80 µm)	489	30	38
PG4	2	100	30	Glukosa	652	40	48
PL4	2	100	30	Lactosa	652	40	48
PS4	2	100	30	Sacharosa	652	40	48
PG5	2	100	30	Glukosa	815	50	58

Tabulka 1 Složení testovaných inzertů

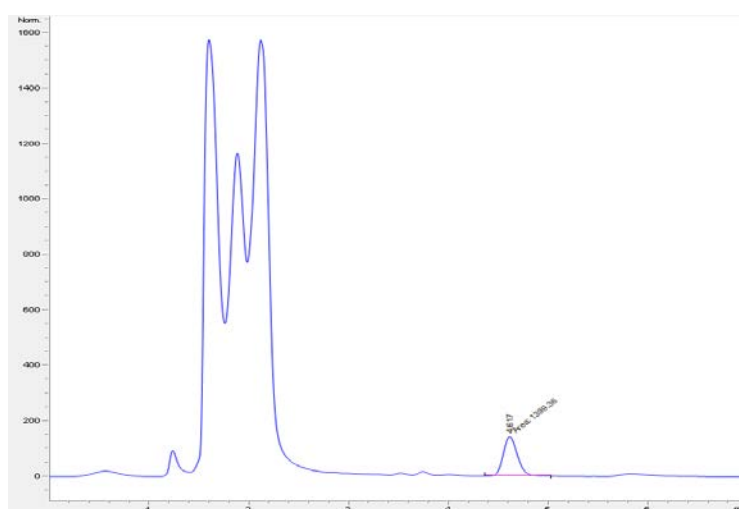
Dle výsledků disoluce byl vybrané inzerty připraveny i ve verzi s reinzerční suturou Seralon[®] velikosti 3. Ta byla zakomponována po obvodu inzertu a po provedení disoluční zkoušky byla testována síla potřebná k jejímu vytržení z inzertu pomocí přístroje Zwick Roell Z010 (Zwick Roell, Germany).

Byla rovněž vyvíjena metodika pro stanovení obsahu v konečné lékové formě extrakční metodou. Oproti předpokladu nebylo možné použitím suchého ledu případně tekutého dusíku dosáhnout teploty, při které by inzert dostatečně zkrěhnul a bylo by možné ho rozdrobnit. Jednodušší variantou bylo dělení inzertu skalpelem na menší části. Jako extrakční média byla vyzkoušena mobilní fáze, aceton, toluen, n-hexan a xylen. Pro extrakci bylo použito vždy 30

ml rozpouštědla a extrakce probíhala 24 hodin na třepače při 120 rpm. 10 ml rozpouštědla bylo odpařeno při 40 °C pod dusíkovou atmosférou, odparek rozpuštěn v 1ml MF a analyzován.

Výsledky

Optimalizovaná metoda pro HPLC využívá mobilní fázi o složení acetonitril - 20 mM H₃PO₄ (54:46,v/v) a průtok 1 ml·min⁻¹, teplotu kolony 40 °C, kolonu Purospher Lichrocart RP-18, 250-4, 5 μm, endcapped a vlnovou délku detekce 200 nm. Vzorek je nastříkovan v objemu 50 μl. Obrázek 1 pak ukazuje chromatogram kalibračního vzorku o koncentraci 1000 ng·ml⁻¹ (Rt ≈ 4,6 min).



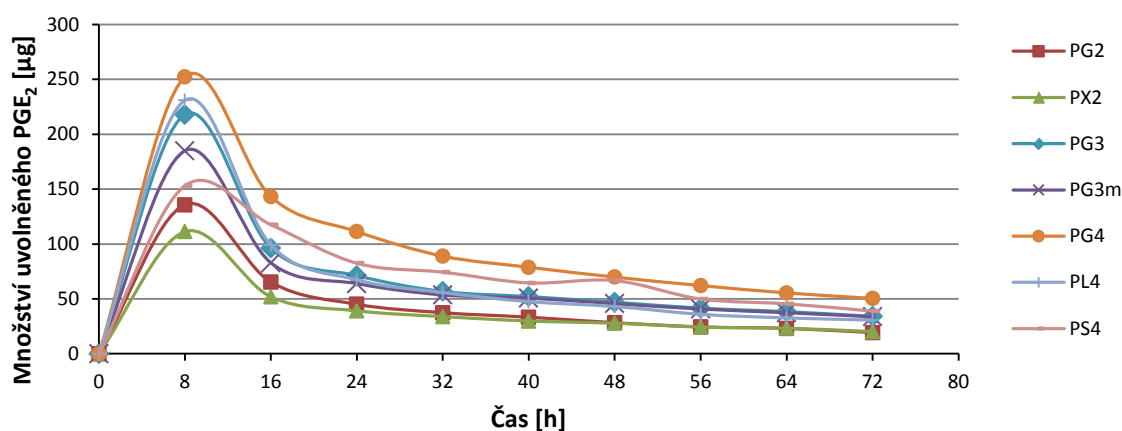
Obrázek 1 Chromatogram PGE₂ v médiu (1000 ng·ml⁻¹)

Pro ověření linearity a rozsahu metody byly připraveny a analyzovány roztoky v rozmezí koncentrace PGE₂ 20 až 5000 ng·ml⁻¹. Z kalibračních měření byl stanoven limit detekce na 8,9 ng·ml⁻¹ a limit kvantifikace na 29,7 ng·ml⁻¹. Limit je tedy dostačující i pro stanovení desetiny původně předpokládané minimální koncentrace v disolučních vzorcích (250 μg v 500 ml média po prvních 8 hodinách). Rovněž byla potvrzena preciznost a pravdivost stanovení.

U připravených matricových kroužků s obsahem 2 mg PGE₂ bylo sledováno uvolňování léčiva v průběhu tří dní. Zkouška probíhala na přístroji Sotax AT7 Smart v 500 ml disolučního média s odběrem vzorku co 8 hodin. Z prvotních výsledků vyplynulo, že za dané teploty a pH dochází v průběhu zkoušky k rozkladu PGE₂ znemožňujícím správné vyhodnocení. Stabilitní testy roztoků o koncentrací 500; 1000 a 2000 ng·ml⁻¹ PGE₂ v médiu (39 °C, pH 5,5) potvrdily rozklad PGE₂ rychlostí ≈ 4,5; 2 a 1 % za 8 hodin (v uvedeném pořadí koncentrace).

Pro další disoluční testování byl zvolen systém Franzových buněk (PermeGear, USA) a magnetických míchadel, který umožnil zmenšit objem použitého vaginálního simulantu na 16 ml (tudíž zvýšit koncentraci PGE₂) a výměnu média v průběhu zkoušky za nové (vždy po 8 h). Výsledky shrnuje Obrázek 2. Vzorek PG5 hodnocen nebyl, neboť nedošlo ke kompletnímu ztuhnutí silikonu vzhledem k vysokému obsahu porogenu.

Do vybraných inzertů (PG3 a PG4) byla inkorporována reinzerční nit Seralon[®] (velikost 3) a po disolučním testování byla zhodnocena mechanická odolnost inzertu proti vytržení nitě (n=3). Maximální síla nutná pro vytržení byla 75,53 N (RSD = 13,1 %) pro typ PG3 a 54,40 N (RSD = 12,07%) pro typ PG4. Celková práce pak byla 3,59 J (RSD = 25,0 %) a 1,91 J (RSD = 9,62 %).



Obrázek 2 Uvolněné množství PGE₂ v průběhu disoluce

V ohledu testování obsahové stejnoměrnosti nepřineslo ani jedno z použitých extrakčních činidel výsledky v podobě plně kvantifikované extrakce i při prodloužení extrakčního času na 72 hodin nebo využití násobné extrakce. Naopak docházelo k degradaci PGE₂. Stanovení obsahové stejnoměrnosti tedy nebylo optimalizováno, ale vzhledem ke konzistentním výsledkům disoluce lze předpokládat, že se obsahy nachází ve vyhovujícím rozmezí, díky použití standardizovaného roztoku PGE₂ při přípravě inzertů.

Závěr

V rámci projektu byla navržena a optimalizována HPLC metoda pro stanovení obsahu PGE₂. Ta byla využita při hodnocení disolučních profilů vaginálních inzertů určených k veterinární léčbě pyometry psů. S přihlédnutím k mechanické odolnosti bylo nejlepšího uvolnění léčiva po 72 hodinách dosaženo u inzertů PG3 s obsahem 30% glukosy (uvolněno ≈ 33 % PGE₂). Pro další testování byla vypočtena celková dávka PGE₂ aproximací z humánního léku Cervidil (uvolní 10 mg za 12 hodin) jako 9,2 mg. Hodnocení obsahové stejnoměrnosti nebylo

možné optimalizovat, vzhledem ke zmíněným obtížím. Jako další možnost se nabízí využití Ramanovy spektroskopie (4).

Seznam literatury:

1. Gábor, O., Silver, L., Szenci, O., Intravaginal prostaglandine F_{2α} for the treatment of metritis and pyometra in the bitch. Acta Veterinaria Hungarica. 1999, 47, 103-108.
2. Hsu, B., et al., HPLC determination for prostaglandins from seaweed Gracilaria gigas. Food Control. 2007,18, 639-645.
3. Gatti, R., Gotti, R., Cavrini, V., Soli, M., Bertaccini, A., Carparelli, F., Stability study of prostaglandin E1 (PGE1) in physiological solutions by liquid chromatography (HPLC). International Journal of Pharmaceutics. 1995, 115, 113-117.
4. Lyndgaard, B., et al., A process analytical approach for quality control of dapivirine in HIV preventive vaginal rings by Raman spectroscopy. Journal of Raman Spectroscopy. 2014, 45, 149-156.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 310/2017/FAF.

Využití magnesium alumino-metasilikátového nosiče pro snížení burst efektu modelového léčiva s vysokou rozpustností z hypromelosových matric

Martina Naiserová, Kateřina Kubová, Jakub Vysloužil, Sylvie Pavloková, Adéla Dvořáková,
Aneta Fridrichová

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

Úvod

Hypromelosa (HPMC) je nejčastěji používanou pomocnou látkou pro přípravu hydrofilních matricových tablet. Obecně platí, že HPMC matrice vykazují výrazně rychlé počáteční uvolňování léčiva po kontaktu s disolučním médiem (*burst efekt*, BE), zvláště když tableta obsahuje ve vodě snadno rozpustné léčivo. Pro omezení *burst efektu* lze využít kombinace HPMC s nerozpustnými methakrylátovými polymery (Eudragit[®]) ve formě vodných disperzí. Díky rozpustnosti léčiva je však jejich přímé nanesení velmi problematické a vede k nadměrnému zvlhčení a vzniku lepivé hmoty. Z tohoto důvodu je nezbytné aplikovat vodnou disperzi Eudragitu[®] na směs snadno rozpustného léčiva a nerozpustného plniva. Při vlhké granulaci se často využívá jako plnivo nerozpustná mikrokrystalická celulóza (MCC) PH101. Limitujícím faktorem pro vlhkou granulaci je její nízká absorpční kapacita. Z tohoto pohledu jsou vhodnou alternativou látky s mnohonásobně větší absorpční kapacitou jako např. magnesium alumino-metasilikáty (Neusilin[®] US2, NEU).

Materiály

Pro přípravu matricových tablet byl vybrán jako modelové léčivo s vysokou rozpustností levetiracetam (Zentiva, CZ). HPMC K4M (Dow Chemicals, USA) byla použita jako polymerní nosič. Neusilin[®] US2 (Fuji Chemical Industries Co., Ltd., J) plnil ve směsi funkci indiferentního nerozpustného plniva, který byl součástí granulační směsi. Jako nerozpustné plnivo byla použita MCC PH102 (FMC Biopolymers, USA). Eudragit[®] NE (Evonik Röhm GmbH, D) byl přidán ve formě 30% vodné disperze. Stearan hořečnatý (Peter Greven, D) a koloidní oxid křemičitý (Degussa, I) byly použity pro zlepšení tokových vlastností granulátů.

Metodika

Příprava tablet: Ze směsi léčiva (levetiracetamu) a Neusilinu[®] byl připraven granulát nanesením 30% vodné disperze Eudragitu[®] NE jako granulační kapaliny ve vysokootáčkovém mixéru (ROTOLAB, Zanchetta, I – doba cyklu – 300 s, rychlost otáčení – 1200 ot/min).

Vodná disperze byla nanášena po dobu 60 s. Následně byla navlhčená směs granulována po dobu 240 s. Připravený granulát byl vysušen v sušárně při teplotě 40 °C po dobu 24 hodin. Část připraveného granulátu byla tepelně ošetřena při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin (TTG vzorky).

HPMC, MCC, stearan hořečnatý (2.5 %) a koloidní oxid křemičitý (0.5 %) byly přidány extragranulárně. Každá tableta (10 mm) obsahovala: léčivo 100 mg, Neusilinu[®] US2 (vzorek NEU50 obsahuje 50 mg a NEU100 obsahuje 100 mg), HPMC 66.7 mg, Eudragit[®] 16.7 mg (5%), 25.1 mg (7.5%), 33.4 mg (10%), MCC 66.7 mg (pro vzorky NEU100) a 116.7 mg (pro vzorky NEU50) minus množství Eudragitu[®]. Polovina vylisovaných tablet byla tepelně ošetřena při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin (TT vzorky). Pro srovnání byly připraveny dva referenční vzorky (R1NEU50 a R2NEU100), v jejich složení nebyl zahrnut Eudragit[®].

Hodnocení tablet:

Stanovení disolučního profilu připravených vzorků (pádlová metoda, 50 ot/min, 900 ml fosforečnanového pufru o pH 6.0, 12 hodin) bylo provedeno na disoluční aparatuře (SOTAX T7 Donau Lab, S). Vzorky byly následně analyzovány HPLC pro stanovení množství uvolněného léčiva.

Mechanismy uvolňování léčiva byly vyhodnoceny na základě korelace získaných disolučních dat s kinetikou 0. řádu a Korsmeyer-Peppas modelem.

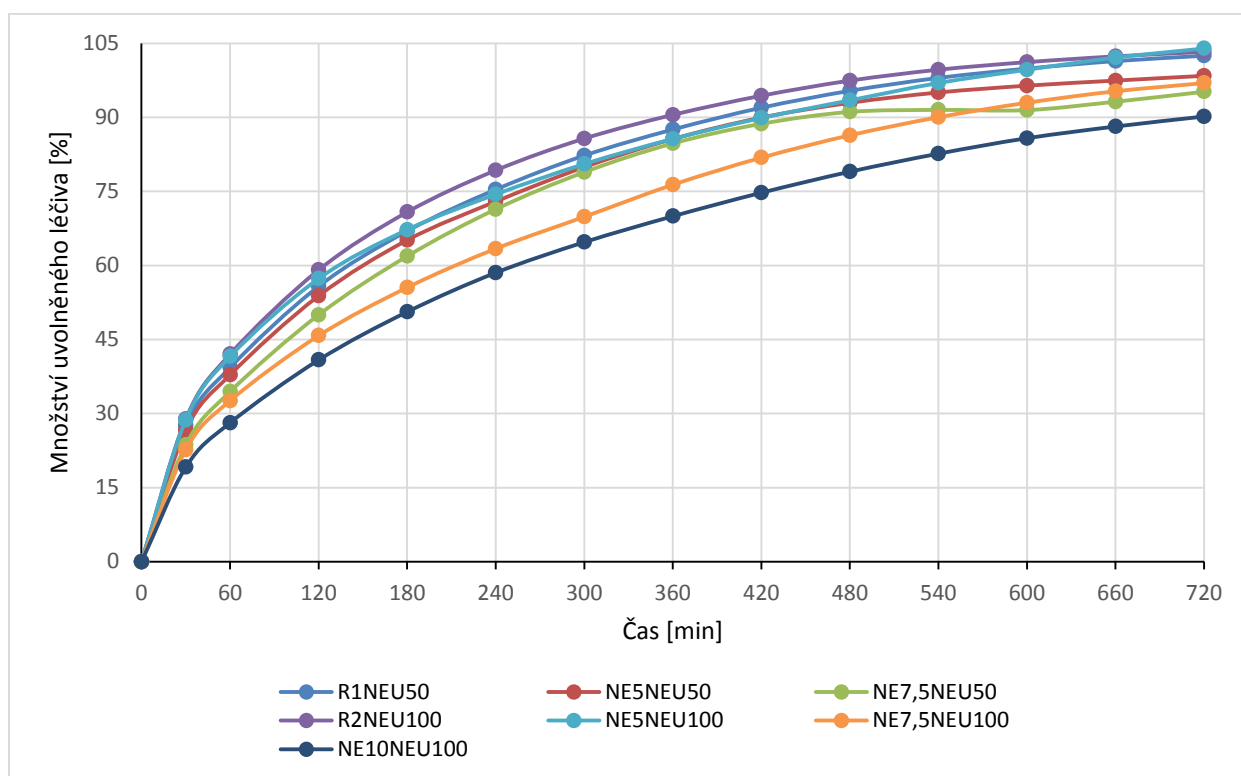
Multivariační analýza dat. Za účelem porovnání referenčních vzorků a vzorků s Eudragitem[®] byla provedena analýza hlavních komponent (PCA) se zaměřením na variabilitu mezi vzorky, která byla založena na měnící se koncentraci Eudragitu[®] a použité technologii.

NMR spektroskopie pevného stavu. Pro stanovení struktury a uspořádání molekul levetiracetamu v polymerní matici byly použity ¹H NMR, ¹H MAS NMR, ¹³C MAS NMR, ¹³C CP/MAS techniky a T¹(¹H), T_{1ρ}(¹H) relaxační experimenty.

Výsledky

Hmotnostní a obsahová stejnoměrnost, pevnost a oděr splňovaly limity platného evropského lékopisu (Ph.Eur. 9). Přítomnost Neusilinu[®] ve směsi s léčivem umožnila snížit počet granulačních kroků, zvýšit nanesené množství Eudragitu[®] a zvýšit pevnost tablet pro všechny testované vzorky.

Hodnoty *burst efektu* se pohybovaly v rozmezí 21.8-26.9 % pro vzorky obsahující NEU50 a 19.2-28.7 % pro NEU100. V porovnání s *burst efektem* referenčních vzorků R1NEU50 (27.6 %) a R2NEU100 (28.9 %), došlo ke snížení této hodnoty o 2.5-6.2 % u vzorku NE5/NEU50, 14.5-21.0 % pro NE7.5/NEU50, a 0.69-19.3 % pro vzorek NE5NEU100, 21.5-30.4 % pro NE7.5NEU100 a 24.6-33.56 % pro vzorek s 10% obsahem Eudragitu[®] (Obr. 1). Z výsledků PCA vyplývá, že hodnota *burst efektu* se s rostoucí koncentrací Eudragitu[®] snižovala. Snížení *burst efektu* mohlo být způsobeno nerovnoměrným pokrytím částic léčiva tenkou vrstvou nerozpustného Eudragitu[®] během granulace, což vede ke snížení povrchové plochy pro uvolňování léčiva (1). Jednodušším vysvětlením může být omezená penetrace média do matricového systému v důsledku nerozpustného charakteru Eudragitu[®] (2).



Obr. 1 : Průběh uvolňování léčiva z HPMC matrice

Všechny vzorky vykazovaly shodu s Korsmeyer-Peppas modelem, což odpovídá faktu, že ve vodě rozpustná léčiva jsou primárně uvolňována difuzí rozpuštěného léčiva přes hydratovanou vrstvu gelu HPMC matrice (3). Hodnoty exponentu n pro vzorky s Eudragitem[®] ($n = 0.49-0.54$) poukazují na tzv. anomální transport (4). PCA analýza potvrdila, že došlo k navýšení podílu eroze u vzorků s 10% obsahem Eudragitu[®]. Obdobně bylo pozorováno přibližování disolučních profilů k uvolňování 0. řádu s narůstající koncentrací Eudragitu[®].

Pro vysvětlení chování matricových systémů byly vybrané vzorky zkoumány NMR spektroskopii pevné fáze (ssNMR). Ve spektrech ^{13}C CP/MAS NMR nebyly pozorovány žádné strukturní změny levetiracetamu během granulace, účinná látka zůstala v krystalickém stavu bez ohledu na přidané množství Eudragitu[®]. Měření ^{13}C detekovaného ^1H spin-mřížkového experimentu $T_1(^1\text{H})$ odhalily rozdíly v relaxačních časech molekuly levetiracetamu. Zatímco relaxační doba $T_1(^1\text{H})$ čistého léčiva byla relativně dlouhá (cca 32-35 s), u granulátů došlo k výraznému snížení na cca 24 s, u vzorků s 5% obsahem Eudragitu[®], a dokonce na 5 s v systému s 10 % methakrylátu. Toto zkrácení relaxačního času znamenalo významné snížení velikosti částic léčiva v granulích. Velikost částic se snížila na 100-500nm. Levetiracetam (průměrná velikost částic $101.7 \pm 23.7 \mu\text{m}$) byl během granulace rozpuštěn ve vodné disperzi Eudragitu[®] NE a následně během sušení rekrystalizován na výrazně menší částice. Tvorba menších částic byla pravděpodobně způsobena přítomností neiontového tenzidu nonoxynolu 100 v Eudragitu[®] NE30D.

Závěr

Aplikace vodné disperze Eudragitu[®] NE jako granulační kapaliny na směs léčivo/Neusilin[®] ve vysokootáčkovém mixéru při přípravě HPMC matricových tablet byla vyhodnocena jako účinný nástroj pro významné snížení iniciálního uvolňování léčiva. Použití Neusilinu[®] US2 s vysokou absorpční schopností umožnilo v jednom kroku aplikovat vodnou disperzi Eudragitu[®] na snadno rozpustné léčivo. Přidání Eudragitu[®] NE zapříčinilo snížení *burst efektu* a rychlosti uvolňování léčiva a přiblížení se uvolňování kinetice 0. řádu. Toto chování lze vysvětlit na základě výsledků ssNMR spektroskopie, která jasně ukázala významné snížení velikosti částic levetiracetamu (150-500 nm) v granulátu v závislosti na množství přidaného Eudragitu[®] a vytvoření výrazně většího rozhraní mezi těmito dvěma entitami.

Seznam literatury:

1. KHAMANGA, S.; WALKER, Roderick B. Drug transport mechanisms from carbopol/Eudragit verapamil sustained-release tablets. *Dissolut Technol*, 2011, 18(3): 30-38.
2. AZARMI, S., et al. Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int J Pharm*, 2002, 246(1): 171-177.
3. LESKINEN, JTT, et al. Monitoring of swelling of hydrophilic polymer matrix tablets by ultrasound techniques. *Int J Pharm*, 2011, 404(1): 142-147.

4. SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv Drug Deliver Rev*, 2001, 48(2-3): 139-157.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 311/2017/FAF.

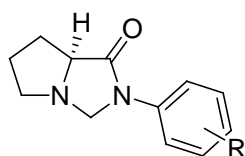
Optimalizace nové *in situ* syntézy pyrroloimidazolidinonových derivátů prolinu jako potenciálních lokálních anestetik

Markéta Havelková¹, Jakub Mareček¹, Hana Pířová¹

¹Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Lokální anestetika jsou látky blokující vznik a šíření vzruchu v senzitivních nervech. Podstatou jejich účinku je interakce s napětově řízenými sodíkovými kanály. Struktura lokálního anestetika se většinou skládá z benzenového jádra (popř. heterocyklus) a bazického dusíku v postranním řetězci. Tyto dvě jednotky jsou spojeny esterovou nebo amidovou (popř. anilidovou) vazbou. Mezi druhý typ patří i tocainid a jeho strukturní analogy, mezi které se



R = H, X, Me, CF₃, OMe, OH,....

Obr.1

řadí i látky s pyrrolo-imidazolidinovým kruhem, kde je bazický dusík součástí tohoto kruhu^{1,2}. Tyto typy látek se mimo jiné připravují i reakcí anilidu prolinu s příslušným aldehydem³. Tento typ syntézy je zdoluhavý, protože zahrnuje čtyři syntetické kroky⁴. Právě tento typ látek se podařilo připravit nám při odstraňování chránící

benzyloxykarbonylové skupiny z dusíku anilidu prolinu a zkrátit tak syntézu těchto látek. Tímto způsobem lze připravit sérii látek s různou substitucí na anilidovém kruhu přímo z chráněného anilidu prolinu a po biologických testech tak lze vyvodit vztahy mezi strukturou a biologickým účinkem.

Metodika

Cílem projektu je optimalizace nové metody vedoucí k přípravě série derivátů specificky substituovaného (7aS)-2-fenyl-hexahydro-1*H*-pyrrolo[1,2-*c*]imidazolidin-1-onu **2** a jejich charakterizace. Tyto nově syntetizované látky budou po jejich analytické charakterizaci testovány jako látky s potenciálním lokálně anestetickým účinkem a následně budou vyvozeny vztahy mezi strukturou a aktivitou.

Syntéza vycházela z (2S)-1-[(benzyloxy)karbonyl]pyrrolidin-2-karboxylové kyseliny (Z-L-prolinu). V prvním kroku byl připraven z kyseliny anilid reakcí s vhodně substituovaným anilinem pomocí T3P⁵ (Schéma 1). Pro přípravu derivátů s hydroxy skupinou na aromatickém jádře anilinu byla tato metoda neúspěšná. Ty byly připraveny reakcí přes směsný anhydrid pomocí ethylchlorformiátu a triethylaminu v THF⁶.

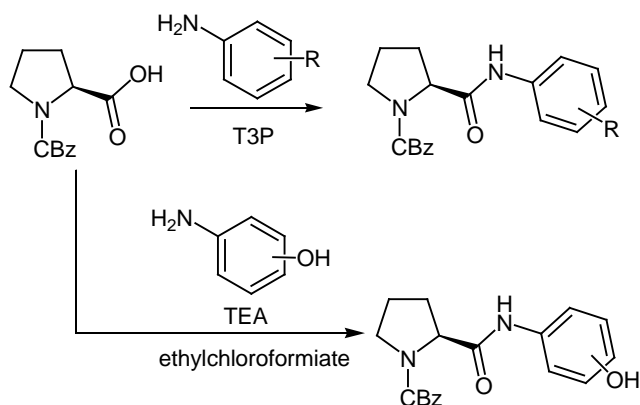


Schéma 1

Při odstraňování chránící benzyloxykarbonylové skupiny docházelo z části také k cyklizaci na látky s pyrroloimidazolidinovým kruhem **2**. Produktem reakce byla směs látek **2** a **3** v různém poměru v závislosti na použitém substrátu (Schéma 2).

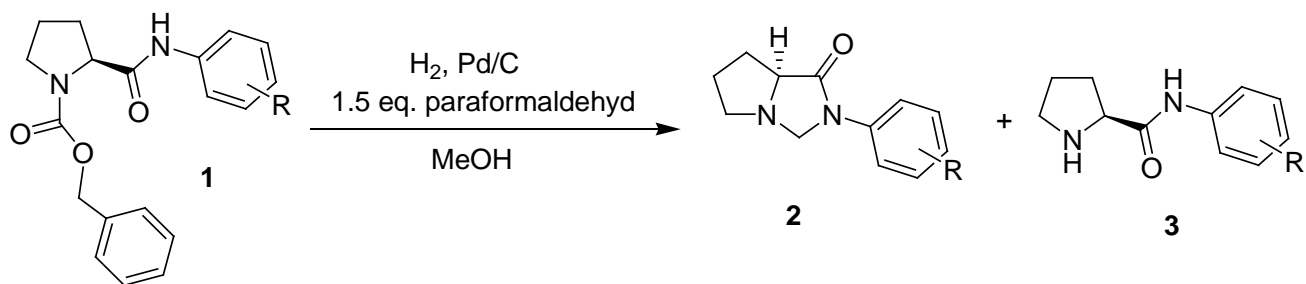


Schéma 2

Cílem tohoto projektu byla optimalizace reakčních podmínek ve prospěch vzniku cyklizovaného produktu **2**. Konečné výsledky optimalizace jsou shrnuty tabulce (Tabulka 1).

Výsledky

Na optimalizaci reakce byly vybrány tři sloučeniny, u kterých se pohybovala konverze mezi 40-99 %. Nejdříve byla prodloužena reakční doba a snížen tlak na 1 barr. To ale na konverzi reakce nemělo vliv. Byla proto použita bazická katalýza, kde došlo ke zvýšení konverze ve prospěch požadované látky **2** na cca 60%. Po přidání dalšího 0,5 ekvivalentu K_2CO_3 se už konverze nezlepšila. Proto byla použita kyselá katalýza pomocí hydrátu kyseliny p-toluensulfonové a do reakce byl přidán $MgSO_4$ kvůli zachycení vznikající vody. Konverze cyklizace vzrostla na více než 90% (Tabulka 1).

Látka 1	podmínky	konverze
R = o-OCF ₃	4 barr, 2 hod	99,9 % látky 2
	4 barr, 2 hod, 0.5 eq. K ₂ CO ₃	99,9 % látky 2
	4 barr, 2 hod, 0.2 eq. p-TSA, 1.2 eq. MgSO ₄	99,9 % látky 2
R = H	4 barr, 2 hod	40 % látky 2, 60 % látky 3
	4 barr, 2 hod, 0.5 eq. K ₂ CO ₃	70 % látky 2, 30 % látky 3
	4 barr, 2 hod, 0.2 eq. p-TSA, 1.2 eq. MgSO ₄	94 % látky 2, 6 % látky 3
R = m-OMe	4 barr, 2 hod	60 % látky 2, 40 % látky 3
	4 barr, 2 hod, 0.5 eq. K ₂ CO ₃	70 % látky 2, 30 % látky 3
	4 barr, 2 hod, 0.2 eq. p-TSA, 1.2 eq. MgSO ₄	99 % látky 2, 1 % látky 3

Tabulka 1

Závěr

Podářilo se zoptimalizovat podmínky cyklizace derivátů benzyl (2S)-2-(fenyلكarbamoyl)pyrrolidinkarboxylátu **1** na řísušné (7aS)-2-fenyl-hexahydro-1H-pyrrolo[1,2-c]imidazolidin-1-ony **2**. Tyto podmínky jsou postupně aplikovány na dostupné deriváty s říznuou substitucí anilidového kruhu a řízpravovány nové substituované pyrroloimidazolidinony.

Seznam literatury:

1. Talon, S. et al. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *134*, 1523-1531.
2. Carrieri, A., Muraglia, M., Corbo, F., Pacifico, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 1477-1485.
3. Knight, B. J., Stache, E. E., Ferreira, E. M. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 5814-5823.
4. Uozumi, Y., Yasoshima, K., Miyachi, T., Nagai, S. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 411-414.
5. Pizova, H., Bobal, P. *Tetrahedron Lett.*, **2015**, *56*, 2014-2017.
6. Rhyoo, H. Y., Yoon, Y. A., Park, H. J., Chung, Y. K. *Tetrahedron Lett.*, **2001**, *42*, 5045-5048.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 312/2017/FAF.

Molekulárně biologické hodnocení nově syntetizovaných nanotransportérů antracyklinových antibiotik

Zuzana Bábková^{1,2}, Kamila Tichavská¹, Veronika Šerksová¹, Veronika Pařilová¹ a Marie
Brázdová¹

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie¹, Ústav chemických léčiv²,
Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Nejčastějším typem nádoru u žen na celém světě je karcinom prsu, ročně je diagnostikováno přibližně 1,4 milionu nových případů (1). Incidence karcinomu se navíc celosvětově zvyšuje a mortalita se snižuje pouze ve vyspělých zemích. Molekulárně-genetickou profilací bylo v nedávné době určeno 5 podtypů karcinomu prsu (luminální A, B, basal-like, HER2-pozitivní a normal breast like), jedná se tedy o vysoce heterogenní skupinu nádorů na úrovni klinické i molekulární. Molekulárně-biologicky se jedná o poměrně složitou skupinu zhoubných nádorů, kde hraje důležitou roli aktivace onkogenů, které jsou často transkripčními faktory, které regulují „gain-of-function“ onkogenní signály např. aktivace proliferace, rezistence vůči cytostatikům či inhibice apoptózy. Mezi důležité transkripční faktory patří proteiny STAT, p53, NF-κB, c-JUN a FOXM1. V léčebném protokolu jsou zařazovány typicky taxany a antracykliny. Ze skupiny antracyklinů je využíván především doxorubicin (DOX) a je považován za jedno z účinných chemoterapeutických činidel vzhledem k jeho vysoké účinnosti a toleranci (2). Jedním ze stálých problémů, s kterými se terapie potýká, zůstává nízká rozpustnost chemoterapeutik a jejich selektivní zacílení (systémová terapie). Cílem projektu bylo stanovit ovlivnění metabolické aktivity několika buněčných linií karcinomu prsu a také ovlivnění exprese cílových genů transkripčního faktoru proteinu p53 po inkubaci linií s DOX, fullerénem (Ful) či zinkovými (ZnO) nanotransportery a jejich kombinací.

Materiál a metodika

Buněčné linie a měření jejich metabolické aktivity

Byly použity buněčné linie z karcinomu prsu MCF-7 (ATCC, wtp53) a MDA-MB-231 (ATCC, mutp53 R280K). Pro stanovení byl využit MTT test. Na 96-ti jamkovou destičku bylo vyseto 7 500 buněk na jamku a dále byla inkubována 24 hodin při 37°C a 5 % CO₂. Na destičce byly i jamky bez buněk s kultivačním médiem pro určení pozadí. Poté bylo vyměněno médium u negativní kontroly a prázdných jamek. K ostatním jamkám byly přidány testované látky v různých koncentracích. Jednalo se o koncentrace 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 µM. Pro kombinaci fullerenu a doxorubicinu byla využita koncentrace fullerenu 0,25; 0,5 a 2,5 mg/ml (3). Pro kombinaci ZnO a doxorubicinu byla využita koncentrace ZnO 10 µg/ml. Po 48 hodinové inkubaci bylo odsáno médium a všechny jamky byly promyty 1 × PBS pufrem a následně bylo do všech jamek přidáno 120 µl směsi tvořené 100 µl média a 20 µl MTT soli rozpuštěné v pufru 1 × PBS. Po 2 hodinové inkubaci bylo médium s MTT odsáto a přidáno 150 µl solventu MTT. Poté byla 96 jamková destička inkubována 15 minut při pokojové teplotě, za současného třepání a ve tmě. Dále byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm na přístroji Synergy H1 a byla vyhodnocena metabolická aktivita živých buněk. Z naměřených hodnot byly vypočítány aritmetické průměry a směrodatné odchylky. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí testu jednocestná ANOVA v kombinaci s Dunnettovým testem (* P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001). Statistické vyhodnocení bylo prováděno v programu GraphPad Prism 5.00 software (GraphPad Software, San Diego, USA).

Testované uhlíkové (fullerenové) nanotransportéry byly připraveny a charakterizovány v Laboratoři nanomedicíny CL FaF pod vedením prof. R.Kizka.

RT-qPCR

Buněčné linie MCF-7 (wtp53) a MDA-MB-231 (mutp53) byly 12 hodin inkubovány s DOX, Ful, ZnO a jejich kombinací. Celková RNA byla izolována pomocí kitu NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) a 2 µg RNA byly následně pomocí kitu High Capacity RT (Applied Biosystems) přepsány reverzní transkripcí do cDNA. RT-qPCR analýza byla provedena s využitím fluorescenčního barviva EvaGreen (Solis Biodyne) za podmínek 15 min 95 °C; 15 s 95 °C, 30 s 60 °C, 20 s 72 °C, 10 s 74 °C; 50 cyklů v přístroji Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). Vzorky byly měřeny v triplicátu a jako referenční gen byl použit *GAPDH*. Byla

provedena absolutní kvantifikace s využitím metody standardní křivky a data byla následně normalizována na *GAPDH*. Sekvence použitých primerů:

MT2A QF: CCGACTCTAGCCGCCTCTT MT2A QR: GTGGAAGTCGCGTTCTTTACA;

MDM2-F: ATCTTGGCCAGTATATTATG MDM2-R: GTTCCTGTAGATCATGGTAT;

p21-F: CCTCAAATCGTCCAGCGACCTT p21-R: CATTGTGGGAGGAGCTGTGAAA;

BAX-F: GCCCTTTTGCTTCAGGGTTT BAX-R: TCCAATGTCCAGCCCATGAT;

GAPDHQF: TGCACCACCAACTGCTTAGC

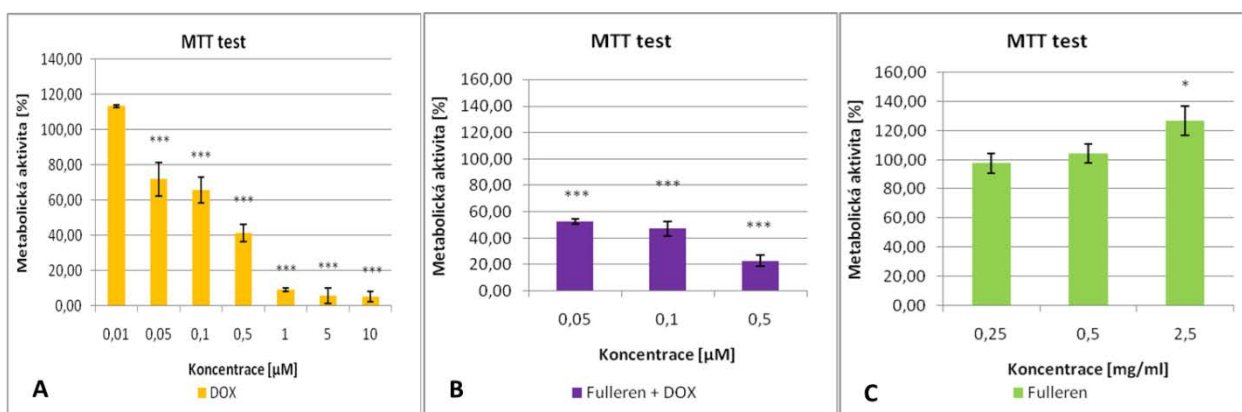
GAPDHQR:

GGCATGGACTGTGGTCATGAG

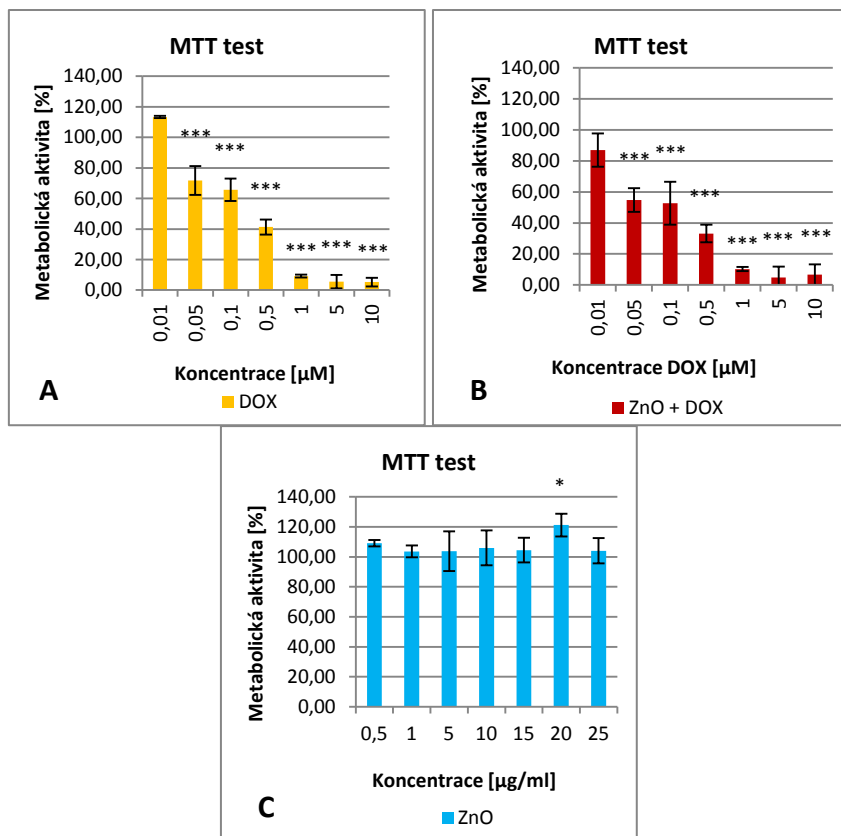
Výsledky

Ovlivnění metabolické aktivity bylo studováno pro neagresivní typ karcinomu prsu pro buněčnou linii MCF-7 i pro agresivní typ karcinomu prsu MDA-MB-231, exprimující onkogenní formu proteinu p53 v několika časových intervalech pro nanotransportéry fullerénové i zinkové. Z dosažených výsledků je prezentován vliv DOX a v kombinaci s fullerény (grafy 1A – C) a DOX v kombinaci se ZnO (grafy 2A – C) pro buněčnou linii MCF-7 po 48 hodinová inkubaci.

Graf 1. Ovlivnění metabolické aktivity buněčné linie MCF-7 po 48 hodinové inkubaci s doxorubicinem, fullerénem nebo jejich kombinací.



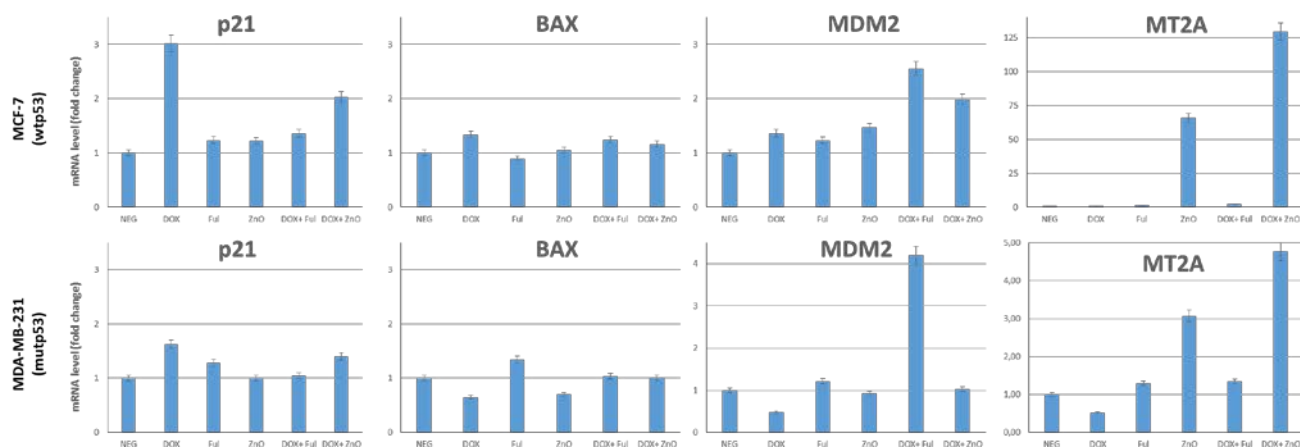
Graf 2. Ovlivnění metabolické aktivity buněčné linie MCF-7 po 48 hodinové inkubaci s doxorubicinem, ZnO nebo jejich kombinací.



Analýzy pomocí MTT prokázaly, že kombinace fullerenu s doxorubicinem, zinkové nanotransportéry a doxorubicin má cytotoxickou aktivitu vyšší v porovnání s DOX.

Molekulárně biologickou analýzou exprese cílových genů proteinu p53, genů *BAX*, *p21*, *MDM2* a metalothioneinů (*MT2A*) po působení studovaných látek a jejich kombinací byl prokázán pozitivní účinek kombinace doxorubicin, zinkové nanotransportéry a doxorubicin na expresi některých cílových genů.

Graf 3. Vliv DOX, Ful a ZnO, a jejich kombinace na expresi vybraných cílových genů p53 u buněčných linií MCF-7 (wtp53) a MDA-MB-231 (mutp53).



Závěr

Naše výsledky prokázaly slibnou protinádorovou aktivitu kombinací studovaných látek (fullerenu s doxorubicinem, zinkových nanotransportérů a doxorubicinem) a naznačují, že další takto zaměřený výzkum by mohl vést k nalezení nových strategií založených na zacílení již používaných chemoterapeutik uplatnitelných při protinádorové léčbě karcinomu prsu.

Seznam literatury:

1. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol.* 2012;23(Suppl 6):vi7-12.
2. Nehoff, H.; Parayath, N. N.; Domanovitch, L.; Taurin, S.; Greish, K., Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine* 2014, 9, 2539-2555.
3. Skaličková S, Löfelmann M, Gargulák M, Dočekalová M, Ruttkay-Nedecký B, Suchý P, Kepinská M, Kizek R. Fullerene Doxorubicin Nanotransporter for Target Interaction with mutated gene BRCA2. *Klin Onkol.* 2017 Spring;30(Supplementum1):177-179. Czech.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 313/2017/FAF.

Biofyzikální a biochemická charakteristika derivátů hydronaftalenkarboxanilidu

Zuzana Bábková^{1,2}, Sabina Ihrická¹, Lenka Šplíchalová¹, Tereza Valčáková¹, Marie Brázdová¹

*Ústav molekulární biologie a farmaceutické biotechnologie¹, Ústav chemických léčiv²,
Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Rozšiřující se rezistence patogenních organismů na řadu užívaných antibiotik je celosvětovou hrozbou, proto je potřeba zabývat se výzkumem nových látek s antibakteriálním potenciálem. Velké množství biologicky aktivních látek s antibakteriální, antimykobakteriální i antiparazitární aktivitou obsahuje ve své struktuře amidovou skupinu, která je zodpovědná za interakci s různými enzymy a ovlivňuje tak biologickou odpověď buňky (1). Mezi látky obsahující ve své základní struktuře již zmiňovanou hydrofobní amidovou skupinu patří i deriváty hydroxynaftalenkarboxanilidu. Cílem práce bylo definovat základní absorpční a fluorescenční vlastnosti vybrané skupiny derivátů hydroxynaftalenkarboxanilidu pro případné využití těchto látek pro monitoring na buněčné úrovni. Vzhledem k neznámému antimikrobiálnímu mechanismu účinku těchto látek byl testován vliv těchto derivátů na různé potenciální enzymy a proteiny, a to především trans-2-enoyl-ACP reductázu (FABI) a glutathion S-transferázu (GST).

Materiál a metodika

Deriváty hydroxynaftalenkarboxanilidu

Testované deriváty hydronaftalenkarboxanilidu byly syntetizovány a poskytnuty Dr. T. Goňcem, Ph.D. a prof. J. Jampílkem a následně byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na zásobní roztoky s koncentrací 100 mM, které byly uchovávány při - 20°C. Pro další použití byly ředěny dle potřeby v DMSO.

Absorpční a emisní vlastnosti testovaných derivátů

UV-VIS absorpční spektra byla měřena při pokojové teplotě v 10 mm křemenné kyvetě na spektrofotometru SPECORD 210 PLUS (Analytik Jena). Základní nastavení spektrofotometru bylo provedeno v programu WinASPECT®PLUS Software (Analytik Jena AG). Blankem byl DMSO použitý pro ředění. Z naměřených hodnot pro 5 µM vzorky testovaných látek byly vytvořeny grafy závislosti hodnoty absorbance na vlnové délce v nanometrech. Dle absorpčních spekter byla zvolena ideální vlnová délka, při které byly testované sloučeniny excitovány (350 nm). Emisní spektra byla měřena při 20 °C v 10 mm křemenné kyvetě

na spektrofluorimetru PC1 - Photon Counting Spectrofluorimeter (ISS). Základní nastavení tohoto přístroje bylo provedeno v programu VinciTM (ISS). Dále byly vytvořeny grafy závislosti intenzity fluorescence na vlnové délce v nanometrech. Z naměřených výsledků s využitím Lambert-Beerova zákona byly stanoveny spektrofotometrické vlastnosti testovaných látek, a to Stokesův posun a molární extinkční koeficient.

Příprava vektorů pro exprese analyzovaných proteinů

Pro expresi rekombinantních proteinů FABI (*S. aureus*), FABI (*E. coli*), SortaseA (*S. aureus*), GST (*S. japonicum*), p53 (*H. sapiens*) byly použity odpovídající expresní vektory poskytnuté Dr. Brázdovou nebo zakoupené u firmy Addgene (pGEX-6TK (GST), pGEX-4TKp53_92-312, pGBMCS-SortA (Addgene, plasmid #21931), pET15b-FabI (*S. aureus*), (Plasmid #61691)). Další vytypované enzymy např ecFABI byly klonovány do vektorů odvozených od pGEX-4TK nebo pDEST26 s GST nebo 6 ×His tagem pro purifikaci; inzert byl získán na základě amplifikace genu z genomové DNA mikroorganismů *E.coli* či *S.aureus*. DNA pro expresi byla izolována v bakteriálním kmeni *E.coli* TOP10 (Statagene) a sekvenována z příslušných primerů z vektorů firmou Seqme.

Expese a purifikace rekombinantních proteinů

Pro expresi byla DNA transformována do buněk C41 (deriváty od BL21 *E.coli*) a pro expresi byla použita dvoustupňová indukce při 18 °C pomocí 0,2 mM IPTG popsaná v (2). Buňky byly následně sklizeny, lyzovány sonikací v 50 mM TrisHCl pH 7,6 s lysozymem a byly purifikovány pomocí afinitní chromatografií na kolonách GSTrap, HisTrap a HiTrap Heparin, dále gelovou permeační chromatografií na koloně Superdex 200. Koncentrace proteinů byla určena dle SDS-PAGE s BSA jako standardem.

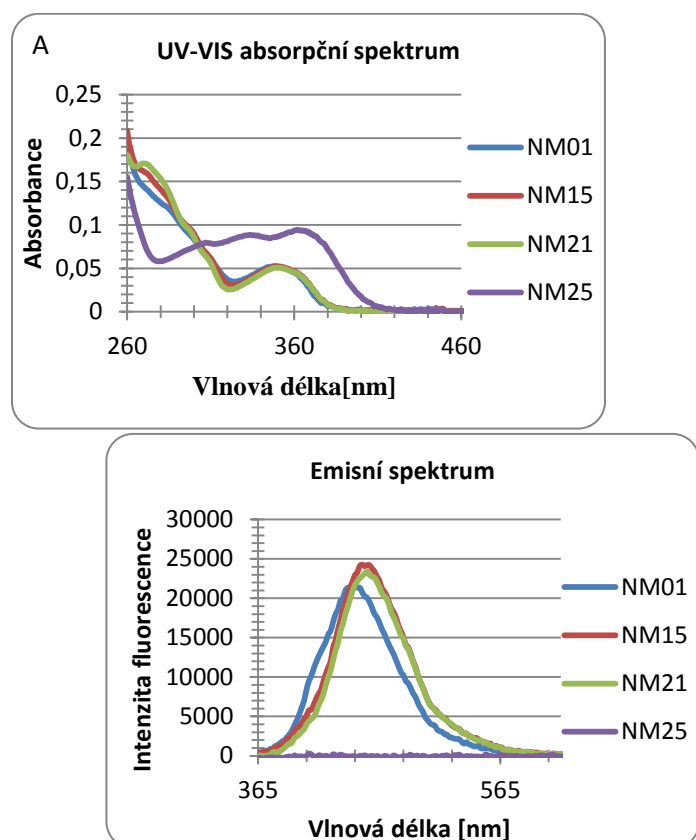
Měření enzymové aktivity GST a FABI

Test enzymatické aktivity Glutathion S-transferázy (GST) využívá utilizace 1-chlor-2,4-dinitrobenzenu (CDNB). Testované sloučeniny byly preinkubovány s 0,2 ng GST po dobu 25 minut při 20 °C a dále byl přidán 50 mM CDNB a 100 mM glutation. Po konjugaci thiolové skupiny glutathionu s CDNB substrátem se po 5 minutách změnilo zvýšení absorbance při 340 nm, enzymatická aktivita byla vypočítána podle neošetřeného kontrolního vzorku a substrátu. V reakci katalyzované ecFABI nebo saFABI bylo měřeno snížení absorbance při 340 nm způsobené oxidací NADH / NADPH. Testy byly provedeny v časových intervalech 0-10 min. Reakce enzymu FabI z *E. coli* (200 ug / ml purifikovaného ecFABI; 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4; 0,4 mM NADH; 10 mM EDTA) nebo *S. aureus* (400 ug / ml saFABI; 0,1 M MOPS, pH 6,4; 0,4 mM NADPH; 10 mM EDTA) byly iniciovány substrátem (0,25 mM crotonoyl-CoA).

Studované sloučeniny byly inkubovány v úplném reakčním pufru 1 hodinu před zahájením enzymatické reakce.

Výsledky

V rámci výsledkové části jsou uvedeny analýzy vybraných derivátů 1-hydroxynaftalen-2-karboxanilidu v různých typech experimentů, především látek NM01, NM15, NM21, NM25. Výsledky UV-VIS absorpční a fluorescenční spektroskopie jsou znázorněny grafy 1A a 1B. Základní absorpční a emisní vlastnosti jsou shrnuty v tabulce 1.

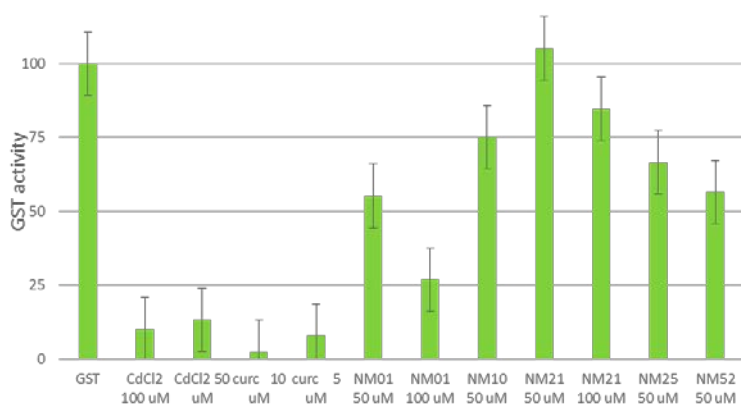


Graf 1. UV-VIS absorpční spektra pro vybrané deriváty o koncentraci 5 μM (A) a emisní spektra pro tytéž vzorky (B).

Látka	Substituent	Maximum absorbance [nm]	Maximum emise [nm]	Stokesův posun [nm]	Molární absorpční koeficient [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
NM01	-H	348	443	95	10513,4
NM15	3-Cl	350	451	101	10440
NM21	3-CF ₃	350	455	105	10153,4
NM25	4-NO ₂	362	407	45	18860

Tabulka 1. Shrnutí základních absorpčních a fluorescenčních vlastností testovaných derivátů o koncentraci 5 μM .

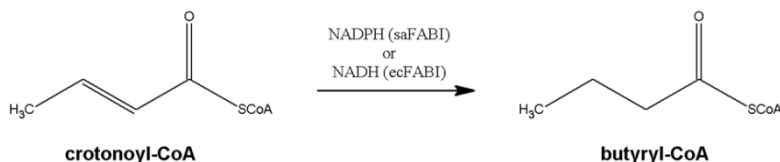
Vliv vybraných derivátů 1-hydroxynaftalen-2-karboxanilidu, především NM01, NM10, NM21, NM25 na enzymatickou aktivitu GST je znázorněn na grafu č. 2. Inhibiční účinek



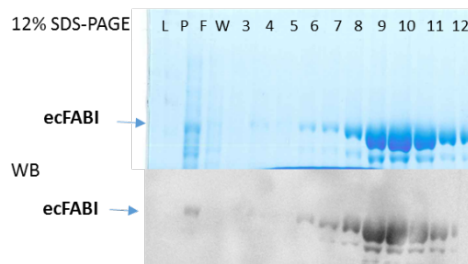
látek je srovnáván se známým inhibitorem kurkuminem a ionty kadmia.

Graf 2. Vliv derivátů 1-hydroxynaftalen-2-karboxanilidu na enzymatickou aktivitu GST.

Výsledky purifikace proteinu ecFABI z bakteriálního lyzátu pomocí afinitní chromatografie jsou zobrazeny na obr. 1 prostřednictvím SDS-PAGE a imunodetekce ecFABI na membráně.



Dále je na obr. 1 znázorněn princip analýzy enzymové aktivity FABI a prvotní analýza inhibičního účinku vybraných derivátů na enzymy ecFABI a saFABI ve srovnání se známým specifickým inhibitorem triclosanem Obr.1.



	IC ₅₀	
	ecFABI	saFABI
DMSO	>> 10%	>> 10%
NM01	> 1 mM	> 1 mM
NM15	> 1 mM	> 1 mM
NM16	> 1 mM	> 1 mM
NM21	> 1 mM	> 1 mM
NM25	> 1 mM	> 1 mM
CP08	< 1 mM	
CP09	< 1 mM	
CP10	< 1 mM	
CP11	< 1 mM	
CP17	< 1 mM	
CP20	< 1 mM	
triclosan	< 5 μM	< 5 μM

Obrázek 1. Výsledky purifikace proteinu ecFABI, imunodetekce na membráně a ovlivnění enzymové

aktivitu ecFABI a saFABI.

Závěr

Naše výsledky zabývající se spektrofotometrickými vlastnostmi prokázaly fluorescenční vlastnosti testovaných derivátů, které se intenzitou a charakterem liší dle substituentů, významný negativní vliv na tyto vlastnosti měla nitro skupina v pozici *para*. Úspěšně byly klonovány a izolovány enzymy potencionálně související s antibakteriálním účinkem testovaných látek, byly získány proteiny ecFABI, saFABI a GST. Byly aplikovány postupy na analýzu jejich enzymové aktivity, založené na kinetických a end point měřeních. Zjištěné

výsledky naznačují, že další takto zaměřený výzkum by mohl vést k nalezení mechanismu účinku těchto látek.

Seznam literatury:

1. Kos, J.; Nevin, E.; Soral, M.; Kushkevych, I.; Gonec, T.; Bobal, P.; Kollar, P.; Coffey, A.; O'Mahony, J.; Liptaj, T.; et al., Synthesis and antimycobacterial properties of ring-substituted 6-hydroxynaphthalene-2-carboxanilides. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2035–2043.
2. Brázdová M, Navrátilová L, Tichý V, Němcová K, Lexa M, Hrstka R, Pečinka P, Adámik M, Vojtesek B, Paleček E, Deppert W, Fojta M. [Preferential binding of hot spot mutant p53 proteins to supercoiled DNA in vitro and in cells.](#) *PLoS One.* 2013;8(3):e59567. doi: 10.1371/journal.pone.0059567. Epub 2013 Mar 26.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 314/2017/FAF.

Účinky citalopramu na hladiny adipokinů v experimentu

Tomáš Hammer, Petra Pokrivčáková, Jiří Procházka, Kateřina Horská, Hana Kotolová

Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu patří celosvětově k nejvíce předepisovaným léčivům a jsou první volbou v terapii deprese, generalizované úzkostné poruchy a řady dalších psychických poruch. Jejich použití může být ovšem spojeno s nežádoucími metabolickými účinky jako je nárůst tělesné hmotnosti, dyslipidémie, inzulinová rezistence a vznik metabolického syndromu. Mechanismus vzniku těchto nežádoucích účinků není plně objasněn, přičemž jako jedno z možných vysvětlení se v současné době zkoumá endokrinní funkce adipocytů. Cílem projektu bylo sledovat změny v sérových hladinách vybraných adipokinů, cytokinů a základních biochemických parametrů v závislosti na akutním (7 dní) a subakutním (35 dní) podání citalopramu a dietě u laboratorní myši.

Materiál a metodika

V experimentu jsme použili samce myši kmene C57BL/6N (n=50) ve věku šesti týdnů, kteří byli náhodně rozděleni do 5 skupin:

- kontrolní skupina
- kontrolní skupina s tučnou dietou
- skupina medikovaná 35 dní
- skupina medikovaná 35 dní s tučnou dietou
- skupina medikovaná po 7 dní

Myšim jsme podávali intraperitoneálně citalopram (10 mg/kg/den), kontrolním skupinám byl ve stejnou dobu podáván fyziologický roztok. Zvířata byla 2x týdně vážena, krmivo a voda byla zvířatům dostupná *ad libitum*.

Po ukončení aplikace léčiva byly zvířata usmrcena vykrevním v celkové inhalační anestezii. Ze zachycené krve bylo centrifugací získáno sérum, které bylo použito pro biochemickou analýzu. Stanovení sérových hladin adipokinů a cytokinů proběhlo pomocí

imunoanalytické metody ELISA za využití komerčně dostupných kitů a získaná data byla následně vyhodnocena pomocí vhodných statistických metod. Veškeré činnosti v rámci experimentu byly provedeny v souladu se zákonem 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů, a další platnou legislativou.

Výsledky

V průběhu experimentu jsme zaznamenali statistické změny ve složení lipidového spektra. Již po týdenní aplikaci citalopramu jsme zaznamenali signifikantní zvýšení sérové hladiny triglyceridů, HDL, LDL a celkového cholesterolu oproti kontrole. Tyto změny lipidového spektra přetrvávaly i v dlouhodobějším pokusu. Zvýšení hladin HDL, LDL, triglyceridů a celkového cholesterolu u skupin s tučnou dietou bylo ovšem mnohem výraznější než po aplikaci citalopramu. Aditivní efekt těchto dvou faktorů nebyl prokázán.

Dále jsme na konci experimentu zaznamenali signifikantní snížení sérového leptinu po aplikaci citalopramu, tučná dieta naopak leptin zvyšovala. Leptin je anorexigenním hormonem, který signalizuje stav tukových zásob organismu, omezuje příjem potravy a zvyšuje výdej energie. U prozánětlivého cytokinu PAI- 1 došlo k signifikantnímu zvýšení jeho sérové hladiny oproti kontrole jak vlivem léčby, tak vlivem diety. Změny v hladinách cytokinů a adipokinů byly patrné až po 35 dnech, výsledky kratšího sedmidenního pokusu neukázaly žádný statisticky významný rozdíl.

Sledované změny ve složení lipidového spektra a hladinách leptinu a PAI-1 po aplikaci citalopramu nastaly bez ovlivnění hmotnosti zvířat. Relativní přírůstek hmotnosti se mezi jednotlivými skupinami experimentálních zvířat významně nelišil.

Závěr

Naše studie naznačuje narušení metabolismu lipidů a ovlivnění hladiny některých adipokinů a cytokinů po aplikaci citalopramu. Společně s nezdravými stravovacími návyky psychiatrických pacientů může být ovlivnění plazmatických hladin lipidů a adipokinů průvodním jevem a příčinou metabolických změn při podávání SSRI antidepressiv.

Seznam literatury:

BEYAZYÜZ, Murat, et al. Relationship between SSRIs and metabolic syndrome abnormalities in patients with generalized anxiety disorder: a prospective study. *Psychiatry investigation*, 2013, 10.2: 148-154.

HORSKA, Katerina, et al. Olanzapine-depot administration induces time-dependent changes in adipose tissue endocrine function in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 2016, 73: 177-185.

KOLCSAR, Melinda, et al. Fluoxetine influence on body weight, serum adiponectin level and adipose tissue triglycerides levels in rats. *Farmacologia*, 2016, 64.4: 599-604.

TANYANSKIY, Dmitry A., et al. Association of adipokines with metabolic disorders in patients with schizophrenia: Results of comparative study with mental healthy cohort. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 2015, 9.3: 163-167.

ZEMDEGS, Juliane, et al. High fat diet induced metabolic disorders impairs 5 HT function and anxiety like behavior in mice. *British journal of pharmacology*, 2015.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 316/2017/FAF.

Hodnocení bioaktivních látek instrumentálními metodami

Nikola Čalkovská¹, Radka Opatřilová¹

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

Úvod

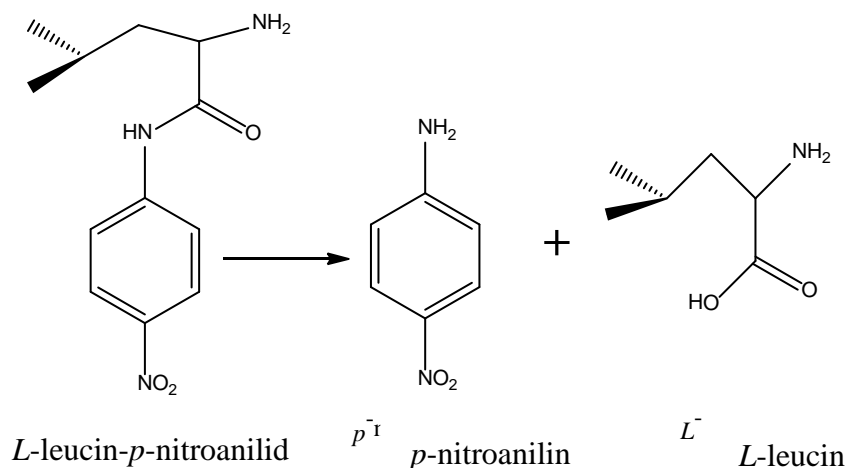
Na Farmaceutické fakultě a jejím Ústavu chemických léčiv (UCHL) probíhá vývoj a optimalizace instrumentálních analytických pro hodnocení bioaktivních látek pomocí moderního zařízení Cytation 3. Tento revoluční hybridní zobrazovací multidetekční reader disponuje zobrazovacím modulem pro snímání vzorků v destičkách (1–384 jamek) s detekcí v oblasti UV-VIS a je vybaven možností třepání a inkubace do 45 °C. Reader je vhodný pro měření v ultranízkych objemech (2 mikrolitry). Reader umožňuje měření absorbance, fluorescence, TRF (časově rozlišná fluorescence) fluorescence, fluorescenční polarizace a luminiscence. Systém umožňuje kombinaci optického a volitelně i laserového autofokusu. Využití zařízení je směřováno pro měření aktivity enzymů pomocí absorbance a fluorescence, TRF fluorescence transferáz a esteráz [1]. Vhodně zvolenými parametry přístroje můžeme stanovit metabolickou aktivitu buněk. Analýza látek na tomto přístroji je velmi rychlá a přesná, při nízkých nákladech na analýzu [2].

Na optimalizaci struktury nových potenciálních léčiv v rámci syntézy homologní řady léčiv z oblasti inhibitorů enzymů se podílí kolektiv pracovníků na UCHL. Na základě tohoto výzkumu na UCHL byly připraveny inhibitory enzymu aminopeptidázy N, chemicky – substituované N-aryloxy-N'-aminoacylhydraziny. Dosud se aktivita těchto inhibitorů testovala na stolních UV/VIS spektrofotometrech. Tyto metody jsou velmi časově náročné a nákladné, metody se potýkají s nižší citlivostí, je spotřebováváno vyšší množství enzymů, substrátů i inhibitorů.

Námi studovaný enzym Aminopeptidáza N patří mezi neuropeptidázy. Podílí se na řízení aktivity peptidických neurotransmiterů a také na jejich štěpení. Inhibitory aminopeptidázy N jsou potenciálními léčivy neurodegenerativních onemocnění například Alzheimerovy choroby, která je v současnosti nevléčitelná a používaná léčiva přináší pacientům jen poměrně nízký prospěch [3] [4]. Proto výzkum a vývoj nových léčiv a testování jejich aktivity je prioritou výzkumu na UCHL.

Materiál a metodika

Při vývoji metody bylo postupováno systematicky. Po prvotních analýzách byl vybrán, pro enzym aminopeptidázu N, substrát L-leucin-*p*-nitroanilid, ze kterého hydrolyzou vzniká *p*-nitroanilin.



Obr. 1 Schéma reakce vzniku substrátu [5]

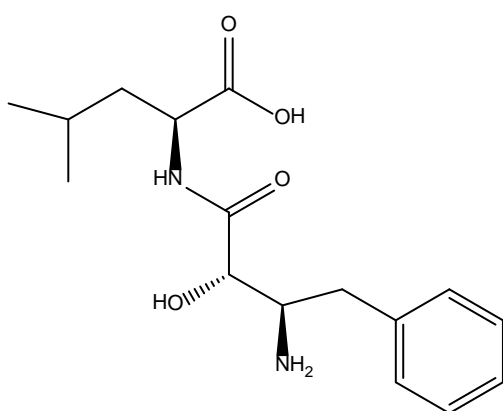
Koncentraci vznikajícího *p*-nitroanilinu stanovujeme spektrofotometricky pomocí readru Cytation 3. Měření absorbance probíhalo při 405nm, což je absorpční maximum *p*-nitroanilinu. Protože aktivita enzymů je závislá také na teplotě, proto veškerá stanovení probíhala při 37 °C. Při optimalizaci metody měření bylo nutné také stanovit dobu inkubace. Tato byla stanovena při opakovaném pokusu pro měření absorbance v jednotlivých časových intervalech v celkové délce 180 minut.

Optimalizací metody byla také stanovena nejvhodnější koncentrace substrátu, která byla stanovena na základě měření absorbancí ve vzorcích se vzrůstající koncentrací substrátu. Tato měření probíhala při 37°C po 60 minutové inkubaci, tato doba inkubace byla zvolena, jako dostatečně dlouhá pro měření absorbance.

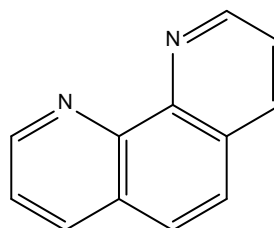
Všechny analýzy probíhaly při fyziologické pH, které bylo udržováno pomocí pufru. Pro pufování bylo nutné zvolit takovou látku, která není toxická, je izotonická, její pufovací schopnosti se shodují s fyziologickým pH. Pufr by měl být také běžně používán a mohl by tedy být dále využit v dalším testování případných inhibitorů. Byly testovány pufované fyziologické roztoky TBS (Tris buffer saline) tris pufr s přidavkem chloridu sodného PBS (Phosphate buffer saline) fosfátový pufr s přidavkem chloridu sodného, BBS (Borate buffer

saline) borátový pufr s přidavkem chloridu sodného, pro ověření zdali jsou pufované roztoky potřebné, byl testován i samotný fyziologický roztok. Všechny pufovací roztoky byly připraveny v přesných koncentracích, následně bylo jejich pH upraveno na testované pH v rozmezí 7 - 9.

Po optimalizaci podmínek analýzy byla otestována linearita enzymatické reakce a dále byla stanovena K_M (Michaelisova konstanta). Poté bylo možné začít testovat potenciální inhibitory aminopeptidázy N. Testované látky byly odvozeny od struktury N-aroyle-N'-aminoacylhydrazinu. Při testování potenciálních inhibitorů byl, jako standard zvolen bestatin a o-fenantrolin.



Obr. 2 Bestatin

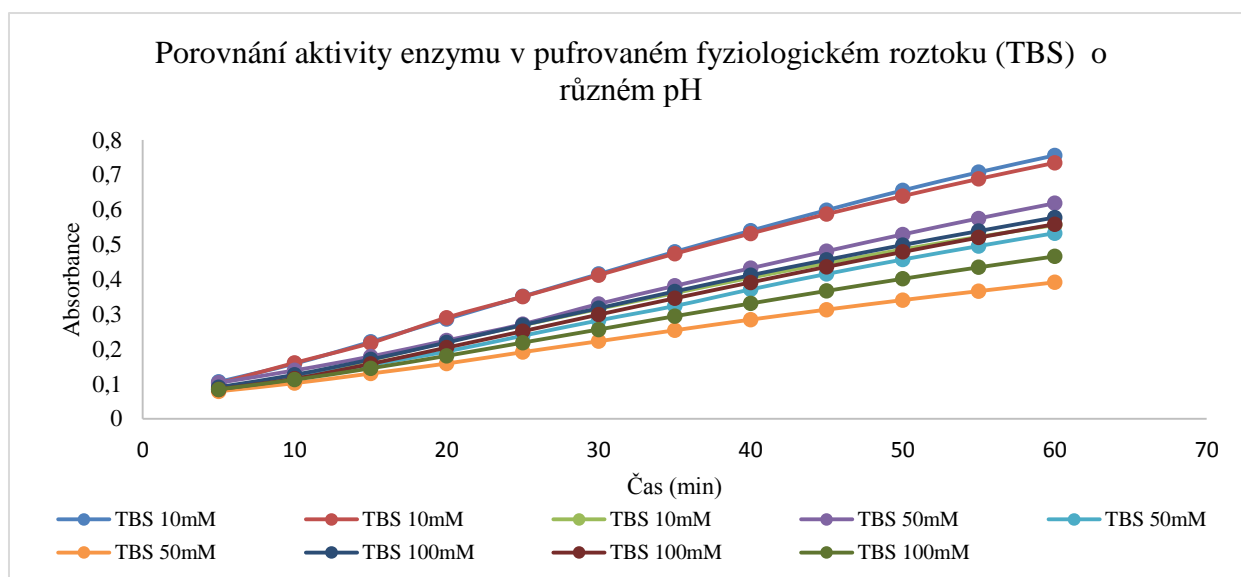


Obr. 3 o-fenantrolin

Výsledky

Za účelem vývoje analytické metody pro prvotní testování látek syntetizovaných na ÚCHL, jako potenciální inhibitorů aminopeptidázy, byla vytvořena metoda, která je vhodná pro reader Cytation 3. Tato metoda je opakovatelná a specifická pro aminopeptidázu N a použitý substrát L-leucin-*p*-nitroanilid, je dostatečně citlivá. Nejnižší množství substrátu, které lze použít je v koncentraci 50 μ M.

Jako vhodné podmínky pro analýzu byla zvolena inkubace při 37°C po dobu 60 minut, dále byl vybrán vhodný pufr TBS (Tris buffer saline) o koncentraci 10mM a pH 7,4.



Obr. 4 Porovnání aktivity enzymu

Závěr

Vytvořená metoda byla použita pro testování potenciálních inhibitorů aminopeptidázy N, které byly syntetizovány na ÚCHL. Některé potenciální inhibitory již vykazují vysokou aktivitu v této specifické metodě pro hodnocení aktivity látek vhodných jako potenciální léčiva neurodegenerativních onemocnění. U těchto látek byla pomocí programu vypočítána IC_{50} .

Seznam literatury

- [1] BioTec.(2013).http://www.biotek.com/products/imaging/cytation3_cell_imaging_multi_mode_reader.html. <http://www.biotek.com> cit. 1. 12 2016,
- [2] Adekunle Adesanya, N. L.: Host suitability and diet mixing influence activities of detoxification enzymes in adult Japanese beetles. Journal of Insect Physiology, 88, 55-62 (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.03.002>
- [3] Noble F., Roques B.: Protection of endogenous enkephalin catabolism as natural approach to novel analgesic and antidepressant drugs. Expert Opin. Ther. Targets. 11, 145-159 (2007).
- [4] John H., Schulz S., Forssmann W.G.: Comparative in vitro degradation of the human hemorphin LVV-H7 in mammalian plasma analysed by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry. Biopharm. Drug. Dispos. 28, 73-85 (2007).
- [5] <http://www.sccj.net/CSSJ/jcs/v5n4/a4/document.pdf>

Tato práce vznikla za finanční podpory IGA VFU Brno 317/2017/FAF.

Hodnocení proapoptotických účinků nových salicylanilidových derivátů na lidských leukemických buňkách THP-1

Tereza Kauerová, Peter Kollár

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

Úvod

Salicylanilidové deriváty, mezi něž se na základě principu cyklické analogie řadí i nově syntetizované hydroxynaftanilidy, patří mezi farmakologicky aktivní látky s širokým spektrem účinků. Vedle antibakteriální či antimykobakteriální aktivity jsou v současné době salicylanilidy předmětem studia také z hlediska slibných protinádorových účinků. Doposud bylo prokázáno, že salicylanilidové deriváty vykazují strukturní podobnost s řadou inhibitorů tyrozinkináz jako jsou např. gefitinib či erlotinib, léčiv klinicky používaných jako inhibitory receptorových tyrozinkináz epidermálního růstového faktoru. U řady nově syntetizovaných salicylanilidů byla tato inhibiční aktivita prokázána v podmínkách *in vitro*, další sloučeniny byly potvrzeny také jako účinné inhibitory erbB-2 signální kaskády [1,2]. U řady salicylanilidových derivátů byla potvrzena schopnost ovlivňovat průběh buněčného cyklu či indukovat apoptózu, a to vnitřní apoptotickou neboli mitochondriální cestou [1,3]. Některé studie prokazují, že dalším možným místem zásahu salicylanilidů v buňce jsou právě mitochondrie. Zahájení mitochondriální apoptotické dráhy spočívá ve změně permeability mitochondriální membrány, což umožňuje uvolnění řady proapoptotických faktorů jako je např. cytochrom C, také dochází k poškození elektronového transportu a oxidativní fosforylace či ke změně redoxního potenciálu, což vede ke zvýšení buněčného oxidativního stresu. Uvolnění vzniklých superoxidových aniontů či molekul peroxidu vodíku potom také sehrává roli při indukcii apoptózy [4,5]. Cílem tohoto projektu je navázat na předchozí studie antiproliferačních a proapoptických účinků, které prokázaly schopnost nitro-substituovaných hydroxynaftanilidů inhibovat buněčný cyklus a indukovat apoptózu u lidských nádorových buněčných linií [1]. Na základě studia vztahu struktury a účinku tak byly pro tento projekt zvoleny strukturně obměněné látky, které splňují předpoklady pro účinnou indukcii apoptózy.

Materiál a metodika

Testované látky

Látky testované v rámci tohoto projektu byly deriváty ze skupiny 1-hydroxynaftalen-2-karboxanilidů, které byly syntetizovány na Ústavu chemických léčiv Farmaceutické fakulty

VFU Brno. Konkrétně se jednalo o následující sloučeniny: *N*-(3,5-difluorofenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**1**); *N*-[3,5-bis(trifluoromethyl)fenyl]-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**2**); *N*-(4-bromo-3-fluorofenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**3**); *N*-(3-fluoro-5-trifluoromethylfenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**4**); *N*-(4-bromo-3-trifluoromethylfenyl)-1-hydroxynaftalen-2-karboxamid (**5**). Efekt látek byl testován v rozsahu koncentrací 0,5 – 20 $\mu\text{mol/l}$. Testované látky byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu, jeho výsledná koncentrace v rámci experimentů pak nepřesáhla 0,1 %.

Buněčné linie

Experimenty byly provedeny s využitím dvou buněčných linií, THP-1 nádorové linie lidských monocytárních leukemických buněk a 3T3-L1 nenádorové linie myších embryonálních fibroblastů. THP-1 buněčná linie byla kultivována v RPMI 1640 médiu a 3T3-L1 buněčná linie v DMEM médiu, v obou případech obohacených o 10 % fetálního bovinního séra a antibiotika (100 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ penicilin, 100 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ streptomycin). Kultivace probíhala v prostředí inkubátoru při teplotě 37 °C s 5% obsahem CO_2 v atmosféře.

Hodnocení antiproliferačního a cytotoxického efektu

Antiproliferační aktivita testovaných látek byla hodnocena pomocí WST-1 analýzy, k analýze byl použit WST-1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo) dle pokynů výrobce. Cytotoxický efekt látek byl hodnocen metodou barvení buněk roztokem erytrosinu B dle [1].

Flowcytometrické analýzy

K analýze apoptózy pomocí duálního značení buněk annexinem V-FITC a propidium jodidem byl použit komerčně dostupný kit Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit (Cell Singaling Technology, Danvers, MA, USA) dle pokynů výrobce. Pro hodnocení přítomnosti subdiploidní populace byly buňky fixovány v 70% ethanolu a značeny propidium jodidem dle [1]. Stanovení míry uvolnění mitochondriálního cytochromu C bylo provedeno dle [6]. Stanovení hladiny mitochondriálního superoxidu bylo provedeno dle [7]. Měření proběhlo pomocí průtokového cytometru Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, USA) a *FACSVerse* (BD, Germany). Získaná data byla pak vyhodnocena pomocí Kaluza Analysis Software (Beckman Coulter, USA).

Westernový přenos

Příprava buněčných lyzátů, zpracování vzorků, Westernový přenos a následná denzitometrická analýza byly provedeny dle [1].

Statistická analýza

Data byla statisticky hodnocena pomocí neparametrického one-way ANOVA testu v kombinaci s Dunnettovým testem na uvedených hladinách statistické významnosti ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$). Prezentovaná data jsou výsledkem minimálně tří nezávislých měření.

Výsledky

V úvodní části studie byl testován efekt na metabolickou aktivitu THP-1 buněčné linie u pěti hydroxynaftanilidových derivátů, které se vzájemně odlišovaly charakterem a pozicí dvou substituentů na anilidové části základního společného skeletu. V testovaném koncentračním rozmezí 0,5 – 20 $\mu\text{mol/l}$ všechny látky po 24 hodinách vykazovaly u THP-1 buněk inhibiční efekt na jejich metabolickou aktivitu. Výsledné hodnoty IC_{50} jsou uvedeny v Tabulce 1. Nejsilnější efekt byl pozorován u látky **2**, $\text{IC}_{50} = 3,24 \pm 0,775 \mu\text{mol/l}$, naproti tomu stejná koncentrace této látky nevyvolala signifikantní pokles metabolické aktivity u nenádorové buněčné linie 3T3-L1. Na základě uvedených dat byl derivát **2** zvolen jako modelová látka pro následující fázi studie zabývající se testováním jeho potenciálního proapoptického účinku.

Tabulka 1: Hodnoty IC_{50} testovaných látek stanovené WST-1 analýzou po 24hodinové inkubaci.

<i>Testovaná látka</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
$\text{IC}_{50} \pm \text{SD}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$8,96 \pm 0,775$	$3,24 \pm 0,775$	$9,35 \pm 1,967$	$6,15 \pm 0,998$	$12,04 \pm 0,448$

Hemocytometrické stanovení viability prokázalo, že látka **2** vyvolala koncentračně i časově závislý pokles viability buněk THP-1. V rámci následných experimentů byla zjištěna zvýšená míra externalizace fosfatidylserinu jako charakteristického znaku časné fáze apoptózy po inkubaci THP-1 buněk s látkou **2**, signifikantní nárůst byl pozorován po 24hodinové inkubaci ($p < 0,001$). Stejně tak byla pozorována přítomnost subdiploidní populace po působení této

látky. V souladu s těmito výsledky byl pomocí Westernového přenosu dále prokázán časově závislý pokles hladiny prokaspázy 3, klíčové exekuční kaspázy, štěpení PARP a pokles hladiny antiapoptotického proteinu Bcl-2. Aktivita kaspázy 8 potvrzena nebyla. Naproti tomu jsme již po inkubačním době 6 hodin s látkou **2** zaznamenali zvýšenou míru uvolnění cytochromu C do cytosolu, který je jedním z významných faktorů mitochondriální apoptotické dráhy. Tyto výsledky podpořil i současně zaznamenaný nárůst hladiny mitochondriálních superoxidových aniontů.

Závěr

Na základě předchozích studií, které povrdily antiproliferační a proapoptotické účinky u monosubstituovaných hydroxynaftanilidů, bylo pro tento projekt zvoleno pět nových, rozdílně disubstituovaných hydroxynaftanilidových derivátů, které díky svým strukturním parametrům splňovaly předpoklady pro obdobné účinky. Všech pět derivátů účinně inhibovalo metabolickou aktivitu THP-1 buněk, nejefektivnější z nich, látka **2**, pak v navazujících experimentech vykazovala proapoptotické účinky na tuto buněčnou linii. Lze předpokládat, že apoptóza mohla být navozena vnitřní mitochondriální cestou. Výsledky tohoto projektu tak mohly přispět k probíhajícímu studiu biologických účinků hydroxynaftanilidových derivátů, jejichž přesný mechanismus potenciálního protinádorového působení stále není plně objasněn.

Seznam literatury:

1. Kauerová T. et al. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effect of Novel Nitro-Substituted Hydroxynaphthanilides on Human Cancer Cell Lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17: 1219.
2. Zhu X.-F. et al. SUCI02 Inhibits the erbB-2 Tyrosine Kinase Receptor Signaling Pathway and Arrests the Cell Cycle in G1 Phase in Breast Cancer Cells. *Cancer Science.* 2006; 97: 84–89.
3. Imramovský A. et al. Substituted 2-hydroxy-N-(arylalkyl)benzamides Induce Apoptosis in Cancer Cell Lines. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2013; 68: 253-259.
4. Lee I.-Y. et al. Structure-Activity Relationships of Antitubercular Salicylanilides Consistent with Disruption of the Proton Gradient via Proton Shuttling. *Bioorganic & medicinal chemistry.* 2013; 21: 114-126.

5. Circu, M. L., & Aw, T. Y. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems and Apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2010; 48: 749-762.
6. Waterhouse, N. J. et al. Assaying Cytochrome C Translocation during Apoptosis. *Methods Mol. Biol.* 2004; 284: 307–313.
7. El Gaafary M. et al. An α -Acetoxy-Tirucallic Acid Isomer Inhibits Akt/mTOR Signaling and Induces Oxidative Stress in Prostate Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015; 352(1): 33-42.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 318/2017/FaF.

Syntéza derivátů 1,3,5-triazinu obsahujících nové triazolové, piperazinové a další dusíkaté strukturní motivy a jejich prekurzorů s využitím metod „zelené chemie“

Eva Havránková¹, Jozef Csöllei¹, Pavel Pazdera²

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

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno²

Úvod

V posledních letech bylo prokázáno, že analoga 1,3,5-triazinu (*s*-triazinu) vykazují široké spektrum biologických aktivit, od anti-bakteriálních až po anti-rakovinové vlastnosti. [1] U těchto analogů se pak často vyskytují strukturní motivy typu substituovaných piperazinových, substituovaných triazolových a dalších dusíkatých heterocyklických kruhů, dále různé aminoalkoholy, případně další dusíkaté substituenty. [2, 3]

Konkrétním cílem studie biologické aktivity, kde již substituované *s*-triaziny prokázaly svou biologickou účinnost, je izozym lidské karboanhydrázy IX (human carbonic anhydrase; hCA IX). [4,5] Tento enzym je úzce spojen s tumorovým bujením, konkrétně s tumorovou hypoxií.

Při syntéze uvedených analogů *s*-triazinu a jejich prekurzorů je však jen v minimální míře využíváno metod „zelené chemie“, jako jsou organokatalýza, metalokatalýza a jejich kombinace, katalýza s využitím imobilizovaných katalyzátorů, couplingové reakce, „click“ reakce a další. [6]

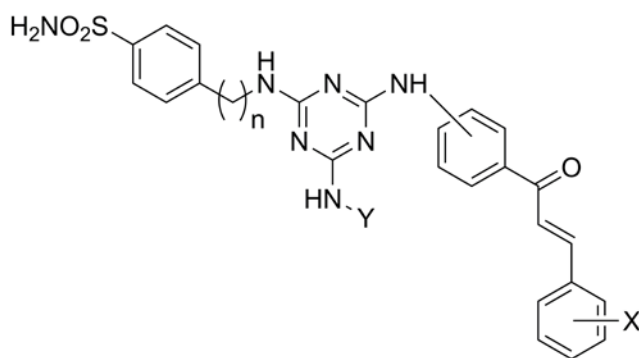
Vzhledem k současnému vývoji farmaceutického a chemického průmyslu, kdy je kladen stále větší důraz na začleňování principů zelené chemie do chemických výroby, je využití těchto principů již během návrhu syntézy nové účinné látky značnou výhodou. Vezmeme-li v úvahu také široké spektrum biologických aktivit analogů *s*-triazinu, jejich potenciál a nekompletnost současného stavu jejich poznání, získáváme velmi slibný a zajímavý předmět výzkumu.

Výsledky a diskuse

V prvním kroku byla provedena predikce biologické aktivity vybraného data-setu struktur proti izozymu lidské karbohydrázy IX (hCAIX) spojovaného s tumorovým bujením. Toto dokování bylo provedeno pomocí softwarového balíku Schrödinger. Výsledné struktury (viz Obr. 1) byly poté syntetizovány v souladu s principy Zelené chemie.

Cílové deriváty *s*-triazinu byly připraveny z komerčně dostupného kyanurtrichloridu (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu) substitucí jednotlivých chlorů. K substituci atomů chloru dochází *per partes* přes atom dusíku alifatické primární nebo sekundární amino-skupiny daného substituentu. Substituce nejreaktivnějšího (prvního) atomu chloru může probíhat cestou nukleofilní aromatické substituce nebo výhodněji procesem katalyzovaným novým imobilizovaným Cu(I) komplexem (připraveným dle [7]). Jestliže byla využita katalýza Cu(I), pak se jedná o cestu oxidativní adice - heterolytické adice - reduktivní eliminace. Příprava disubstituovaných a trisubstituovaných derivátů *s*-triazinu byla prováděna výhradně s využitím imobilizovaných iontů Cu(I). V principu se jedná o aplikaci Ullmannovy syntézy (případ Buchwaldova-Hartwigova C-N-couplingu katalyzovaného Cu(I)) s použitím iontů Cu(I) imobilizovaných na slabě kyselém makroporézním katexu polyakrylátového typu jako levného, recyklovatelného a stabilního katalyzátoru. Důsledkem použití imobilizovaných Cu(I) iontů je nejen zvýšení reakční rychlosti ale i vyšší výtěžky jednotlivých produktů. Substituci všech tří atomů chloru lze s úspěchem provést jako one-pot reakci za kontrolovaného teplotního režimu. Při syntézách tohoto typu je postupné zvyšování teploty (od substituce prvního atomu chloru po substituci třetího) nutné jednak pro kontrolu počtu substituovaných atomů chloru (tj. vznik mono-, di- nebo tri-substituovaných derivátů), jednak z důvodu poklesu reaktivity po zavedení příslušného dusíkatého substituentu.

Pořadí zavedení příslušných substituentů bylo prováděno s ohledem na reaktivitu aminových prekurzorů tak, aby nejméně reaktivní reagoval v prvním (nejvíce reaktivním) syntetickém stupni, a naopak nejvíce reaktivní amin pak v posledním (nejméně reaktivním) syntetickém stupni.



Obr 1. Obecná struktura připravených substituovaných *s*-triazinů s potencionální vysokou biologickou aktivitou. X = -H, -OH, -NH₂, atd. Y = různě substituované alkoholy, piperaziny, triazoly, atd., n=0-2.

Pro vytvoření postranního aminochalkonového substituentu byly s úspěchem použity ionty Ce(III) imobilizované na slabě kyselém katexu polyakrylátového typu (katalytický komplex

připraven dle [7]). Substituovaný 3-, resp. 4-aminochalkonový strukturální motiv byl formován aldolovou kondenzací na příslušném aminoacetofenonu již navázaném na *s*-triazinu se substituovaným benzaldehydem. Takto provedená syntéza probíhala rychleji a ve vyšších výtěžcích, než je při přípravě daných produktů klasickými metodami (např. za katalýzy NaOH) běžné.

Konečné produkty byly identifikovány pomocí ¹H-NMR, ¹³C-NMR, IR a dalších metod. V další fázi se pokusíme zjistit hodnoty biologických aktivit syntetizovaných látek a vztah mezi jejich strukturou a příslušnými hodnotami biologické aktivity.

Závěr

S pomocí dokovacího softwaru Schrödinger bylo navrženo několik derivátů *s*-triazinu obsahujících různé aminoalkoholové, piperazinové, aminochalkonové a další substituenty s potenciální biologickou aktivitou proti isozymu hCAIX. Nejpravděpodobněji účinné látky byly syntetizovány. Design všech syntéz byl navržen s ohledem na cíle a principy zelené chemie. Výsledkem řešení je one-pot syntetický proces, v němž je dosahováno vyšších výtěžků při kratších reakčních časech, než je obvyklé u podobných substitucí na kyanurtrichloridu. Takto optimalizované syntetické postupy mohou být aplikovány při přípravě všech *s*-triazinových derivátů s drobnými obměnami s ohledem na reaktivitu jednotlivých aminových substituentů. Dalším krokem našeho týmu bude testování biologické aktivity již připravených derivátů.

Seznam literatury:

- [1] Kumar, R.; Singh, A. D.; Singh, J.; Singh, H.; Roy, R. K.; Chaudhary, A.; 1,2,3-Triazine Scaffold as a Potent Biologically Active Moiety: A Mini Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2014, **14**, 72-83.
- [2] Abonia, R.; Insuasty, D.; Castillo, J.; Insuasty, B.; Quiroga, J.; Nogueras, M.; Cobo, J.; Synthesis of novel quinoline-2-one based chalcones of potential anti-tumor activity. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, **57**, 29-40.
- [3] Wang, Y.; Ai, J.; Wang, Y.; Chen, Y.; Wang, L.; Liu, G.; Geng, M.; Zhang, A.; Synthesis and c-Met kinase inhibition of 3, 5-disubstituted and 3, 5, 7-trisubstituted quinolines: identification of 3-(4-acetylpiperazin-1-yl)-5-(3-nitrobenzylamino)-7-(trifluoromethyl) quinoline as a novel anticancer agent. *J. Med. Chem.*, 2011, **54** (7), 2127-2142.

- [4] Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Cancer-Related Carbonic Anhydrase Isozymes, in: Supuran, C.T.; Scozzafava, A.; Conway, J. (Eds.), Carbonic Anhydrase-Its Inhibitors and Activators, CRC: Boca Raton,FL, USA, 2004, p 253.
- [5] Pastorekova, S.; Parkkila, S.; Pastorek, J.; Supuran, C.T.; Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2008, **19**, 199-229.
- [6] Havránková, E.; Pospíšil, P.; Pazdera, P.; Synergism of Metal and Organocatalysis in Condensation Reactions of Aromatic Aldehydes with Anilines Affording Imines: Effect of Catalysts on the Base of a Supported Cerium(III) and Proline. *Science Journal of Chemistry, Special Issue, Green Chemistry: Synthesis and Its Uses*, 2014, 2 (1), 1-8.
- [7] Pazdera, P.; Zberovská, B.; Němečková, D.; Datinská, V.; Šimbera, J.; Catalyst for Chemical Syntheses Based on Metal Complex and Process for Preparing thereof, CZ 305277 (B6), Year: 06/2015.

Děkuji Vladimíru Garajovi za dokování inhibiční aktivity proti izozymu hCAIX, daného datasetu struktur, provedeného pomocí softwarového balíku Schrödinger (Katedra farmaceutické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského Bratislava, Odbojárov 10, 831 04 Bratislava, garajl@uniba.sk).

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 319/2017/FaF.

Stanovení obsahu proanthokyanidinů v nutraceutických přípravcích

Klára Urbanová, Klára Odehnalová

*Ústav chemických léčiv, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Česká republika*

Úvod

Proanthokyanidiny (PAC) představují skupinu polyfenolů, přírodních sekundárních metabolitů, které jsou tvořeny vzájemně spojenými oligomerními jednotkami flavan-3-olů [1]. Bylo prokázáno, že tyto látky vykazují (mimo jiné) účinky antioxidační, antimikrobiální, antialergické, protizánětlivé a také antihypertenzní aktivitu [2-6]. Stanovení obsahu PAC v nutraceutických přípravcích je důležité pro ověření autentičnosti těchto přípravků a jejich účinnosti [7]. Doposud byla vyvinuta a použita řada analytických metod včetně metod spektrofotometrických, gravimetrických, chromatografických i hmotnostně spektrometrických [4,6,8]. Kvantifikace PAC je však obtížná, protože se vyskytují jako polydisperzní hetero-oligomery.

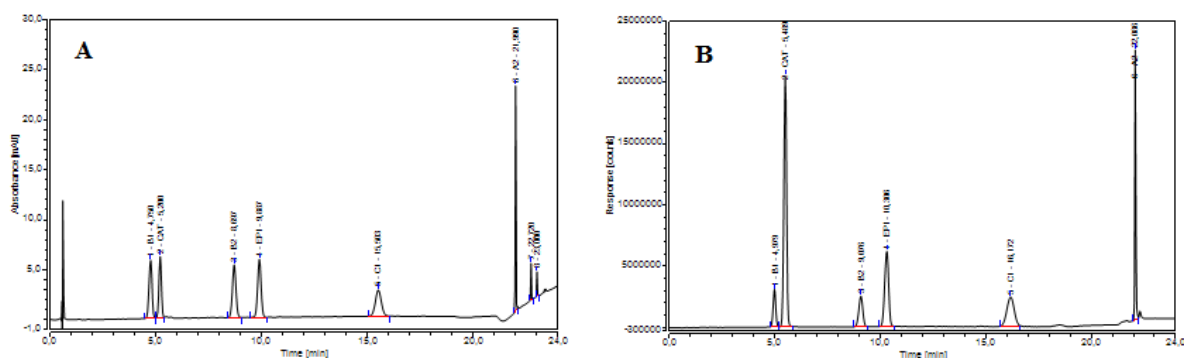
Cílem projektu bylo vyvinout metodu stanovení proanthokyanidinů, která by pomohla usnadnit porovnání jejich obsahu ve vybraných nutraceutických výrobcích na trhu. V rámci projektu jsme se zaměřili na separaci proanthokyanidinů a to konkrétně prokyanidinů A2, B1, B2 a C1 a dále katechinu a epikatechinu, jejichž autentické standardy jsou komerčně dostupné.

Materiál a metody

Separace byla realizována na kapalinovém chromatografu Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) kontrolovaném Chromeleon® Chromatography Data systémem (verze 7.2). K detekci byl použit detektor diodového pole (DAD) s nastavenou vlnovou délkou na hodnotu 280 nm a fluorescenční detektor (FLD), kde excitační vlnová délka byla nastavena na hodnotu 230 nm a emisní vlnová délka na 315 nm. Za účelem separace výše uvedených PAC byly testovány dvě chromatografické kolony: Hypersil Gold CN (100 x 3 mm; 3µm) a Hypersil Gold C18 (100 x 3 mm; 3µm). Binární mobilní fáze se sestávala z vodného roztoku 0,1% kyseliny mravenčí (složka A) a 0,1% kyseliny mravenčí (FA) v acetonitrilu (složka B). K eluci analytů byl použit víceúrovňový gradient. Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na hodnotu 1,2 ml/min, teplota kolony na 30°C a nastříkovaný objem činil 10 µl.

Výsledky

V průběhu optimalizace separace byla vyzkoušena řada různých mobilních fází (0,1 – 1% FA, acetonitril, methanol, tetrahydrofuran) při použití obou výše zmíněných kolon. Jako nejvhodnější byla pro separaci vybrána kolona Hypersil Gold C18. Podmínky separace byly optimalizovány za použití spektrofotometrického detektoru při 280 nm (*Obr. 1A*), poté bylo optimalizováno nastavení detektoru fluorescenčního (*Obr. 1B*). Retenční charakteristiky analytů jsou uvedeny v tabulce *Tab. 1*.



Obr. 1: Chromatogram směsi proanthokyanidinů: **A** – $\lambda = 280$ nm, $c \sim 0,01$ mg/ml; **B** – $\lambda_{\text{ex}} = 230$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 315$ nm, $c \sim 0,001$ mg/ml, B1 – prokyanidin B1, CAT – katechin, B2 – prokyanidin B2, EPI – epikatechin, C1 – prokyanidin C1, A2 – prokyanidin A2.

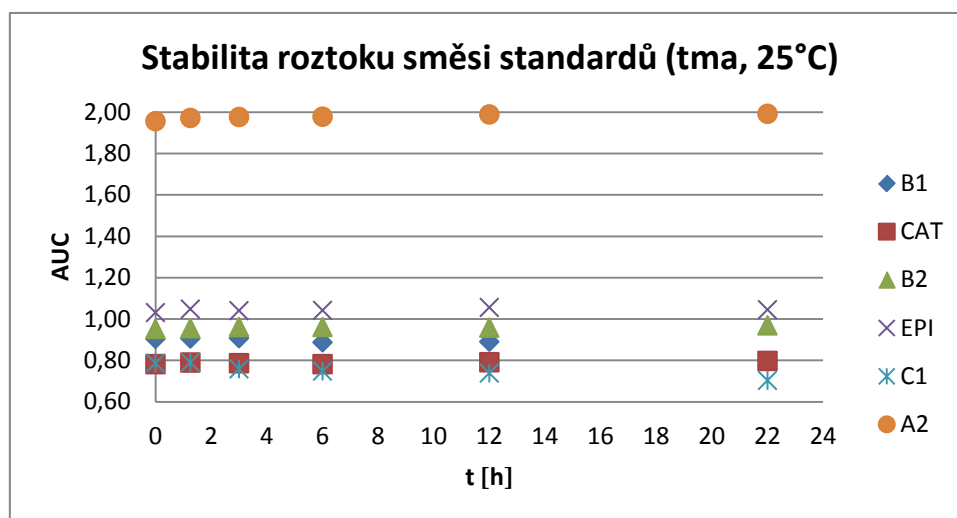
Analyt	t_R [min]	Asymetrie	Rozlišení	Kapacitní faktor	Počet teoretických pater
B1	$4,600 \pm 0,071$	1,03	2,56	10,27	8186
CAT	$5,110 \pm 0,062$	1,03	14,52	11,52	10908
B2	$8,627 \pm 0,104$	1,02	4,25	20,14	14148
EPI	$9,840 \pm 0,107$	1,06	14,99	23,12	19363
C1	$15,483 \pm 0,176$	0,98	24,33	36,95	17206
A2	$21,993 \pm 0,014$	1,26	12,67	52,91	1862115

Tab. 1: Retenční charakteristiky analytů, DAD, $\lambda = 280$ nm; $n = 6$

Pro výše zmíněné analyty byly stanoveny limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) a studována byla také stabilita směsi standardů za laboratorní teploty. Hodnoty LOD a LOQ jsou uvedeny v tabulce *Tab. 2*. Výsledky stabilitní studie jsou znázorněny graficky (*Obr. 2*).

Analyt	LOD _{FLD} [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ _{FLD} [$\mu\text{g/ml}$]	LOD _{280nm} [$\mu\text{g/ml}$]	LOQ _{280nm} [$\mu\text{g/ml}$]
B1	0,0125	0,0378	0,1225	0,3711
CAT	0,0013	0,0040	0,1164	0,3527
B2	0,0355	0,1075	0,1652	0,5006
EPI	0,0051	0,0154	0,1474	0,4468
C1	0,1048	0,3175	0,6246	1,8929
A2	0,0154	0,0466	0,1174	0,3559

Tab. 2: Limity detekce a kvantifikace stanovené pro fluorescenční a spektrofotometrický detektor.



Obr. 2: Stabilitní studie směsi standardů ($c \sim 0,01 \text{ mg/ml}$).

Optimalizovaná metoda byla aplikována na stanovení analytů v reálných vzorcích. Analyzovány byly dvě formy nutraceutických přípravků, sirup (vzorek A) a tablety (vzorek B). Obsah jednotlivých analytů byl kvantifikován metodou přidavku standardu. V tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny výsledky jednotlivých analytů v $\mu\text{g/g}$ a jejich obsah v doporučené denní dávce (DDD).

Analyt	Vzorek A		Vzorek B	
	obsah [$\mu\text{g/g}$]	obsah v DDD [μg]	obsah [$\mu\text{g/g}$]	obsah v DDD [μg]
B1	11,09	213,69	52,77	113,87
CAT	0,40	7,66	13,16	28,41
B2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EPI	1,64	31,64	34,46	74,37
C1	< LOQ	-	< LOQ	-
A2	2,41	46,42	76,64	165,39

Tab. 3: Obsah proanthokyanidinů, katechinu a epikatechinu v reálných vzorcích; FLD, n. d. - nedetekováno, < LOQ – obsah pod limitem kvantifikace.

Závěr

V rámci projektu byla vyvinuta metoda separace katechinu, epikatechinu a prokyanidinů A2, B1, B2 a C1. Vyvinutá metoda byla aplikována na stanovení dvou různých forem reálných nutraceutických přípravků. Dále byly v těchto přípravcích pomocí autentických standardů identifikovány kyseliny gallová, kumarová, kávová, skořicová a benzoová.

Seznam literatury

1. Hong, Y. J., Tomas-Barberan, F. A., Kader, A. A., Mitchell, A.E.; The flavonoid glycosides and procyanidin composition of Deglet Noor dates (*Phoenix dactylifera*). *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2405.
2. Adamson, G.E., Lazarus, S.A., Mitchell, A.E., Prior, R.L., Cao, G., Jacobs, P.H., Kremers, B.G., Hammerstone, J.F., Rucker, R.B., Ritter, K.A., Schmitz, H.H.; HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4184.
3. Karonen, M., Loponen, J., Ossipov, V., Pihlaja, K.; Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 105.
4. Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Zhang, Z., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R.L.; Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J Mass Spectrom* 38 (2003) 1272.
5. Shoji, T., Masumoto, S., Moriichi, N., Kanda, T., Ohtake, Y.; Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 206.
6. Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Prior, R.L., Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J Agric Food Chem* 51 (2003) 7513.
7. Krueger, C. G., Reed, J.D., Feliciano, R.P., Howell, A.B., Quantifying and characterizing proanthocyanidins in cranberries in relation to urinary tract health. *Anal Bioanal Chem* 405 (2013) 4385.
8. Gu, L., Kelm, M.A., Hammerstone, J.F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., Prior, R.L., Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J. Nutr.* 134 (2004) 613.

Tato práce byla financována grantem IGA VFU Brno 320/2017/FaF.

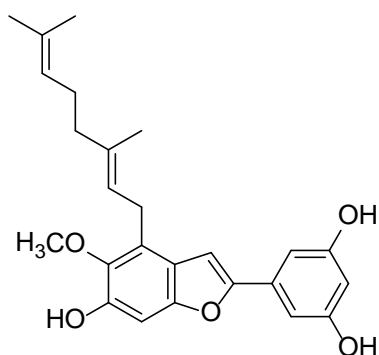
Totální syntéza Mulberrofuranu Y a jeho analogů jako látek se slibnou protizánětlivou aktivitou

Ema Novotná, Anna Faustmannová, Jana Jarábková, Pavel Bobál

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

Úvod

Mulberrofuran Y, chemicky 5-[4-[(2E)-3,7-dimethyl-2,6-oktadien-1-yl]-6-hydroxy-5-methoxy-2-benzofuranyl]-1,3-benzendiol (obr. 1) je přírodní látka izolovaná s morušovníku bílého *Morus alba* L. nebo černého *Morus nigra* L. a patří svou strukturou mezi arylované



Obr. 1 Struktura Mulberrofuranu Y

benzofurany. Tato látka s významnou cytotoxickou¹ a antimikrobiální aktivitou² vykazuje také významnou protizánětlivou³ aktivitu. Ačkoliv je možné mulberrofuran Y izolovat ze směsi látek získaných extrakcí přírodního materiálu, získané množství není postačující pro provedení všech potřebných testů. Navíc jeho analoga nejsou vůbec dostupná. Proto je nevyhnutelné připravit tuto látku chemickou syntézou, která umožní také přípravu jeho analogů. Tímto

způsobem je možné získat větší množství látek, což umožní prozkoumat potenciál mulberrofuranu Y a jeho analogů jako látek s protizánětlivým účinkem. Navíc jeho syntéza zatím nebyla publikována. Návrh syntézy mulberrofuranu Y je znázorněn na Schématu 1.

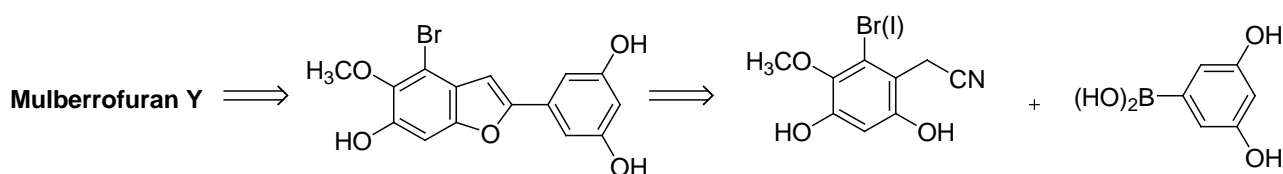


Schéma 1: Zkrácená retrosyntéza mulberrofuranu Y.

Materiál a metodika

Veškeré meziprodukty a produkty byly charakterizovány pomocí ¹H NMR, ¹³C NMR, IČ a HRMS. Čistota připravených sloučenin byla ověřena pomocí TLC nebo HPLC.

Výsledky

Samotnou syntézu mulberrofuranu Y a jeho analogů je možné rozčlenit do tří částí.

1. Ověření syntézy 2-arylbenzofuranů palladiem katalyzovanou cyklizační reakcí *o*-hydroxyarylacetonitrilů s arylboronovými kyselinami⁴. Tato metoda byla úspěšně testována a derivát 2-arylbenzofuranu byl připraven v dobrém výtěžku podle Schématu 2. Nedílnou součástí této syntézy byla příprava *o*-hydroxyarylacetonitrilů⁵ z příslušného benzylalkoholu a kyanidu draselného, a také příprava dimethoxyarylboronové kyseliny transmetalací reakcí přes Grignardovo činidlo z 1-brom-3,5-dimethoxybenzenu. Obě metody byly úspěšně ověřeny a optimalizovány.

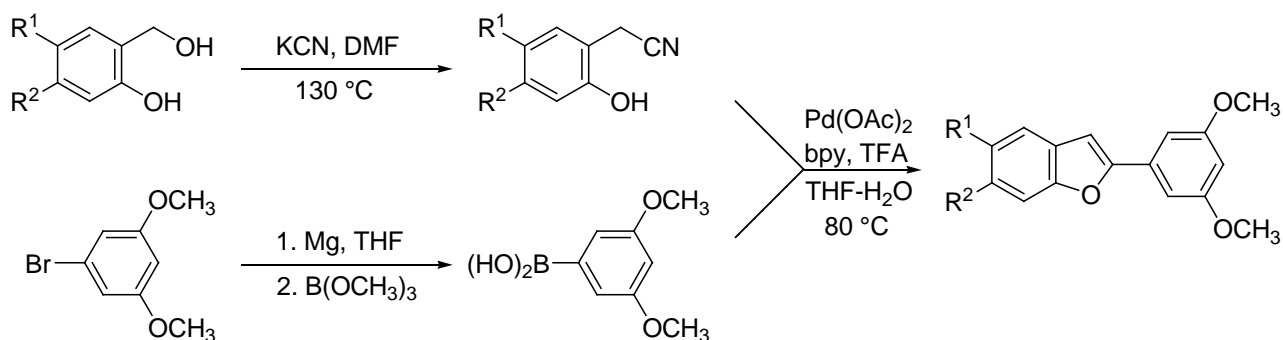


Schéma 2: Ověření syntézy 2-arylbenzofuranů.

2. Druhá část syntézy mulberrofuranu Y představuje vnesení postraního řetězce geranylu dle Schématu 3. Pro přípravu vhodného substrátu pro geranylaci je nutné zavést atom halogenu do vhodné polohy. Kromě selektivní demethylace⁶ byla otestována metoda přípravy bromovaného intermediátu. Připravený bromderivát obsahoval asi 30 % neznámé nečistoty. Separace bromderivátu od neznámé nečistoty a poslední kroky syntézy zahrnující geranylaci, jsou v současné době předmětem výzkumu.

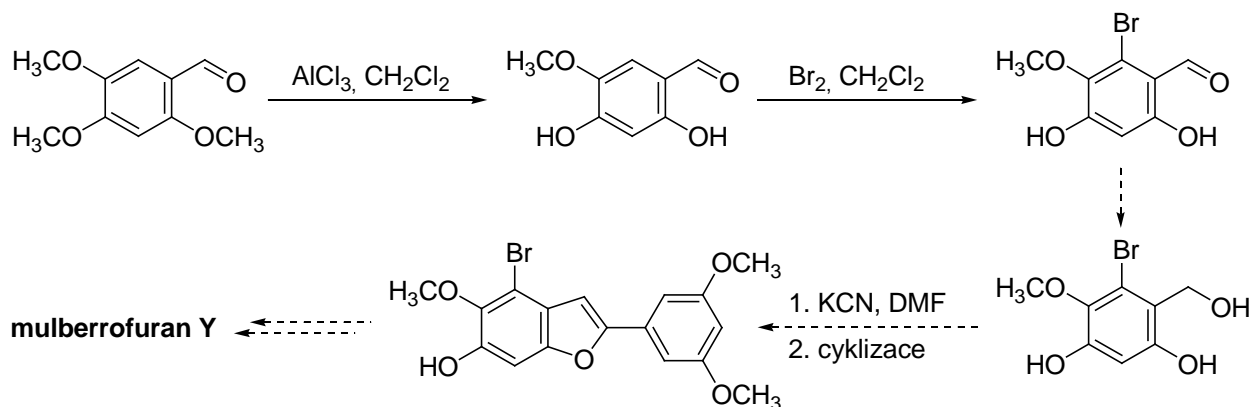


Schéma 3: Metoda přípravy substrátu vhodného k geranylaci.

3. Odstranění chránících skupin z molekuly 2-arylbenzofuranů. Deprotekce byla testována na dimethoxyderivátu, kterého demethylací byl připraven stemofuran A v dobrém výtěžku dle Schématu 4.

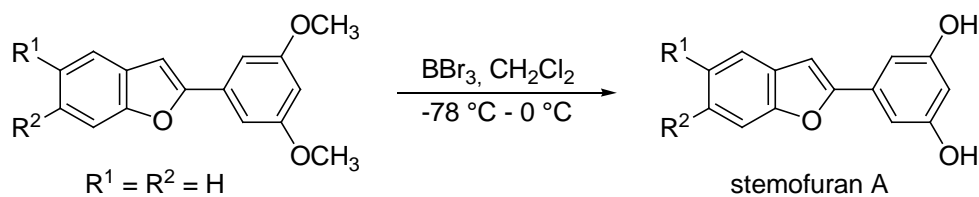


Schéma 4: Ověření metody demethylace – syntéza stemofuranu A.

Závěr

Cílem práce bylo připravit mulberrofuran Y a jeho analogy. Úspěšně byla otestována příprava komerčně nedostupných substituovaných boronových kyselin a phenylacetonitrilů nezbytných pro cyklizaci a dále samotná metoda cyklizace a příprava základního skeletu mulberrofuranu Y. Rovněž bylo vyzkoušeno odchránění, důležité v závěrečné fázi syntézy a zavedení halogenu do molekuly potřebné pro geranylace. Samotná geranylace a syntéza finálního mulberrofuranu Y jsou nadále předmětem výzkumu.

Seznam literatury:

1. Shi, Y.-Q.; Fukai, T.; Sakagami, H.; Chang, W.-J.; Yang, P.-Q.; Wang, F.-P.; Nomura, T., Cytotoxic Flavonoids with Isoprenoid Groups from *Morus mongolica*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 181-188.
2. a) Fukai, T.; Oku, Y.; Hano, Y.; Terada, S., Antimicrobial activities of hydrophobic 2-arylbenzofurans and an isoflavone against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Med.* **2004**, *70*, 685-687.; b) Fukai, T.; Kaitou, K.; Terada, S., Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 708-711.
3. Zelova, H.; Hanakova, Z.; Cermakova, Z.; Smejkal, K.; Dall'Acqua, S.; Babula, P.; Cvacka, J.; Hosek, J., Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Prenylated Substances Isolated from *Morus alba* and *Morus nigra*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1297-1303.
4. Wang, X.; Wang, X.; Liu, M.; Ding, J.; Chen, J.; Wua, H., Palladium-Catalyzed Reaction of Arylboronic Acids with Aliphatic Nitriles: Synthesis of Alkyl Aryl Ketones and 2-Arylbenzofurans. *Synthesis* **2013**, *45*, 2241-2244.

5. Kim, H. J. et al., New synthetic method for benzofurans from 2-(cyanomethyl)phenyl derivatives. *Tetrahedron* **2012**, 68, 3942-3947.
6. Viglianisi, C.; Bartolozzi, M. G.; Pedulli, G. F.; Amorati, R.; Menichetti S., Optimization of the Antioxidant Activity of Hydroxy-Substituted 4-Thiaflavanes: A Proof-of-Concept Study. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 12396-12404.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 323/2017/FaF.

Syntéza a charakterizace potenciálních inhibitorů acetylcholinesterázy

Aleš Kroutil, Anna Hudcová

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

Úvod

Inhibitory acetylcholinesterázy zkr. ACHEI představují skupinu látek různé chemické struktury inhibující acetylcholinesterázu. Zvyšují účinek působení acetylcholinu na synapsi. Patří k nim některá parasymptomimetika, organofosfáty, látky používané jako léky v léčbě demence. Selhání cholinergního systému v CNS je považováno za důležitý patogenetický mechanismus demence. Do této skupiny patří např. donepezil, rivastigmin, takrin, metrifonát, galantamin.

Během řešení předchozího grantového projektu IGA VFU 330/2016/FaF byla zjištěna slibná aktivita některých připravených látek jako inhibitorů acetylcholinesterázy (srovnatelná aktivita s galantaminem). Rozhodli jsme se proto syntetizovat analoga látek, které prokázaly slibnou aktivitu.

Materiál a metodika

Syntéza byla zaměřena na dvě skupiny látek. První z nich jsou alkyl {3-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamáty. Jako výchozí látka byl použit 3-aminoacetofenon, ze kterého byly pomocí příslušných alkylchlorformiátů připraveny alkylestery kyseliny 3-acetylfenylkarbamové. Reakce probíhala za laboratorní teploty v dichlormethanu a za přítomnosti pyridinu. Reakční směs byla extrahována vodou, organická vrstva byla odpařena a surový produkt byl čištěn krystalizací z propan-2-olu. Pro syntézu byly použity methyl-, ethyl-, propyl- a butylchlorformiát.

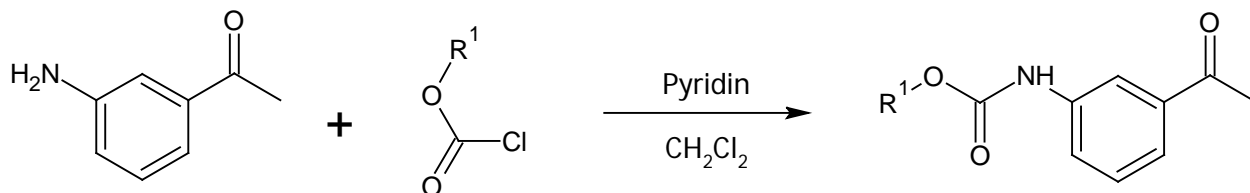


Schéma 1: Syntéza alkyl-(3-acetylfenyl)karbamátů; R¹ – CH₃; C₂H₅; C₃H₇; C₄H₉

Z těchto meziproductů pak byly pomocí Mannichovy reakce s paraformaldehydem a příslušným aminem připraveny finální látky – amoniové soli, které byly následně přečištěny krystalizací a charakterizovány. Jako amin byl použit piperidin a morfolin. V případě

piperidinu byl nejdříve připraven piperidinium chlorid – reakcí piperidinu s chlorovodíkem v diethyletheru.

Vlastní Mannichova reakce probíhala za varu v tetrahydrofuranu za použití piperidinium chloridu, příslušného alkyl-(3-acetylphenyl)karbamátu a paraformaldehydu. Do reakční směsi bylo před reakcí přidáno 0,2 ml 35% HCl. Reakční doba byla šest hodin.

Po ochlazení reakční směsi byl pevný surový produkt izolován filtrací a přečištěn krystalizací z alkoholů (methanol, ethanol, propan-2-ol).

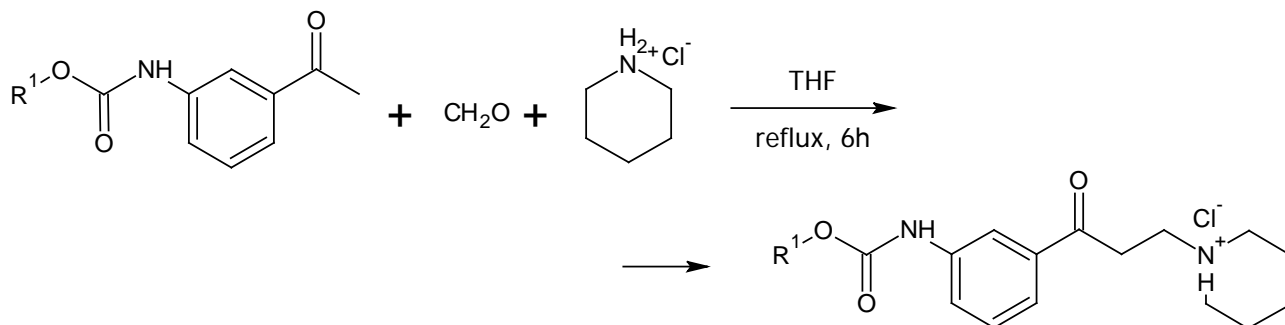


Schéma 2: Mannichova syntéza

V případě derivátů s morfolinem byl do reakční směsi použit morfolin a amoniová sůl byly připravena *in situ* přidavkem 35% HCl.

Druhou skupinou syntetizovaných látek byly alkyl {4-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamáty s modifikací bazické části molekuly za použití N-substituovaných piperazinů. Byla pro ně navržena syntéza analogická Mannichove reakci (Schéma 2) za použití alkyl-(4-acetylphenyl)karbamátů a hydrochloridu příslušného N-substituovaného piperazinu.

Vzhledem k velmi nízkým výtěžkům výše uvedené metody byla zkoušena jiná syntetická cesta, kdy byly syntetizovány alkyl-[4-(3-brompropanoyl)fenyl]karbamáty, z nichž lze nukleofilní substitucí příslušným N-substituovaným piperazinem získat požadované deriváty

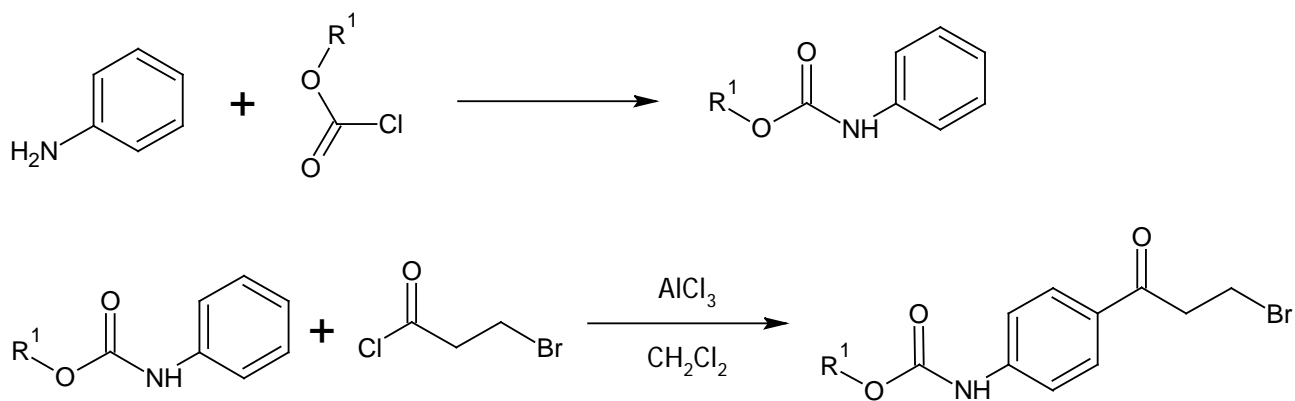


Schéma 3: Příprava alkyl-[4-(3-bromopropanoyl)fenyl]karbamátů

Výchozí látkou je anilin, ze kterého jsou připravovány potřebné alkylkarbamáty. Z nich jsou pak Friedel-Craftsovou acylací připraveny bromderiváty, ze kterých lze nukleofilní substitucí připravit požadované látky.

Výsledky a diskuse

Syntéza první skupiny látek – alkyl {3-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamátů probíhala podle předpokladů a látky byly získány v dostatečné čistotě i množství. Některé z nich byly testovány na inhibiční aktivitu. V porovnání s analogickými deriváty, ve kterých je na benzenovém jádře substituce *para*, je jejich inhibice acetylcholinesterázy nižší, naopak vykazují vyšší aktivitu inhibice butyrylcholinesterázy.

Tabulka 1: Přehled syntetizovaných alkyl {3-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamátů

Alkyl	Amin	Označení	Výtěžek
Methyl	Piperidin	3m-P	35 %
Ethyl	Piperidin	3e-P	43 %
Propyl	Piperidin	3p-P	41 %
Butyl	Piperidin	3b-P	48 %
Methyl	Morfolin	3m-Mo	12 %
Ethyl	Morfolin	3e-Mo	44 %
Propyl	Morfolin	3p-Mo	5 %
Butyl	Morfolin	3b-Mo	12 %

Výtěžky jednotlivých látek jsou uvedeny po krystalizaci. Nižší výtěžky u derivátů s morfolinem v bazické části jsou způsobeny odlišnou metodikou syntézy a následného čištění, která bude optimalizována.

Syntéza derivátů s N-substituovanými piperaziny v bazické části molekuly Mannichovou syntézou nebyla úspěšná ani po změnách reakčních podmínek. Přesto dále probíhá optimalizace této syntézy. Druhou popsanou metodou byly zatím připraveny methyl- a ethyl-[4-(3-bromopropanoyl)fenyl]karbamáty, které lze připravit v dostatečné čistotě a

množství. Tyto látky nebyly dosud popsány v dostupné literatuře. V současné době probíhají experimenty se syntézou finálních látek za použití těchto meziproductů.

Závěr

Bylo připraveno osm látek – alkyl {3-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamátů, resp. jejich solí, které dosud nebyly popsány v dostupné literatuře. V případě alkyl {4-[3-(amino)propanoyl]fenyl}karbamáty s modifikací bazické části molekuly za použití N-substituovaných piperazinů je vyvíjena náhradní syntetická cesta, dva z dosud připravených meziproductů nebyly popsány v dostupné literatuře.

Seznam literatury:

- Čolović, Mirjana B et al. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* 11.3 (2013): 315–335.
- Hwang TY, Ahn IS, Kim S, Kim DK. Efficacy of Galantamine on Cognition in Mild-to-Moderate Alzheimer's Dementia after Failure to Respond to Donepezil. *Psychiatry Investig.* 2016 May;13(3):341-348
- Halise I., G.; Synthesis of Mannich Bases by Two Different Methods and Evaluation of their Acetylcholine Esterase and Carbonic Anhydrase Inhibitory Activities; *Letters in Drug Design & Discovery*; 2017, 14(5); 573-580

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 327/2017/FaF.

**ZINKEM MODIFIKOVANÝ NANOTRANSPORTÉR DOXORUBICINU PRO CÍLENOU LÉČBU
ZHOUBNÝCH NÁDORŮ PROSTATY**

Sylvie Skaličková¹, Martin Homola¹, René Kizek^{1,2},

*Ústav humánní toxikologie a farmakologie, Farmaceutická fakulta¹, Centrální laboratoře²
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Úvod

Karcinom prostaty je nejčastější onkologickým onemocnění mužů v České republice. Přestože nárůst mortality na to onemocnění není zdaleka tak rychlý - spíše je v posledních letech neměnný v porovnání s jeho incidencí, je třetí nejčastější příčinnou úmrtí na zhoubný nádor u mužů (Nesvadba, Cmorej, Mamova, & Slowik, 2016). Při léčbě nádorových onemocnění je často používaným terapeutikem doxorubicin. Přes svou terapeutickou účinnost však vykazuje vysokou kardiotoxicitu (Mitry & Edwards, 2016). Vývoj nových nanotransportérů je zaměřen na snížení kardiotoxicity antracyklinových antibiotik. Metody nanomedicíny za využití různých nanokonstruktů by pomohly snížit vedlejší efekty spojené s léčbou známými cytostatiky u nádorového onemocnění (Blazkova et al., 2014; Drbohlavova et al., 2013). Biodegradabilní polymerní nanonočástice (NPs) pro kontrolovaný transport léčiv k cílové tkáni je velmi perspektivní oblast výzkumu v léčbě onkologických onemocnění. Jedním z používaných polymerů je chitosan (CS) (Lal, Dubey, Gaur, Verma, & Verma, 2017). Chitosanové nanočástice (CS NPs) jsou formovány zesíťované díky elektrostatické interakci s tripolyfosfátem sodným (TPP) a případně některými ionty kovů (Skalickova et al., 2017) Pozitivní náboj CS NPs umožňuje navázat na povrch nanočástic negativně nabitě biomolekuly (Desai, 2016).

Cílem naší práce byl teranostický návrh chitosanového nanotransportéru doxorubicinu pro cílení k nádoru prostaty. Kromě toho předpokládáme pozitivní efekt zinkových iontů na strukturu nanočástic a jejich stabilitu.

Materiál a metodika

Chemikálie

Nízkomolekulární chitosan, tripolyfosfát sodný, chlorid zinečnatý a další chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (USA). Ninhydrin, hydridantin byly pořízeny od firmy Ingos (Česká republika).

Příprava chitosanových nanočástic

12.5 mg chitosanu bylo rozpuštěno v 1 % kyselině octové. (30 μM) Doxorubicin a (0,5 mg/ml) chloridu zinečnatého bylo přidáno k roztoku chitosanu a mícháno (30 rpm, 3 hodiny,

24 °C). Nakonec byl přidán TPP (0.25 % w/v) za stálého míchání (30 min, 22 °C, 30 rpm) na rotatoru Multi-Rotator RS-60 BIOSAN.

Ninhydrinová reakce

2 g ninhydrinu byly rozpuštěny v 25 ml 4 M acetátového pufru (pH 5.2) a 0.3 g hydrindantinu v 75 ml DMSO. 75 µL reagentu bylo přidáno k 100 µL vzoru. Po inkubaci (30 min, 99°C) byly změřeny absorbanční spektra v rozsahu 300-700 nm (Infinite M200 Pro, TECAN, USA).

Elektrochemická detekce iontů zinku

Zinek byl analyzován metodou diferenční pulzní voltametrie (663 VA Stand, Metrohm, Švýcarsko). Visící kapková rtuťová byla pracovní elektroda, Ag/AgCl/3M KCl jako referenční elektroda a uhlíková jako pomocná elektroda. 0.2 M acetátový pufr (pH = 5.0) byl použit jako elektrolyt. Parameter DPV měření byly: vstupní potenciál 0 V, koncový potenciál -1,7 V a krokový potenciál 5 mV.

Výsledky

Optimalizace ninhydrinové reakce

Spektrofotometrická analýza chitosanových nanočástic je založena na reakci amino skupin chitosanu s ninhydrinem. Reakcí kondensace aminu s ninhydrinem vznikne barevný komplex s charakteristickými absorpčními maximy při 408 a 572 nm. Pro dosažení citlivé spektrofotometrické detekce byly jednotlivé parametry reakce chitosanu s ninhydrinem optimalizovány. Z výsledků je patrné, že závislost reakční teploty (70, 80, 90 a 100 °C) je úměrná absorbanci komplexu při 408 a 572 nm. Pro optimalizaci reakčního času (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min) byla reakční teplota zvolena na 100 °C. Zde byl zaznamenán rostoucí trend délky průběhu reakce a zvyšující se absorbance až do reakčního času 40 min. Nakonec bylo optimalizováno množství ninhydrinu (12, 16, 20, 24, 28, 32, 34, 40 µg) vstupujícího do reakce s amino- skupinami chitosanu. Se zvyšující se koncentrací se zvyšovala absorbance směsi až do 32 µg ninhydrinu na reakci. Následně došlo k slabému snížení absorbance v obou absorpčních maximech. Závislost koncentrace chitosanu (0 - 0,5 mg/ml) na absorbanci při 408 a 572 nm byla analyzována za optimálních podmínek reakce: teplota 100 °C, čas 40 min a 32 µg ninhydrinu na reakci. Limit detekce metody byl 2 µg/ml.

Stabilita chitosanových nanočástic (CS NPs)

Pro sledování vlivu TPP a iontů zinku na formaci CS NPs byla využita reakce aminoskupin přítomných v molekule chitosanu s ninhydrinem za vzniku barevného komplexu. Pro sledování formace NPs jsme vycházeli z předpokladu, že čím více je struktura nanočástic

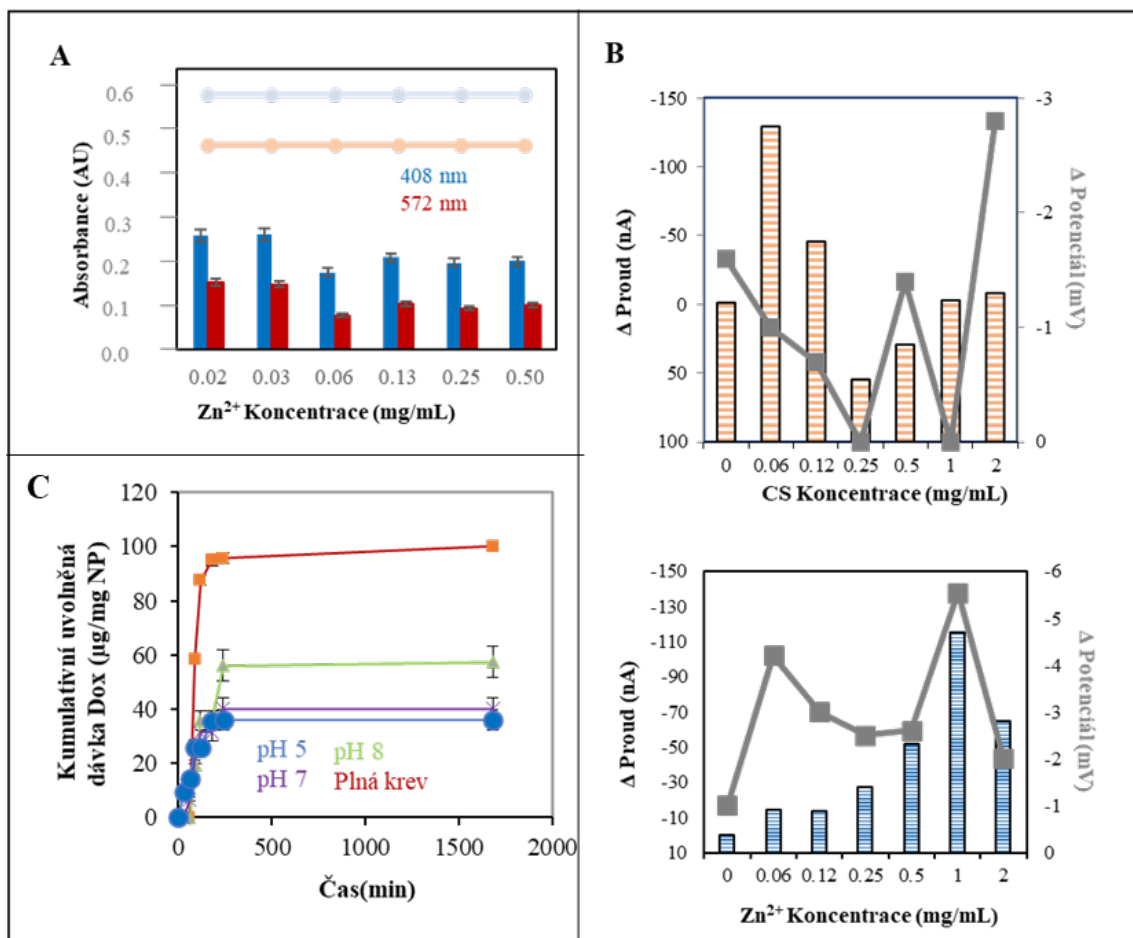
kompaktní, tím méně je přístupných aminoskupin v molekule CS pro reakci s ninhydrinem. Bylo pozorováno, že absorbance komplexu CS-Ninhydrin se snižuje o 30 % v závislosti na zvyšující se koncentraci zinku (0,02; 0,03; 0,06; 0,13; 0,25; 0,5 mg/ml) a TPP ve srovnání se samotným chitosanem (Obr. 1A). Tyto výsledky potvrdily vliv TPP a zinku na stabilizaci a uzavření struktury chitosanové nanočástice. Výsledky byly nezávisle potvrzeny elektrochemickou analýzou zinkových iontů, kde byl monitorován potenciál a výška elektrochemického signálu zinku v přítomnosti zvyšující se koncentrace jednotlivých komponent nanočástic: CS, TPP a iontů zinku (0,02; 0,03; 0,06; 0,13; 0,25; 0,5 mg/ml). Zatímco u CS nebyl zaznamenán přímý vliv na formaci nanočástic, vyšší koncentrace TPP a Zn způsobila potenciálový posun o 0,5 mV a snížení elektrochemického signálu zinku přibližně o 800 μ A, což potvrzuje interakci mezi jednotlivými částmi komplexu a vytvoření CS NPs vhodných pro enkapsulaci doxorubicinu (Obr. 1B).

Uzavření doxorubicinu do struktury CS NPs

CS NPs s uzavřeným doxorubicinem byly podrobeny analýze uvolnění léčiva pomocí magentických zlatých nanočástic, které navázáním na CS NPs umožnily snadnou manipulaci a možnost snadné separace nanočástic od uvolněného doxorubicinu (ten je stanoven fluorescenčně). V průběhu experimentu (0 až 72 hodin) bylo zjištěno výrazné uvolnění doxorubicinu již po 250 min s následnou stabilizací postupného uvolňování, kdy se kumulativní uvolnění doxorubicinu zvyšovalo o 5 %. Zjištěné kumulativní uvolňování doxorubicinu pro pH 5<7<8 bylo stanoveno na 35<40<60 μ g/mg nanočástic (Obr. 1C). V plné krvi byl zaznamenán nejvyšší kumulativní uvolnění doxorubicinu 80 μ g/mg nanočástic, což může být vysvětleno afinitou CS NPs k erytrocytům a tím pádem ztrátou nanotransportéru během purifikace. Vypočítaná efektivita enkapsulace byla 20 %.

Závěr

V experimentu jsme provedli charakterizaci chitosanového nanotransportéru a vliv zinku a TPP na zvýšení jeho stability pomocí spektrofotometrické a elektrochemické metody. Modifikace nanotransportéru ionty zinku umožňuje jeho zacílení do nádorové tkáně, kde je zvýšená exprese zinek-vazného proteinu metallothioneinu jako produktu metabolismu nádorové tkáně. Chitosanový nanotransportér představuje cílený přístup v léčbě onkologických onemocnění a snížení vedlejších účinků terapie tetracyklinovými antibiotiky.



Obr. 1: **A)** Spektrofotometrická detekce komplexu ninhydrinu-CS (2 mg/ml) a vliv koncentrace zinkových iontů (0,02; 0,03; 0,06; 0,13; 0,25; 0,5 mg/ml) a TPP (2 mg/ml na stabilitu CS NPs. Linky naznačují signál samotného komplexu CS-ninhydrin (2 mg/ml). **B)** Vliv koncentrace CS (0,02; 0,03; 0,06; 0,13; 0,25; 0,5 mg/ml) a iontů zinku (0; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 2 mg/ml) na elektrochemický signál zinku. Grafy jsou vyjádřeny jako rozdíl zjištěného signálu komplexu a měření samotného zinku. Měření probíhalo v 0,2 M Acetátovém pufru (pH 5) metodou DPV.

Seznam literatury:

- Blazkova, I., Nguyen, H. V., Kominkova, M., Konecna, R., Chudobova, D., Krejcova, L., et al. (2014). Fullerene as a transporter for doxorubicin investigated by analytical methods and in vivo imaging. [Article]. *Electrophoresis*, 35(7), 1040-1049.
- Desai, K. G. H. (2016). Chitosan Nanoparticles Prepared by Ionotropic Gelation: An Overview of Recent Advances. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 33(2), 107-158.

- Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Adam, V., Ryvolova, M., Eckschlager, T., Hubalek, J., et al. (2013). Nanocarriers for Anticancer Drugs - New Trends in Nanomedicine. [Article]. *Current Drug Metabolism*, 14(5), 547-564.
- Lal, N., Dubey, J., Gaur, P., Verma, N., & Verma, A. (2017). Chitosan based in situ forming polyelectrolyte complexes: A potential sustained drug delivery polymeric carrier for high dose drugs. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 79, 491-498.
- Mitry, M. A., & Edwards, J. G. (2016). Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *Ijc Heart & Vasculature*, 10, 17-24.
- Nesvadba, M., Cmorej, P. C., Mamova, A., & Slowik, O. (2016). The incidence, mortality and risk factors of prostate cancer. [Article]. *Epidemiologie Mikrobiologie Immunologie*, 65(4), 211-214.
- Skalickova, S., Gargulak, M., Loffelmann, M., Ruttkay-Nedecky, B., Kepinska, M., Parak, T., et al. (2017). [Zinc-modified Nanotransporter for Target Drug Therapy of Breast Cancer]. *Klin Onkol*, 30(Supplementum1), 174-176.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 328/2017/FaF.

Editovali:	doc. PharmDr. Ing. Radka Opatřilová, Ph.D., MBA prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D. prof. RNDr. Jozef Csöllei, CSc. doc. MVDr. Pavel Suchý, Ph.D.
Název:	Konference Interní grantové agentury VFU Brno
Počet stran:	221
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno 2017

978-80-7305-795-4