



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Sborník příspěvků

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

30. května 2012
Brno

Projekt „Od fyziologie k medicíně“ CZ.1.07/2.3.00/09.0219 je spolufinancován
Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

**Ústav fyziologie
Veterinární a farmaceutická
univerzita Brno**

**Vydala
Veterinární
a farmaceutická
univerzita Brno
2012**

ISBN 978-80-7305-620-9

1. vydání, neprodejné



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

Sborník příspěvků

Editoři: doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D.,
prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.

Za obsah jednotlivých příspěvků zodpovídají autoři.

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-620-9

**Konference mladých vědeckých pracovníků
s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno**

30. května 2012

FVL VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno

Organizace konference:

doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D., prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc.

ve spolupráci:

doc. RNDr. Marcela Buchtová, Ph.D., prof. MVDr. Vladimír Celer, CSc.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

Odborný program

Sekce I

Předsedající: E. Matalová/J. Doubek, posluchárna Sekce anatomie a fyziologie FVL, budova č. 34

8:00-8:30	<i>registrace, zahájení konference</i>
8:30-9:00	Middle ear – from development to function (L. Joshi, UK)
9:00-9:30	3D models of physiological tissue interactions (C. A. Zimmermann, BRD)

Sekce II

Předsedající: E. Matalová/M. Buchtová, seminární místnost Ústavu fyziologie FVL, budova č. 34

9:30-9:45	c-Myb transcription factor and tissue differentiation (V. Lungová)
9:45-10:00	Stem cells, Myb transcription factors and apoptosis related molecules in hair follicle development and maintenance (B. Veselá)
10:00-10:15	Physiological functions of caspase-7 in hard tissues (E. Švandová)
10:15-10:30	<i>přestávka s občerstvením</i>

10:30-10:45	BMP6 in postnatal development of mouse molars and surrounding tissues (V. Oralová)
10:45-11:00	Separase and MPF interaction during meiosis in mammals (A. Danylevska)
11:00-11:15	Age-related aneuploidy in mouse oocytes (J. Šebestová)
11:15-11:30	Explant cultures in pharmacological inhibition of molecules with physiological impact (J. Kudělová)
11:30-11:45	Dynamics of caspase activation and inhibition – quantification at one cell level (I. Chlastáková)
11:45-12:00	Biochemical characterization of novel haloalkane dehalogenase for production of optically pure compounds (L. Chrást)
12-13 h	<i>polední přestávka</i>
13:00-13:15	Vývoj řezáků horní čelisti u prasete (I. Putnová)
13:15-13:30	Microarray analýza regionalizace dolní čelisti u myši (S. Balková)
13:30-13:45	Detekce receptorů pohlavních hormonů v ovariální tkáni morčete domácího (Š. Stehlíková)
13:45-14:00	Neinvazivní hodnocení pohlavních hormonů: biologická validace EIA metody pro gibony (J. Petrášová)
14:00-14:15	Funkce FGF při vývoji končetin (D. Horáková)
14:15-14:30	Morfologické změny v tkáních laboratorního potkana po podání reaktivátorů acetylcholinesterasy (P. Jirásková)
14:30-14:45	<i>přestávka s občerstvením</i>
14:45-15:00	Úloha hypoxie v regulaci exprese ABC-transportérů asociovaných s MDR u kmenových buněk (M. Lánová)
15:00-15:15	Studie terapeutické ekvivalence generických léčivých přípravků (E. Adamová)
15:15-15:30	Prase jako experimentální model pro klinický kranio-maxilo-faciální výzkum (J. Štembírek)
15:30-15:45	Dlouhé kosti prasete - model pro testaci tensometru (M. Pyszko)
15:45-16:00	Femur psa - klinicky významné morfologické aspekty (L. Cihlářová)
16:00-16:15	Detekce mutací fibrillinu1 u psů s rupturou aorty a podezřením na Marfanův syndrom (E. Boženková)
16:30 h	<i>ukončení konference</i>

Sekce III

Předsedající: J. Doubek/V. Celer, posluchárna Sekce anatomie a fyziologie
FVL, budova č. 34

9:30-9:45	Nebezpečí babeziózy v České republice (J. Konvalinová)
9:45-10:00	Případ aviární tuberkulózy u supa krahujového (L. Frgelecová)
10:00-10:15	Případ kutánní mastocytózy u psa plemene šarpej (K. Pavlicová)
10:15-10:30	<i>přestávka s občerstvením</i>
10:30-10:45	Prognostické markery u mastocytomů psů (N. Kružíková)
10:45-11:00	Sledování vybraných parametrů nespecifické imunity koček ve vztahu k určitým zoonózám (leptospiroza, borrelióza) (D. Mašková)
11:00-11:15	Incidence katarální horečky ovcí u volně žijících přežvýkavců v ČR (2011-2012) (A. Šperlová)
11:15-11:30	Monitoring promořenosti klíšťat na patogenní <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato na dvou lokalitách v Brně a studium promořenosti volně žijících hlodavců (jejich roztočů) na různých lokalitách (H. Kučerová)
11:30-11:45	<i>Mycoplasma bovis</i> – antimikrobiální citlivost izolátů ze stáda dojnic postiženého mastitidou (J. Pospíchalová)
11:45-12:00	Molekulární detekce potenciálně zoonotických původců virových gastroenteritid u klinicky zdravých prasat v ČR a fylogenetická analýza terénních kmenů (L. Dufková)
12-13 h	<i>polední přestávka</i>
13:00-13:15	Hodnocení sepse u novorozených hříbat hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče (T. Hytychová)
13:15-13:30	Prognostické ukazatele u pacientů s dilatací a volvulem žaludku (I. Uhríková)
13:30-13:45	Kontinuální monitoring diabetického pacienta (D. Tarkošová)

13:45-14:00	Vliv <i>Pithyum oligandrum</i> na průběh dermatofytóz malých zvířat v porovnání s klasickou terapií (M. Načeradská)
14:00-14:15	Kvantitativní analýza histologických změn semenotvorného epitelu varlat kocourů při supresi pohlavní aktivity GnRH agonistou deslorelinem (R. Novotný)
14:15-14:30	Dočasná suprese říše u koček pomocí GnRH agonisty deslorelinu (M. Janošovská)
14:30-14:45	<i>přestávka s občerstvením</i>
14:45-15:00	Vliv opakovaného odběru ejakulátu hřebce na mrazitelnost semene (M. Mráčková)
15:00-15:15	Elektromyografie v diagnostice neuromuskulárních onemocnění psů a koček (I. Hájek)
15:15-15:30	Rentgenologicky patrné změny patelárního vazů u psů po operaci TTA (L. Stehlík)
15:30-15:45	Fraktury antebrachia, jejich řešení a komplikace (I. Blažek-Fialová)
15:45-16:00	Sledování koncentrace manganu ve vztahu matka - mládě v den porodu u koz (E. Zvonareva)
16:00-16:15	Vliv dotace různých forem a dávek selenu na vybrané ukazatele bachorové tekutiny a krve u ovcí (A. Panev)
16:30	<i>ukončení konference</i>



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Projekt “Od fyziologie k medicíně” CZ.1.07/2.3.00/09.0219, v jehož rámci je konference pořádána, je podporován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

SEKCE I

MIDDLE EAR – FROM DEVELOPMENT TO FUNCTION

Eya1 mice as models for understanding middle ear morphogenesis and joint formation

Joshi L., Tucker A.S.

Department of Craniofacial Development and Stem Cell Biology, King's College London, UK

Introduction: The mammalian middle ear is composed of three bony ossicles, the malleus, incus and stapes which function to conduct sound from the external ear via the tympanic membrane, to the inner ear through the oval window (Fig. 1). Normal development of these three ossicles and the formation of a tissue and liquid free middle ear space are integral for this transduction of sound, defects resulting in conductive deafness (1).



Fig. 1: Sound conduction in the middle ear through the ossicle chain. (tm) tympanic membrane, (M) malleus (I) incus (S) stapes.

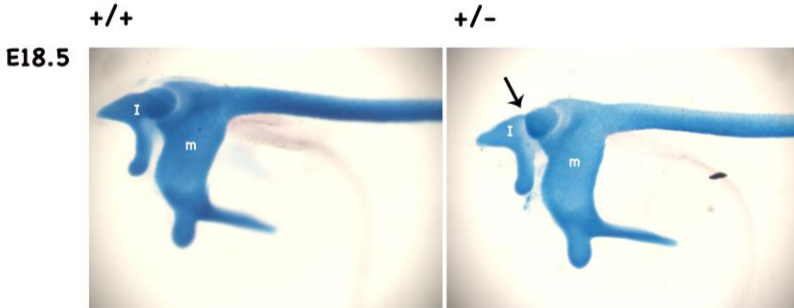
Most vertebrates can sense their environment through some form of hearing. Middle ear function specifically ranges from basic bone conduction through the reptilian jaw to a fully specialised mammalian middle ear apparatus. Hearing plays an integral role in response, survival and communication and is additionally important in humans for speech development from birth (2). As hearing has greatly influenced our evolution as social animals, deafness can be a profoundly isolating condition. In the UK alone 9 million people are estimated to suffer from hearing impairments (www.nhs.uk). These largely fall into two categories, sensorineural hearing loss caused by a functional defect in the inner ear or conductive hearing loss associated with the middle and external ear.

Branchio-oto-renal syndrome is a disorder of craniofacial development which causes developmental defects in both the middle and inner ear structures and accounts for 2 % of profoundly deaf children worldwide. Sufferers of this syndrome possess autosomal dominant mutations in the *Eya1* gene which encodes a transcription factor.

Aims: Analysis of *Eya1* mouse as a model of BOR syndrome to understand the role of *Eya1* in middle ear development.

Material and Methods: Comparative investigation of wild type and *Eya1* mutant mice.

Results: *Eya1* mice exhibit signs of deafness as assessed by the prayer reflex response test. This is where a brief auditory stimulus is provided near to the mouse external ear and movements of the external ear (pinna) are observed, absence of pinna movement suggesting deafness. *Eya1* heterozygous mice have malformed ossicles which form as a result of ectopic joints and bone fusions (Fig. 2).



*Fig. 2: An ectopic joint in the *Eya1* +/- middle ear (arrow).*

This provides us with a tool to investigate the mechanisms of ossicle morphogenesis and cartilage joint formation in the middle ear (3).

Discussion: Middle ear defects are often a byproduct of severe craniofacial abnormalities where middle ear ossicles can be absent, malformed, hypoplastic and often fused. In some syndromes the persistence of an ossified Meckel's cartilage in newborns has even been reported. This

condition results in a fused immobile Meckel's cartilage-middle ear structure which is unable to conduct sound efficiently.

Ossicular synostoses is one of two main causes of conductive deafness observed in syndromes of developmental abnormalities. The second cause concerns the mesenchyme of the middle ear. During human embryonic development the middle ear cavity is filled with mesenchyme which embeds the ossicles and prevents their movement. This mesenchyme is gradually cleared from the middle ear cavity in the last trimester in humans and within the first two post-natal weeks in mice. Without effective clearance the middle ear ossicles remain fixed in the mesenchyme and are unable to vibrate and transduce sound, resulting in conductive deafness. Residual mesenchyme into childhood is also thought to increase the risk of otitis media. Theories for mesenchymal clearance have been proposed although none are conclusive. There are therefore several clinical motivations in understanding the mechanisms of mesenchymal clearance (Fig. 3).

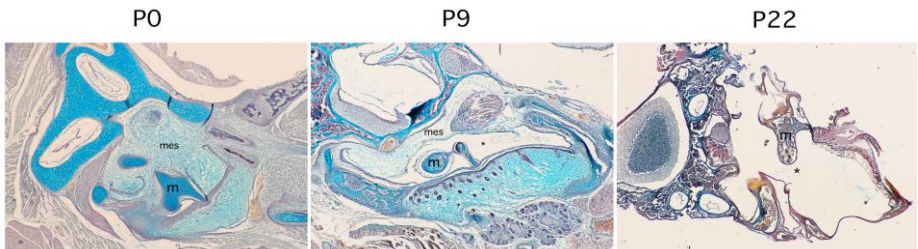


Fig 3: Cavitation of the middle ear. The mouse middle ear cavity is filled with mesenchyme on the day of birth (P0) but is gradually cleared during postnatal development.

Conclusion: Eya 1 is one of several genetic factors influencing the development of the branchio- oto- renal syndrome. In addition, the Eya1 mice also show abrogated development of Meckel's cartilage and are further predisposed to developing otitis media in adult life, implicating Eya1 as a regulator of embryonic and postnatal middle ear development.

References:

- (1) Richter C.A. et al. 2010: Hum Mol Gen 19: 1551-1560, (2) Stelmachowicz D. et al. 2004: Ear Hearing 25: 47-56, (3) Amin S., Tucker A.S. 2006: Dev Dyn 235: 1326-1333

Notes & comments

3D MODELS OF PHYSIOLOGICAL TISSUE INTERACTIONS

A Procedural Method for computer-assisted 3D-Reconstructions and their Importance for the Depiction of Tissue Interactions illustrated on the Example of Tooth-Bone-Development

Zimmermann C., Renz H., Radlanski R.J.

Charité - Campus Benjamin Franklin at Freie Universität Berlin, Germany

Introduction: Embryological development is a 3-dimensional process during which biochemical tissue interactions correlate with a sequence of morphological changes, spatial impediment being a morphogenetic factor itself (20). For a full understanding of organogenesis a 3-dimensional visualization is therefore necessary. Neither anatomical preparation – due to its inevitable destruction of removed tissues – nor mere microscopy of histological sections – due to the great influence the cutting angle has on the appearance of a sliced structure (12) – suffice to attain this goal. The limitations mentioned above express the need for 3-dimensional models and led to the development of mechanical model building techniques based on the analysis of histological serial sections (18, 3, 7, 1, 21, 16, 4, 2, 11). These techniques became replaced by computer-assisted graphical reconstruction methods (22, 6, 14, 8, 15) which entail the advantage of allowing "virtual dissection" and the analysis of changing volumes and relationships of tissues as well as the application to, or combination with techniques such as immunohistochemistry (10) or in situ hybridization (19). Competing alternative nondestructive 3D-imaging techniques include optical projection tomography (13), x-ray micro computed tomography (9), microscopic magnetic resonance imaging (17), microscopic ultrasound imaging (5), optical coherence tomography (23) and confocal laser scanning or multiphoton microscopy, all of which are fast developing technologies used in research practice yet. Nevertheless there are different limitations concerning resolution, partly required but on dead material not applicable preconditioning with contrast agents, deficient depth of penetration for adequate 3D-imaging or lacking compatibility with histopathological staining which still prevent these technologies from replacing the method of computer-assisted 3D-reconstructions based on histological serial sections.

Aims: To introduce and illustrate a procedural method for computer-assisted 3D-reconstructions by exemplarily answering selected questions from current research into tooth-bone-development.

Material and Methods: Human embryos and fetuses with a CRL of 19 to 270 mm were processed according to standard histological procedure. Selected sections were photographed with a camera connected to a light microscope providing magnification in the range of 1.25-10 x. The pictures taken were subsequently processed with the digital imaging software analySIS (Olympus, Berlin GER).

Results: In a first step the photos were manually aligned using the contours of well characterized landmarks like Meckel's cartilage as fiducial markers (6) (Fig.1). Subsequently manual segmentation of the tissues of interest (e. g. alveolar bone, enamel organ, dental papilla etc.) was performed on each of the aligned photographs. Additionally the histomorphological differentiation of the cells lining the bony surface was analyzed. Zones of bone resorption and apposition, characterized by osteoclasts respectively osteoblasts, were marked by manual segmentation as well (Fig. 1). By active triangulation the software then created a 3-dimensional object, "wire-framing" the serially stacked 2-dimensional outlines of the manually segmented structures (Fig.1). The completed 3D-reconstruction could now be analyzed from random angles of view beyond the original section plane, preparation-like steps could be taken by virtually removing selected structures or clipping of 3-dimensional elements with a virtual microtome. In addition morphometrical analysis became possible.



Fig. 1 (left): Human fetus of 190 mm CRL. Stack of pictures after manual alignment has been performed. Exemplarily selected photograph of an H. E. stained horizontal section shows the anterior part of a fetal human mandible, right half, containing the dental primordia of the deciduous

central and lateral incisor and of the canine (from left to right). Fig. 1 (centre): Human fetus of 190 mm CRL. Photograph of an H. E. stained horizontal section of the anterior part of a fetal human mandible, right half. After manual segmentation has been performed, the outlines of the manually plotted polygons of structures to be reconstructed are depicted in various colours: bone (yellow), dental papilla (pink) and enamel organ (blue) belonging to the dental primordia of the deciduous central (i_1) and lateral (i_2) incisor. The magnifying clip in the upper left corner of the picture visualizes the marking of zones of bone resorption (green) and apposition (red) dependent on the identification of osteoclasts or osteoblasts on the surface of the bone. Fig. 1 (right): Human fetus of 190 mm CRL. Partial 3D-reconstruction of the anterior part of a fetal human mandible, right half, cranial view. The dental primordia of the deciduous central (i_1) and lateral (i_2) incisor are pictured slightly transparent for better view on the inside of the dental crypts. The surface of the bone (ochre) is marked green for bone resorption and red for bone apposition.

Discussion: By employing these options of analysis it was shown that the formation of the dental crypts as well as the formation of the interdental and the interradicular bone is the result of a mixture of resorptive and appositional processes. Whereas bone resorption can mostly be found on the inside of the dental crypts, predominantly where the distance between tooth bud and surrounding bone falls below 200 μm , bone apposition takes place on the outer walls of the crypts and adds to vertical growth and the formation of interdental septa.

Conclusion:

This newly gained knowledge about the occurring morphological changes and the spatial arrangement of the tissues described yet needs to be linked to biochemical findings which will be object to further research.

Acknowledgement: Supported by grant Ra 428/1-9 Deutsche Forschungsgemeinschaft, Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kiefer-heilkunde (DGZMK), and the GACR 524/08/J032.

References:

The list of references can be requested from the authors.

Notes & comments



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

SEKCE II

MYB TRANSCRIPTION FACTORS AND HARD TISSUE DIFFERENTIATION

Lungová V.^{1,2}, Matalová E.^{2,3}

¹*Department of Zoology, Faculty of Science, UP Olomouc, Olomouc,*
²*Department of Physiology, FVM UVPS, Brno,* ³*Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i., Brno, Czech Republic*

Introduction: Myb family proteins represent transcriptional activators that control proliferation, differentiation and cell survival (1). They are generally expressed in mitotically active cells during embryogenesis (2,3), later in cells with very high turnover such as in bone marrow (hematopoietic system) and intestinal or mammary epithelial tissues (4). c-Myb is the best characterized member of the Myb family proteins, found also in embryogenesis (4). Its presence in differentiated cells was reported in a few cases, as in cell of the mouse adult brain (5) or in B and T lymphocytes during their progressive state of differentiation (3). We have earlier demonstrated c-Myb positive cells among differentiated ameloblasts and odontoblasts during prenatal odontogenesis. These data suggest that c-Myb could be involved in the dental hard tissue production (6).

Aims: 1) to specify the differentiation phase of odontoblasts and ameloblasts associated with c-Myb expression; 2) to find out whether c-Myb is also produced in differentiated fibroblasts, cementoblasts and bone cells that mature during later postnatal stages, 3) to explain the physiological function of c-Myb during hard tissue differentiation.

Materials and Methods: Immunohistochemistry of serial sections (c-Myb, PCNA) using biotinylated primary antibodies and POD-DAB visualization system, paraffin embedded serial sections of postnatal mouse lower jaws up to eruption of the first molar (P16), hematoxylin-eosin staining.

Results: During the postnatal M1 development, c-Myb positive cells were concentrated in the proliferating zones of the dental primordium as well as in differentiated cells such as odontoblasts, ameloblasts (Fig. 1), periodontal fibroblasts, cementoblasts and differentiated bone cells, c-Myb expression was apparently not related to proliferating cells (Fig. 2). c-Myb production

was particularly associated with early stages of their differentiation. As cells matured the c-Myb expression was downregulated.

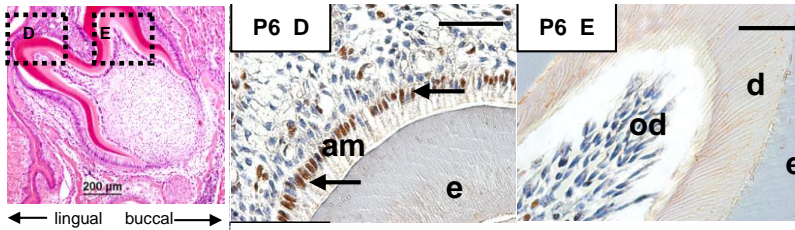


Fig. 1: c-Myb positive cells in ameloblasts (arrows) at postnatal day 6 of mouse development.

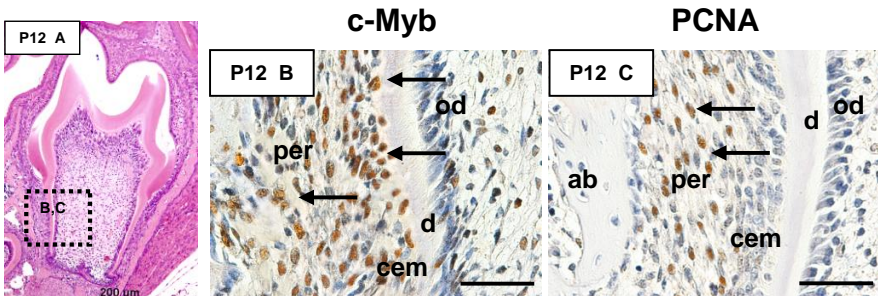


Fig. 2: c-Myb expression in non-proliferating cells of the periodontium and cementoblast populations at postnatal day 12 of mouse development. Arrows point to c-Myb and PCNA positive cells, respectively.

Discussion: In this study, we investigated the distribution of c-Myb during postnatal murine odontogenesis in order to extend our previous results (6) demonstrating c-Myb protein production in differentiated ameloblasts and odontoblasts. c-Myb was shown also in differentiated fibroblasts, cementoblasts and bone mass cells during later postnatal stages of odontogenesis. Nevertheless, c-Myb production is particularly associated with early stages of differentiation, when cells are highly active and secrete cell specific proteins principally to form their extracellular matrices. As the cells mature and their protein synthesis slows down, c-Myb production is downregulated. As far as the function of the c-Myb protein in differentiated cells is concerned, one hypothesis supported by our findings could be a role

of c-Myb in calcium metabolism via control of intracellular calcium concentration (7). Another possible explanation is based on combinatorial interactions of c-Myb with other transcription factors in cells to control their target genes, such as amelogenins in immature ameloblasts (8), transcriptional regulation of *DSPP* (dentin sialophosphoprotein) during odontoblast differentiation (9) and *Colla1* (collagen type I), *BSP* (*bone sialoprotein*) and *osteocalcin* (10) in osteoblasts. *Colla1* has been reported in the literature to be one of the Myb target genes (6), and is highly expressed in bone cells, cementoblasts and periodontal fibroblasts, as it forms a necessary constituent of the bone, cementum and the periodontal ligaments.

Conclusion: c-Myb protein is present in differentiated ameloblasts, odontoblasts, fibroblasts, cementoblasts and odontoblasts. Therefore, there is likely to be a yet novel function of this molecule in hard tissue formation.

Acknowledgement: *The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project P302/12/J059). The IAPG laboratory runs under AVOZ 50450515.*

References:

(1) Weston K. 1998: *Cur Opin Genet Dev* 8: 76-81, (2) Ness S.A. 1996: *Biochim Biophys Acta* 1288: F123-F139, (3) Ramsay R.G., Gonda T.J. 2008: *Nat Rev Cancer* 8: 523–534, (4) Ess J. et al. 1999: *Oncogene* 18: 1103-1111, (5) Hwang J. et al. 2007: *Neurochem Res* 32: 1091–1097, (6) Ness S.A. 2003: *Blood Cell Mol Dis* 31: 192-200, (7) Matalova E. et al. 2011: *Dev Growth Differ* 53: 793–803, (8) Bein A. et al. 1997: *J Cell Physiol* 173: 319–326, (9) Xu J. et al. 2007: *J Biol Chem* 282: 29882–29889, (10) Chen L. et al. 2008: *J Biol Chem* 283: 19359–19370

Notes & comments

STEM CELLS, TRANSCRIPTION FACTORS AND APOPTOSIS RELATED MOLECULES IN HAIR FOLLICLE DEVELOPMENT AND MAINTENANCE

Veselá B.¹, Matalová E.^{1,2}

¹*Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR, v.v.i.*, ²*Department of Physiology, FVM UVPS Brno, Czech Republic*

Introduction: Hair follicles are ectodermal structures which can give rise to the hair. This structure is composed of the bulb filled with matrix cells, the mesenchymal dermal papilla, the hair shaft, root sheaths, the bulge and associated structures, the sebaceous gland and the arrector pili muscle. Hair follicles show periodic changes in their growth activity: anagen-active growing and producing keratinized hair, apoptosis-driven regression at the catagen stage and relative resting at the telogen stage. Hair follicles change their size and morphology during cycling. The catagen stage least two days (in the mouse) and within this time, lower part of the follicle except a dermal papilla is withdrawn. Renewal of cycling starts from the proximal part of the hair follicle, the bulge. In the bulge area, a stem cells niche is located (1).

The Myb family of transcription factors is known to be involved in proliferation, differentiation and apoptosis. B-Myb appears to be highly abundant in embryonic stem cells (2), and c-Myb is in general present in undifferentiated cells (3).

Aims: The aim of this study is detection of transcription factors c-Myb and B-Myb in focus on stem cells area and apoptotic signals, particularly Fas-FasL-FADD and executive caspases in mouse hair follicles.

Material and methods: Immunohistochemistry was applied on serial sections of adult mouse dorsal skin. Bulge specific keratinocytes were detected by immunostaining of CD34 surface antigen (marker of stem cells). B-Myb and c-Myb were colocalized with proliferating cell nuclear antigen (PCNA). TUNEL technique was used for visualization of apoptotic cells. TUNEL marked cells were compared with expression of Fas, Fas-Ligand (Fas-L) Fas-Associated protein with Death Domain (FADD), caspase-3 and caspase-7.

Results: Both, c-Myb and B-Myb proteins were found in mouse hair follicles. Focused on the bulge area, c-Myb positive cells were abundant, but only some cells expressed B-Myb and none of them copied the CD34 pattern (Fig. 1).

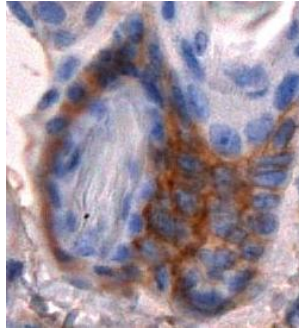


Fig. 1: Detail of CD34 positive cells in the stem cell niche of the hair follicle (positive cells are brown), counter-stained by hematoxylin (blue nuclei).

Moreover, strong c-Myb and B-Myb expression was observed in CD34 negative parts of the follicle including hair follicle matrix (Fig. 2), outer root sheath and sebaceous gland.

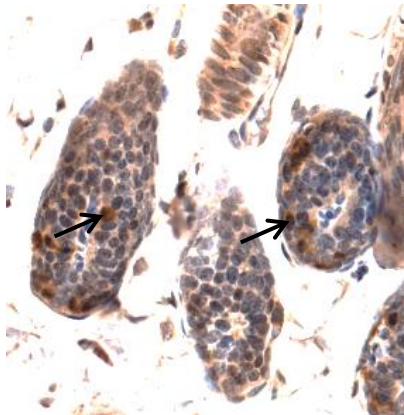


Fig. 2: Expression of B-Myb in hair follicle bulbs, positive cells are brown (arrows), counter-stained by hematoxylin (blue nuclei).

In telogen/early anagen stages, TUNEL and caspase-3 positive cells were detected in lower parts of the follicles and in the dermis and subcutis. Caspase-7 expression was evident particularly in the interfollicular space. Fas, Fas-L and FADD expression was detected in the bulge region. Cells of sebaceous glands were Fas-positive, whereas some interfollicular cells appeared FasL-positive.

Discussion: The recent data suggest that in adult stem cells, neither B-Myb nor c-Myb are specific for hair follicle stem cell niche. However, both proteins are present in hair follicles and sebaceous glands and thus seem to have a role in development and maintenance of these structures. Fas mediated signalling was described as an important pathway in homeostasis of several organs. As the Fas receptor is present in catagen hair follicles (4), this signaling may be involved also in hair cell apoptosis and also regeneration (5). Further cellular and molecular networks are recently under study.

Conclusion: Myb transcription factors were found in the stem cell niches of the hair follicles but were not restricted to this region. Apoptosis related molecules FasL-FasR-FADD and caspases play role in hair follicle homeostasis, detailed investigations are in process.

Acknowledgement: *The research was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project P502/12/1285). The IAPG laboratory runs under AVOZ 50450515.*

References:

- (1) Boheler K.R. 2009: J Cell Physiol 221: 10-17, (2) Ess K.C. et al.: 1999. Oncogene 18: 1103-11, (3) Mitsiadis A.T. et al.: 2007. Exp Cell Res 313: 3377-3385, (4) Linder G. et al.: 1997. Am J Pathol 151: 1601-17, (5) Guan D.W. et al. 2000: Histochem J 32: 85-91

Notes & comments

PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF CASPASE-7 IN HARD TISSUES

Švandová E.^{1,2}, Matalová E.^{1,3}

¹Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR, v.v.i. Brno, ²Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ³Department of Physiology, FVM UVPS Brno, Czech Republic

Introduction: Apoptosis is one of processes involved in tooth and surrounding bone development (1,2) being involved in tooth shape formation as well as for dental eruption, exfoliation and ameloblast or odontoblast population reduction. In the alveolar bone, some osteoblasts have to die via apoptotic mechanisms to allow for integrate of the developing tooth into the surrounding bone. Apoptosis accompanies all stages of tooth development, however the most intensive incidence of apoptotic cells is in the region of the enamel knot.

Caspase-7 is a member of executioner pro-apoptotic caspase group that acts together with caspase-3. Mice knock-out studies showed that caspase-3, caspase-9 and Apaf-1 molecules are essential for apoptosis in the signalling centres of developing tooth germs (3). Moreover, several reports suggest importance of caspases, particularly of caspase-3 also in non-apoptotic processes. As caspase-7 acts in a similar manner as caspase-3, examination of caspase-7 cleavage during odontogenesis and analysis of mutant phenotype have been performed.

Aims: The aim of the study was to investigate engagement of caspase-7 in molar tooth and surrounding bone development.

Material and methods: Immunohistochemistry (anti-caspase-7 antibody) and TUNEL staining on serial sections of mouse embryonic and postnatal heads (E15, E17.5, P0, P5, P10, P20), analysis of caspase-7 knock-out mice, microCT and statistical evaluation.

Results: Cleaved caspase-7 is present in the signalling centres of the enamel knot where it positively correlates with apoptosis. However, along with development, it gradually appears in non-apoptotic area and becomes restricted particularly to differentiating odontoblasts and ameloblasts (Fig.

1). In the surrounding bone, cleaved caspase-7 appears already at E15 (Fig. 2). In caspase-7 knock-out mice, no changes in apoptosis distribution were observed. There were slight alterations in the mineralisation of molar teeth (Fig. 3), however, significant changes were observed in the incisor and bone tissue which are subjected to further analysis.

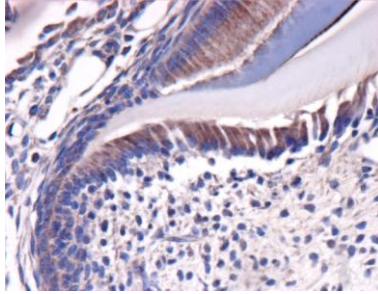


Fig. 1: Cleaved caspase-7 odontoblasts and ameloblasts at P10, POD-DAB immunohistochemistry, hematoxylin counterstain).

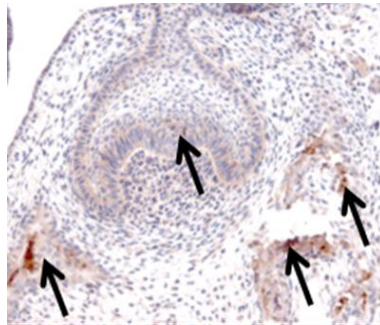


Fig. 2: Cleaved caspase-7 (arrows) in the enamel knot and tooth surrounding bone at E15, POD-DAB immunohistochemistry, hematoxylin).

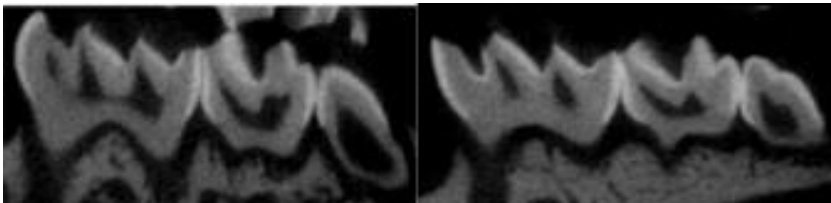


Fig. 3: MicroCT analysis of caspase-7 knock-out (left) vs. wild type tooth phenotype (right).

Discussion: Caspase-7 belongs to execution group of pro-apoptotic caspases, however, the role of caspase-7 in odontogenesis may differ from caspase-3. Compared to caspase-3, caspase-7 deficiency did not cause any changes in apoptosis, thus perhaps caspase-3 is the leading caspase. It is likely, that caspase-3 can compensate caspase-7 but not *vice versa*, indicating non essential role of caspase-7 as an executioner caspase in dental knot apoptosis. Notably, cleaved caspase-7 was detected in differentiating/differentiated odontoblasts and ameloblasts, this location support the idea about a new role of caspase-7 in non-apoptotic processes during tooth and bone development. This would agree with previous studies showing that caspases participate in non-apoptotic processes such as lens development, hematopoiesis or keratinocytes differentiation (4, 5).

Conclusion: Caspase-7 is not the key execution caspase for apoptosis in dental apoptosis. However, caspase-7 apparently participates in non-apoptotic pathways involved in odontoblast, ameloblast and osteoblast differentiation and further hard tissue mineralization.

Acknowledgement: *The research was funded by the Grant Agency of the Czech Republic (P502/12/1285). Knock-out mice were provided by prof. Vanden Berghe and Vandenabeele (Ghent University), microCT was performed at King's College London (thanks to dr. Healy, dr. Tucker, prof. Sharpe). The IAPG laboratory runs under AVOZ 50450515.*

References:

(1) Matalova E. et al. 2004: J Dent Res 83: 11-16, (2) Lungova V. et al. 2011: J Anat 218: 699-716, (3) Matalova E. et al. 2006: Int J Dev Biol 50: 491-497, (4) Lamkanfi M. et al. 2007: Cell Death Differ 14: 44-55, (5) Feinstein-Rotkopf Y., Arama E. 2009: Apoptosis 14: 980-995

Notes & comments

BMP6 IN POSTNATAL DEVELOPMENT OF MOUSE MOLARS AND SURROUNDING TISSUES

Oralová V.^{1,2}, Chlastáková I.^{2,3}, Matalová E.^{1,3}

¹Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i, ²Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ³Department of Physiology, FVM UVPS Brno, Czech Republic

Introduction: The morphogenesis of tooth is initiated by dynamic interactions between ectodermally derived epithelium and neural crest derived mesenchyme. The corresponding epithelial-mesenchymal signalling drives the tooth development from a bud to the cap and later bell stage followed by tissue mineralization.

Teeth develop in context of other orofacial structures, particularly the bone. Mouse molars develop under different mineralization condition of the surrounding bone, as the first (M1) and second (M2) molars form prenatally but the third molar (M3) starts its budding perinatally. In differentiation of both, odontoblasts and osteoblasts is involved a subsets of molecules, such as BMP (bone morphogenetic proteins), which belong to the transforming growth factor beta superfamily of proteins (TGF- β), the major regulator of bone formation. BMP6 (bone morphogenetic protein 6) mediated osteoblast differentiation plays a key role in skeletal development and bone disease (1). Expression of BMP6 was reported dramatically increased in the DF and was found up-regulated in human periodontal ligament, which is derived from DF (2,3) and seems to have an important function in tooth eruption (2).

Aims: This study aims to use all three mouse molars as a model system to follow BMP6 expression 1) at different stages of tooth development, 2) at different mineralization stage of the surrounding bone tissue, and 3) in context of tooth eruption.

Material and Methods: Serial sagittal sections of formalin-fixed paraffin embedded mouse postnatal (P) mandibles from P0 to P26; hematoxylin-eosin staining (morphology), immunohistochemistry (anti-BMP6, Abcam, ab15640).

Results: The results showed that during perinatal crown formation of M1 (Fig. 1A₁) the expression of BMP6 increased in the surrounding bone (Fig. 1B₁). Some scattered positive cells were identified also in the mesenchymal dental sac. At the postnatal (P) stage P8, when the M3 passed the same developmental stage as M1 at P0 (Fig. 1A₂), the expression of BMP6 was similar to M1 (Fig. 1A₂). Initiation of root development in M1 started at the stage P4, where BMP6 positive cells were found in the mesenchymal dental sac near the Hertwig's epithelial root sheaths (HERS). BMP6 positive cells in HERS of the M3 were identified around P13. In the later stages of tooth development, before tooth eruption, expression of BMP6 became reduced to the dental pulp and some positive cells were identified in AB. Tooth eruption (M1-M2-M3) occurs between P17-P26.

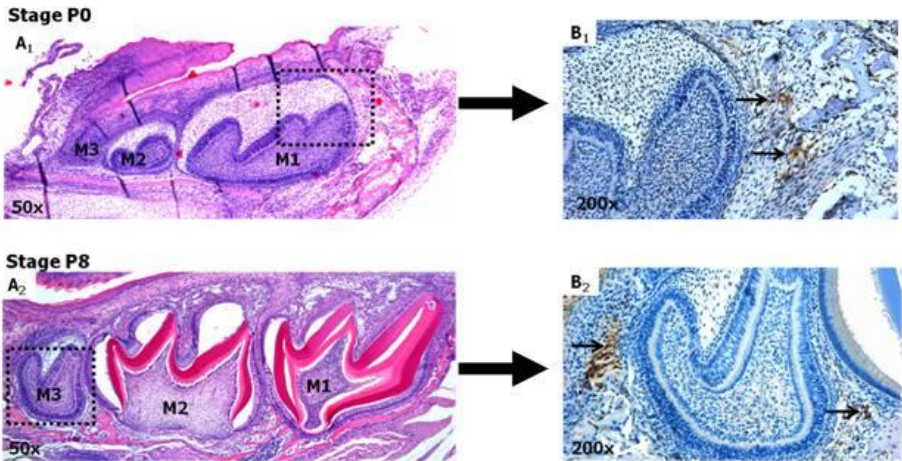


Fig. 1: BMP6 expression at a comparable developmental stage of M1 and M3 but in different conditions of the surrounding bone. A-hematoxylin-eosin, B-BMP6 immunohistochemistry (positive cells in brown).

Discussion: M3 starts development postnatally (P0) approximately 8 days after initialization of M1. Therefore, M3 develops under different environmental condition of the surrounding bone than M1 and thus resembles secondary dentition in human. Nevertheless, the expression of the BMP6 in the bone was shown tooth-stage dependent indicating developmental signals allowing the tooth to actively create supportive structures for its eruption. The exact signalling networks and functional

explanations are under study, however, expression of BMP6 can be involved in development of the connective fibres of the tooth supporting apparatus (Sharpey's fibres of periosteum). The fact that peripheral ends of these fibres are embedded in a compact bone supports this hypothesis.

Conclusion: Based on the temporospatial results, BMP6 protein apparently positively correlates with formation of supportive bone mass prior/during eruption of molar teeth.

Acknowledgement: *Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (P302/12/J059). The IAPG laboratory runs under AVOZ 50450515.*

References:

(1) Luo J. et al. 2011: Syst Biol 5: 82, (2) Wise G.E. et al. 2011: Eur J Oral Sci 119: 333-338, (3) Wescott J. et al. 2007: J Dent Res 86: 1212-1216, (4) Wise G.E., Yao S. 2006: Eur J Oral Sci 114: 512-516

Notes & comments

SEPARASE AND MPF INTERACTION DURING MEIOSIS IN MAMMALS

Danylevska A.

Veterinary Research Institute, v.v.i., Brno, Czech Republic

Outlines: Separase is a cysteine protease, which plays key role during both types of cell division - mitosis and meiosis – triggering sister chromatids and homologues chromosomes segregation. Two regulatory mechanisms controlling Separase activity are known: binding in complex with Securin and phosphorylation by MPF (Maturation Promoting Factor) composed of Cdk1 and its regulatory cyclin – Cyclin B1. For controlling function of MPF formation of a stoichiometric complex with Separase is required. Activity of MPF fluctuates during cell cycle. For meiosis I exit MPF needs to be transiently inhibited in anaphase I. It has been presented in several studies that forming complex with Separase could be one of the mechanisms causing decrease of MPF activity. To discover relations between Separase and MPF we have performed single cell histone H1 kinase assays using mice strain with Separase gene deleted specifically in oocytes. Results of our experiments show no difference in Cdk1 activity in Separase depleted and control oocytes, suggesting that Separase doesn't affect the activity of MPF *in vivo*.

Notes & comments

AGE-RELATED ANEUPLOIDY IN MOUSE OOCYTES

Šebestová J.

Veterinary Research Institute, v.v.i., Brno, Czech Republic

Outlines: Increasing maternal age leads to significantly higher risk for trisomic pregnancies, spontaneous abortions and infertility. Aneuploid eggs and embryos mostly originate from aberrant chromosome segregation and spindle abnormalities during first meiotic division, which involves the segregation of replicated homologous chromosomes. Spindle assembly checkpoint is mechanism that control correct chromosomal attachment to spindle prior to cell division. This mechanism prevents anaphase efficiently in mitotic cells but it seems that meiotically divided cells have to align only critical mass but not all of the chromosomes. In our study, we used oocytes from naturally aged outbreed mice without any hormonal stimulation. Oocytes from 3-4 months and 18-20 months old mice were examined for aneuploidy rate after first meiotic division by kinetochore counting assay. Time-lapse confocal video microscopy was used for observation of chromosomal movement from prophase of meiosis I to metaphase of meiosis II. Our experiments reveals that chromosomes in old oocytes are aneuploid and do not correctly establish metaphase plate in meiosis I but cell division is not arrested by spindle assembly checkpoint mechanism. So we suggest that this could be the reason for increasing reproductive problems.

Notes & comments

EXPLANT CULTURES IN PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF MOLECULES WITH PHYSIOLOGICAL IMPACT

Kudělová J.¹, Doubek J¹, Matalová E.^{1,2}

¹*Department of Physiology, FVM UVPS Brno,* ²*Institute of Animal Physiology and Genetics, CAS, v.v.i., Brno, Czech Republic*

Introduction: Pharmacological inhibitors are widely used in research and tested also for clinical applications. Important target molecules are caspases being involved in apoptosis and inflammation. Limb digitalisation represents a classic example of the role of apoptosis in morphogenesis and development (1). Different studies established that interdigital necrotic zones regression occurs through a caspase-dependent apoptotic process and the central caspase-3 has been identified in regressing interdigits (2). However, the final separation of digits happens even in the absence of this protease as shown in the knock-out mice (3). A possible alternative is a compensatory network among caspase, another one alternative mechanisms, such as necrosis (4). Lack of caspase-3 may cause a temporal defect in development before alternative pathway may start as shown in other systems and in the case of other apoptotic molecules (such as Apaf-1, a molecule upstream of caspase-3).

Aims: To follow any temporal impact of specific inhibition of active caspase-3 on interdigital cell removal using an *ex vivo* approach.

Material and methods: Culture of mouse limbs, embryonic day (E) 12.5 on membrane discs supported by a metal grid (Fig. 1), DMSO+10% FBS medium, humidified atmosphere (37°, 5% CO₂), culture up to 72 h. Design: the first group of samples - cultivation control (medium only), the second group - vehicle control (1% DMSO), and the third one - caspase-3 inhibitor (R&D System, FMK 004). Samples were harvested after 24, 48 and 72 hours to perform further microscopic analysis of apoptosis (TUNEL assay), proliferation (PCNA IHC) and active caspase-3 (IHC).

Results: First, pattern of caspase-3 in the interdigital tissue was followed using immunohistochemistry and correlated with apoptosis (Fig. 2). As active caspase-3 was not present in the interdigit region up to E13, the

E12.5 limbs were selected for initiation of inhibition. Growth of the cultures was monitored by PCNA marker. In the control groups, there were localized TUNEL and caspase-3 positive cells in the interdigital spaces. However, there was no sign of apoptotic bodies or TUNEL positive cells after 24 hours in the caspase-3 inhibited samples. After 48 hours in culture, TUNEL positive cells reappeared in the interdigital tissue of the caspase-3 inhibited samples, however, webbing was still apparent between the digits, when compared to controls.

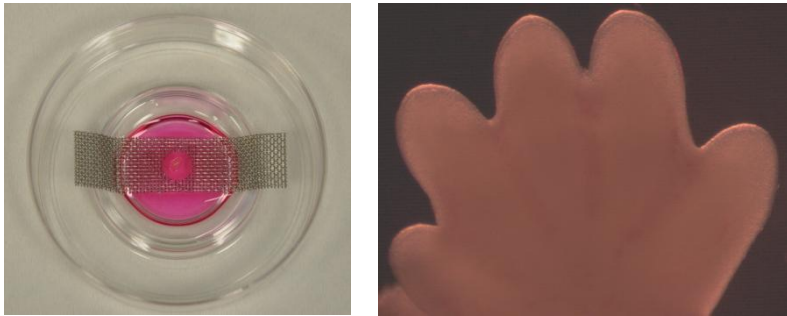


Fig. 1: Culture of mouse limbs – culture setting (left) and starting separation of digits ex vivo (right).

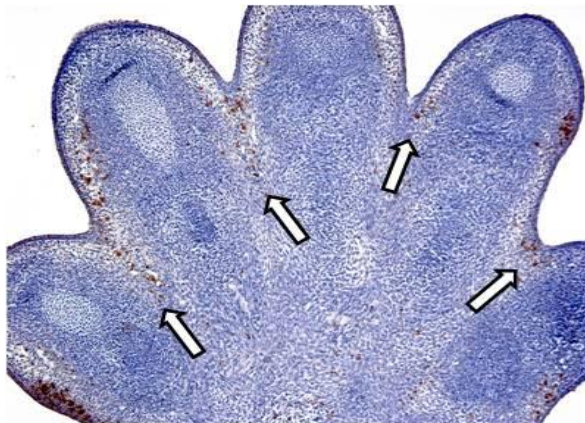


Fig. 2: TUNEL staining of E14.5 mouse front limbs. Apoptotic regression is apparent in the interdigital mesenchyme (arrows). Hematoxylin staining (blue) was used to counterstain TUNEL positive cells (brown).

Discussion: Our findings show that caspase-3 inhibition alone can cause a temporal block in interdigital apoptosis and consequently in limb digitalization. This short delay may be caused by a switch to an alternative mechanism. One possibility is that other caspases can compensate in our cultures, and *in vivo*, for the lack of caspase-3. It has been proposed that the effector caspases-3, -6 and -7 act redundantly as they share several target proteins (5). It is also possible that a necrotic and caspase-independent mechanism starts to act in the cultures after 48 hours, similar to that observed in *Apaf1* mutants or after general caspase inhibition where caspase redundancy was excluded (4).

Conclusion: Caspase-3 is engaged in interdigital apoptosis, however, is not essential. Nevertheless, absence of caspase-3 causes delay in digit separation before onset of compensatory mechanisms.

Acknowledgement: *The research has been recently supported by GA CR P502/12/1285. The IAPG laboratory runs under AVOZ 50450515.*

References:

(1) Doseff A.I. 2004: Stem Cells Dev 13: 473-483, (2) Huang C., Hales B.F. 2002: Teratology 66: 288-299, (3) Kuida K. et al. 1996: Nature 384: 368-372, (4) Chautan M. et al. 1999: Curr Biol 9: 967-970, (5) Zuzarte-Luis V. et al. 2006: Apoptosis 11: 701-715

Notes & comments

DYNAMICS OF CASPASE ACTIVATION AND INHIBITION - QUANTIFICATION AT ONE CELL LEVEL

Chlastáková I.^{1,2}, Matalová E.^{1,2}

¹*Department of Physiology FVM UVPS Brno,* ²*Institute of Animal Physiology and Genetics, AS CR, v.v.i., Brno, Czech Republic*

Introduction: Apoptosis as a physiological type of cell death is precisely regulated and mostly requires cooperation of molecules called caspases (cystein proteases). Caspase-3 is the main executioner caspase activated by cleavage and targeting several apoptotic substrates (1). Caspases can be regulated *in vivo* by different molecules of activators or inhibitors (IAPs, FLIP, calpain) or *ex vivo* by different apoptogens and synthetic caspase inhibitors (2,3,4). Modulation of caspases has been investigated in several studies because caspases can be implicated in pathogenesis of many diseases (2,5) and the knowledge can be applied in therapeutic approaches. Only few studies, however, deal with caspase activation/inhibition dynamics and exact quantification.

Aims: The aims of this study were 1) to investigate the dynamics of caspase-3 activation after camptothecine (CPT) treatment in embryonic mesenchymal micromass culture systems and 2) to evaluate the dynamics of caspase-3 inhibition after CPT induced apoptosis peak.

Material and Methods: Front limbs at embryonic day (E) 12.0 were obtained from wild type pregnant mice, individual cells were mechanically and enzymatically disintegrated, equal aliquots were used to make spots in cultivation plates, these were further cultured in the CO₂ incubator. Four parallel groups were run: 1) control (medium only), 2) vehicle control (medium+DMSO), 3) experimental group – activation (CPT), 4) experimental group – inhibition (FMK after CPT peak). The spots were harvested in corresponding intervals (hours for activation, each minutes for inhibition experiments), Caspase-Glo[®] 3/7 assay was applied for detection of caspase-3 activity and chemiluminescence (CL) emission was monitored. The maximum signal was taken as a representative value proportional to the amount of caspase-3 which was finally expressed as the amount per cell.

Results: Caspase-3 activation peak was detected in the experimental group treated with CPT and compared with control group without any treatment (Fig. 1). The difference between control and experimental group started to be clear 6 hours after CPT application with a peak after 8-10 h.

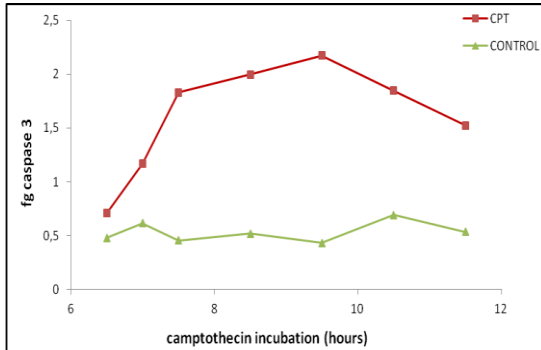


Fig. 1: Dynamics of caspase-3 activation after CPT treatment (fg of cleaved caspase-3 per cell).

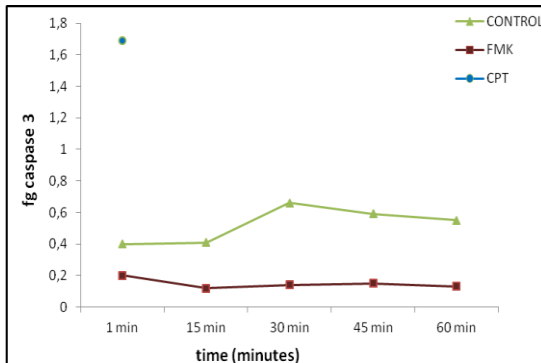


Fig. 2: Dynamics of cleaved caspase-3 inhibition after CPT induced peak (fg of caspase-3 per cell).

Dynamics of inhibition with FMK caspase-3 inhibitor was evaluated after addition of FMK inhibitor at the CPT peak time (Fig. 2). The inhibitor entered the cells within 1 min and the inhibitory effect was completed within 30 min.

Discussion: CPT is a very potent apoptogen and has been reported to possess antitumor activity used especially in anti-cancer chemotherapy (6). It is known that CPT is effective in different concentrations and in our study we used concentration based on study of Saeki et al. (7). The photon counting precise method allowed for evaluation of caspase-3 amount per one cell, thus at femtogram level. The results indicate a strong onset of caspase-3 activation after 6 hours of apoptosis induction which culminates 8 h after CPT treatment. Effect, particularly penetration and timing, of FMK inhibitor in cells has been often discussed. Our results showing dynamics of caspase inhibition indicate effectiveness of FMK inhibitor in a short time period of minutes (4).

Conclusion: The photon-counting chemiluminiscence method has been shown as a potent tool to evaluate dynamics of cellular events at femtogram levels as demonstrated in the activation experiment. FMK inhibitor penetrates cells within one minute and displays a rapid effect on caspase-3 inactivation.

Acknowledgement: *Thanks for cooperation to Dr. Klepárník, Dr. Lišková (IACH AS CR, v.v.i.) and for financial support to GA CR P502/12/1285.*

References:

(1) Fischer U. et al. 2003: Cell Death Differ 10: 76-100, (2) Rupinder S.K. et al. 2007: Vasc Pharmacol 46: 383-393, (3) Chowdhury I. et al. 2008: Comp Biochem Physiol 151: 10-27, (4) Roy R. et al. 2010: J Cell Biochem 111: 653-658, (5) Iwata et al. 2003: J Immunol 170: 3386-3391, (6) Lee P. et al 2012: Int J Nanomedicine 7: 731-737, (7) Saeki K. et al. 2011: Biol Pharm Bull 34: 290-294. (8) Parent N. et al. 2009: J Prot 72: 960-973

Notes & comments

CHARACTERIZATION OF NOVEL HALOALKANE DEHALOGENASE FOR PRODUCTION OF OPTICALLY PURE COMPOUNDS

Chrást L., Chovancová E., Koudeláková T., Damborský J.,
Chaloupková R.

Loschmidt Laboratories, Department of Experimental Biology and Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Czech Republic

Introduction: Optically pure compounds are important for the production of fine chemicals and pharmaceuticals (1). Preparation of optically pure enantiomers by organic synthesis or by separation from racemic mixtures can be challenging. Enzymatic resolution of enantiomers makes enantioselective enzymes the valuable biocatalysts (2). Enantioselectivity of haloalkane dehalogenases has been recently described for the wild type enzymes (3) and the mutants prepared by the directed evolution (4). Haloalkane dehalogenases can be used for the production of optically pure alcohols, haloalcohols and haloalkanes (5).

Aims: The aim of this study was to characterize a novel haloalkane dehalogenase DmxA isolated from extremophilic organism *Marinobacter* sp. ELB17.

Material and Methods: The sequence of putative haloalkane dehalogenase enzyme has been identified by the database searching. The artificially synthesized *dmxA* gene was subcloned into pET21b vector. The enzyme was overexpressed in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells and purified to homogeneity by metallo-affinity chromatography. Correct folding and thermostability of DmxA was analyzed by using of circular dichroism (CD) spectroscopy. Substrate specificity of DmxA was assayed towards a set of 30 halogenated substrates by a colorimetric Iwasaki method (6) and statistically analyzed by Principal component analysis (7). Effect of temperature and pH on activity of DmxA was determined by activity measurement with 1,3-diiodopropane. Steady-state kinetic parameters of the enzyme were determined towards 1,3-dibromopropane and 1-

chlorobutane. Enantioselectivity of DmxA was tested with selected α -brominated esters and β -substituted alkanes.

Discussion: Similarly to other haloalkane dehalogenases, DmxA exhibited CD spectrum with one positive peak at 195 nm and two negative maxima at 208 and 222 nm, characteristic of α -helical content. The melting temperature of DmxA was determined to be $T_m = 65.9$ °C, representing the the most thermostable enzyme from all previously characterised haloalkane dehalogenases (Fig. 1).

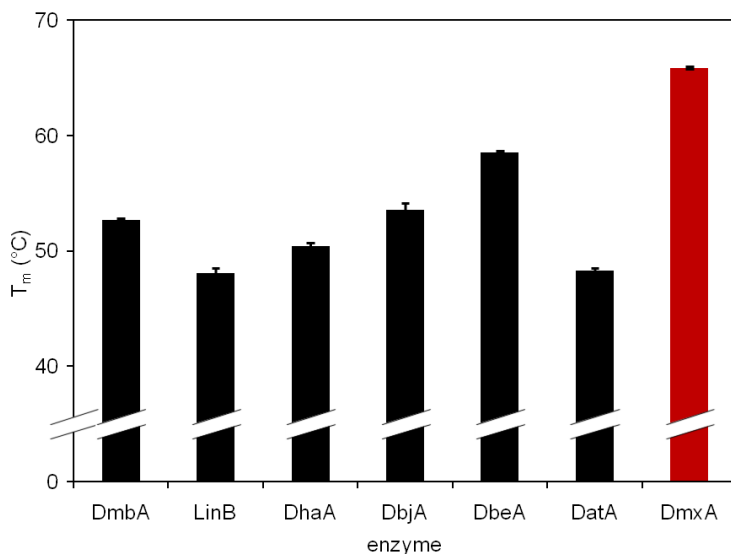


Fig. 1: Comparison of the melting temperatures of DmxA and related members of HLD-II subfamily.

DmxA exhibited activity towards 26 out of 30 tested substrates with the slight preference towards brominated and bromo-chlorinated alkanes and the highest activity towards 1,3-dibromopropane. Statistical analysis clustered DmxA to the substrate specificity group I. The highest activity of DmxA towards 1,3-diiodopropane was detected at 55 °C and pH 6.6–9. Kinetic measurement revealed complex mechanism of 1,3-dibromopropane dehalogenation, employing positive cooperativity and substrate inhibition ($K_{0.5} = 0.15 \pm 0.01$; $k_{cat} = 2.05 \pm 0.12$ s⁻¹; $n = 13.8 \pm 1.9$; $K_{si} = 1.46 \pm 0.2$ mM). The steady-state kinetics of DmxA measured with 1-chlorobutane

exhibited, in agreement with other family members, Michaelis-Menten dependence. High enantioselectivity of DmxA was observed in the reaction with ethyl-2-bromobutyrate ($E > 200$), methyl-2-bromobutyrate ($E > 200$) and 2-bromopentane ($E = 100$). Determined E -values make DmxA one of the most enantioselective haloalkane dehalogenase.

Conclusion: The novel haloalkane dehalogenase DmxA isolated from extremophilic microorganism was biochemically characterized. Observed unique properties, such as high thermostability and enantioselectivity, make DmxA suitable catalyst for practical application in the biosynthesis of optically pure compounds.

Acknowledgement: *This work was supported by the European Regional Development Fund (CZ.1.05/2.1.00/01.0001 and CZ.1.05/1.1.00/02.0123), the Grant Agency of the Czech Republic (203/08/0114 and P207/12/0775) and the Grant Agency of the Czech Academy of Sciences (IAA401630901).*

References:

(1) Patel R.N. 2004: Food Technol Biotechnol 42: 205-325, (2) Patel R.N. et al. 2000: J Am Oil Chem Soc 77: 1015-1019, (3) Prokop Z. et. al. 2010: Angew Chem Int Ed 49: 6111-6115, (4) van Leeuwen J.G.E. et al. 2012: ChemBioChem 13: 137-148, (5) Prokop Z. et al. (2004): Patent application CZ 2004-1240 A1, (6) Iwasaki I. (1952): Bul Chem Soc Jap 25: 226, (7) Koudeláková T. et al. 2011: Biochem J 435: 345-354

Notes & comments

PŮVOD ŘEZÁKŮ HORNÍ ČELISTI U PRASETE

Putnová I.¹, Buchtová M.^{1,2}, Tichý F.¹

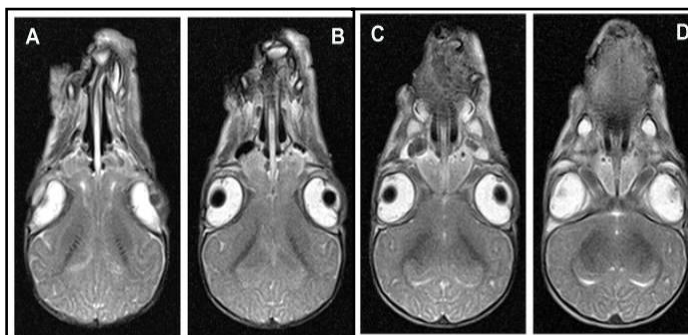
¹Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno, ²Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i, Brno

Úvod: Výskyt rozštěpu rtu a/nebo patra je u humánních pacientů doprovázen ve vysokém procentu poruchou erupce zubů, zejména pak laterálního řezáku na postižené straně. Jedná se zejména o nadpočetný řezák nebo naopak jeho absenci, častý je výskyt nejrůznějších tvarových abnormalit (1). Vzácněji je možné pozorovat u postižených jedinců přítomnost tzv. natálních nebo neonatálních zubů, kdy jsou v dutině ústní přítomny některé prořezané zuby již v okamžiku narození, či během krátké doby post partum (*dentitio praecox*) (2). S tím korespondují nálezy poruch erupce zubů u selat postižených některou z rozštěpových vad pysku a/nebo patra. Zdravý neonatus prasete se rodí s prořezanými řezáky (i3, laterální řezák) a špičáky (c) ve všech zubních kvadrantech.

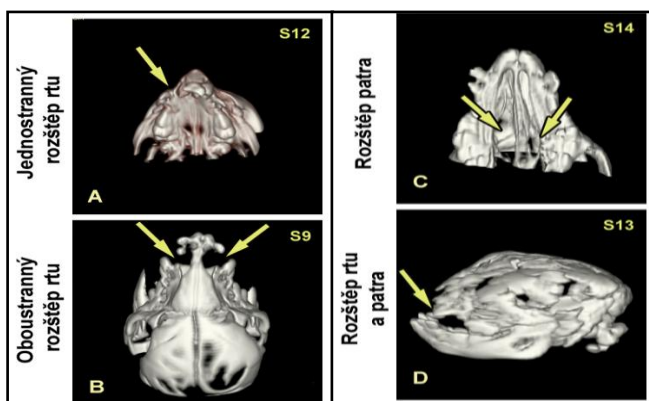
Cíle: Uvedené nálezy nás vedly k vyslovení hypotézy, že embryonální původ těchto zubů bude odlišný od původu prvního a druhého řezáku a budou pravděpodobně pocházet z oblasti maxilární prominence, zatímco první dva řezáky z oblasti frontonazální masy. Cílem naší práce tedy bylo tuto teorii potvrdit či vyvrátit.

Materiál a metody: Jako studijní materiál nám sloužila selata se sledovanými vadami, která jsou shromažďována z několika vybraných chovů v ČR. Do studie jsou zahrnuti kříženci landrase x české bílé ušlechtilé a miniprasata z experimentálního chovu v Liběchově. Kadavery těchto selat jsou na místě zmrazeny a poté transportovány na VFU Brno. Hlavy selat postižených sledovanými kraniofaciálními malformacemi byly zobrazeny metodou magnetické rezonance (obr. 1) a počítačové tomografie (obr. 2). Pro vlastní studii embryonálního původu řezáků byla provedena trojrozměrná rekonstrukce (3D) zubní lišty horní čelisti prasete ve vývojových stádiích E30, E35 a E36 (E-den embryonálního vývoje). Pro vlastní analýzu byly použity sériové transverzální řezy hlavové části embryí miniprasat obarvené přehledným barvením hematoxylinem-eosinem, k následnému sestrojení 3D obrazu (obr. 3) pak software WinSurf.

Výsledky: Tvorba patra začíná u prasete v třetím týdnu prenatalního vývoje (E20) a následně dochází k iniciaci osifikace premaxily (E24). Třetí řezák (i3) se vyvíjí kaudálně za oblastí fúze primárního a sekundárního patra u normálních embryí.

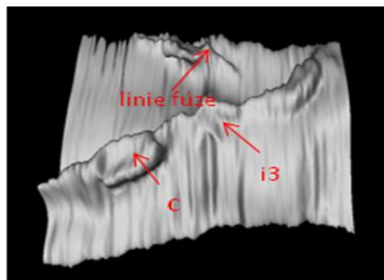


Obr. 1: MRI obraz selete s jednostranným rozštěpem pysku.

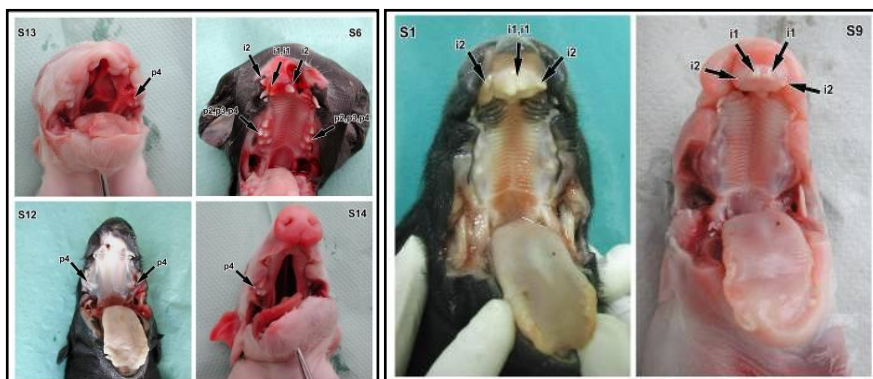


Obr. 2: CT analýza selat s rozštěpem pysku a/nebo patra.

Diskuse: V případě selat postižených některou z rozštěpových vad pysku a/nebo patra se objevuje široké spektrum poruch erupce zubů. Nejčastěji se jedná o zuby předčasně prořezané (i1, i2, p), které se za normálních okolností objevují v dutině ústní až několik týdnů po narození. Důležitým zjištěním je fakt, že ve všech námi zaznamenaných případech se laterální řezák a špičák nacházely vždy až za linií rozštěpu (obr. 4).



Obr. 3: 3D rekonstrukce zubní lišty horní čelisti embrya prasete (E36).



Obr. 4: Příklady rozštěpů pysku a/nebo patra u prasete.

Závěr: Metodou trojrozměrné rekonstrukce jsme potvrdili naši hypotézu o odlišném embryonálním původu třetího řezáku u prasete. Tento zub se skutečně zakládá v oblasti maxilární prominence, zatímco první dva řezáky vznikají v oblasti frontonazální masy.

Poděkování: Interní grantové agentuře Veterinární a farmaceutické univerzity Brno (grant 28/2010/FVL) za finanční podporu.

Literatura:

(1) Tsai T.P. et al. 1998: Cleft Palate Craniofac J 35: 154-160, (2) Chow M.H. 1980: J Am Dent Assoc 100: 215-216

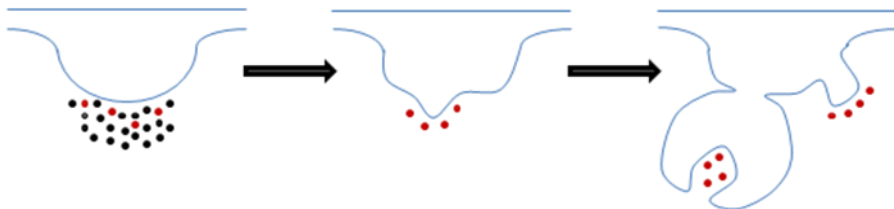
Poznámky & komentáře

MICROARRAY ANALÝZA REGIONALIZACE DOLNÍ ČELISTI U MYŠI

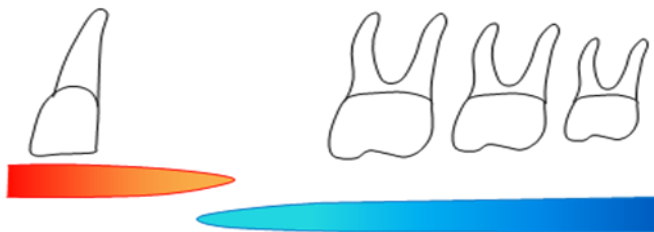
Balková S.^{1,2}, Buchtová M.^{1,3}

¹Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno, ²Lékařská fakulta, MU, Brno ³Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno

Úvod: Myš domácí (*Mus musculus var. alba*) slouží již značnou dobu jako oblíbený modelový organismus pro studium vývoje zubů a čelistí. Vývoj čelistí začíná formováním stomodea, kolem kterého rostou a zvětšují se jednotlivé obličejové výběžky. Maxilární prominence a následně horní čelist vzniká z postoptického mezenchymu, mandibulární prominence vzniká z prvního faryngeálního oblouku (1). V období E11,5 (E - embryonální den) dochází u myši k rozlišení maxilárního a mandibulárního výběžku především z důvodu intenzivního růstu obou prominencí. Vývoj zubů je iniciován v podobě epitelového ztlustění podél čelistí. V následujícím období (E12,5) pak dochází k rozvoji jazyka a v čelistech probíhá růst epitelových čepů zubních primordií do mezenchymu (2). U myši se zakládají pouze dva typy zubů – řezáky a moláry, které od sebe odděluje diastema. Dodnes bylo prezentováno několik hypotéz, které vysvětlují vznik rozdílných tvarů zubů v různých oblastech čelistí. Teorie klonů (obr. 1) předpokládá, že z neurální lišty putují klony buněk s již determinovaným osudem vývoje (3). Tedy tvar zubu je předurčen již v okamžiku vzniku zubního primordia. Teorie morfogenetických polí (obr. 2) předpokládá existenci morfogenetických gradientů podél zubní lišty (4), které určují budoucí tvar základu. Tato teorie byla později potvrzena expresí homeoboxových genů (5). Současný výzkum však ukazuje, že se zřejmě na vývoji tvaru zubů podílí kombinace všech výše zmíněných teorií.



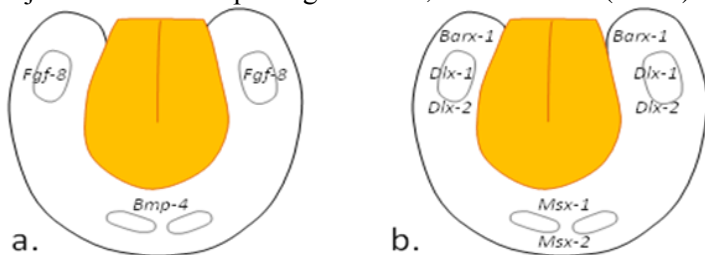
Obr. 1: Teorie klonů (upraveno dle Osborne, 1978).



Obr. 2: Teorie morfogenetických polí. Červená oblast předurčuje vývoj jednohrbolkových řezáků, modrá vícehrbolkových molárů (upraveno dle Butler, 1939).

Vývoj ektodermálních derivátů, mezi které patří i zuby, je regulován sekvencí recipročních reakcí mezi epiteliální a mezenchymální složkou. Signální molekuly, které řídí jejich vývoj, náleží do několika rodin parakrinních faktorů (BMP, FGF, WNT, SHH). Přesná lokalizace jak signálních molekul, tak jejich specifických receptorů je řízena epitelomezenchymálními interakcemi. Některé signální molekuly jsou omezeny jen na určité vývojové stádium, v mnoha případech se uplatňují opakovaně během jednotlivých stadií morfogeneze.

V časném zubním epitelu byla v rostrálním úseku čelistí exprese *Bmp4*, který indukuje expresi homeoboxového transkripčního faktoru *Msx1* a *Msx2* v mezenchymu. *Fgf8* je exprimován v epitelových buňkách kaudální části čelisti, která odpovídá budoucí oblasti molárů (6,7,8). V mezenchymu této oblasti je stimulována exprese genů *Dlx1*, *Dlx2* a *Barx1* (obr. 3).



Obr. 3: Expresce homeoboxových genů v epitelu (a) a mezenchymu (b) (upraveno dle Sharpe, 1995).

Cíle: Cílem naší práce bylo pomocí metody microarray zjistit kompletní profil exprese genů podílejících se na stanovení rostro-kaudální osy dolní čelisti a popřípadě odhalit nové geny, které se podílejí na řízení vývoje identity a tvaru zuby.

Materiál a metody: Z tkáně odebrané z rostrální a kaudální oblasti dolní čelisti myši ve dvou vývojových stádiích (E11,5 a E12,5) byla izolována RNA, která byla následně zaslána na analýzu do ÚEM AV ČR, v.v.i. Pro hybridizace byly použity čipy GeneChips Mouse Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix). Data byla vyhodnocena v programu Gene Spring GX (Agilent Technologies), ve kterém byla provedena i statistická analýza (ANOVA, $p < 0,05$). Následně jsme srovnaly rozdíly exprese genů mezi rostrálním a kaudálním segmentem čelisti stadií stejného stáří.

Výsledky: Pro rostrální oblast byla charakteristická vysoká exprese genů *Bmp4*, *Msx1*, *Msx2*, *Pax3*, *Alx3* a *Satb2*. V kaudálních úsecích byly nejvíce zvýšeny geny typické pro molárovou oblast (*Fgf8*), otickou oblast (*Neurod1*, *Ina*) nebo ganglia (*Neurog1*). Navíc byly odhaleny další geny, které nebyly v předešlých analýzách spojovány s modelováním zubů a čelistí. Tyto kandidátní geny budou následně podrobeny dalším analýzám pro potvrzení lokalizace jejich exprese metodou *in situ* hybridizace. Patří mezi ně například *Elavl4*, který byl dosud spojován s vývojem karcinomu plic nebo gen *Sncg*, jehož mutace jsou spojovány s neurodegenerativními onemocněními nebo rakovinou prsu.

stadium/oblast	molárová oblast	řezáková oblast
E11,5	149 genů	72 genů
E12,5	202 genů	124 genů

Závěr: Využití microarray technologie umožnilo získat komplexní profil genové exprese rostrální a kaudální oblastí mandibuly, který bude následně využit pro identifikaci nových genů podílejících se na rostro-kaudálním modelování čelistí a jednotlivých typů zubů heterodontní dentice.

Literatura:

(1) Lee S.H. et al. 2004: Dev Biol 276: 207-224, (2) Kaufman H.M. 1999: The atlas of mouse development. Academic Press, (3) Osborn J.W. 1978: Morphogenetic gradients: fields versus clones. London, Academic Press 171-201, (4) Butler P.M. 1939: Proc Zool Soc Lond, 109B: 1-36, (5) Sharpe, P.T. 1995: Connect Tissue Res 32: 17-25, (6) Heikinheimo M. et al. 1994: Mech Dev 48: 129-38, (7) Jernvall J. et al. 1994: Int J Dev Biol 38: 463-469, (8) Kettunen P. et al. 1998: Dev Dyn, 211: 256-68

Poznámky & komentáře

DETEKCE RECEPTORŮ POHLAVNÍCH HORMONŮ V OVARIÁLNÍ TKÁNI MORČETE DOMÁCIHO

Stehlíková Š.¹, Macháňová J.¹, Stránská T.¹, Hauptman K.³, Matalová E.^{1,2}

¹Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, ²ÚŽFG AV ČR, v.v.i., Brno, ³Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, FVL VFU Brno

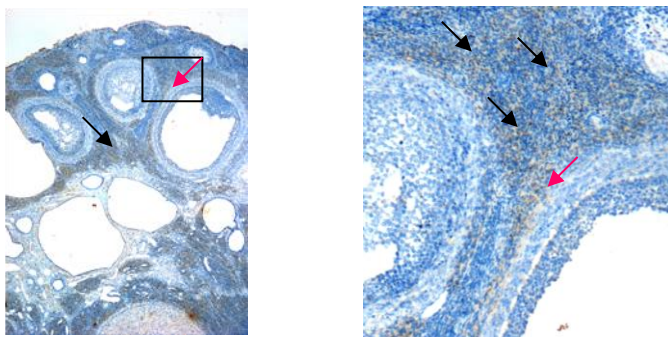
Úvod: Luteinizační hormon (LH) a folikuly stimulující hormon (FSH) patří do skupiny gonadotropinů produkovaných adenohipofýzou. FSH stimuluje růst ovariálních folikulů u samic a spermatogenezi u samců (1,2). LH u samic indukuje ovulaci a následnou luteinizaci, u samců je odpovědný za sekreci testosteronu (2). Při přenosu signálu se FSH i LH musí vázat na specifické receptory pro FSH (FSHR) a LH (LHR). Oba typy receptorů se nacházejí na buňkách pohlavních žláz. U samic jsou FSHR lokalizovány pouze na granulózních buňkách ovarií (3). LH receptory jsou u samic lokalizovány na thekálních, granulózních, luteálních a intersticiálních buňkách ovarií (4,5,6). Po aktivaci receptoru je spuštěna kaskáda dějů vedoucích ke specifické biologické odpovědi, u FSH proliferaci, diferenciaci folikulů a zrání oocytů, u LH k ovulaci (1,3,7). V současné době patří morče domácí mezi nejvíce chované drobné savce. Jedno z nejčastějších onemocnění, které se vyskytuje jak u samic morčat zařazených do reprodukce, tak u jedinců chovaných samostatně, patří ovariální cisty. Ovariální cisty se mohou vyskytovat na vaječnicích jak unilaterálně, tak bilaterálně (8). Cystické struktury obsahují čirou tekutinu a postupem času se stávají hormonálně aktivní. Na základě zvýšené hormonální aktivity dochází k hypotrichóze až symetrické bilaterální nepruritické alopecii, v pozdějších stadiích dochází k dysmikrobii (9). Folikulární cisty vznikají pravděpodobně na základě nepoměru FSH a LH hormonů (v neprospěch LH). V důsledku absence LH nedochází k ovulaci folikulů. Ty naopak perzistují na vaječnicích a mohou vést k rozvoji folikulárních cyst (10).

Cíle: Detekce a lokalizace LH a FSH receptorů v ovariích morčete domácího.

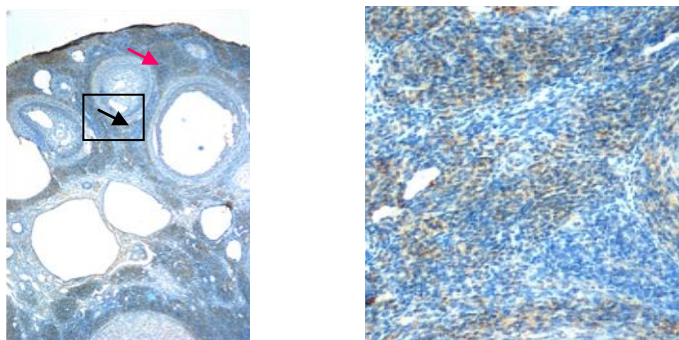
Materiál a metody: Vzorky ovariální tkáně z klinicky zdravých samic morčete domácího (18 měsíců), u kterých byla provedena

ovariohysterektomie. Sériové histologické řezy ovariálních tkání, 1. řez barvený hematoxylinem a eosinem, další řezy určeny pro imunohistochemickou detekci FSH (FSH Receptor Antibody, Novus Biologicals, NLS2231) a LH (LH Receptor Antibody, Novus Biologicals, NLS1436) receptorů. Standardní protokol s citrátovým předpůsobením, aplikace primární protilátky 1 h při laboratorní teplotě a koncentraci 1:200.

Výsledek: Z dosažených výsledků je patrná exprese FSH a LH receptorů v buňkách vrstvy *theca externa* a intersticiálních buňkách v ovariální tkáni morčat (obr. 1, 2).



Obr. 1: Expres FSH receptorů v ovariální tkáni morčete (pozitivní buňky hnědé). Detailní záběr (vpravo) ukazuje expresi v buňkách vrstvy theca externa (červená šipka) a intersticiálních buňkách (černá šipka).



Obr. 2: Expres LH receptorů v ovariální tkáni morčete. Pozitivní buňky (hnědé) v theca externa (červená šipka) a intersticiálních buňkách (černá šipka). Detailní záběr (vpravo) ukazuje expresi v intersticiálních buňkách.

Diskuse: Na základě zpracovaných vzorků byla v ovariální tkáni zjištěna exprese FSH a LH receptorů na buňkách intersticiálních a thekálních. Exprese na granulózích buňkách nebyla potvrzena. Změna lokalizace může být způsobena tím, že vzorky pocházejí od morčat ve věkové kategorii, kdy se začínají tvořit cysty na vaječnicích, i když histologicky cysty nebyly potvrzeny. Vzhledem k vysoké prevalenci výskytu syndromu polycystických ovarii u morčat jsou tato vhodným experimentálním modelem pro sledování interakcí pohlavních hormonů (FSH, LH) a současné porovnání těchto interakcí u vzorků se syndromem polycystických ovarii a vzorků kontrolních (zdravá tkáň). U samic morčat s polycystickými ovarii lze očekávat změnu exprese receptorů pro LH a FSH. Rovněž předpokládáme změnu exprese receptorů na ostatních částech pohlavního aparátu (děloha, pochva). Sledování exprese receptorů na vaječnicích, děloze a pochvě u morčat s polycystickými ovarii, bude předmětem navazující studie.

Závěr: Tato práce přinesla první výsledky týkající se lokalizace receptorů v ovariální tkáni, která dosud nebyla u morčat prováděna. Data budou použita v dalších studiích týkajících se korelace rozložení receptorů pro dané hormony a výskytu ovariálních cyst.

Poděkování: *Tato studie vznikla na základě finanční podpory IGA VFU Brno 56/2012/FVL a rovněž díky pomoci MVDr. Petra Fictuma, Ph.D., který vzorky histologicky zpracoval.*

Literatura:

(1) Simoni M. et al. 1997: Endocr Rev 8: 739-773, (2) Ganong W.F. 2005: Přehled lékařské fyziologie. Nakladatelství Galén: 890, (3) George J.W. et al. 2011: Biol Reprod 84: 7-17, (4) Catt K.J. et al. 1976: Biol Reprod 14: 1-15, (5) Derecka K. et al. 1999: J Reprod Fertil 115: 365-372, (6) Patsoula E. et al. 2001: Reproduction 121: 455-461, (7) Segaloff D.L. et al. 1993: Endocr Rev 14: 324-342, (8) Jekl V. et al. 2004: Veterinářství 54: 498-502, (9) Hauptman K. et al. 2011: Veterinární klinika 2: 63-67, (10) Kohútová S. 2011: Odborná práce, 68 stran, VFU Brno

Poznámky & komentáře

NEINVAZIVNÍ HODNOCENÍ POHLAVNÍCH HORMONŮ: BIOLOGICKÁ VALIDACE EIA METODY PRO GIBONY

Petrášová J.¹, Korytářová M.¹, Bolechová P.^{2,3}

¹Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, ²Katedra obecné zootechniky a etologie, FAPPZ ČZU Praha, ³Zoologická zahrada Liberec

Úvod: V době, kdy z planety postupně mizí mnohé živočišné druhy a velká část se stává ohroženým nebo kriticky ohroženým druhem (1), je možnost získávání dat o těchto zvířatech neinvazivním způsobem důležitou součástí výzkumu (2). Kromě srsti a moče je nejnázne získatelným materiálem trus, který je využíván nejen pro populační genetiku, či detekci mikroorganismů, ale v posledních letech i na získání dat o endokrinním statusu zvířat (2,3,4). Giboni rodu *Nomascus* patří ke kriticky ohroženému druhu, o kterém zároveň chybí velké množství základních informací o fyziologii reprodukce (1). I když ovariální cyklus byl stanoven na základě dat o říjí, době a způsobu páření, bohužel jen některá data byla získána na základě analýz hormonálních změn v moči nebo trusu (5,6). Sporná je však výpovědní hodnota, protože většina analýz byla provedena jen na jednom jedinci. Použití neinvazivních metod pro sledování hladin hormonů je důležité, jak z hlediska požadovaných informací o fyziologii reprodukce, tak z hlediska zachování welfare zvířat. Pro zajištění interpretovatelnosti EIA metody byla zvolena biologická validace, která prokazuje, že hormonální hladiny přesně odrážejí fyziologické děje organismu, konkrétně jednotlivé stadia reprodukce (7).

Cíle: Základní cíle tohoto projektu jsou následující: 1) stanovení množství metabolitů progesteronu z trusu dospělých samců a samic, 2) statistické vyhodnocení dat a tím validity EIA metody pro rod *Nomascus*.

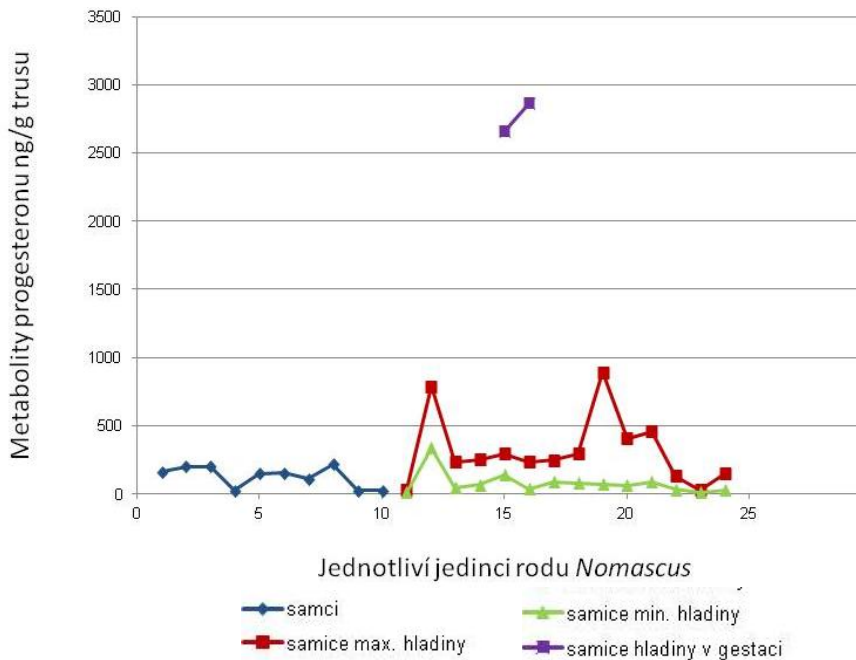
Materiál a metody: Do projektu byli zahrnuti dospělí samci a samice s pravidelným ovariálním cyklem (věk 9-27 let). Vzorkování 14 jedinců rodu *Nomascus gabriellae* (5 samců a 9 samic) a 10 jedinců *Nomascus leucogenys* (5 samců a 5 samic) probíhalo v zoologických zahradách ČR a SR. Jednou týdně v rozmezí 5 až 8,5 měsíců u samic a 1-2 měsíce u samců byl od každého sledovaného zvířete odebrán čerstvý vzorek trusu, nejdéle 2 hodiny po defekaci a zamražen na -20 °C. Vzorky trusu o hmotnosti 0,5 g

byly fixovány 80% metanolem, odstředěny a získána supernatantová frakce. Mikrotitrační destičky byly pokryty progesteron-polyklonální protilátkou (CL425, C. Munro, University of California, USA). V rámci kompetitivní enzymové imunoreakce byl použit progesteron konjugovaný s peroxidázou a byla také sledována zkřížená reaktivita progesteronových protilátek. Všechna stanovení hormonů byla prováděna duplicitně pro výpočet koeficientu variability. Výsledky byly propočteny na steroidní metabolity progesteronu v ng/g vlhkého trusu. Pro statistické vyhodnocení byl použit neparametrický Mann-Whitney test.

Výsledky: Délka ovariálního cyklu (OC) samic rodu *Nomascus gabriellae* byla $24,7 \pm 4,8$ dní, s průměrně nejnižšími hladinami metabolitů progesteronu $104,02$ ng/g trusu ve fázi folikulární a nejvyššími hladinami $327,28$ ng/g trusu ve fázi luteální. U dvou samic byla zachycena také část fáze gestace, kdy hladiny metabolitů progesteronu byly v rozmezí $1414,3 - 3516,7$ ng/g trusu u jedné samice a $1511,92 - 2887,42$ ng/g trusu u samice druhé. Délka OC samic rodu *Nomascus leucogenys* byla $25,1 \pm 4,5$ dní, s průměrně nejnižšími hladinami $51,54$ ng/g trusu ve fázi folikulární a nejvyššími hladinami $349,1$ ng/g trusu ve fázi luteální. Průměrné hladiny metabolitů progesteronu samců byly $131,2$ ng/g (*Nomascus gabriellae*) a $122,8$ ng/g (*Nomascus leucogenys*). Průměrné hodnoty byly vyneseny do grafu (obr. 1).

Srovnání rozdílů hladin metabolitů progesteronu samců s nejvyššími hladinami samic v rámci OC bylo statisticky významné ($Z = -2,73388$; $p = 0,006260$) a srovnání samců s nejnižšími hladinami samic v rámci OC statisticky nevýznamné ($Z = 0,594322$; $p = 0,552297$). Z důvodu nedostatečného množství vzorků od gravidních samic nebylo možné testovat rozdíl mezi hladinami v čase ovariálního cyklu a gestace, ale hodnoty v období gravidity byly u jedné samice o 200 % a u druhé o 150 % vyšší než v píku jejich ovariálního cyklu. Senzitivita analýzy byla 2,3 pg/jamka pro progesteron a koeficienty variability byly intra-assay <10 % a inter-assay <14 %.

Závěr: Na základě dosažených výsledků je možné konstatovat, že byla úspěšně zavedena a biologicky validována EIA analýza pro stanovení metabolitů progesteronu z trusu primátů rodu *Nomascus* a že délka ovariálního cyklu u obou druhů je v souladu s údaji dostupnými v literatuře.



Obr. 1: Průměrné hodnoty hladin metabolitů progesteronu v ng/g trusu u samců, samic a jejich nejvyšší a nejnižší hladiny v rámci ovariálního cyklu a gestace.

Poděkování: Tento projekt vznikl ve spolupráci se Zoo Bojnice, Zoo Bratislava, Zoo Chleby, Zoo Jihlava, Zoo Liberec, Zoo Olomouc, Zoo Ostrava a Zoo Ústí nad Labem. Práce byla financována IGA VFU Brno (33/2011/FVL).

Reference:

- (1) IUCN 2009: IUCN Red List of Threatened Species. Version 2009.2. www.iucnredlist.org,
- (2) Heistermann M. 2010: Adv Sci Res 5: 1-9,
- (3) Anderson H. et al. 2006: Hystrix 17: 65-77,
- (4) Petrželková K.J. et al. 2010: Am J Primatol 72: 307-316,
- (5) Lukas K.E. et al. 2002: ZOO Biology 21: 413-434,
- (6) Geissmann T., Anzenberger G. 2009: Gibbon J 5: 61-70,
- (7) Barelli C., Heistermann M. 2009: In: The Gibbons, Chapter 15: 313-325

Poznámky & komentáře

FUNKCE FGF PŘI VÝVOJI KONČETIN

Horáková D.^{1,2}, Celá P.^{2,3}, Buchtová M.^{1,2}

¹Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno, ²Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno, ³Ústav experimentální biologie, PřF MU, Brno

Úvod: Rodina fibroblastových růstových faktorů (FGF) reguluje mnoho vývojových procesů, mezi které patří i vývoj končetin (1). Do současné doby bylo popsáno 22 členů rodiny FGF (2). V končetině je zdrojem FGF zejména apikální ektodermální hřeben ležící na distálním okraji končetinového pupene. Dochází zde ke tvorbě FGF4, FGF8, FGF9 a FGF17 (3). Po vazbě ligandu na příslušný receptor (FGFR1- 4) se následně spouští signalizační kaskáda dějů v buňce. Dojde-li k narušení této signalizační dráhy, vznikají různé vývojové poruchy (4).

Cíle: Cílem naší práce bylo sledovat efekt působení různých FGF inhibitorů na vývoj končetin a kraniofaciální oblasti. Pro naši práci jsme použily čtyři inhibitory – SU5402, NF449, PD161570 a PD173074. Inhibitory SU5402 a PD161570 antagonizují všechny FGF receptory, PD173074 je inhibitorem FGFR1 i FGFR3, a NF449 inhibuje selektivně FGFR3 (5,6,7). Zaměřily jsme se na porovnání externí morfologie křídel a následně detailněji na změny skeletu. Dále jsme také zjišťovaly, zda dojde vlivem inhibitorů FGF ke zvýšení počtu apoptotických buněk.

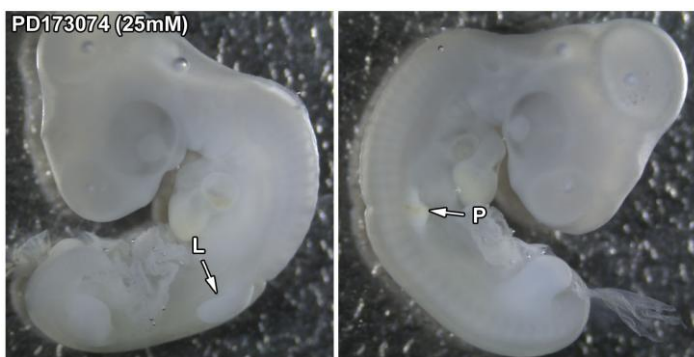
Materiál a metody: Jako modelový organismus jsme zvolily kuřecí embrya ve stadiu HH20-22, která jsou snadno přístupná manipulacím. Embrya mají v tomto období již dobře vyvinuté končetinové pupeny. Inhibitory byly pomocí mikromanipulátoru a mikroinjektačního zařízení aplikovány do pravého základu křídla, zatímco levá končetina sloužila jako kontrolní. Embrya byla po aplikaci inhibitorů inkubována při 37,8 °C. Pro analýzu změn skeletu byla za 10 dní odebrána křídla do 100% etanolu a následně obarvena 3% alcianovou modří a 0,1% alizarinovou červení. Vzorky pro sledování vlivu inhibitorů na apoptózu byly odebrány po 24 hodinové inkubaci do 4% pufovaného formaldehydu, zality do parafínu a ve zhotovených řezech byla detekována apoptóza pomocí ApopTag® *In situ* Apoptosis Detection Kit (ProMega).

Výsledky: Při použití inhibitoru SU5402 (1 mg/ml a 2,5 mg/ml) nebyly ve většině případů pozorovány makroskopické změny, ani nedošlo k narušení vývoje skeletu pravého křídla. Inhibitor NF449 (200 μ M) způsobil zkrácení a deformaci křídla, ale tato embrya většinou přežila pouze do stádia HH25-29. U embryí, která přežila stadium HH30 nebyly pozorovány žádné fenotypové změny. Testovány byly tři různé koncentrace inhibitoru PD173074 (1mM, 25 mM a 50 mM). Po aplikaci 1mM roztoku jsme pozorovaly menší autopodium, kratší a tenčí končetinový pupen nebo deformaci celého křídla (obr. 1).



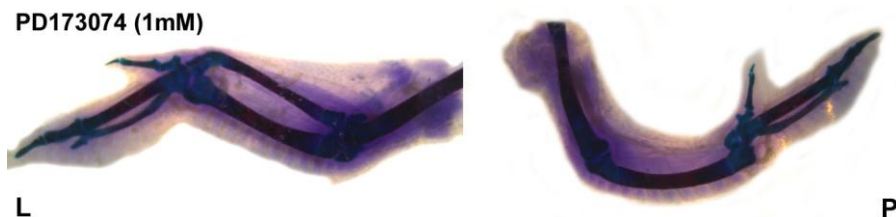
Obr. 1: Změna autopodia po aplikaci 1mM roztoku inhibitoru.

Při použití koncentrace 25 mM a 50 mM došlo k úplné redukci končetiny, případně byl vyvinut jen malý rudiment.



Obr. 2: Redukce končetiny po aplikaci 25 mM roztoku inhibitoru.

V některých případech došlo ke vzniku rozštěpu horního zobáku, potvrzující, že inhibitor nepůsobí jen lokálně, ale ve vyšších koncentracích může být krví translokován i na větší vzdálenosti. Po obarvení skeletu se ukázalo, že docházelo k úplné redukci kosti vřetenní nebo článků prstů a zkrácení metakarpálních kostí (obr. 3).



Obr. 3: Skeletální změny po aplikaci 1 mM roztoku inhibitoru.

Poslední použitý inhibitor PD161570 (1mM) měl podobný efekt jako PD173074 v odpovídající koncentraci. U žádného z použitých inhibitorů jsme nezaznamenaly zvýšení počtu apoptotických buněk při porovnání levého kontrolního a pravého experimentálního křídla.

Závěr: Porovnání fenotypu embryí po aplikaci různých FGF inhibitorů ukázalo rozdílný efekt jednotlivých inhibitorů. Zjistily jsme, že nejvýrazněji dochází k ovlivnění vývoje křídla po aplikaci PD173074 a PD161570, po jejichž použití vznikají ve srovnání s SU5402 a NF449 velké skeletální defekty a současně není zvýšen počet apoptotických buněk u žádného z injektovaných inhibitorů.

Poděkování: *Tento projekt je financován GA ČR (304/09/0725) a IRP IPAG AVOZ 5045015.*

Literatura:

(1) Beenken A. et al. 2009: Nature Rev 8: 235-253, (2) Krejci P. et al. 2009: Hum Mut 30: 1245-1255, (3) Mariani F.V. et al. 2008: Nature 453: 401-405, (4) Itoh N. et al. 2011: J Biochem 149: 121-130, (5) Szabo-Rogers H. L. et al. 2008: Dev Biol 318: 239-302, (6) Mohammadi M. et al. 1998: EMBO J 17: 5896-5904, (7) Krejci P. et al. 2010: J Biol Chem 285: 20644-20653

Poznámky & komentáře

MORFOLOGICKÉ ZMĚNY V TKÁNÍCH PO PŮSOBNÍ REAKTIVÁTORŮ ACETYLCHOLINESTERASY (HI-6, K027) A ANTICHOLINERGIK TAKRINU A 7-MEOTA

Jirásková P.¹, Novotný L.^{1,2}

¹Ústav patologické morfologie a parazitologie FVL VFU Brno, ²Ústav histologie a embryologie LF UK v Hradci Králové

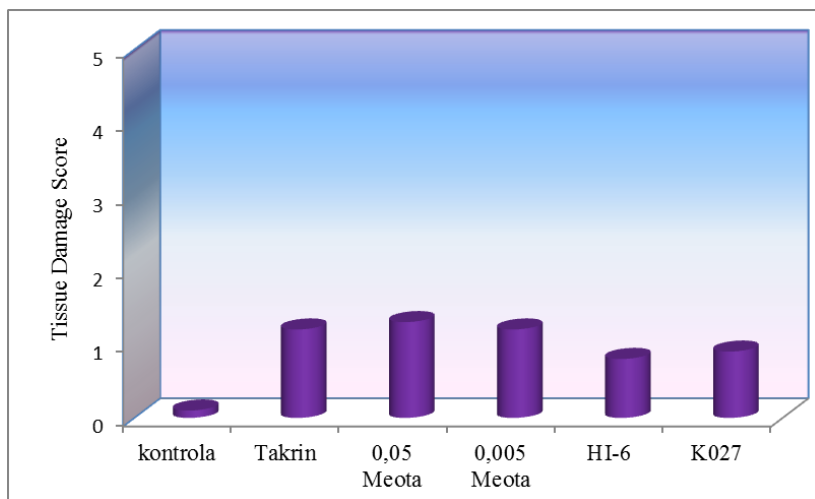
Úvod: Acetylcholinesterasa (AChE) je esenciální enzym při přenosu vzruchů na cholinergních receptorech u všech eukaryotních organismů. Neurotransmiterem na konci nervových zakončení je acetylcholin (Ach), který je enzymem rozkládán na cholin a acetylkoenzym A (1). Takrin a 7-methoxytakrin (7-MEOTA) reverzibilně inhibují AChE, což vede k nahromadění Ach na cholinergních receptorech a následně k nadměrnému dráždění cholinergních receptorů jak v centrálním, tak i v periferním nervovém systému (2). Oxim HI-6 a nově syntetizovaný K027 naopak antagonizují účinek nahromaděného Ach na nervových synapsích (3).

Cíle: Cílem projektu bylo experimentálně zjistit morfologické změny na albinotických potkanech kmene Wistar po podání látek 7-MEOTA, takrin, HI-6 a K027 v subakutním 14 denním testu toxicity. Do první skupiny sledovaných látek jsou zařazeny reaktivátory AChE (HI-6, K027), které se používají jako terapeutika v případě intoxikace nervově paralytickými látkami (NPL) nebo pesticidy na bázi organofosfátů. V další skupině jsou takrin a 7-MEOTA, což jsou anticholinergicky působící látky, určené k terapii při intoxikaci bojovou chemickou látkou 3-quinuclidinyl benzilate QB (BZ), (4). Výsledky získané tímto experimentem přispěly k rozšíření znalostí o účincích výše uvedených látek při jejich dlouhodobém podávání.

Materiál a metody: Albinotičtí potkani samčího pohlaví kmene Wistar o hmotnosti 320-370 g byli rozděleni do 5 skupin po 7 jedincích pro každou testovanou látku, přičemž 7-MEOTA byl podáván ve 2 rozdílných dávkách, a tudíž byl testován na 2 skupinách potkanů, každá po 7 jedincích. Šestá skupina čítající 6 jedinců byla kontrolní. Takrin byl testován v dávce 5,15 mg.kg⁻¹ v per orálním testu toxicity. 7-MEOTA byl testován ve dvou koncentracích a to v 37,65 mg.kg⁻¹ a 5,01 mg.kg⁻¹. Reaktivátory HI-6 a K027 byly aplikovány intramuskulárně a to v dávce 39,00 mg.kg⁻¹ a 22,30

mg.kg⁻¹. Na závěr pokusu byli potkani utraceni v atmosféře CO₂. Při pitvě byly odebírány vzorky z jater, ledvin, srdce a mozku. U perorálně aplikovaných látek navíc i vzorky z tenkého a tlustého střeva. Získané vzorky byly zpracovány klasickou parafinovou technikou a barveny hematoxylin eosinem. Stupeň poškození tkání v histopatologických vzorcích byl vyjádřen pomocí stupnice 0 až 5 (TDS- *tissue damage score*), kde 0 = normální morfologie a 5 = závažné ireversibilní poškození tkání (nekrosa).

Výsledky: Největší rozsah morfologických změn v tkáních laboratorních potkanů jsme dle TDS zaznamenali po podání 7-MEOTA v dávce 37,65 mg.kg⁻¹. U ostatních testovaných látek byly změny méně výrazné, ale stále charakteru dystrofií.



Diskuse: Dystrofické změny zjištěné v parenchymatózních orgánech laboratorních potkanů nebyly specifické pro intoxikaci ať inhibitory, či reaktivátry AChE a mohly souviset s ovlivněním metabolismu v daných orgánech, nicméně jejich frekvence výskytu byla vyšší než u kontrolní skupiny. Otázkou zůstává relevantnost aproximace získaných výsledků u laboratorních potkanů na člověka s vědomím, že metabolismus jak inhibitorů, tak reaktivátorů se může významně mezidruhově lišit (5).

Závěr: Po subchronickém působení reaktivátorů HI-6, K027 a anticholinergicky působících látek takrin a 7-MEOTA v testovaných koncentracích byly histopatologickým vyšetřením zjištěny ve tkáních laboratorních potkanů jen mírné morfologické změny typu dystrofií.

Literatura:

(1) Ekström F. et al. 2009: PLoS ONE 4 (6): e5957, (2) Soukup O. et al. 2011: *Physiol Res* 60: 679-686, (3) Kuca K. et al. 2010: *J Enzym Inhib Med Chem* 25 (4): 509-512, (4) Gupta R. et al. 2009: *Handbook of toxicology of chemical warfare agents*: 135-142, (5) Helden H. van et al. 1996: *Arch Toxicol* 70: 779-786

Poznámky & komentáře

ÚLOHA HYPOXIE V REGULACI EXPRESE ABC-TRANSPORTÉRŮ ASOCIOVANÝCH S MDR U (EMBRYONÁLNÍCH) KMENOVÝCH BUNĚK

Lánová M., Kučera J., Kotasová H., Procházková J., Pacherník J.

*Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav experimentální biologie,
PřF MU Brno*

Úvod: Expres ABC transportérů (ATP-binding cassette) asociovaných s multilékovou rezistencí (MDR – multidrug resistance) je charakteristická pro kmenové a nádorové buňky různého typu. Aktivita těchto proteinů je významná z hlediska ochrany buněk, ale současně jsou tyto proteiny odpovědné za nedostatečnou účinnost léčiv. Za MDR klíčovým způsobem odpovídají tři typy ABC transportérů: ABC B1a/b (MDR1, Pgp), ABC C1 (MRP1) a ABC G2 (BCRP) (1).

Současné poznatky ukazují, že na zachování kmenovosti se významně podílí distribuce kyslíku a živin. Niche adultních kmenových buněk *in vivo* bývá hypoxické. Experimenty s kultivací různých typů kmenových buněk *in vitro* také potvrzují pozitivní úlohu hypoxie pro zachování kmenovosti (2). Zajímalo nás, zda se hypoxie podílí také na regulaci exprese a funkce MDR transportérů u kmenových buněk. Jako modelové buňky pro *in vitro* experimenty jsme použili embryonální kmenové (ES – embryonic stem) buňky, které se v základních znacích kmenovosti shodují s adultními kmenovými buňkami, silně exprimují MDR transportéry a představují vysoce homogenní populaci buněk v *in vitro* kultuře.

Hypoxie u buněk indukuje stabilizaci hypoxií indukovaného faktoru (HIF), který reguluje celou řadu genů odpovědných za adaptaci na hypoxii, ale i její eliminaci. Hypoxie také indukuje produkci reaktivních kyslíkových metabolitů (ROS – reactive oxygen species) a intracelulární oxidační stres. Nedávno byla na modelu ES buněk prokázána úloha ABC G2 ve stabilizaci jejich intracelulární redoxní rovnováhy a zachování kmenovosti (3).

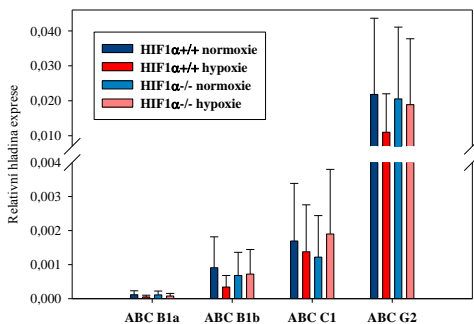
Cíle: V naší práci jsme studovali změny v expresi MDR transportérů u ES buněk v důsledku hypoxie. Dále pak na úlohu HIF1 α a kinázy p38 α (kináza citlivá na ROS a zároveň jeden z klíčových regulátorů buněčné odpovědi na oxidační stres) v regulaci této exprese.

Materiál a metody: Použité buněčné linie, jejich kultivace a analýza exprese MDR transportérů pomocí qRT-PCR byly popsány již dříve (4,5,6). Hypoxii (1 % O₂) byly buňky vystaveny po 24 h v inkubátoru s regulovanou atmosférou CO₂ a N₂.

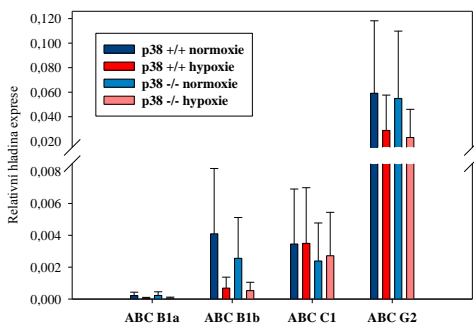
Výsledek: Analýza exprese mRNA MDR transportérů (ABC B1a, ABC B1b, ABC C1, ABC G2) u různých linií mES buněk ukázala nejvyšší expresi mRNA pro ABC G2, nejnižší pak pro ABC B1a a ABC B1b.

Vystavení buněk hypoxii (1% O₂) po dobu 24h vedlo k mírnému snížení exprese příslušných mRNA s výjimkou mRNA pro ABC C1. Toto snížení bylo překvapivě závislé na přítomnosti HIF1α u buněk s deplecí HIF1α (HIF1α^{-/-}) jsme toto snížení nezaznamenali (obr. 1).

Obr.1.



Obr.2.



Jako kontrola hypoxie byly použity cílové geny HIF (PGK1, VEGF), jejichž exprese se dle očekávání v hypoxickém prostředí zvyšovala (data nejsou ukázána). Experimenty s linií neexprimující p38α (p38^{-/-}) a k ní původní linii W17 (p38^{+/+}) opět ukázaly snížení exprese mRNA pro MDR

transportéry v důsledku hypoxie s výjimkou ABC C1. Navíc je exprese MDR transportérů ABC B1b a ABC C1 u buněk p38^{-/-} mírně snížena i v normoxických podmínkách. (obr. 2).

Diskuse: V našich experimentech jsme potvrdili expresi MDR transportérů u mES buněk. Největší expresi vykazoval transportér ABC G2, u něhož byl již dříve prokázán význam pro ochranu kmenových buněk před oxidativním stresem (3). Vystavení mES buněk hypoxii po dobu 24 h vedlo ke snížení exprese studovaných transportérů s výjimkou ABC C1. Pokles lze vysvětlit indukcí diferenciací studovaných buněk v důsledku námi použité nízké koncentrace O₂. Tento fakt byl potvrzen i analýzou exprese mRNA genů spojených s pluripotencí (Oct4, Nanog, Zfp42, ALP) a časnou diferenciací (FGF5) ES buněk (není ukázáno). Zajímavé je zjištění, že snížení exprese ABC B1b je závislé na přítomnosti HIF1 α , protože u linie HIF1 α ^{-/-} jako jediné z testovaných nedošlo v důsledku vystavení buněk hypoxii ke snížení exprese mRNA tohoto transportéru.

Závěr: Význam kinázy p38 α v regulaci exprese MDR transportérů v důsledku hypoxie jsme neprokázali. Buňky p38^{-/-} však vykazují mírně nižší hladinu exprese ABC B1b a ABC C1, což zřejmě souvisí s jejich diferencovanějším fenotypem, jak ukazují naše dosud nepublikované studie. V dalších experimentech se zaměříme na funkční analýzu aktivity jednotlivých MDR transportérů pomocí jejich specifických substrátů a inhibitorů, a také na detekci hladin těchto transportních proteinů pomocí protilátek. Naše předběžné výsledky funkční analýzy studovaných MDR transportérů totiž naznačují, že exprese příslušných mRNA nekoreluje s jejich reálnou aktivitou u buněk.

Poděkování: *Studie je financována v rámci Programu rektora (MUNI/C/0836/2011).*

Literatura:

(1) Stavrovskaya A.A., Stromskaya, T. P. 2008: Biochemistry (Mosc), 73: 592-604, (2) Simon, M.C., Keith B: 2008: Nat Rev Mol Cell Biol. 9: 285-296, (3) Susanto J. et al. 2008: PLoS One 3: e4023, (4) Prochazkova J. et al. 2011: Free Radic Res. 45:779-87, (5) Carmeliet P. et al. 1998: Nature 394(6692): 485-90, (6) Kim J.M. et al. 2005: J Immunol 174: 1239-1244

Poznámky & komentáře

STUDIE TERAPEUTICKÉ EKVIVALENCE GENERICKÝCH LÉČIVÝCH PŘÍPRAVKŮ

Adamová E., Zavadilová R.

Ústav farmakologie a farmacie, FVL VFU Brno

Koncept: Generické přípravky obsahují stejné účinné látky ve stejné koncentraci a lékové formě jako přípravky originální. Uvedení generika na trh je možné až po vypršení patentové ochrany originálních přípravků. Generické přípravky nemusí procházet kompletními klinickými zkouškami, ale musí splňovat stejné nároky na bezpečnost a efektivitu, jako přípravky originální. Průkaz účinnosti generika v porovnání s originálními (referenčními) přípravky lze prokázat bioekvivalenčními studií. Bioekvivalenčními studiemi prokazujeme, že generický přípravek uvolňuje aktivní složku do krevního oběhu ve stejném množství a stejnou rychlostí. V případě kožních/ušních kapek prokazujeme terapeutickou účinnost, která se provádí v podmínkách *in vivo* na základě cytologického, mikrobiologického a parazitologického vyšetření. Součástí mikrobiologického vyšetření je průkaz daných patogenů, jejich citlivost na účinnou látku a sledování rezistence. Jako podpůrná data lze využít výsledky testování *in vitro*. Na základě dat získaných z klinického hodnocení je možné podat žádost o registraci generického přípravku.

Poznámky & komentáře

PRASE JAKO EXPERIMENTÁLNÍ MODEL PRO KLINICKÝ KRANIO-MAXILO-FACIÁLNÍ VÝZKUM

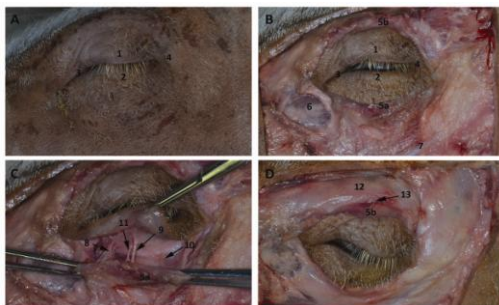
Štembírek J.^{1,2}, Kyllar M.³, Putnová I.³, Stehlík L.⁴, Daněk Z.⁵,
Buchtová M.^{2,3}

¹Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, FN Ostrava, ²Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno, ³Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU, Brno, ⁴Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, ⁵Klinika ústní, čelistní a obličejové chirurgie, FN Brno

Úvod: Prasete se využívá jako zvířecí model pro experimenty vzhledem k jeho relativní anatomické a fyziologické podobnosti s člověkem (1). Využívá se jako modelový organismus pro výzkum rakoviny a jiných onemocnění u člověka, pro farmaceutické studie a testování toxicity léků, v tkáňovém inženýrství nebo ve vývoji nových operačních technik a chirurgických materiálů (2,3,4). I přes relativní podobnost některých anatomických struktur prasete s člověkem je v současnosti k dispozici málo informací o oro-faciálním regionu (např. očníce, maxilární sinus, slinné žlázy, čelistní kloub atd.). Diagnostické zobrazování této oblasti pomocí výpočetní tomografie (CT) a nukleární magnetické rezonance (MRI) se v humánní medicíně rutinně využívá. Ve veterinární medicíně se však tyto metody využívají u prasat pouze okrajově.

Cíle: Analýza prasečí očníce s využitím moderních zobrazovacích metod.

Materiál a metody: Provedli jsme anatomickou pitvu a dále vyšetření pomocí CT a MRI. Výsledky jsme porovnali s CT, MRI a chirurgickými přístupy k očníci u lidí s důrazem na významné anatomické struktury. Celkem jsme analyzovali 10 prasečích hlav. Prasata pocházela jednak z chovu v Liběchově (linie LiM) a dále pak z jatek (Steinhauser, Tišnov). Jejich věk kolísal v rozmezí 6-24 měsíců. Hlavy šestiměsíčních prasat byly vyšetřeny výpočetní tomografií (Synergy, GE Healthcare, USA), hlavy 24 měsíců starých prasat byly vyšetřeny magnetickou rezonancí (Magnetom Trio 3T, Siemens, Německo) v T2 modu na Klinice zobrazovacích metod (IKEM, Praha) podle standardního protokolu pro orofaciální oblast. Následně byla provedena pitva očníce (obr. 1).

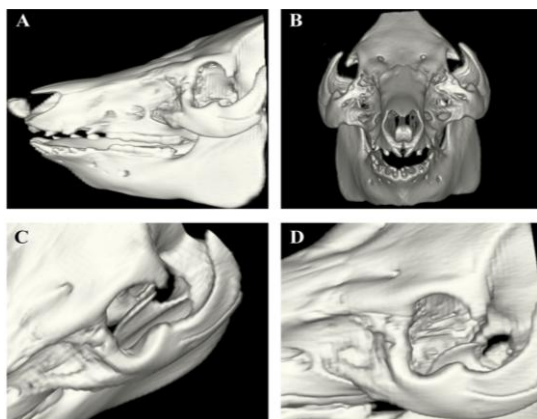


Obr. 1: Pitva prasečí orbity.

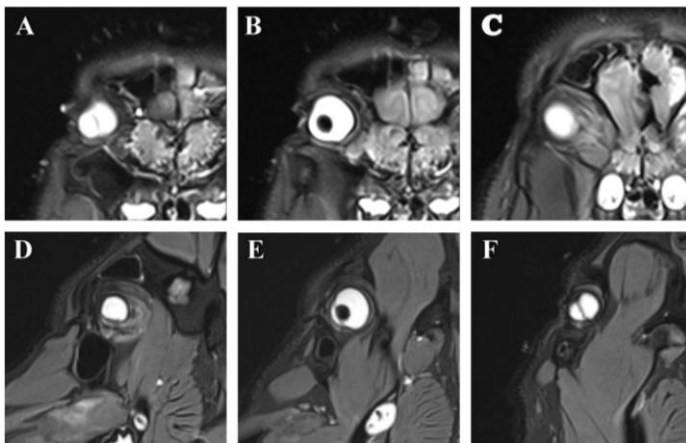
Výsledky: Prasečí orbita představuje prostor ohraničený čtyřmi stěnami, z nichž tři jsou kostěné (obr. 2). Mediální stěna je zhruba obdélníkového tvaru. Je tvořena slznou kostí, jařmovou kostí a očnicovou částí horní čelisti. Strop je složen z kosti čelní a křídla kosti klínové. Dno orbity je velmi krátké, omezené pouze na 1 cm za infraorbitalní okraj, prudce se svažující do *fossa pterygopalatina*. Kaudolaterální stěna se skládá z měkkých tkání tvořených očnicovým vazem, který probíhá mezi jařmovým výběžkem čelní kosti a čelním výběžkem jařmové kosti. Základem víček jsou okrouhlé svaly. Tyto svaly jsou připojeny pomocí krátkých vazů na úrovni obou očních koutků. Senzitivní inervace je odvozena zejména od čelního nervu (zadní část dráhy) a jařmo-obličejového nervu (ventrální část dráhy), což jsou větve trojklaného nervu. Cévní zásobení je zajištěno maxilární tepnou a jejími větvemi.

Diskuse: Ačkoliv velikostí očnice, strukturou víček či uložením svalů je prasečí očnice relativně podobná lidské, tvar prasečí orbity je odlišný. Navíc v kaudolaterální části je prasečí orbita ohraničena pouze vazivovým pruhem. Výstupy nervů v okolí očnice se nacházejí ve výrazně jiné pozici než u člověka.

Závěr: Prasečí očnice se obecně jeví jako vhodná pro experimentální medicínu (např. rozvoj chirurgických technik či vývoj nových chirurgických materiálů), nicméně při plánování experimentů je nezbytné vzít v úvahu zmíněné anatomické odlišnosti.



Obr. 2: Zobrazení prasečí orbity z různých úhlů pohledu pomocí 3D reformátu, které byly získány z CT skenů.



Obr. 3: MR skeny v různých částech prasečí oční v koronárních (A, B, C) a sagitálních řezech (D, E, F).

Literatura:

(1) Bustad L.K., McClellan R.O. 1966: Science 152: 1526-1530, (2) Blagbrough I.S., Zara C. 2009: Pharm Res 26: 1-18, (3) Zheng Y. et al. 2009: J Dent Res 88: 249-254, (4) Papadaki M.E. et al. 2010: J Oral Maxillofac Surg 68: 2783-2791

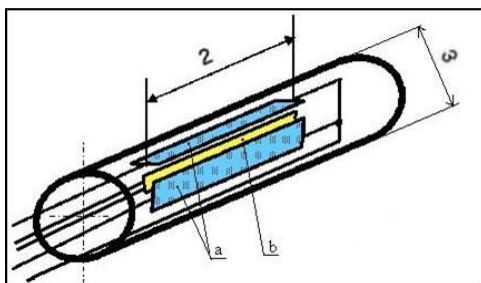
Poznámky & komentáře

DLOUHÉ KOSTI PRASETE - MODEL PRO TESTACI TENSOMETRU

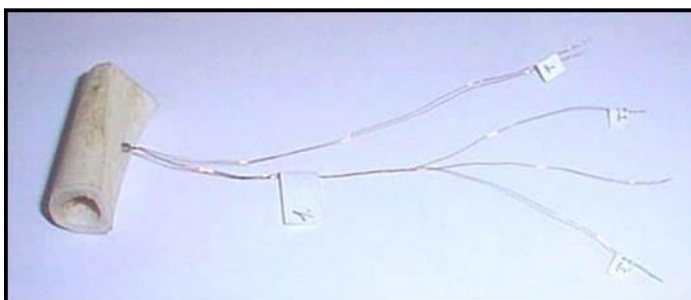
Pyszko M., Páral V.

Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno

Úvod: Obecně je známo, že při různé mechanické zátěži kostí dochází ke změně napětí v kostní tkáni. Přesné zjištění tohoto napětí a jeho případné ovlivnění by mohlo přispět ke zlepšení chirurgického řešení fraktur a dalších traumat kostí člověka i zvířat. Z tohoto důvodu bylo specializované pracoviště strojní fakulty ČVUT v Praze požádáno o návržení, zhotovení a otestování snímače (obr. 1, 2), který by toto napětí v kostech mohl aktuálně stanovovat (1).



Obr. 1: Schématické znázornění tensometrového snímače.



Obr. 2: Způsob zavedení snímače do kosti.

Cíle: Cílem naší práce bylo zjistit a popsat makroskopickou stavbu i mikroskopickou strukturu vybraných kostí prasete, které by mohly být vhodným modelem pro testaci tensometrového snímače.

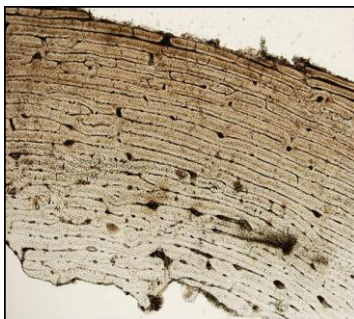
Materiál a metody: Studovaný materiál – skelety hrudních a pánevních končetin z 12 jedinců prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*), pocházel ze zvířat 6-7 měsíců starých s živou hmotností kolem 110 kg. Ze skeletů byly pro další studie odebrány pouze kosti stylopodíí (*humerus* a *femur*) a větší kosti zeugopodií (*radius* a *tibia*). Použili jsme metody makroskopické, a to morfometrii a měření tloušťky kompakty (2) a metody mikroskopické s pomocí světelné mikroskopie kostních výbrusů (3).

Výsledky: Pro instalaci testovaného snímače byl stanoven požadavek minimální tloušťky kompakty 2,3 mm. Tuto podmínku splňovala diafýza kosti vřetenní ve své střední části a tibia v části střední i distální. Tyto úseky obou kostí jsou i dobře chirurgicky přístupné v případě instalace testovaných snímačů do kostí živých experimentálních zvířat. Při použití izolovaných kostí, vypreparovaných z kadáverů, jsou k danému účelu vhodné i obě kosti stylopodíí, ve střední části svých diafýz.

Diskuse: Je třeba vzít v úvahu fakt, že vrstva kompakty, i když je dostatečně robustní a tak makroskopicky vhodná pro umístění testovaného zařízení, není u mladých prasat ve věku 6 – 7 měsíců tvořena zcela „dospělou“ sekundární přestavěnou kostní tkání. Klasická učebnicová stavba kostní tkáně tedy vrstva zevních plášt'ových lamel, homogenní vrstva longitudinálních Haversových systémů a vrstva vnitřních plášt'ových lamel, nebyla u studovaných kostí vyvinuta v žádné části. Kompakta byla většinou rozdělena na dvě vrstvy a to na tzv. periostální vrstvu s osteony orientovanými cirkulárně, plexiformně či šikmo a vnitřní endostální vrstvu s osteony longitudinálními (obr. 3).

Závěr: Závěrem lze říci, že požadované tloušťky dosahuje jen stěna diafýzy humeru ve střední a distální části (úroveň B a C), diafýza femuru ve střední části (úroveň B) a v proximální části jen v kraniiálním úseku. V případě radiu je vhodný pouze mediální úsek jeho proximální části (úroveň A) a úseky laterální a kaudální ve střední části diafýzy (úroveň B). Při využití tibie je dostatečně robustní celá střední část její diafýzy (úroveň B) a v distální části (úroveň C) jsou vhodné jen úseky laterální a mediální.

Mikroskopickou studií bylo zjištěno, že kompakta diafýz všech kostí zvířat ve věku 6-7 měsíců vykazuje známky mladé, rostoucí a vyvíjející se kosti.



Obr. 3: Kostní výbrus, zvětšení 40x.

Literatura:

(1) Driesch A. 1976: Measurement of animal bones, 137 stran, (2) Maat G. J. R. et al. 2001: Internat J Osteoarcheol 11: 366-374, (3) Volf J. et al. 2002: 6th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics XX: 273-275

Poznámky & komentáře

FEMUR PSA - KLINICKY VÝZNAMNÉ MORFOLOGICKÉ ASPEKTY

Cihlářová L., Pyszko M., Páral V.

Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno

Úvod: Je obecně známo, že jedny z nejčastějších problémů týkajících se psiho skeletu, jsou nemoci a poruchy vývoje kyčelního kloubu, který se skládá z acetabula a hlavice kosti stehenní. O významu acetabula na rozvoji dysplazie či osteoartrózy tohoto kloubu existuje mnoho studií a odborných prací (1, 5), ale o vlivu hlavice kosti stehenní na rozvoji těchto patologií se ví velmi málo.

Cíle: Cílem naší práce proto bylo posoudit klinickou významnost některých vybraných struktur na proximálním konci femuru psa. Pozornost byla zaměřena zejména na tzv. „kaudolaterální kurvilineární osteofyt“ (CCO - Caudolateral Curvilinear Osteophyte, obr. 1), který je v poslední době často diskutovanou strukturou a o jehož významu při vzniku degenerativních kloubních onemocnění (DJD) je zatím polemizováno (2, 3, 4). Studovali jsme i vzájemný vztah mezi výskytem CCO a vybranými morfometrickými charakteristikami (délky a úhly, obr. 2), četnost výskytu této struktury u různých plemen psů, věkových kategorií a pohlaví. Také jsme porovnávali nálezy CCO na RTG snímcích a na zkoumaných kostech, abychom ověřili spolehlivost rentgenodiagnostiky.



Obr. 1: CCO na femuru.

Materiál a metody: Do studie bylo zahrnuto celkem 63 psů z 27 různých plemen tak, aby byla zajištěna statisticky významná variabilita výsledků. Rovněž zastoupení obou pohlaví a věkových skupin bylo různorodé, abychom se vyhnuli případným chybám způsobeným nedostatečně pestrým souborem studovaných jedinců. K dosažení vytyčených cílů byly použity metody makroskopické (měření délek, hodnocení přítomnosti CCO a hodnocení artrotických změn), morfometrické (měření úhlů) a hodnocení RTG snímků.

Výsledky: Odpověď na otázku „zda se jedná o strukturu fyziologickou či patologickou“ se nám bohužel nepovedlo, neboť i v této práci bylo prokázáno, že se CCO nachází jak v kloubech patologicky změněných, tak i naprosto zdravých. Zjistili jsme také, že velikost studovaných úhlů alfa, beta a gama, tedy vzájemné vztahy mezi dlouhou osou femuru, funkční osou femuru a dlouhou osou krčku studované kosti, nejsou v žádném vztahu k výskytu CCO. Při ověřování spolehlivosti rentgenodiagnostiky pro průkaz přítomnosti CCO bylo zjištěno, že jen 29 % případů CCO bylo rentgenologicky prokazatelných. Nejspolehlivější prokazatelnost tohoto osteofytu přitom byla na kostech s vysokým stupněm artrotických změn.



Obr. 2: Morfometrie femuru.

Závěr: 1) Vztah mezi CCO a DJD není jednoznačný. U kloubů s artrotickými změnami bylo CCO vždy, u kloubů zdravých jen v 59 % případů. 2) Souvislost mezi CCO a měřenými délkami a úhly se neprokázala. 3) CCO nalezen u 26 plemen z 27 studovaných. 4) Výskyt CCO je napříč věkovými kategoriemi i pohlavní příslušností. 5) Prokazatelnost CCO na RTG snímcích je jen 29 %.

Literatura:

(1) Alexander J.W. 1992: Vet Clin North Am Small Anim Pract 503-511, (2) Kishimoto M. et al. 2010: J Vet Sci, 11: 89-91, (3) Mayhew P.D. et al. 2002: J Am Vet Med Assoc 220: 472-476, (4) Powers M.Y. et al. 2004: J Am Vet Med Assoc 225: 233-237, (5) Smith H.K. et al. 2001: J Am Vet Med Assoc 219: 1749-1755

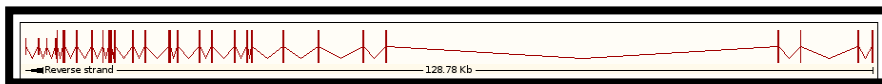
Poznámky & komentáře

DETEKCE MUTACÍ FIBRILLINU 1 U PSŮ S AORTÁLNÍ RUPTUROU A PODEZŘENÍM NA MARFANŮV SYNDROM

Boženková E.¹, Fictum P.², Buchtová M.^{1,3}

¹Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno, ²Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno, ³Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno

Úvod: Marfanův syndrom (MFS) je autozomálně dominantně dědičná choroba z heterogenní skupiny vrozených onemocnění pojivové tkáně. Příčinnou jsou mutace genu pro fibrillin 1 (FBN-1) lokalizovaného u člověka na chromozomu 15 (1), popř. mutace genů TGFβR 1 a TGFβR 2 na chromozomu 9 (2). Frekvence výskytu tohoto syndromu je cca 1/10 -20 tisíc porodů. U 45 % pacientů je pozitivní rodinná anamnéza, u 25-30 % z nich vznikají nové nezděděné mutace. Lidé trpící MFS mají poruchy zejména kosterního, svalového a kardiovaskulárního systému. Z hlavních symptomů můžeme jmenovat deformace kostí, dislokaci oční čočky, poruchy srdečních chlopní, aneurysma a rupturu aorty. V literatuře bylo zaznamenáno pouze několik ojedinělých kazuistik, které popisují obdobný nález u psů. Etiologie této nemoci u psů však nebyla dosud zjištěna. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli pokračovat v analýze vzorků s cílem prokázat či vyvrátit možnou souvislost postižení u psů s výskytem mutací FBN-1, jakožto prokazatelného etiologického faktoru tohoto onemocnění u člověka. Fibrillin 1 je u psů lokalizován na chromozomu 30 a obsahuje celkem 30 exonů (obr. 1).

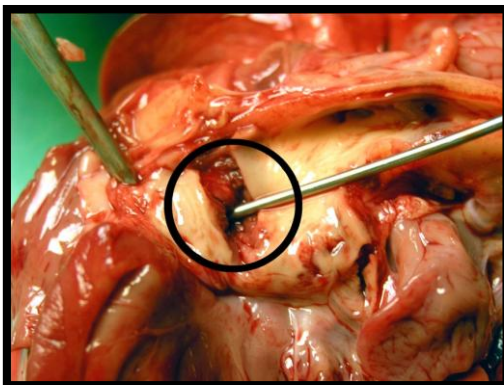


Obr. 1: Gen *FBN-1* u psů (www.ensembl.org).

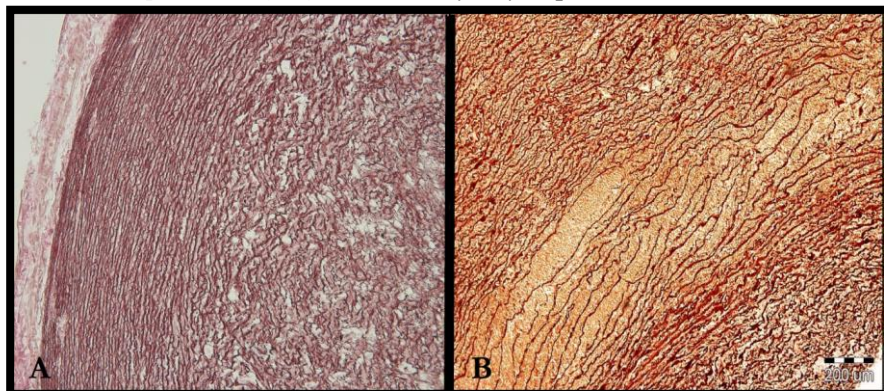
Cíle: Cílem projektu je pomocí metody scanningu analyzovat přítomnost mutací či polymorfismů v genu FBN-1 porovnáním nálezů od postižených psů se zdravými kontrolami.

Materiál a metody: Na Ústavu patologické morfologie a parazitologie VFU Brno byla provedena pitva dvou štěňat uhynulých ve stáří šesti týdnů. Pro první analýzu byly odebrány tkáně ze 14 zdravých kontrol a 2 uhynulých probandů s podezřením na MFS. Vzorky aorty byly fixovány, zality do parafínu a barveny hematoxylinem-eosinem a orceinem pro analýzu uspořádání elastických vláken. Dále byly odebrány a zmrazeny vzorky svaloviny pro izolaci DNA a následnou PCR.

Výsledky: Při patomorfologické i histopatologické analýze byly zjištěny symptomy vykazující značnou podobnost s MFS známým u lidí, jehož výskyt byl prokázán i u skotu (obr. 2).

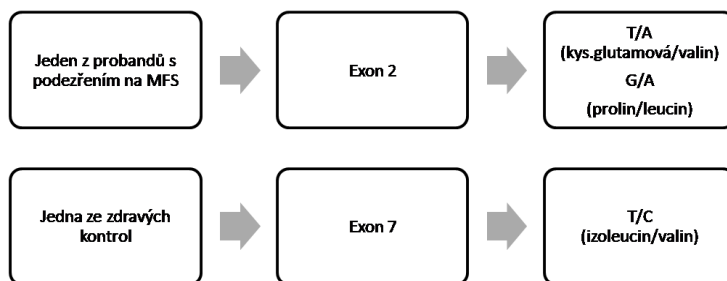


Obr. 2: Ruptura aorty u jednoho z uhynulých psů.



Obr. 3: Barvení orceinem. A - aorta zdravého psa, B - strukturální abnormality ve struktuře elastických vláken ve stěně aorty nemocného psa.

Diskuse: Do současné chvíle byla provedena analýza prvních 15 exonů. V oblasti exonu 2 byly zjištěny u jednoho z postižených psů dvě sekvenční změny, a to T/A a G/A. Analýza sekvenčních křivek ukázala možnost výskytu heterozygocie. Další sekvenční změna T/C byla zjištěna u jedné ze zdravých kontrol v oblasti exonu 7. Sekvenční křivka v této oblasti ukázala rovněž na možný výskyt heterozygocie a tedy i možnou přirozenou variabilitu v psí populaci. Ve všech třech případech se jedná o změny, při nichž dochází k zařazení jiné aminokyseliny do polypeptidického řetězce. Tyto nálezy je nezbytné potvrdit sekvencí s využitím druhostranných primerů.



Závěr: V současné době probíhá analýza následujících exonů 16-30 a navýšení počtu kontrol pro zjištění případné variability v populaci psů. Rovněž se snažíme získat vzorky tkáně či krve od arabských chrtů sloughi, aby mezi zdravé kontroly byly zařazeny vzorky stejné rasy, jaké byli probandi s podezřením na MFS.

Poděkování: *MVDr. Michalu Kyllarovi, Ph.D. za poskytnutí materiálu a JCMM za finanční podporu tohoto výzkumu.*

Literatura:

(1) Magenis R.E. et al. 1991: Genomics 11: 346-51, (2) Sarfarazi M. et al. 1992: J Med Genet 29: 75-80

Poznámky & komentáře



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí 2012 na FVL VFU Brno

SEKCE III

NEBEZPEČÍ BABESIÓZY V ČESKÉ REPUBLICE

Konvalinová J.¹, Svobodová V.², Svoboda M.¹

¹Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, ²Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno

Úvod: Babesióza psů je protozoární onemocnění způsobené intraerytrocytárními parazity rodu *Babesia*. Jedná se o celosvětově rozšířené onemocnění postihující různé druhy domácích i volně žijících zvířat i člověka. Nejdůležitějším původcem babesieózy v Evropě je *B. canis*. Vektorem je klíště *Dermacentor reticulatus* (1,2). Výskyt tohoto klíštěte je v České republice omezen pouze na oblast v povodí řek Moravy a Dyje na Břeclavsku a Hodonínsku (3). Aktivita dospělců má 2 vrcholy. První je na jaře od konce února do dubna. Druhý pak na podzim v září. V České republice zatím nebyl zaznamenán autochtonní výskyt psí babesieózy (4). První importovaná infekce byla popsána v roce 1992 (5). Dynamika šíření psí babesieózy v Evropě zaznamenala v posledních letech výrazných změn. Toto onemocnění se šíří na území Německa, Rakouska, Švýcarska, Maďarska a Polska. (6,7,8,9). Babesióza představuje závažné onemocnění psů. Klinické příznaky mohou být velmi rozmanité a průběh onemocnění od mírného až po perakutní s úhynem do 2 dnů. V návaznosti na infekci se objevuje protilátková odpověď. Není však většinou dostatečně silná k tomu, aby došlo k úplné likvidaci babesii v organismu a tak se zvířata stávají chronickými nosiči infekce (10). Protilátky se obvykle objevují za 8 - 10 dní po infekci. Hladina protilátek se snižuje asi za 3 - 5 měsíců po infekci. Psi jsou průměrně chráněni asi 5 - 8 měsíců po prodělané infekci proti reinfekci stejným druhem babesii.

Cíle: Cílem naší práce bylo vyšetřit skupinu psů z lokality, kde lze předpokládat první možnost objevení se infekce *B. canis*.

Materiál a metody: Od března do listopadu 2010 bylo vyšetřeno celkem 68 vzorků krve od 41 psů 11 plemen. V souboru bylo 22 psů a 19 fen ve věku od 1 do 12 let. Všichni psi pocházeli z okresu Břeclav a byli klinicky zdraví. Některým psům byla krev odebírána opakovaně. Vzorky plné krve byly vyšetřeny metodou PCR. DNA byla ze vzorků extrahována komerčním kitem QIAGEN NucleoSpin Blood (Machery-Nagel,

Germany). Vzorky DNA byly vyšetřeny pomocí primerů: forward TB-F (5'-CTTCAGCACCTTGAGAGAAAT-3') reverse TB-R (5'-TCDATCCCCRCWACGATGCRBAC-3'). Amplifikace: 5 min při 94 °C, 39 cyklů, každý 94 °C po dobu 45 s, 62 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 45 s, se závěrečnou extensí periodou 10 min při 72 °C. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná od pacienta s prokázanou importovanou infekcí *B. canis*, pacienta naší kliniky. K detekci specifických IgG protilátek proti *Babesia canis* metodou nepřímé imunofluorescence byl použit komerční set *Babesia canis* IFA IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories Fullerton, California, USA).

Výsledky: Bylo vyšetřeno 68 vzorků krve psů metodou PCR. Ani v jednom z vyšetřovaných vzorků nebyla zachycena DNA *B. canis*. Specifické protilátky byly detekovány u 5 psů (12,2 %). Sérologické vyšetření provedené metodou nepřímé imunofluorescence prokázalo 6 pozitivních vzorků séra. Titr se pohyboval v rozmezí od 50 do 200. Jeden pes byl pozitivní ve dvou odběrech v rozmezí 3 měsíců. Nejvíce pozitivních výsledků bylo zjištěno v odběrech v měsíci červnu. Výsledky jsou zpracovány v tabulce 1.

Tabulka 1: Titry specifických protilátek proti Babesia canis u pozitivních psů (n=5).

Plemeno	Pohlaví	Stáří (roky)	Titry specifických protilátek		
			Březen	Duben	Červen
Jezevčík	pes	3	50	NT	50
Jagtier	fena	11	Negativní	100	NT
Německý ovčák	pes	5	Negativní	Negativní	50
Jezevčík	pes	8	Negativní	NT	50
Sibiřský husky	pes	8	NT	NT	200

NT- netestováno

Diskuse: Na naší klinice se setkáváme s klinickými případy babesiózy stále častěji. Zatím se vždy jednalo o importovanou infekci, nejčastěji ze Slovenska. Autochtonní infekce nebyla zatím v České republice zaznamenána. V naší práci jsme vyšetřili skupinu psů, která pochází z lokality výskytu *D. reticulatus*. Zároveň se jednalo o skupinu psů, kteří se často pohybují ve volné přírodě a mají tak větší pravděpodobnost styku

s klišťaty. Žádný z vyšetřovaných psů během svého života neopustil území České republiky. V krvi sledovaných psů se nám nepodařilo prokázat pomocí PCR vyšetření přítomnost babesii. Tento výsledek svědčí o tom, že zde parazit nebyl přítomen nebo byla jeho DNA v tak malém množství, že se námi použitou metodou tuto DNA nepodařilo prokázat. Sérologické vyšetření prokázalo u pěti vyšetřených psů přítomnost protilátek proti *B. canis*. U jednoho z těchto psů byl pozitivní titr zjištěn opakovaně po 3 měsících (březen a červen, v obou případech titr 50). V měsíci dubnu byl jeden pozitivní záchyt s titrem 100. Nejvíce pozitivních záchytů (4) bylo v měsíci červnu. V tomto měsíci byl také prokázán nejvyšší zjištěný titr (200). Aktivita *D. reticulatus* na jaře připadá na měsíc březen, druhý vzestup je koncem léta. Protilátky se začínají tvořit za 1 - 2 týdny po kontaktu s infekčním agens. Námi zjištěné výsledky svědčí o pravděpodobném kontaktu vyšetřovaných psů s parazitem. Pokud by byla infekční dávka nízká, mohlo dojít pouze k protilátkové odpovědi, ale ne k propuknutí onemocnění. V tomto případě by i DNA parazita mohla být ve vyšetřených vzorcích pod hladinou detekce nebo byl parazit eliminován.

Závěr: Česká republika má v současné době ohledně výskytu babesiózy ve srovnání s ostatními sousedními státy výjimečné postavení. V okolních státech dochází k rozšiřování areálu vektora a zároveň s tím i k šíření babesiózy. Na našem území nebyl ještě autochtonní klinický případ babesiózy potvrzen. V roce 2011 jsme v naší práci detekovali specifické protilátky u 5 (12,2 %) vyšetřených psů. I když jsme přímým průkazem PCR babesie nezachytili, výsledky naší práce naznačují, že se nedá vyloučit přítomnost *B. canis* na našem území.

Literatura:

- (1) Boozer A.L., Macintire D.K. 2003: Vet Clin Small Anim 33: 885-904,
- (2) Irwin P. 2005: Babesiosis and cytauxzoonosis. In: Shaw S. E., Day M. J. Arthropod-borne infectious disease of the dog and cat. London; Manson Publishing Ltd.: 120-133,
- (3) Kubelová M., Široký P. 2010: Veterinářství 4: 198-202,
- (4) Svobodová Z., Svobodová V. 2004: Veterinářství 54: 76-79,
- (5) Kučera J. 1992: Veterinářství 42: 371-373
- (6) Földvári G., Farkas R. 2005: Vet Parasitol 129: 125-131,
- (7) Zygner W., Wędrychowicz H. 2006: Ann Agric Environ Med 13: 355-359,
- (8) Zygner W. et al. 2008: Vet Parasitol 153: 139-142,
- (9) Hornok S., Farkas R. 2009: Med Vet Entomol 23: 41-46.,
- (10) Vercammen F. et al. 1997: Vet Parasitol 68: 51-55

Poznámky & komentáře

PŘÍPAD AVIÁRNÍ TUBERKULÓZY U SUPA KRAHUJOVÉHO (*Gyps ruppellii*)

Frgelecová L.¹, Škorič M.¹, Fictum P.¹, Kříž P.², Slaná I.², Kaevska M.²,
Pavlík I.²

¹Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno, ²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Úvod: Aviární tuberkulóza je významné infekční onemocnění, které postihuje nejen domácí, ale i volně žijící a exotické druhy ptáků. Různí autoři udávají, že aviární tuberkulóza může být u dravců příčinou úhynu v 1 – 30 %. Vyšší počty diagnostikovaných případů se vyskytují u ptáků žijících v zoologických zahradách. V našem případě se jednalo o volně žijící samici supa krahujového (*Gyps ruppellii*), neznámého věku, která byla odchycena v roce 2007 v Jižní Africe a prodána do zoologické zahrady v České republice, kde žila dva roky, až do svého úhynu v říjnu 2009. V říjnu 2009 byla samice supa předvedena s klinickými příznaky nekoordinovaných pohybů, slabostí a kachexií. Opeření kolem kloakálního otvoru bylo potřísněno trusem. Po klinickém vyšetření byl sup léčen systémovými antibiotiky s intramuskulární aplikací a byla zavedena sonda do volete, kterou byla podávána potrava tvořená syrovým masem a vejci. Přestože byla nasazena terapie, pacient do druhého dne uhynul. Kadáver byl zaslán na VFU Brno na nekroptické a eventuální další vyšetření.

Cíle: Cílem bylo zjistit příčinu úhynu samice supa krahujového.

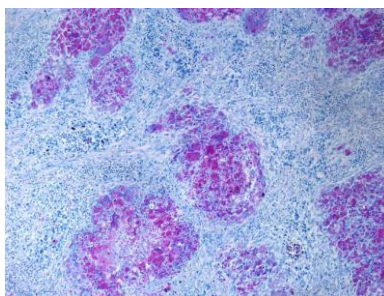
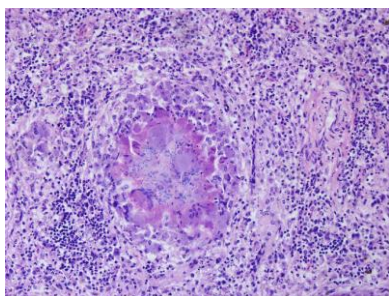
Materiál a metody: Bylo provedeno patomorfologické vyšetření. Vzorky tkání (srdce, trachea, plíce, játra, ledviny, slezina, žaludek, střeva a mozek) byly odebrány na histopatologické vyšetření. Vzorky tkání byly fixovány v 10% formalinu, odvodněny a vloženy do parafinu. Následně byly krájeny na tloušťku 4 µm a obarveny hematoxylin-eosinem (HE) a speciálním barvením pro detekci mykobakterií Ziehl-Neelsenem (ZN). Dále byly vzorky jater odebrány ke kultivaci a na vyšetření kvantitativní Real – time PCR.

Výsledky: Nekroptickým vyšetřením byla zjištěna kachexie a dehydratace – výrazně prominující prsní kost a zapadlé oba oční bulby v orbitě. Nalezen

byl mírný edém podkoží ve ventrální části těla v oblasti kloaky. Slezina byla výrazně zvětšená a deformována přítomností tuhých mnohočetných nodulů bělavé až žluté barvy, velikosti v průměru 0,1 – 1,5 cm. Noduly často splývaly a u některých byla patrna centrálně nekrotická tkáň (obr. 1). Játra byla difuzně zvětšena, s oblymi okraji a v parenchymu byly patrné bělavé multipní noduly (obr. 1). Dále byla pozorována hyperemie sleziny, jater, ledvin a plic a dilatace pravé komory srdeční. V tělní dutině, zejména mezi střevními kličkami, byl fibrinózní exsudát, který tvořil i adheze na seróze střev. Histopatologické vyšetření sleziny ukázalo multipní ložiska granulomatózního zánětu. Některé menší granulomy byly tvořeny jen epiteloidními makrofágy. Několik větších granulomů mělo v centru kaseózní nekrózu obklopenou palisádovitě uspořádanými epiteloidními makrofágy a mnohojadernými obrovskými buňkami Langhansova typu. Lem těchto granulomů tvořilo různé množství lymfocytů a plazmatických buněk (obr. 2). Histopatologickým vyšetřením jater byly prokázány drobné, mnohočetné diseminované granulomy, tvořené především z epiteloidních makrofágů a menším množstvím lymfocytů. V některých granulomech byla patrna centrální kaseózní nekróza. Barvení ZN v histopatologických řezech jater a sleziny odhalilo vysoký počet krátkých tyčinek lokalizovaných centrálně uvnitř kaseózní nekrózy granulomu a také na periferii léze. Tyčinky byly lokalizovány volně v nekrotické masě a také v cytoplasmě makrofágů (obr. 2). Vyšetření Real-time PCR pro detekci mykobakterií bylo pozitivní.



Obr. 1: Slezina; sup - multipní bělavé granulomy patrné na řezné ploše (vlevo), játra; sup - multipní miliární, granulomy v parenchymu (vpravo).



Obr. 2: Slezina; sup - granulom s centrální nekrózou obklopený epitelioidními makrofágy a na periférii lymfocyty (vlevo), slezina; sup - mykobakterie v granulomu (vpravo), ZN, 200x, HE, 400x.

Diskuse: Tuberkulóza je běžnou příčinou úhynu u dravců. Mrchožrouti jsou ale přirozeně rezistentní k mykobakteriálním infekcím, proto se na vzniku infekce mohl podílet např. vysoký věk zvířete související s oslabením imunity nebo jinou konkuretní infekcí. Patoanatomické změny a výskyt lézí vyvolaných mykobakteriální infekcí závisí od druhu ptačího druhu. U většiny případů aviární tuberkulózy se patologické léze prezentují diseminovanou formou ve viscerálních orgánech, zejména v játrech a ve slezině. Granulomy ve střevě a parenchymatózních orgánech jsou typické při mykobakteriální infekci u dravců. Aviární tuberkulóza má velký zoonotický potenciál, zvláště u pacientů postižených HIV / AIDS. Klinická diagnostika u dravců je ztížena nevýraznými nebo chybějícími klinickými příznaky a léčba je často neúspěšná. Histopatologické vyšetření postižených orgánů, kultivace a Real – time PCR jsou spolehlivé metody k stanovení diagnózy *post mortem*.

Závěr: U samice supy byla ze vzorků jater a sleziny kultivací a PCR vyšetřením prokázána infekce *Mycobacterium avium* subsp. *avium*.

Literatura:

Související literatura k dispozici u autorů.

Poznámky & komentáře

PŘÍPAD KUTÁNNÍ MASTOCYTÓZY U PSA PLEMENE ŠARPEJ

Pavlicová K.¹, Fictum P.¹, Kružíková N.²

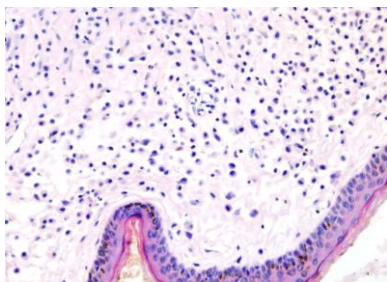
¹Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL FVU Brno, ²Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: Mastocytóza je obecný termín používaný pro popis různorodé skupiny reaktivních nebo nádorových onemocnění charakteristických akumulací mastocytů ve tkáních (1). Neoplastické mastocytózy nemají známou etiologii a představují jednu z nejčastějších kutánních neoplastických proliferací u psů (2,3) Primární kutánní mucinóza je charakterizována nadměrným hromaděním mucinózních látek v dermis. Je to vzácné degenerativní onemocnění kůže u psů, s výjimkou plemene šarpej (4).

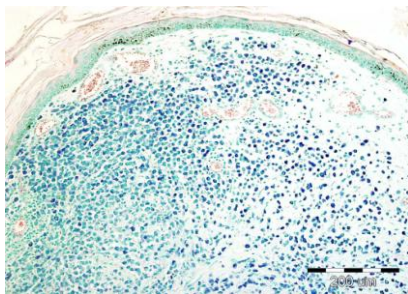
Cíle: Cílem vyšetření bylo zjistit diagnózu tumoru na LPK a jeho další prognózu pro pacienta.

Materiál a metody: Pacientem byl pes, kastrát, plemene šarpej přibližně ve věku 9 let. Biopsie se odebírala z kůže LPK a to z difuzních, vakovitých kožních změn. Druhý odběr byl proveden po aplikaci kortikoidů (prednisonu) za 2 měsíce - z kožního nodulu a kůže na LPK. Tyto biopsie se zpracovaly klasickou metodou zalití do parafinových bločků a následně se řezy barvily metodou hematoxylin-eosin a specifickým barvením dle Giemsky.

Výsledky: Histopatologickým vyšetřením dvou vzorků (první biopsie) kůže z LPK se diagnostikovala výrazná akumulace bezstrukturní bazofilní substance mezi kolagenními vlákny v dermis (výrazná difuzní kožní mucinóza). Dále v dermis byla zjištěna výrazná difuzní infiltrace dobře diferencovaných mastocytů. Jednalo se o mitoticky inaktivní populaci. Histopatologickým vyšetřením vzorku z nodulu na LPK (druhá biopsie) byla klasifikována léze jako mastocytom *grade* I-II (mírně až středně pleomorfní populace). Tato populace byla opět mitoticky inaktivní. Dále zjištěno ložiskově rozvolnění kolagenních vláken (mírná fokální kožní mucinóza).



Obr. 1: Lokalita pro bioptický odběr (vlevo)(foto N. Kružiková), mastocytóza – barvení hematoxylin-eosin (vpravo).



Obr. 2: Mastocytóza – barvení dle Giemsy – Romanowskyho.

Diskuse: Pokud pacient s mucinózou nereaguje na léčbu, měl by být vyšetřován dalšími diagnostickými metodami (cytologie, histopatologie), kvůli možnosti koexistenci mastocytózy (2) Z důvodu difuzního charakteru léze (první biopsie) a predispozici šarpejů, se diagnostikovala kožní mastocytóza v terénu výrazné kožní mucinózy. Vzhledem k nodulárnímu charakteru léze, se ve vyšetřovaných řezech kožního bioptátu (druhá biopsie) diagnostikoval mastocytom *grade* I-II. V případě popsaných nálezů z prvního odběru před podáním kortikoidů se může jednat o souvislost z předchozí diagnózou kožní mastocytózy. V případě výrazné kožní mucinózy se po 2 měsících po podávání kortikoidů diagnostikovala již mírná fokální kožní mucinóza.

Závěr: Mastocytom je jedno z nejčastějších neoplastických onemocnění u psů, na rozdíl od mastocytózy, která bývá diagnostikována vzácně (4). Je uváděno, že končetiny, tříselná a perianální oblast jsou predisponovanými lokalitami pro mastocytomy s horšími biologickými vlastnostmi u

některých plemen psů, včetně plemene šarpej, což se ukázalo i v tomto případě (5).

Literatura:

(1) O'Keefe D.A. et al. 1987: Vet Int Med 1: 75-80, (2) Yager J.A., Wilcock B.P. 1994: Surgical Pathology of the Dog and Cat. Dermatopathology and Skin Tumors. London: Mosby, 30-38, (3) Davis B.J. et al. 1992: Vet Pathol 29: 363-365, (4) Gross T.L. et al. 1992: Veterinary dermatopathology: A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin diseases. Toronto: Mosby, 1992: 228-229, (5) Miller D.M. 1995: J Vet Diagn Invest 7: 360-363

Poznámky & komentáře

PROGNOSTICKÉ MARKERY U MASTOCYTOMŮ PSŮ

Kružíková N.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: Mastocytomy tvoří až 21 % všech kožních neoplazií psů (1). Podle Patnaika et al. (1984) se mastocytomy dělí na dobře, středně a málo diferencované. Dobře diferencované mastocytomy lze označit jako prognosticky nejpříznivější, naopak u málo diferencovaných je prognóza nejméně příznivá a jejich výskyt je často spojen s recidivou a tvorbou metastáz (2,3). Většina mastocytomů je řazena mezi středně diferencované, kdy lze jen těžko předpokládat vývoj onemocnění. Z toho důvodu byla sledována řada markerů, které by umožnily vyslovení přesnější prognózy, pravděpodobnost recidiv a vznik metastáz. Stanovení mitotického indexu spočívá ve sledování počtu mitotických figur v histologických řezech. Udává míru buněčné proliferace, která je sledována v 10-ti zorných polích. Je prokázáno, že počet mitóz větší než 5 je spojen s kratší dobou přežívání, častější recidivou a tvorbou metastáz. Jako další prognostický faktor lze využít PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Nejvíce je PCNA buňkami exprimováno v S-fázi buněčného cyklu, během syntézy DNA (4). AgNORs (*argyrophilic nucleolar organizer regions*) jsou jaderné substruktury zapojené do ribosomální RNA transkripce. Množství AgNORs v jádru koreluje se stupněm buněčné proliferace a rychlostí nádorového růstu *in vivo* (5). Za prognosticky nejvýznamnější je považován nukleární protein Ki-67, který je exprimován všemi proliferujícími buňkami. Proliferační index >23 je spojen s agresivnější povahou nádoru, s častějšími recidivami a kratší dobou přežití (3). V posledních letech byl zkoumán možný genetický podklad vzniku mastocytomů a bylo prokázáno, že mutace genu *c-kit* hraje roli při vzniku mastocytomů. Jedná se o proto-onkogen, který kóduje transmembránový protein řazený mezi receptorové tyrosinkinázy (6). Přítomnost mutace na exonu juxtamembránové domény tohoto proto-onkogenu je spojena s vyšším histologickým stupněm malignity a kratší dobou přežití psů (7). Zjištění, že maligní transformace mastocytů je vyvolána na základě genetické mutace, může být využito i ke zvolení vhodné adjuvantní terapie. Ta je založena na využití molekulárních inhibitorů působících na receptorové tyrosinkinázy mastocytomů s mutací *c-kit*.

Cíle: Komplexní stanovení prognostických markerů u mastocytomů umožní přesnější vyslovení prognózy a zvolení vhodné adjuvantní terapie. Předpokládáme nález mutace proto-onkogenu *c-kit* u mastocytomů s vyšším histologickým stupněm malignity.

Materiál a metody: Předmětem analýzy jsou vzorky nádorové tkáně psů s mastocytomem. V první řadě je provedeno cytologické vyšetření vzorku nádorové tkáně. Při histopatologickém vyšetření je určen stupeň malignity dle Patnaika et al. (1984). Ze vzorku je dále izolována RNA, pomocí RT-PCR je získána cDNA. Jednotlivé požadované úseky jsou amplifikovány a následně sekvenovány. Výsledné sekvence jsou porovnány s publikovanou referenční sekvencí (Letard et al. 2008). Vyšetřovány jsou kódující úseky s popsáním výskytu mutací, tzv. *hot spots*. Jedná se o exony 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18 a 19.

Výsledky: Vzorek č. 1: pes, samice nekastrovaná, anglický bulteriér, stáří 7 let, útvar velikosti 4x4 cm na kaudální ploše stehna pravé pánevní končetiny. Histopatologické vyšetření: mastocytom *grade* II. Přítomnost *c-kit* mutace nebyla prokázána. Vzorek č. 2: pes, samec nekastrovaný, zlatý retrívr, stáří 8 měsíců, útvar velikosti 2x2 cm na laterální ploše stehna pravé pánevní končetiny. Histopatologické vyšetření: mastocytom *grade* II. Přítomnost *c-kit* mutace nebyla prokázána. Vzorek č. 3: pes, samice kastrovaná, kříženeček, stáří 10 let, útvar velikosti 5x3 cm lokalizovaný v podkoží v oblasti vnitřního stehna levé pánevní končetiny. Histopatologické vyšetření: mastocytom *grade* II-III. Přítomnost *c-kit* mutace nebyla prokázána. Vzorek č. 4.: pes, samice nekastrovaná, bernský salašnický pes, stáří 5 let, útvar velikosti 3x4 cm v oblasti tarsu pravé pánevní končetiny. Histopatologické vyšetření: mastocytom *grade* II. Přítomnost *c-kit* mutace nebyla prokázána.

Diskuse: KIT gen kóduje transmembránový typ III tyrosinkinázy, což je receptor pro růstový buněčný faktor (*stem cell factor*, SCF). Tento protein se skládá z extracelulární části složené z pěti imunoglobulinových domén (kódované na exonu 1-9) a transmembránové domény (exon 10), a dále z intracelulární části (exon 11-21). Ta je dále rozdělena na cytoplazmatickou tyrosinkinázovou doménu (exon 13) a fosfotransferázovou doménu (exon 17). Letard et al. (2008) sledoval výskyt *c-kit* mutací u 191 psů s mastocytomem. Přítomnost mutace byla potvrzena u 26,2 % psů. Nejvíce

mutací bylo zjištěno na exonu 11, většinou se jednalo o interní tandemovou duplikaci mezi rezidui 571 a 590. Byly nalezeny 2 *hot spots* mutace na kodonech 555-559 a 571-590. Dále pak byly zjištěny mutace na exonu 8 a 9 a velmi ojediněle i na exonu 17. V námi vyšetřovaných vzorcích byly prokázány pouze polymorfismy KIT genu, mutace *c-kit* jako taková nebyla u žádného z pacientů prokázána.

Tabulka 1: Polymorfismy genů identifikované u KIT genů u psů (Letard et al. 2008)

Kodon	Publikovaná sekvence	Identifikovaná sekvence	Nomenklatura	Amino-kyselinová alterace	Frekvence (n=191)
G442D	GGT	GAT	c.1325G>A p.	Gly442Asp	100 %
T606T	ACC	ACT	c.1818C>T p.	Thr606Thr	100 %
T669T	ACA	ACT	c.2007A>T p.	Thr669Thr	100 %
T425T	ACG	ACA	c.1275G>A p.	Thr425Thr	64 %
Y577Y	TAC	TAT	c.1731C>T p.	Tyr577Tyr	24 %
K758K	AAG	AAA	c.2355G>A p.	Lys785Lys	18 %

Závěr: Přítomnost *c-kit* mutace nebyla potvrzena u žádného ze čtyř vyšetřovaných vzorků. Na základě těchto výsledků bylo u všech pacientů provedeno pouze chirurgické odstranění tumoru. Použití inhibitorů receptorových tyrosinkináz není při nepřítomnosti *c-kit* mutace opodstatněno.

Poděkování: *Vzorky byly vyšetřeny ve spolupráci s laboratoří Genomia s.r.o.*

Literatura:

(1) Welle M.M. et al. 2008: *Vet Dermatol* 19: 321-339, (2) Patnaik A.K. et al. 1984: *Vet Pathol* 21: 469-474, (3) Webster J.D. et al. 2004: *Vet Pathol* 41: 371-377, (4) Romanski E.M. et al. 2007: *Vet Pathol* 44: 335-341, (5) Webster J.D. et al. 2007: *Vet Pathol* 44: 298-308, (6) Zemkel D. et al. 2002: *Vet Pathol* 39: 529-53, (7) Webster J.D. et al. 2006: *Neoplasia* 8: 104-111

Poznámky & komentáře

SLEDOVÁNÍ VYBRANÝCH PARAMETRŮ NESPECIFICKÉ IMUNITY KOČEK VE VZTAHU K URČITÝM ZONÓZÁM (LEPTOSPIRÓZA, BORRELIÓZA)

Mašková D.¹, Žáková A.¹, Dušková M.¹, Opatová P.¹, Schánilec P.²,
Tremel F.³

¹Oddělení fyziologie a imunologie živočichů PŘF MU Brno, ²Klinika
chorob psů a koček, FVL VFU Brno, ³Ústav infekčních chorob
a epizootologie, FVL VFU Brno

Úvod: Kočka domácí vystupuje již po několik tisíciletí jako věrný průvodce člověka. Navzdory tomu je však kočičí imunitní systém velmi málo prozkoumán. Mezi významné spirochetální onemocnění domácích zvířat patří lymeská borrelióza a leptospiróza. K hlavním přenašečům lymeské borreliózy patří klíšťata nesoucí patogenní agens *Borrelia burgdorferi* sensu lato a jako rezervoár pro leptospiry (*Leptospira interrogans* sensu lato) slouží drobní hlodavci. Volně se pohybující kočky přichází s klíšťaty drobnými hlodavci často do styku. Jelikož kočky žijí v úzkém kontaktu s lidmi, hrozí riziko přenosu nemocí do lidského prostředí.

Cíle: Cílem bylo přispět k rozšíření poznatků o nespecifické imunitě koček a reakcí jejich mechanismů v souvislosti s onemocněním lymeská borrelióza a leptospiróza.

Materiál a metody: Kočičí krev, resp. sérum, bylo podrobena analýze chemiluminiscenční, radiální difúzi v agaróze, ELISA a mikroskopickému aglutinačnímu testu. Jednotlivé vzorky byly rozděleny do tří souborů. Kočičí sérum dodané z veterinární kliniky bylo zařazeno do souboru Pacienti, krev z útulku obsahuje soubor Útulky a v posledním souboru, zvaném Odchyty, je zařazena krev získaná od odchycených koček z ulice.

Výsledky: Dané soubory koček byly mezi sebou porovnávány, zdali se liší ve výskytu pozitivit. Výskyt antiborreliových protilátek IgM byl výrazně vyšší v souboru Pacienti, což může souviset s tím, že do ambulance přichází majitelé se zvířaty v časně fázi infekce, pro kterou je typická produkce IgM. Zvýšenou hladinu IgM lze pozorovat po 2-4 týdnech,

kdežto hladina IgG se zvyšuje po 4-6 týdnech od začátku infekce (1). Další vysvětlení může spočívat ve způsobu stanovení těchto IgM, které díky své nižší specifitě a nižší afinitě mohou do určité míry reagovat se širším spektrem antigenů. Rovněž na IgM mají vliv různé nespecifické faktory (2). Dále bylo zkoumáno, zda mají životní podmínky kočky vliv na dané parametry. Soubor Útulky vykazoval vyšší hladiny lyzozymu oproti ostatním dvěma souborům, což může být zapříčiněno právě prostředím útulku, které je pro kočky nepřírozené. Velké množství koček na jednom místě je pro kočky stresující a vhodné pro přenos infekce. Žádného významného rozdílu nebylo dosaženo při porovnávání jak spontánní, tak aktivované chemiluminiscence. Předpoklad však byl, že by chemiluminiscence mohla být odlišná v důsledku jiného způsobu odběru krve u těchto souborů (soubor Útulky byl odebírán bez anestezie).

Tabulka 1: Srovnání pozitivit na patogenní agens

	Borrelie IgM (%)	Borrelie IgG (%)	Leptospiry (%)
Pacienti	17,7	8,1	11,2
Útulky	4,8	9,5	9,5
Odchyty	10,3	5,2	10,3

Tabulka 2: Porovnání nespecifických parametrů mezi soubory

	Počet koček lyzozym	Průměr (lyzozym µg/ml)	Počet koček CL	Průměr (CL spont., RLU/min)	Průměr (CL aktiv., RLU/min)
Pacienti	242	122,49	-	-	-
Útulky	34	169,29	41	4868	44719
Odchyty	52	129,62	55	5163	53273

Tabulka 3: Vliv přítomnosti antiborreliových a antileptospirových Ab na lyzozym

Pozitivita Lyzozym	Počet koček Pacienti	Průměr (µg/ml)	Počet koček Útulky+Odchyty	Průměr (µg/ml)
Negativní	178	116,11	62	148,81

IgM	40	138,30	8	139,13
IgG	16	124,69	5	160,40
Leptospiry	20	149,75	9	157,22

Tabulka 4: Vliv přítomnosti antiborreliových a antileptospirových Ab na produkci kyslíkových radikálů při fagocytóze

Pozitivita CL	Počet koček Útulky+Odchyty	Průměr (CL spont.) (RLU/min)	Průměr (CL aktiv.) (RLU/min)
Negativní	73	4755	50490
IgM	8	8772	68484
IgG	7	6257	52676
Leptospiry	10	6509	38582

Diskuse: Vzhledem k tomu, že podobná stanovení koncentrace lysozymu a chemiluminiscence v plné krvi nebyla dosud u koček publikována a nejsou známy ani referenční hodnoty, nelze získané výsledky zhodnotit odpovídajícím způsobem. Co se týče vlivu přítomnosti antiborreliových a antileptospirových protilátek na dané parametry, významný vliv pozitivity se projevil pouze v koncentraci lysozymu v souboru Pacienti, a to v pozitivitě na antiborreliové protilátky IgM a antileptospirové protilátky, které vykazovaly vyšší hodnoty lysozymu.

Závěr: Rozdíly v koncentraci lysozymu byly zjištěny u koček žijících v útulku oproti kočkám žijících na ulici a kočkám ošetřovaným na veterinární klinice. Žádných rozdílů nebylo shledáno v intenzitě chemiluminiscence. Přítomnost specifických protilátek proti *B. burgdorferi* s. l. a proti *L. interrogans* s. l. pravděpodobně nespecifické parametry výrazně neovlivňuje.

Literatura:

(1) Craft J.E. et al. 1984: Yale J Biol Med 57: 561-565, (2) Opatová P. 2010: Vybrané parametry specifické imunity kočky domácí (*Felis catus f. domestica*) ve vztahu k infekčním spirochetálním onemocněním Lymeská borrelióza a leptospiróza, PřF MU, Brno

Poznámky & komentáře

INDICENCE KATARÁLNÍ HOREČKY OVCÍ U VOLNĚ ŽIJÍCÍCH A FARMOVĚ CHOVANÝCH PŘEŽVÝKAVCŮ V ČESKÉ REPUBLICI (2011-2012)

Šperlová A.¹, Zendulková D.¹, Rosenbergová K.¹, Lamka J.²

¹Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno, ²Katedra farmakologie a toxikologie, FF v Hradci Králové, UK Praha

Úvod: Katarální horečka ovcí (KHO) je infekční nekontagiózní onemocnění domácích i volně žijících přežvýkavců přenášené tiplíky r. *Culicoides*. Původcem onemocnění je bluetongue virus (BTV) z r. *Orbivirus*, čel. *Reoviridae*, jež zahrnuje 26 sérotypů (1). V ČR byl BTV-8 poprvé zaznamenán v r. 2007 a do roku 2009 zde bylo zjištěno 25 případů KHO u skotu a bylo vyhlášeno 14 ohnisek. Díky povinné nouzové vakcinaci domácích přežvýkavců se nakažová situace na našem území konsolidovala a od 25. 11. 2011 je ČR oficiálně prostá KHO a vakcinace je zde zakázána. Volně žijící přežvýkavci však pochopitelně vakcinováni nebyli, a mohou tudíž sloužit jako vhodná sentinelová zvířata (3). Proto jsme se zaměřili na tuto populaci zvířat.

Cíle: Cílem studie bylo zjistit incidenci případů KHO u volně žijících a farmově chovaných přežvýkavců v období 2011-2012.

Materiál a metody: Od dubna 2011 do března 2012 jsme získali 258 vzorků krevních sér či plné krve s EDTA od volně žijících a farmově chovaných přežvýkavců (Tab. 1) z různých oblastí ČR. Z plné krve byla odstředěním získána plazma. Všechny vzorky sér a plazmy byly vyšetřeny komerčním cELISA kitem (Bluetongue Competition, ID.Vet, Francie) k průkazu skupinově-specifických protilátek proti BTV. Vybrané vzorky sér a plazmy byly navíc vyšetřeny komerčním edELISA kitem k detekci časných i pozdních skupinově-specifických protilátek proti BTV (Bluetongue Early Detection, ID.Vet, Francie). Dvanáct vybraných vzorků plné krve muflonů a daňků evropských bylo vyšetřeno metodou RT-nested PCR specifickou pro BTV-8.

Tab. 1: Druhy a počty vyšetřovaných zvířat

Druh	Počet
Muflon (<i>Ovis musimon</i>)	135
Daněk evropský (<i>Dama dama</i>)	45
Koza bezoárová (<i>Capra aegagrus</i>)	27
Sika Dybowského (<i>Cervus nippon Dybowski</i>)	25
Jelen lesní (<i>Cervus elaphus</i>)	12
Srnec obecný (<i>Capreolus capreolus</i>)	11
Jelen milu (<i>Elaphurus davidianus</i>)	2
Paovce hřivnatá (<i>Ammotragus lervia</i>)	1

Výsledky: Ve 2 vzorcích byly zjištěny specifické protilátky proti BTV, a to v krevním séru muflona z obor. chovu Podčejk, který byl pozitivní v cELISA testu a negativní v edELISA testu, a v séru jednoletého muflona z obor. chovu Žleby. Ve vzorku plazmy získané z plné krve odebrané od 2. pozitivního zvířete s dvouměsíčním odstupem protilátky prokázány nebyly. V téže vzorku plné krve nebyla zjištěna ani přítomnost RNA BTV-8. Stejně tak nebyla zjištěna RNA BTV-8 ani ve zbývajících 11 vzorcích plné krve.

Diskuse: Volně žijící přežvýkavci jsou vnímaví k infekci BTV a jsou jeho potenciálním rezervoárem (3). V Evropě byla cirkulace BTV u volně žijících přežvýkavců zjištěna v Německu (4), Belgii (5), ve Španělsku (6,7,8) a ve Francii (9). Autoři příspěvku se výskytem KHO u volně žijících přežvýkavců v ČR zabývají od r. 2008 a do r. 2011 byl z 594 vyšetřených vzorků zjištěn 1 sérologicky pozitivní případ. V období sledování 2011-2012 byly zjištěny další nové případy – 2 sérologicky pozitivní vzorky. V prvním případě se jednalo o krevní sérum odebrané od tříletého muflona z obor. chovu Podčejk (okr. Mladá Boleslav). Tento vzorek byl pozitivní v cELISA testu, avšak v edELISA testu byl negativní. U edELISA testu je vyšší riziko falešně negativních výsledků, pokud k infekci došlo před delší dobou (10), což by mohlo rozdílné výsledky obou testů vysvětlit. Avšak vzhledem k tomu, že nebylo možné získat od tohoto zvířete i vzorek plné krve za účelem průkazu virové RNA, nemůžeme posoudit, zda se jednalo o akutní či starší infekci. Druhý pozitivní vzorek pocházel od jednoletého muflona z obor. chovu Žleby (okr. Kutná Hora). Vzorek byl však (opakovaně) pozitivní pouze v edELISA testu, zatímco

v cELISA testu byl negativní (jeho % kompetice bylo 40,7, přičemž pozitivní jsou vzorky s % kompetice < 40 %), což by mohlo signalizovat časnou infekci. Vzorky odebrané s dvouměsíčním odstupem však tuto hypotézu nepotvrdily, neboť byly získány negativní výsledky v sérologickém vyšetření i v RT-nested PCR. Protilátky proti BTV ovšem obvykle přetrvávají dlouhodobě a BTV RNA může být v krvi detekovatelná až 6 měsíců po infekci. Možnou infekci jiným sérotypem jsme vyloučili vzhledem k negativním výsledkům plazmy z 2. odběru v obou ELISA testech, které jsou séro skupinově specifické. Vyšetření plazmy a séra poskytuje v testech podobné výsledky (10).

Závěr: O využití Bluetongue Early Detection ELISA testu u muflonů nejsou v odborné literatuře žádné údaje. Předpokládáme však, že test je dostatečně spolehlivý i pro stanovení specifických protilátek u muflonů. Uvedený test je totiž mj. určený pro sérologické vyšetření ovcí domácích (*Ovis aries*), které jsou muflonům geneticky velmi příbuzné. Rozpor ve výsledcích vyšetření vzorků z prvního a druhého odběru si tak v tuto chvíli nedovedeme vysvětlit. ČR je nyní již oficiálně prostá KHO a platí zde zákaz vakcinace proti této nákaze. Není však vyloučeno, že se mohou objevit nové případy KHO vyvolané reziduálním BTV-8, případně introdukcí jiného, dosud v ČR nezaznamenaného sérotypu BTV. I nadále se proto budeme věnovat sledování výskytu KHO v populacích volně žijících a farmově chovaných přežvýkavců.

Poděkování: *Děkujeme uživatelům honiteb, SLŠ v Hranicích a prof. J. Pikulovi. Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru MŠMT ČR č. 6215712403.*

Literatura

(1) Šperlová A., Zendulková D. 2011: Vet Med 56: 430-452, (2) Elbers A.R.W. et al. 2009: Prev Vet Med 92: 1-8, (3) Falconi C. et al. 2011: Vet Microbiol 151: 209-219, (4) Staubach C. et al. 2007: European Food Safety Authority: 38, (5) Linden A. et al. 2010: Emerg Infect Dis 16: 833-836, (6) Ruiz-Fons F. et al. 2008: Emerg Infect Dis 14: 951-953, (7) García I. et al. 2009: Eur J Wildl Res 55: 173-178, (8) García-Bocanegra I. et al. 2011: Vet Res 42: 88-94, (9) Rossi S. et al. 2010: Bulletin épidémiologique 35: 28-32, (10) Eschbaumer M. et al., 2011: Vet Rec 168: 643-644

Poznámky & komentáře

MONITORING PREVALENCE PATOGENU *BORRELIA BURGDORFERI* SENSU LATO (*BBSL*) NA RŮZNÝCH LOKALITÁCH SE ZAMĚŘENÍM NA KLÍŠŤATA (BRNO) A NA VOLNĚ ŽIJÍCÍ HLODAVCE A JEJICH ROZTOČE (POODŘÍ, MORAVSKÝ KRAS)

Kučerová H., Žáková A., Bartoňková N., Rašovská T., Píše R., Vostal K., Norek A., Gallusová M.

Ústav Experimentální biologie PřF MU Brno

Úvod: *Borrelia burgdorferi* sensu lato je obecné označení pro skupinu 18 bakteriálních genomospecies rodu *Borrelia*, kde některé z druhů jsou původci nemoci lymeská borelióza, resp. *B. afzelii*, *B. garinii* a *B. burgdorferi* sensu stricto. Jako rezervoár bakterií vystupují drobní savci a ptáci, velmi důležití jsou zejména hlodavci. Hlavním vektorem *Bbsl* jsou klíšťata, zejména klíšťata rodu *Ixodes* (1). DNA *Bbsl* byla také zjištěna u některých jiných krev sajících členovců, hlavně hmyzu (komáři, vši a blechy). V této studii se zaměřujeme na možný výskyt *Bbsl* v hlodavcích, na nich parazitujících roztočích, včetně klíšťat. Jako zdroj studijního materiálu byli vybráni hlodavci, jakožto rezervoár borelií a klíšťata jako významný vektor.

Cíle: Cílem našeho výzkumu je předložit informace o prevalenci patogenu *Bbsl* na vybraných lokalitách ČR a to nejen odborné, ale i laické veřejnosti. Vybrány byly lokality využívané obyvateli jako oddechová místa k odpočinku, a tudíž místa potenciálního rizika nakažení v případě ataku pozitivního klíšťete.

Materiál a metody: Sběr vzorků metodou vlajkování, která je založena na smýkání bílé plachty po vegetaci, přičemž dochází k zachycení klíšťat na plachtě. Odchyty hlodavců. Bylo využito dvou typů pastí, pasti sklapovací a živolovné.

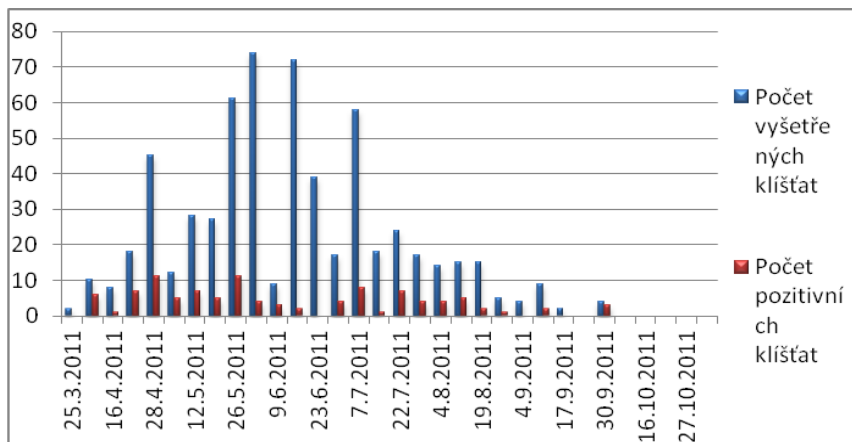
Vyšetření vzorků: DFM. Všechna klíšťata a roztoči z hlodavců byli vyšetřeni speciální mikroskopickou technikou DFM na přítomnost bakterie *Bbsl*. PCR. Všechna DFM pozitivní klíšťata a pozitivní roztoči byli následně vyšetřeni na přítomnost boreliové DNA. ELISA. Séra odchycených hlodavců byla vyšetřena na přítomnost protilátek proti *Bbsl*.

Výsledky: Výzkum probíhal v různých časových intervalech na čtyřech lokalitách: ZH (Zamilovaný hájek), Pisárky, MK (Moravský kras), Poodří, na kterých byly sbírány vzorky: klíšťat, hlodavců, případně roztočů z hlodavců. Vzorky byly vyšetřeny na přítomnost patogenu *Bbsl* (Tab. 1). Nejvyšší riziko nákazy tímto patogenem vykazuje Zamilovaný hájek v Brně s pozitivitou klíšťat 16,3% (Graf 1).

Tab. 1: Shrnutí výsledků dvouletého sledování výskytu patogenu *Bbsl* v různých živočišných na čtyřech lokalitách (* vyšetření metodami DFM, PCR, ** vyšetření metodou ELISA, *** bez výsledků, doplněny na konferenci)

Vzorek	Lokalita	Množství 2010	Pozitivita	Množství 2011	Pozitivita
Klíšťata*	ZH	222	5,4%	606	16,3%
	Pisárky	684	1%	598	8,7%
	MK	-	-	53	3,8%
Hlodavci**	Poodří	59	15,3%	31	***
	MK	-	-	21	***
Roztoči z hlodavců*	Poodří	117	0%	76	7,9%
	MK	-	-	84	2,4%

Graf 1: Ukázka promořenosti klíšťat na lokalitě Zamilovaný hájek v Brně na patogenní *Bbsl* v jednotlivých sběrech během ročního sběru 2011



Diskuse: Výzkum několikaletého pozorování promořenosti klíšťat byl prováděn v devítileté studii také ve Valticích a průměrná pozitivita vykazovala 16,8 % (2). Nižší procento prevalence vykazoval výzkum pražských parků v letech 1995-1998 a 1994-1997 (3,4). U obou těchto studií vykazovala klíšťata průměrnou pozitivitu 5,0 %; 6,6 %.

Závěr: Prevalence patogenu Bbsl v klíšťatech má dlouhodobě stoupající trend a odrazem tohoto stavu na dané lokalitě by pak mohla být nepříznivá epidemiologická situace v Brně v roce 2011(ústní konzultace s RNDr. R. Vaverkovou - KHS).

Literatura:

(1) Radolf J. et Samuels D. S. 2010: Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis, Horizon Scientific Press, 574 stran, (2) Hubálek Z. et al. 2003: Med Vet Entomol 17: 46-51, (3) Bašta J. et al. 1999: Eur. J. Clin Microbiol Infect Dis 18: 515-517, (4) Plch J., Bašta J. 1999: Zentralbl Bakteriol 289: 79-88

Poznámky & komentáře

IN VITRO STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE IZOLÁTŮ *MYCOPLASMA BOVIS* Z CHOVU POSTIŽENÉHO MASTITIDOU

Pospíchalová J., Zendulková D.

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno

Úvod: *Mycoplasma bovis* je nejvýznamnější z mykoplazmových agens vyvolávajících mastitidy u skotu (1). K infekci mléčné žlázy dochází přes strukový kanál (2). Infekce se častěji vyskytuje v početnějších chovech, kde se, kromě jiného, na vzniku infekce podílejí špatné hygienické podmínky, nekvalitní výživa, hygienické nedostatky při intramamární aplikaci léčiv a chyby při dojení (1). Pro akutní infekci je charakteristický vysoký počet somatických buněk v mléce ($>10^6$), atrofie postižené čtvrti a postupné rozšíření i na další čtvrti. Běžné jsou i subklinické infekce s nepravidelným vylučováním původce po mnoho měsíců až let, což napomáhá udržování infekce v prostředí (3). Léčba mastitid způsobených *M. bovis* bývá často neúspěšná (1) jednak vlivem rezistence kmenů, ale i specifickou distribucí použitých antimikrobiálních látek v organismu hostitele. Terapii by proto vždy mělo předcházet stanovení rezistence k antimikrobiálním látkám. Někdy infekce spontánně odezní a zvířata se stanou kultivačně negativní. Posuzování jejich zdravotního stavu by však mělo být velmi obezřetné, protože tato zvířata mohou být i přesto potenciálními nosiči infekce (4).

Cíl: Cílem naší studie bylo stanovit *in vitro* minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných antimikrobiálních preparátů na izoláty *M. bovis* a zpřesnit tak možnosti volby vhodného terapeutického postupu v postiženém chovu.

Materiál a metody: Do studie byly zařazeny dva izoláty *M. bovis* (37/2011 a 38/2011), které byly získány od dojníc s klinickou mastitidou pocházejících ze stejného chovu. Identifikace izolátů byla provedena pomocí nested-PCR. Mikrodiluční metodou byly stanoveny *in vitro* MIC pro 7 vybraných antimikrobiálních látek (tylosin, tilmikosin, linkomycin, klindamycin, erytromycin, chloramfenikol a florfenikol). Uvedené antimikrobiální látky byly dodány v lyofilizovaném stavu a navázány na mikrotitrační destičce „Sensitire“ ve specifikovaných koncentracích (zakoupeno z Animal Health and Veterinary Laboratories Agency, UK).

Ředění se pohybovala v rozmezí od 0.12 µg/ml do 32 µg/ml. Inokula izolátů *M. bovis* byla standardizována na přibližnou koncentraci 5×10^5 CFU/ml, inkubace probíhala po dobu 48 h při 37°C a poté byly výsledky odečteny pomocí invertovaného zrcadla.

Výsledky:

Tab. 1: MIC testovaných antimikrobiálních látek pro izoláty *M. bovis* 37/2011 a 38/2011

Typ antibiotika	MIC testovaných antimikrobiálních látek (µg/ml)	
	37/2011	38/2011
Tylosin	8	8
Tilmikosin	> 32	> 32
Linkomycin	1	1
Klindamycin	0,12	0,25
Erytromycin	> 32	> 32
Chloramfenikol	2	2
Florfenikol	2	2



0,12 µg/ml

0,25 µg/ml

0,5 µg/ml

1 µg/ml

2 µg/ml

8 µg/ml

32 µg/ml

Legenda:

T-Tylosin

Tl-Tilmikosin

L-Linkomycin

C-Klindamycin

E-Erytromycin

Ch-Chloramfenikol

F-Florfenikol

T Tl L C E Ch F

Obr. 1: MIC testovaných antimikrobiálních látek pro izolát *M. bovis* 37/2011.

Diskuse: Praktičtí veterinární lékaři společně s chovateli z ekonomických důvodů stále upřednostňují možnost řešit problematiku mykoplazmových mastitid antimikrobiální terapií, přestože je po dlouhou dobu známo, že tato terapie v terénních podmínkách často selhává. Jedním z možných důvodů těchto selhání je, že i přes *in vitro* prokázanou citlivost k určitým antimikrobiálním látkám, dochází k jejich odlišné distribuci v těle hostitele v podmínkách *in vivo* (2,4,5). V naší studii byly hodnoty MIC u linkomycinu a klindamycinu zjištěny jako rovnající se nebo nižší než 1 µg/ml, ke stejným výsledkům dospěli i jiní evropští autoři (5,7,8). Hodnoty MIC stanovené pro tilmikosin (> 32 µg/ml) korelují s výsledky italské studie (8), ale hodnoty MIC pro tylosin jsou v naší studii vyšší (8 µg/ml). Na základě zjištěných hodnot lze oba naše izoláty považovat za rezistentní k erytromycinu, MIC dosahovaly úrovně 32 µg/ml. Stejný názor byl publikován i v zámoří (4). V případě chloramfenikolu hodnoty MIC byly 2 µg/ml. Terapeutické použití chloramfenikolu je v České republice u potravinových zvířat zakázáno, avšak v závažných a odůvodněných případech by mohl být tento preparát použit při léčbě vnímavých nepotravinových a zoo zvířat.

Závěr: Nejnižší hodnoty MIC byly v naší studii prokázány u linkomycinu a klindamycinu, u florfenikolu a chloramfenikolu dosahovaly 2 µg/ml a pro tylosin, tilmikosin a erytromycin byly rovny nebo vyšší než 8 µg/ml.

Literatura:

(1) Gonzalez R. N., Wilson D. J. 2003: Vet Clin North Am Food Anim Pract 19: 199-221, (2) Pfützner H. 1990: Zentralbl Bakteriolog Suppl 20: 394-399, (3) Pfützner H., Sachse K. 1996: Rev Sci Tech Off Int Epiz 15 (4): 1477-1494, (4) Maunsell F. P. 2011: J Vet Intern Med 25: 772-783, (5) Ayling R. D. et al. 2000: Vet Rec 146: 745-747, (6) Bennett R. H., Jasper D. E. 1977: Cornell Vet 67: 361-373, (7) ter Laak et al. 1993: Antimicrob Agents Ch 37: 317-321, (8) Mazzolini et al. 1997: Obiett Doc Vet 1: 61-66

Poznámky & komentáře

VÝSKYT POTENCIÁLNĚ ZOONOTICKÝCH PŮVODCŮ VIROVÝCH GASTROENTERITID U KLINICKY ZDRAVÝCH PRASAT A FYLOGENETICKÁ ANALÝZA TERÉNNÍCH KMENŮ

Dufková L., Ščigalková I., Moutelíková R., Prodělalová J.

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

Úvod: Zástupci rodů *Sapovirus* (čeleď *Caliciviridae*), *Kobuvirus* (čeleď *Picornaviridae*) a *Mamastrovirus* (čeleď *Astroviridae*) jsou malé neobalené RNA viry, které způsobují gastroenteritidy u lidí a zvířat (1,2,3). Populace RNA virů je charakterizována vysokou variabilitou, která je dána vysokým stupněm mutací a výskytem rekombinací, což zvyšuje riziko mezidruhového přenosu (1). Tato skupina enterální virů je hostitelsky specifická, ale u některých virových druhů byl popsán přenos na jiného zvířecího hostitele (4). Přítomnost sapovirů, kobuvirů a astrovirů ve výkalech klinicky zdravých prasat představuje stálý zdroj infekce v populaci prasat a eventuálně také pro jiné zvířecí druhy včetně člověka.

Cíle: Cílem práce bylo zjistit prevalenci sapovirů, kobuvirů a astrovirů u klinicky zdravých prasat v České republice a u vybraných kmenů stanovit fylogenetické vztahy s referenčními kmeny se zaměřením na zjištění podobnosti prasečích kmenů s lidskými.

Materiál a metody: V rámci studie bylo vyšetřeno celkem 196 vzorků výkalů nebo obsahů střev prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*) od různých věkových kategorií pocházejících ze šesti farem, odebraných v období 2010-2011. Jednalo se o 66 vzorků výkalů sajících selat, 46 vzorků výkalů selat po odstavu, 33 vzorků výkalů prasnic a 51 vzorků obsahu tenkého střeva jatečných prasat. V době odběru prasata nevykazovala známky klinického onemocnění.

Celková RNA byla extrahována z 10% suspenze výkalů v pufrovaném fyziologickém roztoku (0,1M, pH 7,2) pomocí TRI Reagent (Sigma, St. Luis, USA). Sapovirová, kobuvirová a astrovirová RNA byla detekována metodou dvoukrokové reverzní transkripce a polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) s genově specifickými primery (3,5,6). Amplifikační produkty byly analyzovány v 1,2% agarózovém gelu a vizualizovány po obarvení ethidium bromidem pod UV světlem. Vybrané amplifikované fragmenty

byly purifikovány a zaslány k sekvenování (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Německo). Získané sekvence byly upraveny v programu BioEdit verze 5.0.9.13. a srovnány se známými sekvencemi dostupnými v GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Fylogenetická analýza sekvencí byla provedena pomocí neighbour-joining metody v 1000 replikacích programu MEGA verze 4.0.14.

Výsledek: V rámci studie byla stanovena prevalence prasečích sapovirů, kobuvirů a astrovirů u domácích prasat v českých chovech. Z celkového počtu 196 vzorků výkalů prasat různých věkových kategorií bylo 89,3 % vzorků pozitivních na přítomnost alespoň jednoho sledovaného viru. Nejčastěji detekovaným virem byl kobuvirus (87,3 %). Astroviry byly zjištěny u 34,2 % a sapoviry u 10,2 % vzorků. Prevalence sledovaných virů vztahované na věkové kategorie jsou uvedeny v Tab. 1.

Tabulka 1: Prevalence sapovirů, kobuvirů a astrovirů ve vzorcích výkalů prasat

	Věkové kategorie				
	Pozitivní vzorky (prevalence %)				
	Selata - sající (n=66)	Selata - po odstavu (n=46)	Prasnice (n=33)	Jateční prasata - obsah tenkého střeva (n=51)	Celkem (n=196)
Sapovirus	2 (3.0)	13 (28.3)	0	5 (9.8)	20 (10.2)
Kobuvirus	60 (90.9)	46 (100)	30 (90.9)	35 (68.6)	171 (87.3)
Astrovirus	19 (28.8)	29 (63.0)	7 (21.2)	12 (23.5)	67 (34.2)

Nejvyšší prevalence kobuvirů, astrovirů a sapovirů byla zjištěna ve skupině selat po odstavu. Z celkového počtu 175 prasat, které byly infikovány alespoň jedním sledovaným virem, byla u 41.7% zvířat zjištěna smíšená infekce. Nejčastěji (30.3%) byla detekována koinfekce kobuviry a astroviry. Sapovirová infekce se vyskytovala pouze ve smíšené infekci, a to buď s kobuviry nebo s kobuviry a astroviry. Fylogenetická analýza náhodně vybraných kmenů s kmeny referenčními potvrdila zařazení do rodů *Sapovirus*, *Kobuvirus* a *Astrovirus*. Největší sekvenční homologie byla zjištěna s prasečími kmeny. Nebyly detekovány žádné kmeny blíže příbuzné lidským. Pouze v případě astrovirů byla zjištěna vyšší podobnost aminokyselinových sekvencí s jelením astrovirem CcAstV/DNK (88,2 %) (7) a s lidským astrovirem AstV-1/UK (80,9 %) (8).

Diskuse: Jak vyplývá z výsledků studie, původci virových gastroenteritid se zoonotickým potenciálem, rody *Sapovirus*, *Kobuvirus* a *Astrovirus* se vyskytují v českých chovech prasat u klinicky zdravých jedinců. Vysoká prevalence kobuvirů v chovech prasat potvrzuje, že se kobuviry běžně vyskytují a jedná se o endemickou infekci. V souladu s naší dřívější studií (9) můžeme konstatovat, že je prevalence sapovirů v České republice nízká.

Závěr: Přestože jsme nedetekovali žádné zvířecí kmeny blízkce příbuzné s lidskými, monitoring enterálních virů je velmi důležitý pro získání informací o jejich prevalenci a genetické diverzitě. Výskyt původců virových gastroenteritid se zoonotickým potenciálem v chovech prasat představuje stálou hrozbu pro lidské zdraví.

Poděkování: *Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QH81061 a AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.006, ED006/01/01.*

Literatura:

(1) Wang Q.H. et al. 2007: *Vaccine* 25: 5453-5466, (2) Reuter G. et al. 2011: *Emerg Infect Dis* 16: 869-870, (3) Luo Z. et al. 2011: *Vet Microbiol* 149: 316-323, (4) Khamrin P. et al. 2010: *Infect Genet Evol* 10: 950-954, (5) Kim H.J. et al. 2006: *J Vet Med* 53: 155–159, (6) Yu J. et al. 2009: *Emerg Infect Dis* 15: 823-825, (7) Smits S.L. et al. 2010: *J Gen Virol* 91: 2719-2722, (8) Willcocks M.M. et al. 1992: *Arch Virol* 124: 279-89, (9) Dufkova L. et al. 2011: *Vet Med* 56: 409–415

Poznámky & komentáře

HODNOCENÍ SEPSE A PŘEŽITELNOSTI U NOVOROZENÝCH HŘÍBAT NA JEDNOTCE INTENZIVNÍ PÉČE

Hytychová T., Bezděková B.

Klinika chorob koní, FVL VFU Brno

Úvod: Sepse je popisována jako nejčastější příčina morbidit a mortality novorozených hřibat (1). Patogenní mikroorganismus je možné odhalit kultivací krve. Pro okamžitý výběr vhodného léčiva je nutné vědět, jaké patogenní organismy byly již dříve hemokultivací zjištěny u hřibat v dané lokalitě a jakou vykazují citlivost (2). V České republice nebyla studie zabývající se sepsí u novorozených hřibat do současné doby provedena.

Cíle: Cílem našeho projektu je zjistit pomocí hemokultivace a kultivace dalších adekvátních vzorků druhy bakteriálních patogenů, které se aktuálně podílí na vzniku sepsy u hřibat hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče na Klinice chorob koní VFU Brno. Druhým cílem práce je pozorování přežitelnosti a faktorů s ní souvisejících u sledované skupiny.

Materiál a metody: Do studie byla zahrnuta všechna nemocná novorozená hřibata přijatá na Kliniku chorob koní a ta, která se zde narodila. Po základním klinickém vyšetření při příjmu byly odebrány vzorky krve pro aerobní a anaerobní kultivaci a další laboratorní vyšetření. Všechny vzorky byly odeslány k dalšímu vyšetření a výsledky byly následně zhodnoceny v korelaci s ostatními parametry. Další vzorky pro kultivaci byly odebírány z případných lokalizovaných míst infekce (omfaloflebitid, artritid, pneumonií, enteritid atd.) nebo *post mortem* a porovnány s výsledky hemokultivace. Ze zjištěných výsledků bylo sestaveno septické skóre.

Výsledky: Do studie bylo zahrnuto 25 hřibat. Dvě hřibata byla narozena na Klinice chorob koní a byla bez patologických příznaků onemocnění. U 9/25 hřibat byla hemokultivace pozitivní a bylo vykultivováno 9 bakteriálních druhů. U 3/9 byly nalezeny G+ bakterie, u 4/9 G- bakterie a u 2/9 smíšená populace bakterií. U 11/25 hřibat stanoveno septické skóre ≥ 11 . Devět z 25 hřibat uhynulo nebo muselo být utraceno pro nepříznivou prognózu (tab 1). Přežitelnost je signifikantně vyšší ve skupině neseptických hřibat (92 %) než ve skupině septických hřibat (33 %).

Tabulka 1: Výsledky hemokultivace, septické skóre, stanovená diagnóza a přežitelnost jednotlivých hříbat

hříbě	septické skóre	hemokultivace	diagnóza	přežilo/nepřežilo
1	0	negativní	inguinální kýla	přežilo
2	4	negativní	dysúrie	přežilo
3	14	x	sepse	nepřežilo
4	4	negativní	urachus patens	přežilo
5	9*	negativní	kontraktura karpu	nepřežilo
6	6	Bacillus circulans	klinicky bez obtíží	přežilo
7	8	negativní	selhání transferu Ig	přežilo
8	12	negativní	aspirační pneumonie, kachexie, sepse	přežilo
9	10*	Moraxella lacunata	sepse	nepřežilo
10	18	negativní	prematurita, sepse	nepřežilo
11	6	negativní	asfyxiční syndrom	přežilo
12	19*	negativní	sepse	nepřežilo
13	5	negativní	kolika	přežilo
14	12	Proteus vulgaris, Clostridium perfringens	sepse	přežilo
15	14	negativní	sepse	přežilo
16	14	negativní	prematurita	přežilo
17	6	negativní	klinicky bez obtíží	přežilo
18	8	Enterococcus casseliflavus/gallin	idiopatická hematurie	přežilo
19	14*	Streptococcus beta-haemol. sk. C	septická artritida	nepřežilo
20	11*	Escherichia coli, Staphylococcus xylosus	septická artritida	nepřežilo
21	7*	negativní	retence mekonie	přežilo
22	20*	Acinetobacter baumannii, Escherichia coli	sepse	nepřežilo
23	6	negativní	retence mekonie, krvácení z a. umbilicalis	přežilo
24	10*	Escherichia coli	urachus patens, ARDS, ARF, sepse	přežilo
25	22*	Escherichia coli	sepse, perikarditida, omfaloflebitida	nepřežilo

* pro přesné zhodnocení chybí některá data

Diskuse: V našem souboru byla sepse u novorozených hřibat nejčastější příčinou morbidit a mortalit, což je ve shodě s publikovanými údaji. Jako hlavní patogeny způsobující sepsi u hřibat jsou popsány G- bakterie s pomalým vzestupem zastoupení G+ bakterií (4, 5). Nejčastějšími izoláty bývají *Escherichia coli*, *Actinobacillus*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* a *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Acinetobacter* (3, 5, 6). V naší studii z České republiky byla hemokultivací zjištěna převaha G+ izolátů (5/9). Procento nepřeživších septických hřibat je bohužel poměrně veliké, protože hřibata jsou často přijata na kliniku ve stadiu značně rozvinuté sepse nebo septického šoku, což je pro přežitelnost limitující (7, 8).

Závěr: Výsledky hemokultivačních vyšetření potvrdily zvyšující se tendenci záchytu G+ bakterií u novorozených hřibat hospitalizovaných na jednotce intenzivní péče v České republice. V rámci Kliniky chorob koní je sepse nejčastější příčinou morbidit i mortalit u novorozených hřibat. Přežitelnost závisí na včasnosti terapeutického zásahu a intenzivní péči.

Poděkování: Studie byla podporovaná granty IGA VFU Brno (1/2011/FVL a 46/2012/FLV).

Literatura:

(1) Cohen N.D. 1994: J Am Vet Med Assoc 204: 1644-1651, (2) Laine J.R., Sykes B.W. 2005: J Vet Int Med 19: 445-446, (3) Corley K.T.T. et al. 2007: Equine Vet J 39: 84-89, (4) Russell C.M. et al. 2008: Aust Vet J 86: 266-271, (5) Marsh P.S., Palmer J.E. 2001: J Am Vet Med Assoc 218: 1608-1610, (6) Steward C.D. et al. 2002: J Vet Intern Med 16: 464-471, (7) Hytychová T., Bezděková B. 2012: EVECCS Congres 2012 – submitted, (8) Bezděková B. 2011: Veterinářství 61: 635-639

Poznámky & komentáře

PROGNOSTICKÉ UKAZATELE SYNDROMU DILATACE A VOLVULU ŽALUDKU U PSŮ

Uhríková I.^{1,2}, Lexmaulová-Raušerová L.³, Macháčková K.¹, Tarabová R.¹,
Hložková J.¹, Řeháková K.²

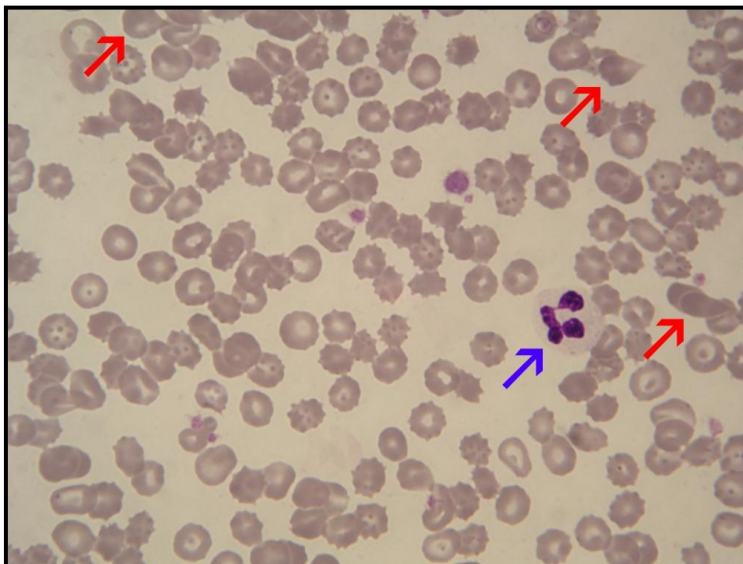
¹Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, ²Klinická laboratoř pro malá zvířata, FVL VFU Brno, ³Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: Syndrom dilatace a volvulu žaludku (GDV) je častým akutním onemocněním postihujícím zejména velká plemena psů. Patogeneze zahrnuje rotaci a dilataci žaludku, což vede ke kompresi v. *cava caudalis* a rozvoji šokového stavu. Hypoperfuze žaludku může vést k nekróze jeho stěny s následnou septickou peritonitidou. Prognóza závisí na délce trvání klinických příznaků, stupni rotace a přítomnosti komplikací (nekróza žaludku, peritonitida, arytmie aj.) (1). Vzhledem k ekonomické náročnosti operačního zákroku považujeme za důležité odhalit prognostické ukazatele indikující výskyt komplikací a tudíž vyšší riziko úmrtí.

Cíle: Cílem studie proto bylo porovnat jednotlivé hematologické a biochemické ukazatele u přeživších a nepřeživších pacientů s dilatací a volvulem žaludku.

Materiál a metody: Do studie bylo zahrnuto celkem 39 psů s GDV, kteří podstoupili terapeutický chirurgický zákrok na Klinice chorob psů a koček FVL VFU Brno. Všem jedincům byla předoperačně odebrána krev na hematologické (stanovení počtu erytrocytů, leukocytů, trombocytů, hematokritu a koncentrace hemoglobinu; Celltac Alpha, Nihon Kohden), biochemické (stanovení koncentrace albuminu, sodíku, draslíku, chloridů, vápníku, fosforu a laktátu: DCP Konelab 20i, Thermo Scientific), acidobazické (stanovení pH, parciálních tlaků kyslíku a oxidu uhličitého s výpočtem koncentrace bikarbonátu a base excess; EasyBloodGss, Medica) a imunologické vyšetření (stanovení koncentrace C-reaktivního proteinu a proteinu high mobility group box 1 (HMGB1); CRP, Biovendor, HMGB1, IBL International). Zvířata byla rozdělena do skupiny přeživších a nepřeživších jedinců a výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí F-testu a T-testu (MS Excel, Microsoft Corp.).

Výsledky: Z celkového počtu 39 jedinců bylo 31 přeživších a 8 nepřeživších. Sedm psů bylo utraceno v průběhu operace z důvodu přítomnosti neoperabilní gastrické nekrózy, jeden pacient uhynul v průběhu pooperační hospitalizace. Z hematologického vyšetření byl signifikantní rozdíl mezi skupinami jak v celkovém počtu leukocytů (průměr přeživších $11,1 \cdot 10^9/l$ vs. nepřeživších $16,1 \cdot 10^9/l$), tak v absolutním počtu neutrofilů ($9,6 \cdot 10^9/l$ vs. $13,7 \cdot 10^9/l$) a eozinofilů ($0,14 \cdot 10^9/l$ vs. $0,03 \cdot 10^9/l$). Počet tyčků ($0,14 \cdot 10^9/l$ vs. $0,79 \cdot 10^9/l$) a dakryocytů (3,5 % vs. 4,3 %, obr. 1) byl sice u nepřeživších vyšší, ale nesignifikantně.



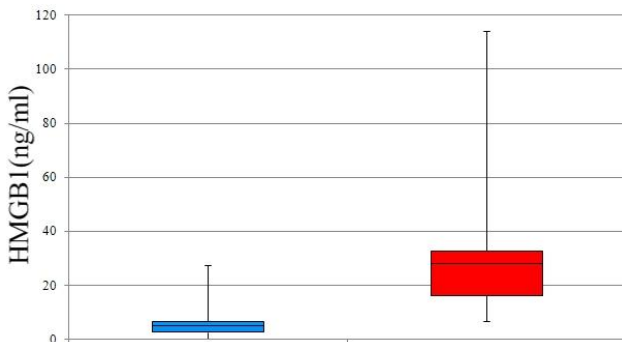
Obr. 1: Výskyt echinocytů (většina buněk) není prognosticky významný. Dakryocyty (červená šipka) jsou u nepřeživších ve vyšším počtu, ačkoliv ne signifikantně. Naproti tomu neutrofilní granulocyty (modrá šipka) jsou u nepřeživších významně zvýšeny.

V biochemickém vyšetření byl signifikantní rozdíl mezi skupinami v koncentraci albuminu (28,4 g/l vs. 23,0 g/l) a laktátu (3,7 mmol/l vs. 8,5 mmol/l).

Acidobazické vyšetření ukázalo signifikantní rozdíly v koncentraci bikarbonátu (23,0 mmol/l vs. 18,5 mmol/l) a base excess (-2,8 mmol/l vs. -8,2 mmol/l), nicméně pH významně odlišné nebylo.

Koncentrace C-reaktivního proteinu (26,8 µg/ml vs. 46,7 µg/ml) a markeru buněčné nekrózy HMGB1, nebyly mezi přeživšími a nepřeživšími signifikantní, ačkoliv hodnoty byly u nepřeživších psů vyšší (graf 1).

Graf 1: Koncentrace HMGB1 u přeživších (modře) a nepřeživších (červeně).



Diskuse: Absolutní počet eozinofilů byl jako indikátor mortality u septických pacientů popsán také u lidí (2), ačkoliv klinické využití tohoto parametru je u psů, stejně jako v humánní medicíně, značně limitováno. Význam koncentrace laktátu u pacientů s GDV jako markeru nekrózy žaludku nebo prognózy onemocnění byl popsán už dříve (3). Zjištěné koncentrace proteinů akutní fáze jsou v rozporu s naší předešlou studií (4), nicméně hodnoty HMGB1 jsou signifikantně vyšší u pacientů s nekrotickou žaludku oproti ostatním.

Závěr: Ze studie vyplývá, že v rámci biochemického a hematologického vyšetření existuje u GDV řada prognostických ukazatelů, kterým doposud nebyla věnována dostatečná pozornost.

Poděkování: Studie byla financována pomocí grantu IGA VFU Brno (24/2011/FVL).

(1) Monnet E. 2003: Vet Clin North Am Small Anim Pract 33: 987-1005, (2) Merino C.A. et al. 2011: J Crit Care *In Press*, (3) Green T.I. et al. 2011: J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 21: 36-44, (4) Uhríková I. et al. 2011: Vet Clin Path 40: 587

Poznámky & komentáře

KONTINUÁLNY MONITORING DIABETICKÉHO PACIENTA

Tarkošová D., Svoboda M.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: Pravidelný monitoring glykémie je základom pre stabilizáciu novodiagnostikovaných a komplikovaných diabetických pacientov. Pre vyhodnotenie efektivity účinku a dĺžky trvania efektu inzulínu ako aj interpretáciu peakov a najnižších hodnôt glykémie je ideálne merať hodnoty glukózy každé 2 hodiny. Pre pacientov je manipulácia a časté odbery glykémii stresujúca, hlavne u mačiek, a to môže skreslovať výsledky kvôli prítomnosti stresovej hyperglykémie (1). Výhodou použitia zariadenia na kontinuálny monitoring glykémie (CGMS) je minimalizácia stresu u pacientov, možnosť merania v domácom prostredí, lepšia detekcia hypoglykémii a možnosť lepšej interpretácie glykemických kriviek (2). Kontinuálny monitoring glykémie je efektívny aj pri stabilizácii kritických pacientov s diabetickou ketoacidózou. Zariadenie umožňuje nastavenie alarmu, ktorý signalizuje zvolené rizikové hladiny glykémie a zabezpečuje včasnú intervenciu rizikových stavov ako hyperglykémia/ hypoglykémia (3). Zariadenie na kontinuálny monitoring glukózy (CGMS) sa aplikuje subkutánne do interskapulárnej oblasti alebo na laterálnu plochu hrudníka a senzor monitoruje hladinu glukózy v intersticiálnej tekutine približne každých 10 sekúnd pomocou glukózovo oxidačnej reakcie (4). Monitorovacie zariadenia sú minimálne invazívne a umožňujú sledovanie hladín glykémie v domácom prostredí a následné lepšie posúdenie individuálneho glykemického profilu s ohľadom na dennú aktivitu, kŕmenie a podávanie inzulínu (5).

Ciele: Možnosť monitoringu glykemického profilu pacientov v domácom prostredí za účelom minimalizácie stresových faktorov a individuálne nastavenie terapie u komplikovaných diabetických pacientov. Interpretácia glykemických profilov a vyhodnotenie kolísanie glykémii v súvislosti s kŕmením, podávaním inzulínu a pohybovou aktivitou.

Materiál a metódy: U vybraných pacientov sa vyholí miesto o veľkosti 10x10 cm na laterálnej ploche hrudníka alebo v interskapulárnej oblasti (individuálne v závislosti od plemena a výživného stavu pacienta). Miesto

sa vydezinfikuje alkoholom a dôkladne vysuší. Potom sa pomocou zavádzača Enlite Serter inzeruje do podkožia senzor Enlite. Po zavedení senzoru sa čaká 5 minút, kým sa hydratuje a potom sa pripojí digitálne meracie zariadenie iPro2. Senzor sa pridrží v pozícii a prilepí sa na kožu hypoalergénnou náplastou. Po správnej fixácii sa zariadenie prilepí ešte z hornej strany. Fixáciu môžeme zlepšiť priložením sterilných gázových štvorcov a zafixujeme prubanom.



Obr. 1: Senzor po prilepení hypoalergénnou lepiacou páskou.

Výsledky: Zariadenie iPro2 bolo použité na kontinuálny monitoring u psa s komplikovaným *diabetes mellitus*. Pacient bol 6 ročný pointer Glen, ktorý bol liečený Caninsulinom v aplikácii 0,5 m.j./kg dvakrát denne s. c. U pacienta bola pozorovaná výrazná kachexia napriek polyfágii, problémy s častým močením a úbytok hmotnosti. Počas terapie boli vyhodnocované glykemické krivky na základe domáceho merania pomocou príručného glukometra Freestyle. Na základe dodaných hodnôt sa predpokladalo správne nastavenie kŕmneho režimu a aplikácií inzulínu. U pacienta začal majiteľ pozorovať rapídne zhoršovanie zraku a zhoršovanie klinických príznakov, preto bol indikovaný kontinuálny monitoring glykémie. Meranie prebiehalo 7 dní. Počas každého dňa majiteľ stanovoval 4 krát pomocou príručného glukometra SD check kalibračné glykémie a zaznamenával si čas kŕmenia a pohybovej aktivity. Výsledky grafov z kontinuálneho

merania ukázali potrebu zmeny času aplikácie inzulínu, úpravu dávky Caninsulínu, a potrebu úpravy časov kŕmenia. Na jednotlivých grafoch boli stanovené najnižšie hodnoty glykémii, najvyššie hodnoty glykémii, dĺžka trvania účinku inzulínu, postprandiálne výkyvy glykémii a bol sledovaný vplyv pohybovej aktivity. Na základe parciálnych výsledkov po prvých 2 dňoch bol upravený čas podávania inzulínu a čas kŕmenia. V priebehu nasledujúcich dní majiteľ sledoval zlepšenie klinických príznakov a pri kontrolnom vyšetrení sme zaznamenali nárast hmotnosti o 350 g za 5 dní.

Diskusia: Výhodou použitia digitálneho zariadenia iPro2 je jeho veľkosť a možnosť dobrej fixácie u pacienta. Zariadenie funguje ako bezdrôtové, čiže zviera nepotrebuje žiadne špeciálne fixačné zariadenie a takmer ho neobmedzuje v aktivitách. Výsledky sú spracované až po ukončení merania retrospektívne, takže je potrebné aby si majiteľ zaznamenával presné informácie o kŕmení, aplikácii inzulínu, pohybovej aktivite a kalibračné hodnoty glykémii. Výsledky a informácie od majiteľa sa potom spracujú pomocou príslušného softwaru a sú vyhodnocované formou grafov. Náš pacient zvládol priebeh merania bez problémov, na základe parciálnych výsledkov bola upravená terapia ktorá viedla u stabilizácii klinických príznakov.

Záver: U monitorovaného pacienta sme zaznamenali dobrú znášanlivosť na zariadenie ktoré si počas monitoringu nevšimol a nijako ho neobmedzovalo. Na základe meraní z prvých dvoch dní boli odhalené hyperglykemické epizódy a nesprávny čas medzi aplikáciami inzulínu ktoré boli následne skorigované a pacientove klinické príznaky sa upravili. Pozorovali sme pozitívny vplyv večerných vychádzok na hladinu glykémie. Zariadenie iPro2 na kontinuálny monitoring glykémie je nápomocné u komplikovaných a zle nastaviteľných diabetických pacientoch. Umožňuje nám individuálny prístup a management inzulínu, kŕmenia a pohybovej aktivity.

Literatúra:

(1) Affenzeller N. et al. 2010: Vet J 184, 2010: 105-110, (2) Fleeman, L.M. 2010: Vet Rec 20: 204-205, (3) Reineke D. et al. 2010 J Vet Emerg Crit Care 20: 303-312, (4) Harman-Boehm I. 2008: Continuous glucose monitoring in type 2 diabetes. Diabetes Res Clin Pr 8: 118-121, (5) Affenzeller N. et al. 2011: Vet Rec 21: 169-206

Poznámky & komentáře

VLIV PITHYUM OLIGANDRUM NA PRŮBĚH DERMATOFYTÓZ MALÝCH ZVÍŘAT V POROVNÁNÍ S KLASICKOU TERAPIÍ

Načeradská M.,^{1,2} Lány P.,² Loučka M.³

¹*Soukromá veterinární ordinace, Praha,* ²*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno,* ³*Ústav matematiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*

Úvod: Dermatofytózy jsou jednou z častých zoonóz diagnostikovaných ve veterinární ordinaci. Nejčastějšími původci dermatofytóz jsou *Microsporum canis* a *Trichophyton mentagrophytes*, méně často pak *Microsporum gypseum* (1,2).

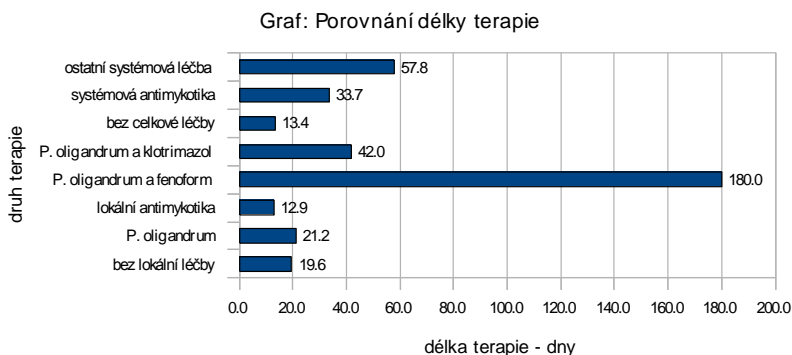
Klinické projevy mohou být různé, v začátku velmi nenápadné. Na postižených místech se objevují jemné krusty nebo drobné šupiny (1). V pozdějších fázích mohou změny vypadat jako kruhové alopetické léze s krustami a se známkami pyodermie, případně granulomy různého rozsahu. Pokud jsou postiženy drápy, jsou křehké a snadno se lámou (2). U neléčených dospělých zvířat může dojít ke spontánnímu vyhojení lézí, ale tento proces může trvat i několik let (1). K diagnostice dermatofytózy způsobené *M. canis* je možné přímo v ordinaci použít UV světlo Woodovy lampy. Další možností je přímé mikroskopické vyšetření změněných chlupů, dále také kultivace změněných chlupů. Tu je možné provést na DTM (dermatophyte test medium) (1,2), ale tento test není příliš spolehlivý. Nejspolehlivějším vyšetřením je kultivace na Sabouraudově agaru, provedená v laboratoři (3). Terapie je možná jak lokální (klotrimazol, elniconazol), tak systémová (griseofulvin, ketokonazol, itrakonazol) antimykotika (1,2). Tlumit výskyt dermatofytózy, je možné i s použitím vakcíny (1). K lokální terapii lze použít biopreparáty využívající přirozený mykoparazitismus houby *Pythium oligandrum* (4-8).

Cíle: Cílem této dotazníkové studie bylo porovnat úspěšnost a délku terapie klasickým způsobem s tou s využitím *P. oligandrum* u praktických veterinárních lékařů v terénu. Dosud publikované případové studie naznačovaly, že by *P. oligandrum* mohlo být úspěšné v terapii dermatofytóz (7,8).

Materiál a metody: Data byla získávána pomocí dotazníku s 31 otázkami, které byly rozesílány veterinárním lékařům emailem, případně předávány osobně. Studie zahrnuje 44 psů, 28 koček, 21 hlodavců a 3 fretky. Data byla získána z 96 dotazníků, týkajících se terapie dermatofytózy vyplněných veterináři z České republiky. Nejčastěji respondenti uvedli jako původce *M. canis* (61), méně často pak *T. mentagrophytes* (21), *Malassaessia* spp. (14) a *M. gypseum* (7). Původce *M. canis* byl u 11 zvířat diagnostikovánv laboratoři, u 41 zvířat s využitím DTM půdy a ve dvou případech s využitím obou možností. Původce *T. mentagrophytes* byl u jednoho zvířete diagnostikován v laboratoři a 15 zvířat na DTM. Malassaessie byly ve všech případech diagnostikovány pod mikroskopem. *M. gypseum* bylo ve 2 případech diagnostikováno v laboratoři a ve 4 na DTM. U 6 zvířat nebyl původce určen. Zastoupení pohlaví bylo téměř rovnocenné, 47 samic a 49 samců. Z postižených zvířat bylo 48 krátkosrstých (50 %), 34 dlouhosrstých (35 %). Většina zvířat byla pravidelně očkovaná (77 %) a většina zvířat pocházela z města (6 %). U všech zvířat bylo provedeno klinické vyšetření, u 48 % zvířat bylo provedeno trichoskopické vyšetření, u 63 % zvířat byla provedena kultivace na DTM a pouze u 17 % zvířat byla provedena kultivace v laboratoři.

Výsledek: Délka terapie *P. oligandrum* byla srovnatelná s délkou terapie ostatními preparáty (klotrimazol, enilkonazol, griseofulvin, itraconazol, ketokonazol) (Graf 1).

Graf 1: Porovnání délky terapie



Lokální terapie byla úspěšná u 24 z 37 léčených *P. oligandrum* (62 %), u ostatních účinných látek 42 z 62 léčených (68 %). Celková terapie byla úspěšná u 19 z 21 zvířat (90 %). Terapeutická vakcína byla aplikována 24 z 96 zvířat (25 %), z toho u 19 zvířat byla terapie úspěšná (79 %). Kontrola terapie byla u 53 z 96 (55 %) prováděna pouze na základě klinického vyšetření, celkem bylo závěrečné klinické vyšetření provedeno u 86 z 96 zvířat (90 %). Trichoskopie byla provedena pouze u 20 zvířat, kultivace na DTM půdě u 26 a kultivace v laboratoři u 8 zvířat.

Účinnost terapie *P. oligandrum* byla srovnatelná s účinností klasické lokální terapie a délka terapie byla také srovnatelná.

Závěr: Klinický efekt léčby *P. oligandrum* v publikovaných případových studiích naznačoval, že by léčba mohla trvat kratší dobu než u klasické konvenční terapie (7,8). Předložená studie tento výsledek nepotvrzuje, ale může to být i díky méně častým aplikacím, než v publikovaných případových studiích. V předložené studii převažuje u lokální terapie aplikace 2x týdně. Osobní zkušenosti s touto léčbou však ukazují, že je zapotřebí 4 aplikací týdně k dobrému klinickému výsledku. Na dobré statistické vyhodnocení je však současný počet zvířat stále malý.

Literatura:

(1) Svoboda, M. et al. 2000: Nemoci psa a kočky 1. díl. Noviko, a.s., Brno: 408-413, (2) Foster A.P. et al. 2003: BSAVA Manual of Small Animal Dermatology, 2nd Edition, BSAVA, Gloucester, England: 169-174, (3) Shadomy H.J. et al. 1980: Am J Clin Pathol 74: 197-201, (4) <http://www.zdravcentra.cz/cps/rde/xbcr/zc/Farmakoterapie-3-2007-659-Soucasne-moznosti-terapie-onychomykoz.pdf>, (5) Mencl K. 2001: Přírodou proti dermatomykózám. Derma 1: 8-12, (6) Mencl K. et al 2007: Dermatologie 1 : 151-154, (7) Načeradská M. et al. 2011: Veterinární lékař 9: 11-16, (8) Načeradská M. et al. 2010 : Veterinářství 10: 559-563

Poznámky & komentáře

KVANTITATIVNÍ ANALÝZA HISTOLOGICKÝCH ZMĚN SEMENOTVORNÉHO EPITELU VARLAT KOCOURŮ PŘI REVERZIBILNÍ SUPRESI POHLAVNÍ AKTIVITY GNRH AGONISTOU DESLORELINEM

Novotný R.¹, Čížek P.², Vitásek R.¹, Bartošková A.¹, Přinosilová P.³,
Janošovská M.¹

¹Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, ²Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno, ³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Úvod: Využití analogů hypotalamického GnRH v lékové formě, zajišťující dlouhodobé uvolňování, je v současnosti velmi efektivní možností suprese pohlavní aktivity samců i samic kočky domácí (1,2,3). V případě kocourů přináší výhody spojené s eliminací samčího chování (značkování páchnoucí močí, agresivita) (4), ale na rozdíl od chirurgické kastrace nemá toto řešení definitivní charakter. (5,6). Desensibilizace GnRH receptorů v hypofýze vede k přerušení produkce gonadotropinů a poklesu tvorby testosteronu. Následuje snížení libida, zastavení spermiogeneze a infertilita. (4,7) Histologickým vyšetřením varlat psů po dlouhodobém působení implantátu s GnRH agonistou bylo prokázáno potlačení spermiogeneze na úroveň spermatogonií a primárních spermatocytů (5,6).

Cíle: Potvrdit kontracepční účinnost a bezpečnost použití implantátu s GnRH agonistou deslorelinem u kocourů, na histologické úrovni ověřit stupeň suprese spermiogeneze a kvantifikovat proběhlé změny.

Materiál a metody: 27 zdravých, pohlavně dospělých kocourů rozdělených následovně: kontrolní skupina - n=5, skupina 1 (implantace deslorelinu, sledování v průběhu 4 měsíců po implantaci) - n=14, skupina 2 (implantace deslorelinu, 4 měsíce po implantaci vyjmutí, sledování další 4 měsíce) - n=8. V průběhu kontrol byla u zvířat sledována velikost varlat, koncentrace testosteronu po stimulaci HCG (T4) a kvalita ejakulátu. Ve skupině 1 byli v týdnech 4, 8, 12 a 16 vždy 3 až 4 kocouři kastrováni a získaná varlata histologicky posouzena. Kocourům ve skupině 2 byl v týdně 16 implantát vyjmut a v týdnech 20, 24, 28 a 32 byli vždy 2 samci kastrováni a získaná varlata histologicky zhodnocena. Histologická analýza

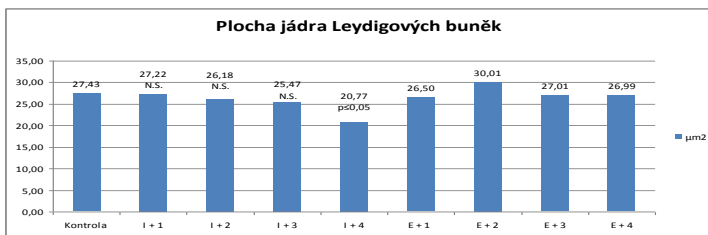
byla provedena kategorizací příčných řezů stočenými semenotvornými kanálky podle přítomnosti nejvyvinutější zárodečné buňky. Dvě stě příčných řezů jsme rozdělili do kategorií tt0 - nejvyvinutější zárodečná buňka spermatogonie, tt1 - spermatocyt, tt2 - okrouhlá spermatida, tt3 - elongující se spermatida, tt4 - elongovaná spermatida. Podle převažujícího typu tubulů jsme zařadili zvířata do skupin G1 - většina tt1, G2 - tt2, G3 - tt3 a G4 - tt4. K posouzení úrovně endokrinní aktivity varlat byla měřena průměrná plocha jader Leydigových buněk.

Výsledky: U zvířat ve skupině 1 došlo k signifikantnímu poklesu hladin T4, zmenšení varlat a poklesu celkového počtu spermií v ejakulátu. Ve skupině 2 jsme pozorovali v průběhu 16 týdnů od explantace návrat hladin T4 do fyziologických hodnot, nárůst velikostí varlat a zvýšení celkového počtu spermií v ejakulátu na hodnoty měřené před zavedením implantátu, nebo v kontrolní skupině. Výsledky histologického vyšetření jsou uvedeny v tab. 1, výsledky měření plochy jader Leydigových buněk v grafu 1.

Tab. 1: Výsledky histologického vyšetření

	Číslo zvířete	tt0	tt1	tt2	tt3	tt4	Celkem	Skupina
Kontrola	2	0.0%	7.5%	24.5%	3.5%	64.5%	100.0%	G4
	7	0.0%	7.5%	20.5%	9.5%	62.5%	100.0%	G4
	26	0.0%	0.0%	20.5%	3.0%	76.5%	100.0%	G4
	28	0.0%	0.0%	23.0%	3.0%	74.0%	100.0%	G4
	29	0.0%	0.0%	11.5%	9.5%	79.0%	100.0%	G4
IMPLANTACE								
I + 1	15	0.0%	1.5%	13.5%	12.5%	72.5%	100.0%	G4
	10	0.0%	0.5%	20.0%	6.0%	73.5%	100.0%	G4
	23	0.0%	2.0%	26.5%	9.5%	62.0%	100.0%	G4
	22	0.0%	0.0%	16.5%	4.5%	79.0%	100.0%	G4
I + 2	1	0.0%	0.0%	15.0%	26.0%	59.0%	100.0%	G4
	11	0.0%	0.0%	8.5%	75.0%	16.5%	100.0%	G3
	20	0.0%	4.5%	38.0%	9.0%	48.5%	100.0%	G4
I + 3	24	0.0%	2.5%	70.0%	17.0%	10.5%	100.0%	G2
	13	2.5%	7.0%	47.5%	5.0%	38.0%	100.0%	G2
	21	0.0%	27.5%	51.0%	12.5%	9.0%	100.0%	G2
I + 4	14	33.5%	65.5%	1.0%	0.0%	0.0%	100.0%	G1
	3	0.0%	7.0%	40.0%	45.5%	7.5%	100.0%	G3
	17	2.0%	14.5%	49.0%	4.0%	30.5%	100.0%	G2
	12	0.0%	2.0%	14.5%	7.5%	76.0%	100.0%	G4
EXPLANTACE								
E + 1	19	0.0%	4.5%	35.0%	7.5%	53.0%	100.0%	G4
	16	0.0%	0.5%	32.5%	3.5%	63.5%	100.0%	G4
E + 2	9	0.0%	0.0%	32.5%	4.5%	63.0%	100.0%	G4
	18	0.5%	3.0%	21.0%	9.0%	66.5%	100.0%	G4
E + 3	6	7.5%	7.0%	34.0%	13.5%	38.0%	100.0%	G4
	8	0.0%	0.0%	17.0%	8.5%	74.5%	100.0%	G4
E + 4	5	0.0%	0.0%	22.0%	8.0%	70.0%	100.0%	G4
	4	5.0%	7.0%	14.5%	6.5%	67.0%	100.0%	G4

Graf 1: Výsledky měření plochy jader Leydigových buněk



Diskuse: Snížení koncentrace testosteronu, velikosti varlat a celkového počtu spermií v ejakulátu prokazují účinnost kontracepční metody u kocourů. Histologické vyšetření semenotvorného epitelu ukazuje na výraznou interindividuální variabilitu a potvrzuje předpoklad, že v prvních dvou měsících je nejvýznamnější kontracepčním faktorem pokles libida způsobený snížením produkce testosteronu. Snížená endokrinní aktivita byla potvrzena i významným zmenšením plochy jader Leydigových buněk u kocourů čtyři měsíce po implantaci. Teprve po 12 týdnech od implantace deslorelinu dochází k histologicky prokazatelnému potlačení spermiogeneze a je tedy nutno do té doby považovat zvíře za plodné.

Závěr: Deslorelin představuje účinnou, bezpečnou a vratnou alternativu k chirurgické kastraci kocourů, nicméně s výraznými individuálními rozdíly v nástupu účinku. Vzhledem k zachované spermiogenezi ještě 8 týdnů po implantaci deslorelinu, neznamená snížené libido a pokles počtu spermií v ejakulátu jednoznačnou sterilitu zvířete. Nástup spermiogeneze již 4 týdny po odstranění implantátu potvrzuje reverzibilitu metody.

Poděkování: Studie byla finančně podpořena grantem IGA VFU Brno (49/2010/FVL).

Literatura

(1) Munson L. 2006: Theriogenology 66: 126-134, (2) Kutzler M. et al. 2006: Theriogenology 66: 514-525, (3) Munson L. et al. 2001: J Reprod Fertil 57: 269-273, (4) Goericke-Pesch S. et al. 2011: Theriogenology 75: 803-810, (5) Ludwig C. et al. 2009: Theriogenology 71: 1037-1045, (6) Goericke-Pesch S. et al. 2009: Reprod Domest Anim 44: 302-308, (7) Junaidi A. et al. 2003: Reprod Fertil Dev 15: 317-322, (8) Herron M. A. et al. 1986: Theriogenology 26: 357-364

Poznámky & komentáře

DOČASNÁ SUPRESE ŘÍJE U KOČEK POMOCÍ GnRH AGONISTY DESLORELINU

Janošovská M., Vitásek R.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: V současnosti jsou dostupné různé metody k potlačení říje u koček. Dočasnou kontracepci je možné navodit hormonální supresí cyklu nebo imunokontracepcí (1). Hormonální preparáty s přímým účinkem na pohlavní orgány nesou velké riziko nežádoucích účinků (patologický růst mléčné žlázy, pyometra, androgenizace atd.) a metody imunokontracepce nejsou v současnosti dostatečně rozvinuté (1, 2). Jako ideální se jeví GnRH agonista v dlouhodobě působící formě, která umožňuje jeho uvolňování v pulzech (podkožní implantát) (1).

Cíle: Cílem naší studie je vyvolání dočasného anestru u koček pomocí GnRH agonisty deslorelinu, ve formě podkožního implantátu Suprelorin 4,7 mg a následné sledování nástupu říje po vyjmutí implantátu z podkoží.

Materiál a metody: Ve studii bylo zahrnuto 17 koček různých plemen (věk 1 až 5 let). Všechny kočky pocházely ze soukromých chovů a byly zařazeny do sledování na základě informovaného souhlasu majitelů. Šestnáct koček bylo již minimálně jednou v říji, jedna kočka byla zahrnuta do sledování před první říjí (tab. 1: Fe č. 9). Čtyři kočky byly v období před zařazením do sledování chovné (tab. 1: Fe č. 2, 5, 6, 12), 13 koček byly nullipary. Kočky byly v době zařazení do sledování v různých fázích pohlavního cyklu. Fáze cyklu byla upřesněna stanovením koncentrace sérového estradiolu (tab. 1: estr. 1) a progesteronu (tab. 1: prog. 1) před aplikací implantátu. Kočkám byl aplikován implantát do podkoží v oblasti pravé lopatky. Kočky byly v domácí péči sledovány majitelem. Měsíc po zavedení implantátu byl stanoven sérový estradiolu (tab. 1: estr. 2) a progesteronu (tab. 1: prog. 2). Po čtyřech (14 koček), pěti (2 kočky) a sedmi (1 kočka) měsících od zavedení (tab 1), byl implantát vyjmut (explantace) přes drobnou kožní incizi (do 4 mm), kočky byly v celkové anestezii (medetomidin-hydrochlorid v dávce 100 µg pro toto v kombinaci s ketaminem v dávce 10 mg/kg). Po zotavení z anestezie byla zvířata předána do domácí péče. V domácím prostředí majitelé sledovali jejich

chování, a při prvních příznacích říje přivedli kočky k odběru krve na stanovení hladiny sérového estradiolu a progesteronu.

Výsledky: Estradiol 1 ukázal, že 7 koček bylo na začátku sledování v říji, u ostatních koček byla hladina estradiolu nižší než 15 pg/ml (hodnota svědčící o anestrui) (3). Vyšetření sérového progesteronu dále prokázalo, že u dvou koček došlo k ovulaci a probíhá luteální fáze (Fe č. 13, 14), (4), (tab. 1: prog. 1). Po aplikaci implantátu nebyly pozorovány žádné nežádoucí účinky. Při kontrolním odběru krve měsíc po aplikaci byly u 14 koček hladiny estradiolu na bazální hladině, u 3 koček (kočky č. 1, 3, 4) byly hodnoty estradiolu svědčící o probíhajícím estru. Progesteron byl zvýšený pouze u jedné kočky (tab. 1: prog. 2). U 23,5 % koček (4 ze 17) nebyla říje po explantaci majitelem pozorována. Tyto kočky byly sledovány 7 (Fe č. 9), 6 (Fe č. 10), 5 (Fe č. 12) a 4 (Fe č. 16) měsíce po vyjmutí implantátu, poté byly na žádost chovatelů vykastrovány (tab. 1). U tří koček byly nalezeny malé vaječníky bez makroskopického nálezu folikulů nebo žlutých tělísek. U jedné kočky (Fe č. 12) byly na vaječniku drobné folikuly (do 2 mm). U zbylých 13 koček říje nastoupila za 122±108 dní (tab. 1). Z těchto 13 zabřezlo při první říji po explantaci 9 koček. 3 ze 4 nebřezích koček byly na žádost majitele vykastrovány v říji (nález folikulů na ovariích ve velikostech 3–6 mm) a jedna byla neúspěšně nakryta (Fe č. 5).

Tabulka 1: Hormonální vyšetření v den 0 a den 30 po implantaci deslorelinu, čas od zavedení po explantaci (exp.) a sledování nástupu a plodnosti říje

Fe č.	Estr. 1 Den 0 pg/ml	Prog. 1 Den 0 ng/ml	Estr. 2 Den 30 pg/ml	Prog. 2 Den 30 ng/ml	Exp. za měsíce	Říje po exp. za Dny	Březí
1	30	0,4	22,2	2	4	183	Ano
2	45	0,8	4,9	1,7	5	49	Ano
3	60	0,3	51,7	1,5	4	265	Ne
4	34	1	55,8	3,7	4	382	Ne
5	45,5	1,2	4,9	0,7	4	99	Ne
6	9,5	0,3	4,9	0,2	4	28	Ano
7	11,4	0	4,9	0,1	4	134	Ano
8	4,9	0	4,9	0	4	55	Ano
9	4,9	0	4,9	0,1	4	Ne	Ne
10	4,9	0,2	4,9	0,8	4	Ne	Ne
11	4,9	0	4,9	0,1	4	39	Ano

12	29	0.4	4.7	22.9	4	Ne	Ne
13	16,5	16.5	4.9	0.2	4	30	Ano
14	4,9	17.6	7.6	0.3	4	190	Ano
15	14.9	0.2	4.9	0.3	5	17	Ne
16	4,9	0.1	4.9	0.2	4	Ne	Ne
17	13,2	0.3	4.9	0	7	125	Ano

Diskuse: Výsledky naší studie potvrdily, že deslorelin ve formě podkožního implantátu je účinným prostředkem k potlačení říje u koček (5, 6). Na rozdíl od dřívějších výsledků, kde 30 dní po aplikaci 6 mg deslorelinového implantátu došlo k poklesu fekálního estradiolu pod bazální hodnotu (5) byly v naší studii hodnoty sérového estradiolu 30 dní po aplikaci u 18 % koček (3 ze 17) zvýšené. Pokud bereme v potaz pouze kočky, u kterých byla hodnota estradiolu zvýšená již při prvním vyšetření (a zároveň u nich nedošlo k ovulaci, kterou ukazuje hladina sérového progesteronu), pak byl po 30 dnech estradiol stále zvýšený u 50 % koček (3 z 6). Dvě z těchto koček byly chovány samostatně v domácnosti a jedna s volným pohybem venku. U žádné z 11 koček, které měly na začátku sledování hodnoty estradiolu svědčící o anestru, nebyl měsíc po aplikaci estradiol zvýšený. Dosud žádná studie neřešila nástup pohlavního cyklu po odstranění implantátu z podkoží. Naše výsledky vykazují velmi vysokou variabilitu v nástupu říje, což je patrné i ve studiích, kde byl implantát ponechán v podkoží po celou dobu účinku (5, 6). Přes vysokou variabilitu v době nástupu první říje po explantaci byla tato v 69 % plodná. Plodnost říje není ovlivněna paritou sledovaných koček. Na základě dostupných informací (5, 6) nelze přesně určit délku působení implantátu v podkoží. Z naší studie vyplývá, že pokud je implantát z podkoží vyjmut, je doba přetrvávajícího účinku deslorelinu vysoce variabilní.

Závěr: Deslorelin ve formě podkožního implantátu je účinný jako kontraceptivum u koček. Po vyjmutí implantátu z podkoží dochází k nástupu říje ve variabilních intervalech.

Literatura:

(1) Munson L. 2006: Theriogenology 66: 126-134, (2) Kutzler M. et al. 2006: Theriogenology 66: 514-525, (3) Svoboda M. et al. 2001: Nemoci psa a kočky II. díl: 1258 stran, (4) Paape S. R. et al. 1975: Biol Reprod 13: 470–474, (5) Munson L. et al. 2001: J Reprod Fertil Suppl 57: 269–273, (6) Toydemir T.S.F. et al. 2012: Theriogenology 77: 662–674

Poznámky & komentáře

VLIV OPAKOVANÉHO ODBĚRU EJAKULÁTU HŘEBCE NA MRAZITELNOST SEMENE

Mráčková M., Vinkler A., Vavrouchová E., Sedlinská M.

Klinika chorob koní, FVL VFU Brno

Úvod: U hřebců je pro získání semene k umělé inseminaci jedinou vhodnou alternativou odběr do umělé vaginy (1). Každý odběr a kvalitní zpracování ejakulátu, odstranění semenné plazmy, ekvibrace a zamrazení, je časově i personálně náročné (2,3). Jednou z možností, jak celý proces zjednodušit, je dvojitý odběr hřebce během jednoho dne. Pokud je však časový odstup mezi odběry krátký, dochází podle výsledků některých studií k poklesu koncentrace spermií v ejakulátu, jejich motility a k poklesu pH ejakulátu (4,5). Tato práce měla ověřit, zda dvojitý odběr hřebce v krátkém časovém intervalu má vliv na kvalitu spermatu a jeho mrazitelnost.

Cíle: Cílem práce bylo posoudit vliv opakovaného odběru ejakulátu hřebce během jednoho dne na kvalitativní ukazatele semene a na jeho mrazitelnost.

Materiál a metody: Sledování bylo prováděno u 20 licencovaných plemenných hřebců. Po odběru do umělé pochvy byl ejakulát přes filtr přelit do nahřáté kalibrované skleněné nádoby, kde proběhlo určení objemu ejakulátu (ml). Hodnoceno bylo 41 dvojic ejakulátů, které byly rozděleny do 4 skupin podle délky časového intervalu mezi jednotlivými odběry. Skupina A: odběry v rozmezí do 90 minut (n=14). Skupina B: odběry v rozmezí 90-120 min (n=12). Skupina C: odběry v rozmezí 120-180 min (n=11). Skupina D: odběry v rozmezí delším jak 180 min (n=4). Mikroskopicky byla hodnocena motilita, koncentrace a morfologie. Poté byly ejakuláty odstředěny (200G po 10 minut), supernatant byl odsát a sediment spermií byl resuspendován ve francouzském ředidle. Ejakulát byl rozplněn do pejet (0,5 ml). Ty byly uzavřeny a po ekvibraci (2 h) při teplotě +4°C zmrazeny v kovovém toulci vychlazeném na teplotu -90°C po dobu 10 min. Pak byly pejety přeneseny do tekutého dusíku (-196°C). Pro zhodnocení byly pejety rozmrazovány ve vodní lázni o teplotě 38,5°C po dobu 30 sekund. Kritériem mrazitelnosti byla motilita po rozmrazení posuzovaná ve světelném mikroskopu (zvětšení 400x). Ejakuláty mající motilitu pod 30% byly považovány za špatně mrazitelné, ty s motilitou

30% a více byly považovány za dobře mrazitelné. Pro statistické zhodnocení výsledků byl zvolen neparametrický Wilcoxonův párový test, pro posouzení mrazitelnosti prvních a druhých odběrů byl zvolen χ -kvadrat test.

Výsledek: Doba mezi dvěma odběry má významný vliv na hodnoty druhých ejakulátů (tab. 1,2). Statisticky významně ($p < 0,05$) byl ovlivněn objem ejakulátu u skupiny A. U dalších skupin nedošlo ke změnám, u skupiny D byla tendence k většímu objemu. Ovlivněna byla koncentrace spermií, která byla ve druhých ejakulátech statisticky významně nižší ($p < 0,05$) s výjimkou skupiny D. S nižší koncentrací úzce souvisí i významně snížený ($p < 0,01$) celkový počet spermií v ejakulátech opět s výjimkou skupiny D. Motilita spermií byla u prvních i druhých ejakulátů zcela srovnatelná, stejně jako procento morfologicky změněných spermií.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty prvních a druhých ejakulátů (skupiny A a B)

parametr	Skupina A (n=14)		Skupina B (n=12)	
	První odběr (průměr±SD)	Druhý odběr (průměr±SD)	První odběr (průměr±SD)	Druhý odběr (průměr±SD)
Objem bez gelové frakce (ml)	93±40,3*	68±27,1*	68±30,6	66±25,1
Motilita po odběru (%)	64±8,7	64±6,6	64±10,3	62±8,6
Koncentrace spermií ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	165±52,9**	120±55,2**	195±124,7*	127,9±70,3*
Celkový počet spermií ($\times 10^9$)	14±4,8*	8±5,5*	12±6,5*	8±4,8*
Morfol. abnormální spermie (%)	45±3,2	44±3,9	36±8,8	36±9,3
Motilita po rozmrazení (%)	24±2,4	29±2,1	28±14,1	27±13,6

statisticky významný rozdíl * $p < 0,05$ mezi 1. a 2. ejakulátem

statisticky velmi významný rozdíl ** $p < 0,01$ mezi 1. a 2. ejakulátem

Tabulka 2: Průměrné hodnoty prvních a druhých ejakulátů (skupiny C a D)

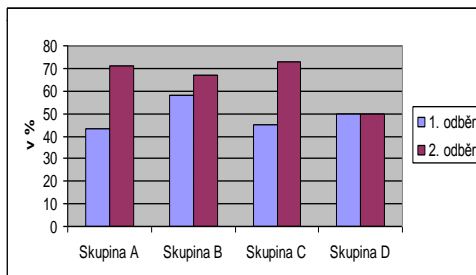
parametr	Skupina C (n=11)		Skupina D (n=4)	
	První odběr (průměr±SD)	Druhý odběr (průměr±SD)	První odběr (průměr±SD)	Druhý odběr (průměr±SD)
Objem bez gelové frakce (ml)	88±19,4	76±30,0	71±46,5	120±44,9
Motilita po odběru (%)	52±21,0	57±12,5	58±5,0	60±0,0
Koncentrace spermií ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	189±59,1*	101±38,8*	218±103,6	106,8±65,1
Celkový počet spermií ($\times 10^9$)	16±5,0**	8±4,1**	12±3,0	10±6,3
Morfol. abnormální spermie (%)	34±13,4	39±12,7	44±3,5	47±11,6
Motilita po rozmrazení (%)	30±17,6	31±8,6	25±8,7	25±8,7

statisticky významný rozdíl * $p < 0,05$ mezi 1. a 2. ejakulátem

statisticky velmi významný rozdíl ** $p < 0,01$ mezi 1. a 2. ejakulátem

Ve všech časových intervalech byla mrazitelnost druhých ejakulátů vyšší (graf 1). Při statistickém zpracování byl tento fakt těsně pod hranicí statistické významnosti.

Graf 1: Dobře mrazitelné ejakuláty (motilita po rozmrazení nad 30 %)



Diskuse: Stejně jako v již publikovaných studiích (4,5) jsme zjistili, že v druhých odběrech v krátkém časovém intervalu (skupina A) dochází k významnému snížení koncentrace spermií a tím i k poklesu jejich celkového počtu. Nepotvrdili jsme pokles motility spermií a pozorovali jsme významný pokles u objemu ejakulátu na rozdíl od výsledků již publikované studie (4). V dalších skupinách docházelo k vyrovnávání všech sledovaných parametrů a v poslední skupině D již ejakuláty výše uvedené změny nevykazovaly, naopak u objemu byla tendence k jeho zvyšování. Při statistickém zhodnocení mrazitelnosti ejakulátů jsme se dostali těsně pod hranici statistické významnosti. Lze ale předpokládat, že při zhodnocení většího počtu ejakulátů bychom mohli potvrdit lepší mrazitelnost ejakulátů z druhých odběrů.

Závěr: Při krátkém odstupu mezi dvěma odběry se významně mění objem, koncentrace i celkový počet spermií. S prodlužující se dobou mezi odběry se však všechny parametry vyrovnávají. Druhé ejakuláty jsou při opakovaných odběrech vhodné k mrazení a dokonce se zdají i lépe mrazitelné než ty z prvních odběrů.

Literatura:

(1) Seime H. et al. 2002: Theriogenology 58: 313-16, (2) Pruit A. et al. 1993: Theriogenology 39: 291, (3) Brinsko S. et al. 2000: Theriogenology 54: 129-136, (4) Gamboa S. et al. 2011: J Equine Vet Sci 31: 109-115, (5) Seime H. et al. 2004: Theriogenology 61: 769-84

Poznámky & komentáře

ELEKTROMYOGRAFIE V DIAGNOSTICE NEUROMUSKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ PSŮ A KOČEK

Hájek I.¹, Schánilec P.¹, Dufek J.²

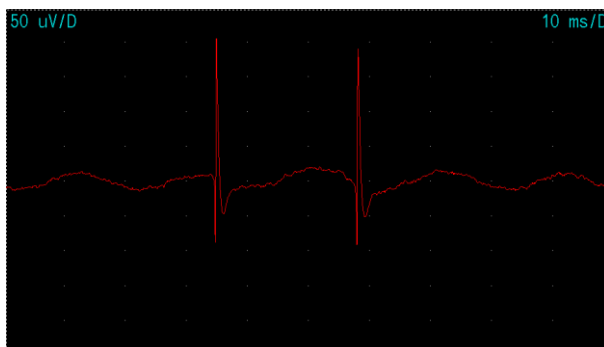
¹Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, ²Privátní neurologická praxe/EP laboratoř, Brno

Úvod: Elektromyografie (EMG) jako vyšetřovací technika používaná v humánní i veterinární medicíně vznikla v návaznosti na rozvoj oboru neurofyziologie. Patří mezi klinické postupy hodnotící funkční stav motorického systému (respektive senzomotorického), jehož studium začalo již v renesanci prací da Vinciho a vědeckému zájmu podléhá dodnes. Podstatou EMG je sledování elektrické aktivity svalů, která není patrná pouze při muskulární kontrakci, ale i u relaxovaných svalů jako spontánní aktivita v případě různých myopatií nebo u zdravých svalů jako tzv. ploténkový šum. Počátek této elektrofyziologické techniky lze datovat do roku 1851, kdy Du-Bois Reymond s využitím baňky s elektrolytem jako prvního typu elektrody registroval elektrickou odpověď ze svalu při volní kontrakci. Stále nové poznatky elektrofyziologie (elektrický náboj membrány nervových a svalových buněk, schopnost změny potenciálu), která podléhala velmi bouřlivému rozvoji od poloviny 20. století (uděleno několik Nobelových cen), přispěla k rozvoji EMG jako nepostradatelné metody při vyšetření nervů a svalů v celé řadě neuromuskulárních onemocnění.

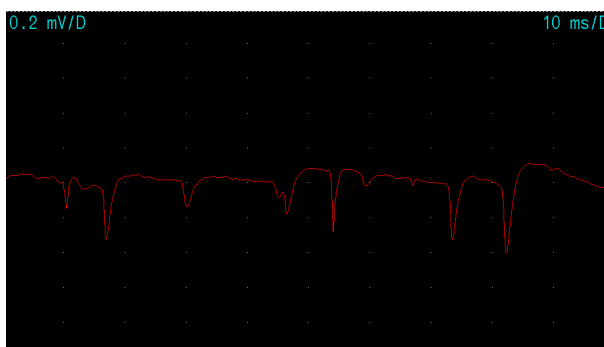
Materiál a metody: Pro prezentaci byli vybráni tři pacienti s různými neurologickými symptomy a diagnózami. Prvním byl tříletý nekastrovaný labrador s omezenou hybností čelistí, druhým sedmiletá nekastrovaná fena WHW teriéra se spasticitou všech končetin a posledním tříletý nekastrovaný kocour bengálské kočky se slabostí pánevních končetin a plantigrádním postojem. U všech těchto pacientů bylo provedeno elektromyografické vyšetření postižených svalových skupin pomocí přístroje Keypoint® Portable (Medtronic, Dánsko) za použití koncentrické jehlové registrační elektrody.

Výsledky: Vyšetřením *mm. masseteres* prvního pacienta byla potvrzena zachovalá inzerční aktivita. Dále byla zjištěna významná spontánní aktivita

v podobě pozitivních ostrých vln (PSW – *positive sharp waves*) a fibrilačních potenciálů (FIP – obr. 1). V záznamu volní aktivity byl zaregistrován její úbytek (obr. 2) a ložiskově byly nalezeny nízké potenciály. U druhého pacienta byly ze svalů pánevních končetin (*m. semitendinosus*, *m. semimembranosus*) snímány rychlé výboje jednotlivých motorických jednotek s vytvořením interferenčního vzorce. U posledního pacienta byla zaznamenána výrazná spontánní aktivita kaudálních svalů pánevních končetin (PSW – obr. 3, *m. gastrocnemius*), nepřítomná v proximálních svalech. Zjevné změny tvaru potenciálů nebyly pozorovány.



Obr. 1: Spontánní aktivita – fibrilační potenciály (FIP, krátké trifazické potenciály o trvání do 3-4 ms s úvodní pozitivitou).



Obr. 2: Úbytek volní aktivity – frekvence aktivity motorických jednotek je nad 30 Hz.



Obr. 3: Spontánní aktivita - pozitivní ostré vlny (PSW, monofazické potenciály s prudkou pozitivní výchylkou a postupným návratem k bazální linii).

Diskuse: V diagnostice onemocnění prvního pacienta přispělo EMG vyšetření společně s ostatními nálezy k potvrzení diagnózy myositidy maseterů, která je nejčastěji způsobena autoimunitní reakcí pravděpodobně proti nově objevenému antigenu mMyBP-C (1) ve žvýkacích svalech, tato reakce může být vyvolána i bakteriálními antigeny (2). U druhého pacienta pozorovaný interferenční vzorec je elektromyografickým důkazem tetanu. Dochází zde k rychlé a opakované aktivaci jednotlivých motorických jednotek. Díky absenci změn tvarů potenciálů u třetího pacienta vylučující čistě myogenní poškození jsme ve spojení s nižší naměřenou rychlostí vedení vzruchu v *n. tibialis* vyslovili susp. diagnózu distální neuropatie bengálských koček, která se u tohoto plemene objevuje kolem jednoho roku života (3).

Závěr: Elektromyografie má nezastupitelnou roli v humánní medicíně, kde se podílí na diagnostice mnoha desítek neuromuskulárních onemocnění. Její využití ve veterinárním lékařství je stále poměrně omezené, poskytuje však velmi cenné informace, kterých jsme úspěšně využili v diagnostice prezentovaných pacientů.

Literatura:

(1) Wu X. et al. 2007: J Immunol 179: 4939-44, (2) Shelton G. et al. 1987: J Vet Intern Med 1: 36-44, (3) Pettigrew R. et al. 2005: Diagnosis and Outcome ACVIM

Poznámky & komentáře

RENTGENOLOGICKY PATRNÉ ZMĚNY *LIGAMENTUM PATELLAE* U PSŮ PO OPERACI TTA

Stehlík L., Proks P., Fedorová P., Nečas A.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: Poškození předního zkříženého vazů (*ligamentum cruciatum craniale*, LCC) patří mezi nejčastější onemocnění kolenního kloubu psů (1). Porušená integrita předního zkříženého vazů způsobí translační a rotační instabilitu kolenního kloubu (2). Pro dosažení opětovné stability kolenního kloubu s poškozením LCC bylo vyvinuto mnoho operačních postupů. Všechny tyto metody se dají rozdělit na statické a dynamické (3,4). Mezi nejpopulárnější metody dynamické stabilizace kolenního kloubu patří tzv. TPLO (Tibial Plateau Leveling Osteotomy) a TTA (Tibial Tuberosity Advancement) (3). Několik studií uvádí vznik patelární desmopatie po TPLO s různým procentuálním zastoupením (1,3,5). Pouze jediná publikace se zabývala změnami *ligamentum patellae* po operaci TTA (4). Obecně platí, že u metody TTA je menší výskyt podobných komplikací, vzhledem k odlišné metodě stabilizace, a tedy menší síle působící na *ligamentum patellae* (3).

Cíle: Určit ze snímků nepřímé počítačové radiografie změny tloušťky *ligamentum patellae* (obecný znak patelární desmopatie) u psů po operaci kolenního kloubu metodou TTA.

Materiál a metody: Do studie bylo zařazeno 18 psů (20 kolenních kloubů) s poškozením předního zkříženého vazů. Podmínkou zařazení do studie byla operace kolenního kloubu metodou TTA a rentgenologické vyšetření před operací (čas 0), 8. (čas 1) a 16. (čas 2) týden po operaci. Pro měření šířky *ligamentum patellae* byla použita boční mediolaterální projekce kolenního kloubu. Tloušťka vazů byla měřena na třech místech, 1 cm distálně od distálního pólu pately (PV1), uprostřed *ligamentum patellae* (PV2) a 1 cm proximálně od úponu *ligamentum patellae* na *tuberositas tibiae* (PV3). Z důvodu korekce zvětšení, ke kterému dochází na každém RTG snímku, byla změřena délka *ligamentum patellae*. Následně byly vypočítány poměry mezi proximální, střední, resp. distální tloušťkou vazů a jeho délkou, a tyto byly použity ve všech výpočtech. Pro statistické

výpočty byl použitý program Minitab (State College, PA: Minitab, Inc.). Pro porovnání měření *ligamentum patellae* v jednotlivých časových bodech byl použitý Wilcoxonův test pro párová data. Pro zhodnocení vztahu mezi naměřenými hodnotami a kategoriálními proměnnými byla použita vícerozměrná ANOVA (MANOVA).

Výsledky: Rentgenologickou kontrolu po osmi týdnech po operaci (medián 52 dnů; rozsah 42 – 83 dní) absolvovalo 14 kolenních kloubů a po šestnácti týdnech po operaci (medián 108 dní; rozsah 88 – 143 dní) 9 kolenních kloubů. Pouze 6 kolenních kloubů mělo RTG snímky zhotovené v 8. i 16. týdnu po operaci. Vzhledem k měřením v čase 0, byl zaznamenán statisticky významný rozdíl tloušťky vazy ve všech místech pro čas 1 ($p < 0,05$) a tloušťky vazy v místě PV2 pro čas 2 ($p = 0,013$). Měření tloušťky *ligamentum patellae* pro místa PV1, resp. PV3 v čase 2 nevykazovala statisticky významný rozdíl při porovnání s měřeními v čase 0 ($p > 0,05$). Statistický rozdíl mezi tloušťkami *ligamentum patellae* v čase 1 a 2 nebyl potvrzen ($p > 0,05$). Ze sledovaných kategoriálních faktorů potvrdila MANOVA pouze významný vliv času na tloušťku *ligamentum patellae*. Ostatní faktory (hmotnost, věk, pohlaví, typ ruptury LCC, artrotomie, šířka klece a poškození menisku) neměly významný vliv na tloušťku *ligamentum patellae*.

Diskuse: Zbytnění *ligamentum patellae* bylo popsáno jako komplikace v souvislosti s operací TPLO (1,3,6). Boudrieau uvádí jako možný důvod tohoto stavu zkrácení vzdálenosti úponu *ligamentum patellae* od místa kontaktu kondylů femuru s tibiálním plató (3). K tomuto zkrácení dochází po osteotomii tibie při operaci TPLO. Následně je nutná větší síla k dosažení extenze kolenního kloubu a *ligamentum patellae* je víc namáháno (3). Naopak u operace TTA dochází k prodloužení vzdálenosti úponu *ligamentum patellae* od místa kontaktu kondylů femuru s tibiálním plató, což má za následek menší sílu nutnou pro extenzi kolenního kloubu, a s tím spojenou menší zátěž *ligamentum patellae* (3). Existuje pouze jedna studie, která se zabývala změnami *ligamentum patellae* po operaci TTA (4). Tato studie potvrzuje výskyt patelární desmopatie po operaci TTA a také uvádí vliv velikosti použité klece (4). Efekt velikosti klece a vliv výsledného posunu místa úponu *ligamentum patellae* na změnu tloušťky tohoto vazy bude předmětem dalšího výzkumu.

Závěr: Změny tloušťky *ligamentum patellae* jsou evidentní v porovnání s předoperačními snímky kolenních kloubů. Z našich výsledků je prokazatelný pouze vliv času. Tento závěr je konzistentní s výsledky studie Kühn et al. (4). Na našem souboru pacientů se nepodařilo dokázat významnost dalších faktorů s ohledem na šířku *ligamentum patellae*. Je dost pravděpodobné, že efekt na *ligamentum patellae* mají ne samotné faktory, ale jejich vzájemná interakce. Tento předpoklad bude předmětem dalších studií.

Literatura:

(1) Pacchiana P.D. et al. 2003: J Am Vet Med Assoc 222: 184–193, (2) Arnoczky S.P. et al 1977: Am J Vet Res 38: 1807–1814, (3) Boudrieau R.J. 2009: Vet Surg 38: 1–22, (4) Kühn K. et al. 2011: Vet Radiol Ultrasound 52: 466–471, (5) Carey K. et al. 2005: Vet Comp Orthop Traumatol 18: 235–242, (6) Mattern K.L. et al. 2006: Vet Radiol Ultrasound 47: 185–19

Poznámky & komentáře

FRAKTURY ANTEBRACHIA, JEJICH ŘEŠENÍ A KOMPLIKACE

Blažek-Fialová I.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno

Úvod: V řadě případů jsou úrazy psů spojeny se zlomeninami. Často se setkáváme se zlomeninami předloktí, nejčastěji z důvodu pádu pacientů z výšky či autoúrazu. Jsme pak od majitelů zvířete postaveni před otázkou, zda se jednodlovná zlomenina předloketních kostí, která není výrazně dislokovaná, nedá s úspěchem řešit i bez operativního ošetření.

Cíle: Cílem naší studie bylo sledování komplikací spojených s volbou metody ošetření pacientů se zlomeninami předloketních kostí se stanovením vhodnosti zvolené terapie i ve vztahu k věku a plemenné příslušnosti pacientů.

Materiál a metody: Psi ošetření na Klinice chorob psů a koček FVL VFU Brno s uzavřeným typem jednodlovných diafyzárních zlomenin obou předloketních kostí. Sledovali jsme věk pacientů, plemennou příslušnost, zvolený způsob terapie a komplikace v průběhu hojení zlomenin. Jako primární metodu ošetření zlomenin předloktí jsme volili konzervativní způsob ošetření v případech minimálně dislokovaných zlomenin u psů do stáří pěti měsíců. U ostatních zlomenin předloktí bylo majitelům navrženo jejich chirurgické řešení. V případě nesouhlasu majitelů s tímto způsobem ošetření jsme volili i u těchto pacientů konzervativní léčbu zlomenin předloktí, kterou bylo přiložení zesílené R-J bandáže pomocí dlahy na kaudální stranu předloktí, přičemž byla respektována zásada znehybnění kloubu pod a nad linií lomu. V ojedinělých případech minimálně dislokovaných zlomenin u velmi mladých jedinců jsme v několika málo případech přistoupili k léčbě bez bandáže pouze striktním klidovým režimem pacienta. Doba přiložení bandáže s dlahou u konzervativně léčených pacientů byla založena na individuálním zhodnocení rentgenologického srůstu zlomeniny, případně na vzniku komplikací spojených s bandážováním končetiny. Ke kontrolním převazům bylo přistoupeno okamžitě podle stavu bandáže, nejméně však jednou za 10 dní. Při chirurgickém ošetření jsme prováděli anatomickou repozici zlomenin vřetenních kostí s jejich následnou fixací neutralizačním nebo kompresním

typem kostní ploténky. Zlomeniny loketních kostí byly ponechány bez fixace. K fixaci zlomenin vřetených kostí byly použity nejčastěji DCP ploténky s otvory pro fixaci 2,0 mm nebo 2,7 mm kortikálními šrouby. V případech většího traumatického zhmoždění okolní měkké tkáně z důvodu samotného úrazu nebo chirurgického ošetření, byla po operaci na končetinu přiložena na jeden až dva dny dobře vypodložená R-J bandáž k eliminaci oběhových obtíží na končetině. Pokud nebyly sledovány brzké klinické obtíže, pak byla následná rentgenologická kontrola hojení zlomenin prováděna v rozmezí 6-8 týdnů od operativního ošetření v závislosti na majitelích. Pokud nebyl na těchto sekundárních rentgenologických vyšetřeních zjištěn srůst vřetenní kosti, opakovaná rentgenologická vyšetření byla prováděna v intervalech 4 týdnů až do srůstu zlomeniny. Při výskytu komplikací byla rentgenologická vyšetření prováděna dle potřeby. Při hojení chirurgicky ošetřených zlomenin jsme se zaměřili na možný výskyt komplikací, ke kterým řadíme špatně se hojící operační ránu, selhání implantátů, osteomyelitida, prodloužená doba hojení zlomeniny, nezhojení nebo refraktura po vyjmutí implantátů u zhojené zlomeniny. Ke komplikacím ve spojení s konzervativní metodou ošetření zlomenin předloktí patří zejména prodloužená doba hojení nebo nezhojení zlomeniny, případně zhojení v dislokaci, ale také časté komplikace ve spojení s nutností dlouhodobějšího přiložením bandáže. K těmto komplikacím patří abraze a nekrózy okolní měkké tkáně, omezení rozsahu pohybu a degenerativní změny v okolních kloubech, případně rozvoj hypotrofie kostní tkáně. V případě zpomalého hojení byla prováděna dynamizace místa lomu odebráním částí implantátů, kterým byla snížena původní síla fixace zlomeniny. K vyjmutí všech implantátů bylo přikročeno až po dokonalém rentgenologickém srůstu zlomeny vřetených kostí.

Výsledky: Hodnoceno 43 psů osmnácti různých plemen s jednodolnými diafyzárními zlomeninami obou předloketních kostí. Nejčastěji postižená plemena byla pražský krysařík (21 %), italský chrtík (14 %) a yorkshirský teriér (9,3 %) věkové skupiny tří měsíců až jednoho roku stáří (63 %). Z 35 chirurgicky ošetřených pacientů (81,4 %) bylo sledováno až do vyjmutí implantátů 21 z nich (60 %). Komplikace nastaly u pěti chirurgicky řešených pacientů (14,3 %). Konzervativně jsme řešili osm pacientů (18,6 %) a u pěti z nich (62,5 %) nastaly komplikace spojené s touto metodou ošetření. Primárně konzervativně byli ošetřeni dva pacienti, hojení probíhalo u obou těchto pacientů bez komplikací.

Diskuse: Konzervativní volba ošetření zlomeniny je vhodná pouze u nekompletní zlomeniny (green stisk) samostatné diafyzární zlomeniny jedné z předloketních kostí nebo minimálně dislokované zlomeniny obou předloketních kostí zejména u mladých psů (1,2,3). Příčinou zvýšeného rizika komplikací hojení zlomenin u této metody je nedostatečná stabilita místa lomu spojená s poruchami neoangiogeneze a následným prodloužením doby hojení. Při nesprávném přiložení bandáže nebo při nesprávné péči o obvaz dochází velmi často k poškození měkkých tkání končetiny (4,5). Pokud již zvolíme, nebo jsme nuceni volit konzervativní metodu léčby zlomeniny předloktí, pak důležitým faktorem zasahujícím do obnovení plné funkce poraněné končetiny je i celková doba bandážování. Dlouhodobá imobilizace a nezatěžování končetiny vyvolávají vznik svalových kontraktur, snížení opacity kostního podkladu distální části končetiny, s čímž souvisí následná ztuhlost zápěstí a kloubů prstů a rozvoj osteoartrózy. Zlomeninu předloktí utrpí nejčastěji malá a miniaturní plemena psů, u kterých jsou přiložení bandáže a její následné revize spojené s technickými obtížemi. Nezanedbatelný je i vliv majitele, který musí převzít zodpovědnost za péči o obvaz. Komplikace po provedené osteosyntéze jsme zaznamenali v pěti případech.

Závěr: Ze studie jednoznačně vyplývá doporučení chirurgických ošetření zlomenin vřetených kostí. Všechny komplikace vzniklé po chirurgickém ošetření neměly na budoucí funkci končetiny žádný vliv. Komplikace spojené s konzervativním ošetřením byly pouze v jednom případě bez vlivu.

Poděkování: *MVDr. Milanu Dvořákovi Ph.D. za pomoc s tvorbou tohoto příspěvku.*

Literatura:

(1) Fox S. M. 1988: Vet Med 83: 153-165, (2) Oakley R. E. 1999: Vet Clin North Am 29: 1083-1095, (3) Piermattei D. L., Flo G. L. Fractures: classification, diagnosis, and treatment. In: Brinker W.O., Piermattei D.L., Flo G.L. (Eds.) 1997: Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair, 3rd edn. WB Saunders, Philadelphia: 24-162, (4) Tomlinson, J. 1991: Vet Clin North Am 21: 735-44, (5) Johnson A. J. 2012: Fundamentals of Orthopedic Surgery and Fracture Management, In: Fossum T.W.: Small Animal Surgery

Poznámky & komentáře

SLEDOVÁNÍ KONCENTRACE MANGANU VE VZTAHU MATKA - MLÁDĚ V DEN PORODU U KOZ

Zvonareva E., Pechová A., Mišurová L., Hauptmanová K., Pavlata L.,
Tomášková M.

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, FVL VFU Brno

Úvod: Koncentrace manganu v plné krvi je často sledována jako ukazatel úrovně zásobení organismu Mn, ale výsledky vědeckých prací na vypovídací hodnotu tohoto stanovení nejsou jednotné. Koncentrace manganu v krvi je ovlivňována věkem (1). Zásobení matky ovlivňuje koncentraci Mn v plodu, protože Mn prochází placentou a kumuluje se v plodu (2). Cílem této práce bylo sledování koncentrace Mn v krvi koz a jejich mláďat při suplementaci různými formami Mn.

Materiál a metody: Experiment byl realizován na Klinice chorob přežvýkavců VFU Brno v roce 2009 - 2010. Do pokusu bylo zařazeno 31 zdravých březích krátkosrstých bílých koz. Všechny kozy byly krmeny shodnou krmnou dávkou, která sestávala z doplňkové směsi (DKS) 0,5 kg na kus a den, dále měly adlibitní přístup k lučnímu senu, vodě a minerálním lizům. Průměrný příjem sena se pohyboval kolem 2,5 kg na kus a den. Koncentrace Mn v senu byla v průměru 87,53 mg/kg. Kontrolní skupina A (n=9) dostávala DKS bez přídavku Mn (přirozený obsah Mn=20 mg/kg). Kozy pokusných skupin dostávaly DKS, která byla obohacena Mn v různých formách v množství 160 mg/kg. Suplementace pokusných skupin byla zahájena od druhého měsíce gravidity. Skupina B (n=8) dostávala DKS obohacenou anorganickým Mn ve formě $MnSO_4$, v dalších pokusných skupinách byly použity organické formy Mn – skupina C (n=6) Bioplex Mn (15 % Mn proteinát, Alltech), skupina D (n=8) B-Traxim 2C Mn (21 % Mn chelát glycinu, Pancosma). V den porodu byla odebrána krev punkcí v. *jugularis* od koz (n=31) a jejich kůzlat (n=65) hned po porodu před prvním napitím kolostra do zkumavky s přídavkem heparinu. Po odběru byly vzorky zamrazeny až do laboratorního zpracování. Analýzy vzorků se prováděly v biochemické laboratoři KCHPř. Koncentrace Mn v krvi byla stanovena elektrotermickou atomovou absorpční spektrofotometrií na přístroji Solaar 939 (Unicam, Velká Británie) po mikrovlnné mineralizaci na přístroji MLS-1200 (Milestone, Itálie).

Výsledky byly statisticky zpracovány v programu Excel (Microsoft Windows 97).

Výsledky: Koncentrace Mn v krvi matek a jejich mláďat byly vyhodnoceny bez ohledu na pokusné skupiny (tab. 1) a podle skupin (tab. 2). Mezi jednotlivými pokusnými skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v koncentraci Mn v krvi matek. Statisticky významně nižší koncentrace Mn v krvi mláďat byly zjištěny u kontrolní skupiny (A) ve srovnání s pokusnými skupinami ($p < 0,05$) suplementovanými $MnSO_4$ (B) a Mn chelátem glycinu (D). Koncentrace Mn v krvi mláďat byla v průměru o 6 % vyšší než u jejich matek, ale rozdíly nebyly signifikantní.

Tabulka 1: Koncentrace Mn v krvi ($\mu\text{g/l}$) matek ($n=31$) a mláďat ($n=65$)

	Průměr	SD	Max.	Min.
Matky	10,55	2,78	18,61	6,79
Mláďata	11,16	2,67	17,33	6,47

Tabulka 2: Koncentrace Mn v krvi ($\mu\text{g/l}$) matek a mláďat podle pokusných skupin

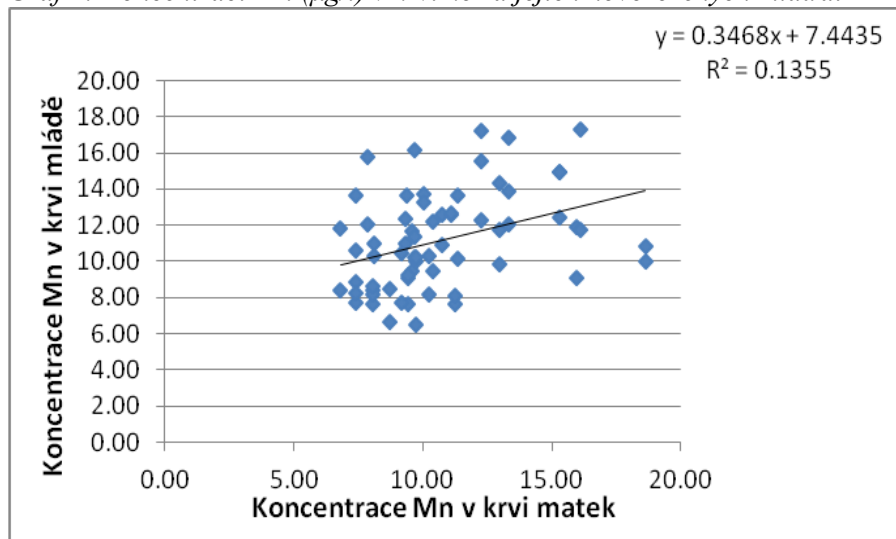
Skupiny	A	B	C	D
Matky	9,63 \pm 2,52	11,35 \pm 2,95	11,07 \pm 3,58	10,88 \pm 1,85
Mláďata	10,01 \pm 2,44 ^{a,b}	11,80 \pm 2,49 ^a	10,79 \pm 3,05	11,97 \pm 2,23 ^b

^a $p \leq 0,05$ (mezi skupinami označenými stejnými písmeny)

Diskuse: V literatuře je uváděno, že s věkem dochází k poklesu koncentrace manganu v krvi (1,6), na základě našich výsledků však nelze jednoznačně tento vliv potvrdit ve vztahu matka a mláďe. Námi zjištěné koncentrace Mn v krvi jsou obdobné jako hodnoty publikované v posledních letech u dojnic 14,0 \pm 3,2 $\mu\text{g/l}$ (3) a 5,10-12,35 $\mu\text{g/l}$ (4). Výrazně vyšší koncentrace Mn v krvi dojnic 20-70 $\mu\text{g/l}$ však uvádí Underwood a Suttle (5). Domníváme se, že tyto velké rozdíly jsou dány změnami v metodice stanovení a především pak přístrojovém vybavení. V dostupné literatuře jsme nenašli informace o koncentraci Mn v krvi koz. Regresní analýzou jsme vyhodnotili vztahy mezi koncentrací Mn v krvi kůzlat a jejich matek. Při vyhodnocení celého souboru bez ohledu na skupiny (graf 1) jsme zjistili signifikantní pozitivní korelaci ($r=0,3680$; $p \leq 0,01$). Určité rozdíly však byly zjištěny při vyhodnocení korelačních vztahů podle pokusných skupin. Signifikantní vztah byl u skupin

suplementovaných organickými formami Mn (C:r= 0,7701, $p \leq 0,01$; D:r= 0,5276, $p \leq 0,05$), zatímco u dalších dvou skupin signifikantní korelační vztah zjištěn nebyl (A:r= 0,0462; B:r= -0,0548).

Graf 1: Koncentraci Mn ($\mu\text{g/l}$) v krvi koz a jejich novorozených mlád'at



Závěr: Suplementace březích koz různými formami Mn signifikantně neovlivnila koncentraci Mn v krvi koz. U mlád'at byly zjištěny vyšší koncentrace u skupiny dotované MnSO_4 a Mn chelátem glycinu. Mezi koncentrací Mn v krvi matek a jejich mlád'at byly zjištěny signifikantní korelační vztahy u skupin dotovaných organickými formami Mn.

Literatura: (1) Wood R. J. 2009: Nutr Rev 67: 416-420, (2) Hostetler C. E. et al. 2003: Vet J 166: 125-139, (3) Pechová A. et al. 2008: Acta Vet Brno 77: 523-531, (4) Gehrke M. et al. 1997: Bull Vet. Inct. Pulawy 41: 115-119, (5) Underwood E.J. et al. 1999: Oxon: CABI Publishing: 614

Poznámky & komentáře

VLIV DOTACE RŮZNÝCH FOREM A DÁVEK SELENU NA VYBRANÉ UKAZATELE BACHOROVÉ TEKUTINY A KRVE U OVCÍ

Panev A., Hauptmanová K., Pavlata L., Pechová A., Dvořák R., Filípek J.

Klinika chorob přežvýkavců a prasat, FVL VFU Brno

Úvod: Význam dostatečné saturace organismu mikroprvky vyplývá z jejich účasti v řadě biologických pochodů v organismu a v jejich ovlivňování zdravotního stavu, neboť se účastní řady funkcí, jak strukturálních, katalytických i regulačních (1). U přežvýkavců je jejich saturace mikroprvky významně ovlivněna lokalitou, kde jsou chováni, protože zvířata jsou obvykle krmena rostlinnými krmivy produkovanými v oblasti farmy. V jaderném krmivu se obvykle v porovnání s objemným krmivem nachází vyšší koncentrace mikroprvků. Za důležitou je považována i forma, v jaké jsou mikroprvky podávány. Česká republika se nachází v oblasti, kde je v půdě nedostatek selenu, proto zde nehrozí riziko otrav, ale karencí selenu (2,3,4). Aby bylo zásobení zvířat selenem adekvátní, je selen třeba vhodným způsobem zvířatům dotovat. V krmné dávce přijatý selen nepřijímá výhradně přežvýkavec, velké množství selenu vstřebají a metabolizují bachorové bakterie (5).

Materiál a metody: Pokus byl prováděn na 15 skopcích, kteří byli před pokusem 4 měsíce krmeni a ustájeni stejným způsobem a pro účely experimentu náhodně rozděleni do dvou skupin (A a B). Skopci byli ustájeni ve dvou samostatných venkovních kotcích. Měli adlibitní přístup k vodě. V průběhu pokusu byla všechna zvířata krmena stejnou krmnou dávkou, jediný rozdíl byl v různých formách a koncentracích selenu, který byl přidáván do doplňkové krmné směsi (Biokron s.r.o., Blučina). Krmná dávka na den a jednoho skopce se skládala ze 2,5 kg lučního sena a 0,3 kg doplňkové jaderné krmné směsi s přidavkem selenu. Dávka byla rozdělena do dvou porcí ráno a večer. Skupině A (n=8) byla podávána krmná směs s organickou formou selenu (Sel-Plex Alltech 2000), skupině B (n=7) krmná směs s anorganickou formou selenu (seleničitan sodný - Na_2SeO_3). Nejprve byla zvířata krmena po dobu dvou týdnů krmnou směsí s množstvím selenu 1,0 mg/kg krmné směsi (den 1 až 14). Poté byla krmena po dobu čtyř týdnů (den 15 až 42) krmnou dávkou s nízkou

koncentrací selenu (0,1 mg/kg) a v poslední fázi po dobu tří týdnů (den 43 až 63) krmnou dávkou se zvýšenou koncentrací selenu (5,0 mg/kg). V průběhu celého pokusu byly provedeny čtyři odběry krve a bachorové tekutiny. Bachorová tekutina byla odebírána pomocí bachorové sondy a podtlakové pumpy vždy po 2 hodinách po ranním krmení. Odebírali jsme vždy 300 ml bachorové tekutiny. Ve stejnou dobu probíhal i odběr krve z v. *jugularis*. Krev jsme odebírali do dvou zkumavek, do jedné bez přídavku antikoagulačního přípravku pro získání séra, do druhé s přídavkem heparinu pro získání vzorku plné krve. První odběr byl proveden po 14 dnech krmení krmnou směsí s obsahem selenu 1 mg/kg (14. den pokusu), druhý odběr po 3 týdnech krmení směsí se sníženou koncentrací selenu (35. den pokusu), třetí odběr po prvním nakrmení směsí se zvýšenou koncentrací selenu (43. den pokusu) a čtvrtý odběr po třech týdnech krmení směsí se zvýšenou koncentrací selenu (63. den pokusu). V bachorové tekutině byly vyšetřovány tyto parametry: pH, celková acidita, počet nálevníků, koncentrace kyseliny mléčné, amoniaku, těkavých mastných kyselin, procentuální zastoupení jednotlivých kyselin (kyselina octová, propionová, n-máselná a n-valerová), koncentrace selenu a aktivity ALP, ALT, AST, GMT, LDH a amylázy. Dále jsme zjišťovali koncentraci selenu v bachorové biomase. Byly vyšetřovány tyto parametry v krvi: koncentrace celkové bílkoviny, albuminu, bilirubinu, močoviny a selenu a aktivity AST, GMT a GSH-Px.

Výsledek: Absolutní hodnoty koncentrací Se v bachorové biomase a tekutině ve své dynamice zhruba odpovídají množství suplementovaného Se, kdy při druhém odběru došlo k průkaznému poklesu koncentrace Se v biomase i bachorové tekutině a následně bezprostředně po začátku krmení vysokých dávek přídavku Se se koncentrace Se v biomase i bachorové tekutině průkazně zvýšila a vzestup koncentrací pokračoval až do konce experimentu. Forma, v jaké byl selen podáván, neměla na absolutní obsah selenu v bachorové biomase průkazný vliv. Naše výsledky jsou v souladu s dříve publikovanými údaji, že se největší množství selenu zjišťuje v biomase a nejnižší v bachorové tekutině, protože selen do sebe velmi rychle inkorporují bachorové bakterie (5). V bachorové tekutině byla zjištěna vyšší koncentrace Se po podávání seleničitanu sodného. Po podávání krmiva se zvýšenou koncentrací Se byla koncentrace Se v bachorové tekutině u skopců krmených seleničitanem téměř dvojnásobná ($4,61 \pm 1,72 \mu\text{mol/l}$ – 3. odběr $9,68 \pm 5,24 \mu\text{mol/l}$ – 4. odběr) oproti skopcům

krmeným organickou formou selenu ($2,60 \pm 1,33 \mu\text{mol/l}$ – 3. odběr, $4,88 \pm 2,16 \mu\text{mol/l}$ – 4. odběr). Rozdíl mezi skupinami byl statisticky významný ($p < 0,05$). Při vyhodnocení vztahu mezi koncentrací Se v bachorové biomase a tekutině jsme zjistili, že mezi obsahy Se v obou materiálech existuje vysoce významný korelační vztah ($r = 0,78$, $p < 0,001$, $n=60$), což dokladuje, že mezi obsahem selenu v bachorové tekutině a biomase existuje určitá rovnováha.

Diskuse: Aktuální příjem selenu ovcemi se odráží v jeho koncentraci v krvi a v aktivitě GSH-Px a také v koncentraci selenu v bachorové tekutině a ještě významněji v bachorové biomase, ve které se nachází v mnohonásobně vyšších koncentracích než v bachorové tekutině. Forma, v jaké je selen podáván, nemá prokazatelný vliv na celkový obsah selenu v bachorové biomase, jeho koncentraci v krvi, ani na aktivitu GSH-Px v krvi, ale bylo možné vysledovat tendenci k vyšším koncentracím selenu a aktivitě GSH-Px v krvi u zvířat krmených anorganickou formou selenu a selenu v biomase u zvířat krmených organickou formou selenu. Po podání vysoké dávky selenu byl zaznamenán průkazný pokles počtu nálevníků a také průkazný vzestup aktivit GMT, LDH, ALP a AST v bachorové tekutině. Další sledované parametry bachorové tekutiny však aplikací selenu ovlivněny nebyly.

Závěr: I přes zjištěné rozdíly v obsahu selenu v bachorové tekutině můžeme konstatovat, že dotace různých forem selenu nemá na distribuci Se mezi bachorovou tekutinou a biomasu zásadní praktický význam – zejména pokud budeme zohledňovat absolutní hodnoty koncentrace Se v biomase.

Poděkování: *Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT ČR v rámci řešení výzkumného záměru č. MSM6215712403.*

Literatura:

(1) Underwood E.J., Suttle N.F. 1999: Mineral Nutrition of Livestock. CAB International, 624 stran, (2) Pavlata L. et al. 2005: Vet Med-Czech 50, 390-400, (3) Pavlata L. et al. 2002: Acta Vet Brno 71: 3-8, (4) Ludvíková E et al. 2005: Acta Vet Brno 74: 369-375, (5) Serra A.B. et al. 1994: Asian-Australasian J Anim Sci 7: 83-89

Poznámky & komentáře

Seznam přednášejících

Adamová Eva, Mgr.

Ústav farmakologie a farmacie, FVL VFU Brno
ea-m@volny.cz

Balková Simona, MDDr., Mgr.

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno
S.Balkova@seznam.cz

Blažek-Fialová Iva, MVDr.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
ivafialova@email.cz

Boženkova Eliška

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno
ebozenkova@gmail.com

Cihlářová Lucie, MVDr.

Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno
cihlicka@centrum.cz

Danylevska Anna, MVDr.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
danylevska@vri.cz

Dufková Lucie, MVDr.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
dufkovaL@vri.cz

Frgelecová Lucia, MVDr.

Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno
luciafrgelecova@seznam.cz

Hájek Ivo, MVDr.

Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
hajeki@vfu.cz

Horáková Dana
Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno
danda.horakova@centrum.cz

Hytychová Taťána, MVDr.
Klinika chorob koní, FVL VFU Brno
V09250@vfu.cz

Chlastáková Ivana, MVDr.
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
ivanachlastakova@seznam.cz

Chrást Lukáš, Bc.
Přírodovědecká fakulta, MU Brno
lukchrast@gmail.com

Janošovská Michaela, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
JencovaM@vfu.cz

Jirásková Pavla, MVDr.
Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno
mvdr.jiraskova@centrum.cz

Joshi Leena
Department of Craniofacial Development and Stem Cell Biology, King's
College London, UK
leena.joshi@kcl.ac.uk

Konvalinová Jarmila, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
konvalinovaj@vfu.cz

Kružíková Naděžda, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
nkruzikova@seznam.cz

Kučerová Hana, Mgr.
Přírodovědecká fakulta, MU Brno
211087@mail.muni.cz

Kudělová Judita
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
judita.kudelova@seznam.cz

Lánová Martina, Bc.
Přírodovědecká fakulta, MU Brno
323514@mail.muni.cz

Lungová Vlasta, RNDr.
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
vlasta.lungova@upol.cz

Mašková Darina, Mgr.
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta
Darina.Maskova@seznam.cz

Mráčková Miroslava, MVDr.
Klinika chorob koní, FVL VFU Brno
m.miruska@seznam.cz

Načeradská Martina, MVDr.
Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL FVU Brno
info@naceradska.com

Novotný Robert, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
novotnyr@vfu.cz

Oralová Veronika, Mgr.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno
VeronikaOralova@seznam.cz

Panev Aleksandar, DVM.
Klinika chorob přežvýkavců a prasat, FVL VFU Brno
ANEVA@vfu.cz

Pavlicová Kateřina, MVDr.
Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno
katerina.pavlicova@centrum.cz

Petrášová Jana, MVDr.
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
petrasovaj@atlas.cz

Pospíchalová Jana, MVDr.
Ústav infekčních chorob a epizootologie, FVL VFU Brno
mvd.pospichalova@seznam.cz

Putnová Iveta, MVDr.
Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno
putnovai@vfu.cz

Pyszko Martin, MVDr.
Ústav anatomie, histologie a embryologie, FVL VFU Brno
pyszkom@vfu.cz

Stehlík Ladislav, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
stehlikl@vfu.cz

Stehlíková Šárka, MVDr., Ph.D.
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
stehlikovas@vfu.cz

Šebestová Jaroslava, MVDr.
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno
reznikova@vri.cz

Šperlová Adéla, MVDr.
Ústav infekčních chorob a epizootologie, FVL VFU Brno
šperlova@vfu.cz

Štembírek Jan, MUDr. et MUDr.
Klinika ústní čelistní a obličejové chirurgie, FN Ostrava
stembirek@iach.cz

Švandová Eva, Mgr.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno
evasvandova@tiscali.cz

Tarkošová Dagmar, MVDr.
Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno
tarkosova.d@gmail.com

Uhríková Ivana, MVDr.
Ústav fyziologie, FVL VFU Brno
uhrikovai@gmail.com

Veselá Barbora, Mgr.
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., Brno
raba21@centrum.cz

Zimmermann Angela Camilla
Center for Dental and Craniofacial Sciences, Charité - Campus Benjamin
Franklin at Freie Universität Berlin, BRD
camilla-ange.zimmermann@charite.de

Zvonareva Elizaveta, MVDr.
Klinika chorob přežvýkavců a prasat, FVL VFU Brno
lizett@email.cz



PANEL 1: VĚDA - VÝZKUM - VZDĚLÁVÁNÍ - MEZINÁRODNÍ UPLATNĚNÍ

Aktuální vědecké poznatky na úrovni Nobelových cen (věda)

Prezentace vlastního výzkumu (vzdělávání)

Mezinárodní možnosti (mezinárodní uplatnění)

Aktuální výzkum v oblasti fyziologie (výzkum)

PANEL 2: VĚDA - VÝZKUM - PRAXE

Fyziologie-patofyziologie-medicína (humánní medicína)

Fyziologie-patofyziologie-medicína (diagnostika)

Studentská odborná konference

Fyziologie-patofyziologie-medicína (veterinární medicína)



OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ - INTEGRACE VĚDY, VÝZKUMU, ODBORNÉHO VZDĚLÁVÁNÍ A PRAXE

CZ.1.07/2.3.00/09.0219

Projekt je určen pro:

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni bakalářské, magisterské a doktorské)
- 2) **Studenty VŠ** (zpracovávající odbornou práci na úrovni bakalářské, magisterské nebo doktorské)
- 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s aktivním zapojením v SOČ)

Projekt nabízí:

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů** se zaměřením na témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, aktivní **zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace**

<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>

Projekt je financován Evropským strukturálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Rejstřík

Adamová Eva	79
Balková Simona	55
Blažek-Fialová Iva	171
Boženková Eliška	93
Cihlářová Lucie	89
Danylevska Anna	35
Dufková Lucie	131
Frgelecová Lucia	103
Hájek Ivo	163
Horáková Dana	67
Hytychová Taťána	135
Chlastáková Ivana	43
Chrást Lukáš	47
Janošovská Michaela	155
Jirásková Pavla	71
Joshi Leena	9
Konvalinová Jarmila	99
Kružíková Naděžda	111
Kučerová Hana	123
Kudělová Judita	39
Lánová Martina	75
Lungová Vlasta	19
Mašková Darina	115
Mráčková Miroslava	159
Načeradská Martina	147
Novotný Robert	151
Oralová Veronika	31

Panev Aleksandar	179
Pavlicová Kateřina	107
Petrášová Jana	63
Pospíchalová Jana	127
Putnová Iveta	51
Pyszko Martin	85
Stehlík Ladislav	167
Stehlíková Šárka	59
Šebestová Jaroslava	37
Šperlová Adéla	119
Štembírek Jan	81
Švandová Eva	27
Tarkošová Dagmar	143
Uhríková Ivana	139
Veselá Barbora	23
Zimmermann Camilla A.	13
Zvonareva Elizaveta	175

Editoři:

doc. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (matalova@iach.cz)

prof. MVDr. Jaroslav Doubek, CSc. (doubekj@vfu.cz)