



Recenzovaný zborník
vedeckých prác
Výskumného centra AgroBioTech 2019

Výskumné centrum AgroBioTech
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Nitra 2019



Výskumné centrum AgroBioTech



Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre



Recenzovaný zborník vedeckých prác Výskumného centra AgroBioTech 2019

Nitra, 2019

Slovenská republika

Názov: *Recenzovaný zborník vedeckých prác Výskumného centra AgroBioTech 2019*

Editori

RNDr. Veronika Fialková, PhD.

Mgr. Jana Bilčíková

Recenzenti

RNDr. Hana Ďúranová, PhD.

RNDr. Veronika Fialková, PhD.

Ing. Veronika Štefúnová, PhD.

Ing. Tomáš Jambor, PhD.

Ing. Emil Kolek, PhD.

Ing. Anton Kováčik, PhD.

RNDr. Veronika Kováčová, PhD.

Ing. Veronika Lancíková, PhD.

Ing. Michal Miškeje, PhD.

Ing. Alica Navrátilová, PhD.

Dr. Ing. Miroslava Požgajová

doc. Ing. Katarína Ražná, PhD.

Ing. Jana Štefániková, PhD.

Ing. Katarína Tokárová, PhD.

Ing. Eva Tvrdá, PhD.

doc. PaedDr. Ing. Jana Žiarovská, PhD.

Grafický dizajn: Ing. Matej Hynšt, RNDr. Veronika Fialková, PhD.

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre dňa 25. 9. 2019 ako zborník vedeckých prác online.



This work is published under the license of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International Public License (CC BY-NC 4.0).
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

ISBN 978-80-552-2053-6 Všetky práva vyhradené

Obsah

In vitro účinok extraktu kôpru voňavého (<i>Anethum graveolens</i> L.) na štruktúru a funkciu bovinných spermíí	
Michal Ďuračka, Július Árvay, Norbert Lukáč, Eva Tvrdá	4
Pestrec mariánsky: liečivá rastlina s významnými terapeutickými vlastnosťami	
Veronika Valková, Hana Ďúranová, Renáta Lužicová, Jana Bilčíková, Miroslav Habán.....	12
Toxicita hliníka a jeho vplyvy na bunkový cyklus	
Petra Borotová, Miroslava Požgajová.....	19
Obsah stopových prvkov v ejakuláte kapra rybníčného (<i>Cyprinus carpio</i>) v podmienkach umelého chovu	
Michal Miškeje, Jaroslav Andreji, Július Árvay, Anton Kováčik	25
Štúdium regulácie priebehu bunkového cyklu pomocou fluorescenčnej mikroskopie v kvasinke <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	
Miroslava Požgajová, Hana Ďúranová, Alica Navrátilová, Anna Trakovická	31
Príprava vzoriek z kvasiniek <i>Schizosaccharomyces pombe</i> pre účely transmisnej elektrónovej mikroskopie: Review	
Hana Ďúranová, Miroslava Požgajová, Marta Novotová, Zuzana Kňazická.....	38
Parametre výťažnosti a čistoty DNA pri rôznych typoch homogenizácie dužín ovocia	
Katarína Vicianová, Martina Žabková, Lucia Zamiešková, Jana Žiarovská	45
AFLP a ISSR polymorfizmus láskavca po gama-radiačnej mutácii	
Matúš Kysel', Jana Žiarovská, Ján Gažo, Katarína Ražná, Mária Labajová, Veronika Lancíková, Veronika Štefúnová, Andrea Hricová	55
DNA microarray – významný nástroj molekulárnej biológie na sledovanie zmien génovej expresie	
Veronika Fialková, Jana Bilčíková, Lucia Zamiešková, Jana Žiarovská.....	64
Aeroalergény v podmienkach klimatických zmien	
Lucia Zamiešková, Jana Bilčíková, Jana Žiarovská	71
Možnosti využitia elektronického panela na hodnotenie kvality potravín	
Matej Hynšt, Jana Štefániková, Vladimír Vietoris	76



In vitro účinok extraktu kôpru voňavého (*Anethum graveolens* L.) na štruktúru a funkciu bovinných spermii

Michal Ďuračka^{1*}, Július Árvay², Norbert Lukáč¹, Eva Tvrdá¹

¹Katedra fyziológie živočíchov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

²Katedra chémie, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

**michaelduracka@gmail.com*

Abstrakt

V našej štúdií sme sa rozhodli stanoviť dynamiku vplyvu rôznych koncentrácií extraktu z listov Kôpru voňavého (*Anethum graveolens* L.) na pohyblivosť, mitochondriálnu aktivitu a oxidatívne poškodenie lipidov bovinných spermii. Vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) bolo identifikované kvalitatívne a kvantitatívne zloženie špecifických biomolekúl. Spomedzi flavónov bol najviac zastúpeným cynarozid. Spomedzi fenolových kyselín bola kyselina chlorogénna najviac zastúpenou. Počítačom asistovaná analýza spermii (CASA) ukázala negatívny účinok extraktu na pohyblivosť spermii. Podobne, mitochondriálnym toxickým testom (MTT) sa potvrdil negatívny účinok extraktu na mitochondriálnu aktivitu. Avšak v prítomnosti extraktu sa významne zachovala integrita lipidov, čím sa dokázali antioxidantné účinky extraktu kôpru. Záverom však konštatujeme, že z globálneho hľadiska mal extrakt z listov kôpru negatívny účinok na funkciu spermii a neodporúčame jeho použitie ako potenciálneho prídavku do prezervačného média.

Kľúčové slová: *Anethum graveolens*, spermie, extrakt, samčia reprodukcia, kôpor

Úvod

Liečivé rastliny sú rozsiahlo využívané v tradičnej medicíne v prevencii alebo liečbe rôznych ochorení. Prospešné účinky etnofarmakologicky-významných rastlín sú pripisované širokému spektru bioaktívnych látok (D'Cruz et al., 2010). V súčasnosti sa množstvo rastlinných extraktov používa pri prevencii alebo liečbe mužskej subfertility, vrátane hypoaktívnej poruchy sexuálnej túžby, hormonálnej nerovnováhy, erektilnej a ejakulačnej dysfunkcie, ako aj subštandardných parametrov spermii a ejakulátu (Kamal et al., 2003). *Anethum graveolens* L.



(kôpor voňavý) je s obľubou využívaný ako korenie alebo ako základ pre výrobu éterických olejov. Kôpor je aromatická bylina z rodiny *Apiaceae*. Medzi najvýznamnejšie prchavé biomolekuly patrí karvón, α -felandrén, limonén, anetofurán a myristicín (Blank a Grosch, 1991; Jana a Shekhawat, 2010). Kôpor sa využíva na zmiernenie bolesti koliky a nadúvania u malých detí. Esenciálny olej zmierňuje črevné kŕče, zlepšuje trávenie a zvyšuje chuť do jedla. U dojčiacich žien vyvoláva produkciu mlieka a tiež pomáha pri liečbe močových ťažkostí (Duke, 2001; Jana a Shekhawat, 2010).

In vivo štúdie naznačujú, že kôprový extrakt stimuluje spermatogézu, ako aj steroidogézu u hlodavcov (Monsefi et al., 2011; Iamsaard et al., 2013). Na pochopenie účinkov potenciálne prospešných alebo škodlivých biomolekúl môže byť vhodnou stratégiou prevedenie experimentov v prostredí *in vitro* na primárnych bunkových kultúrach a tkanivách (Klinefelter et al. 1987; Jambor et al., 2018). Cieľom našej štúdie bolo zhodnotiť dynamiku vplyvu vybraných koncentrácií extraktu z listov kôpru na pohyblivosť, mitochondriálnu aktivitu a oxidatívne poškodenie membránových lipidov spermíí.

Materiál a metódy

Kôpor bol zozbieraný v Botanickej záhrade Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre v letnom období v roku 2016. Čerstvý rastlinný materiál bol vysušený, rozdrvený, odvážený a macerovaný v 96% etanole (Centralchem, Bratislava, Slovensko) počas 2 týždňov pri 20-22°C v tme. Etanol bol odparený v evaporátore (Cole-Parmer, Stone, Spojené kráľovstvo) pri zníženom tlaku (vakuová pumpa, KNF Neuberger, Freiburg, Nemecko). Materiál bol resuspendovaný v DMSO (dimetylsulfoxid; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Koncentrácia zásobného roztoku bola upravená na 1000 mg.ml⁻¹. Pre HPLC analýzu bol materiál lyofilizovaný a rozomletý na prášok. Do 1 g rastlinného materiálu sa pridalo 25 ml 80% metanolu (určený na HPLC; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Výsledná zmes sa mixovala v trepačke pri 250 otáčkach za minútu, 20-22°C počas 8 hodín, následne sa prefiltrovala a skladovala pri 5°C.

Špecifické HPLC štandardy, metanol (vhodný pre HPLC), acetonitril (vhodný pre HPLC) a kyselinu fosforečnú sme obdržali od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Dvakrát deionizovaná voda bola získaná použitím čistiaceho systému (Simplicity 185; Milipore SAS, Francúzsko). Každý štandard (0,5 mg) bol rozpustený v 10 ml metanolu. Následne sa štandardy spolu s extraktami prefiltrovali cez filtračný papier (č. 390, Munktell & Filtrak, Niederschlag, Nemecko), po ktorom nasledoval injekčný filter Q-Max (priemer 0,22 mm; Frisenette, Knebel, Dánsko). Analýza HPLC prebiehala pomocou 1260 Infinity II LC System (Agilent

Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Bola použitá kolóna C18 s reverznou fázou Purosphere (4 mm × 250 mm × 5 mm; Merck, Kenilworth, New Jersey, USA). Mobilná fáza pozostávala z acetonitrilu a 0,1% kyseliny fosforečnej v dvakrát deionizovanej vode. Počiatková prietoková rýchlosť bola nastavená na 1 ml.min⁻¹ pri injekčnom objeme 10 ml. Teplota kolóny bola nastavená na 30°C, zatiaľ čo vzorky a štandardy boli držané pri 4°C. Zber a analýza údajov sa uskutočnila pomocou softvéru Agilent OpenLab ChemStation for LC 3D Systems (Lukšič et al., 2016). Extrakt bol analyzovaný v triplikátoch.

Ejakuláty (n=20) sme obdržali od 10 pohlavne dospelých holštajnsko-frízskych býkov (Slovenské biologické služby, a.s., Nitra, Slovensko) pomocou sterilnej umelej vagíny. Vzorky boli transportované do VC AgroBioTech v termoske. Na experimenty boli použité vzorky, ktoré prešli vstupným testom (minimálne 70% pohyblivosť a koncentrácia 1 × 10⁹ spermii.ml⁻¹). Počas odberu a spracovania boli dodržané inštitucionálne a národné smernice pre starostlivosť a experimentálne využitie zvierat, ktoré boli schválené Štátnym veterinárnym a potravinovým ústavom Slovenskej republiky (č. 3398/11-221/3) a Etickou komisiou. Každá vzorka bola zriedená v pomere 1:40 fyziologickým roztokom, ktorý obsahoval rôzne koncentrácie extraktu (300, 150, 75 a 0 µg.ml⁻¹ v prípade kontrolnej skupiny). Vzorky sa kultivovali pri laboratórnej teplote 22-25°C. Analýzy boli vykonané v časoch 0, 2 a 24 hodín. Hodnotila sa motilita spermii, mitochondriálna aktivita a peroxidácia lipidov.

Motilita spermii bola analyzovaná pomocou počítačom asistovanej analýzy spermii (CASA; Verzia 14.0 TOX IVOS II; Hamilton-Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). Desať µl z každej skupiny bolo umiestnených na počítaciu komôrku Makler chamber (hĺbka 10 µm, 37°C, Sefi Medical Instruments, Haifa, Izrael), ktorá bola vložená do CASA systému. Za pohyblivé spermie sa považujú spermie s rýchlosťou minimálne 5 µm.s⁻¹. Objektívne sa hodnotilo minimálne 300 buniek.

Mitochondriálna aktivita bola hodnotená Mitochondriálnym toxickým testom (MTT). Princípom metódy je farebná zmena žltej tetrazoliovej soli (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrotetrazoliumbromid) na modré formazánové častice enzýmom sukcinátdehydrogenáza, ktorý je aktívny v nepoškodených spermiiach. Optickú denzitu sme stanovili pri vlnovej dĺžke 570 nm oproti 620 nm v prístroji Glomax Multi⁺ (Promega, USA) na 96 jamkových platničkách. Dáta sú vyjadrené v percentách kontrolnej skupiny.

Lipidová peroxidácia bola vyjadrená prostredníctvom stanovenia koncentrácie malondialdehydu (MDA) pomocou TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) metódy, modifikovanej na 96-jamkovú platničku. Každá vzorka bola ošetrovaná 5% SDS (dodecylsulfát sodný; Sigma-Aldrich, USA) a 0,53% kyselinou tiobarbitúrovou (TBA; Sigma-Aldrich, USA).

Zmes bola rozpustená v 20% kyseline octovej s pH upraveným na 3,5 pomocou hydroxidu sodného (Centralchem, Slovensko). Zmes sa varila na 90-100°C počas 1 hodiny. Následne sa ochladila 10 minút na ľade a odstredovala pri $1750 \times g$ počas 10 minút. Kolorimetrická reakcia bola vyhodnotená pri vlnovej dĺžke 540 nm v prístroji Glomax Multi⁺ (Promega, USA). Koncentrácia MDA je vyjadrená v $\mu\text{mol.g}^{-1}$ proteínu.

Štatistické spracovanie výsledkov bolo realizované v programe GraphPad Prism (verzia 6.0 pre Windows, GraphPad software, La Jolla, CA, USA, <http://www.graphpad.com>.) Na vyhodnotenie našich výsledkov bola použitá jednofaktorová analýza rozptylu s následným Dunnettovým testom. Úroveň štatistickej významnosti bola stanovená na *** - $P < 0,001$, ** - $P < 0,01$, * - $P < 0,05$.

Výsledky a diskusia

Koncentrácie špecifických biomolekúl identifikovaných HPLC metódou sú zobrazené v Tabuľke 1. Spomedzi flavónov bol najdominantnejšie zastúpeným cynarozid ($618,15 \pm 9,94 \text{ mg.g}^{-1}$ sušiny). Z fenolových kyselín bola najbohatšie zastúpená kyselina chlorogénová ($533,36 \pm 8,89 \text{ mg.g}^{-1}$ sušiny). Okrem týchto boli v extrakte identifikované nasledovné: kyselina neochlorogénová, karvón, limonén, kyselina salicylová a p-hydroxybenzoová, myristicín a kyselina vanilová (v poradí od najväčšieho po najmenšie zastúpenie).

Tabuľka č. 1: Kvalitatívna a kvantitatívna analýza špecifických biomolekúl [mg.g^{-1} sušiny] v kôprovom extrakte

Biomolekuly	[mg.g^{-1} sušiny]
Cynarozid	$618,15 \pm 9,94$
Karvón	$45,60 \pm 4,09$
Limonén	$17,51 \pm 2,66$
Myristicín	$11,35 \pm 1,22$
Kyselina chlorogénová	$533,36 \pm 8,89$
Kyselina neochlorogénová	$107,67 \pm 1,98$
Kyselina p-hydroxybenzoová	$12,04 \pm 2,27$
Kyselina salicylová	$17,27 \pm 1,89$
Kyselina vanilová	$8,77 \pm 2,01$

Legenda: Priemer \pm štandardná odchýlka

Podobne ako v našej štúdií, Świeca a Gawlik-Dziki (2008) identifikovali najviac zastúpenú kyselinu chlorogénovú spomedzi fenolových kyselín. Okrem nami identifikovaných látok boli identifikované aj biomolekuly zo skupiny flavonoidov ako luteolín, kvercetín, kaempferol, rutín, apigenín, daidzeín a naringenín (v poradí od najväčšieho po najmenšie zastúpenie).

Výsledky hodnotenia motility spermíí (Tabuľka 2) priniesli už v počiatočnom čase signifikantný pokles ($P < 0,05$) v prítomnosti $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ kôprového extraktu. Po 2 hodinách bol pozorovaný rovnaký trend, pričom signifikantný pokles motility ($P < 0,05$) nastal opäť v skupine ošetrenej $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ extraktu z listov kôpru. Po 24 hodinách bol pozorovaný signifikantný pokles v skupinách ošetrených kôprovým extraktom v množstve $150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($P < 0,05$) a $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($P < 0,01$).

Tabuľka č. 2: Motilita [%] spermíí v boviných ejakulátoch ošetrených kôprovým extraktom

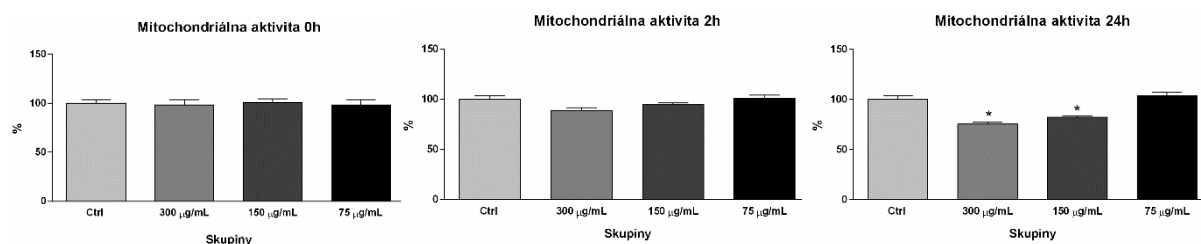
Čas	0h	2h	24h
Kontrola	$81,89 \pm 6,35$	$65,54 \pm 7,54$	$33,23 \pm 4,37$
$300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$58,31 \pm 4,72^*$	$38,89 \pm 2,88^*$	$11,00 \pm 1,10^{**}$
$150 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$73,13 \pm 4,11$	$56,32 \pm 2,19$	$15,23 \pm 2,55^*$
$75 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	$82,22 \pm 3,21$	$59,09 \pm 4,15$	$39,12 \pm 2,99$

Legenda: priemer \pm štandardná odchýlka; * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$

Napriek tomu, že účinky rôznych rastlinných extraktov sú s obľubou študované, účinok kôprového extraktu na samčiu reprodukciu je málo preskúmaný. Shojaee et al. (2014) študovali *in vivo* účinok extraktu semien kôpru na reprodukčné funkcie samcov potkanov. Skonštatovali pokles váhy semenníkov, čo sa odrazilo v celkovej koncentrácii a motilite spermíí. Okrem toho histopatologickými preparátmi dokázali zúženie semenotvorných tubulov, degeneráciu a dezorganizáciu zárodočného epitelu, čo vyústilo v abnormálne alternácie morfológických štruktúr spermíí a vo zvýšený počet nekrotických buniek.

Hodnotenie mitochondriálnej aktivity (Obrázok 1) neprinieslo markantné zmeny v počiatočnej analýze. Po 2 hodinách môžeme sledovať trend klesajúcej mitochondriálnej aktivity s pribúdajúcou koncentráciou kôprového extraktu v porovnaní s kontrolnou skupinou. Po 24 hodinách boli pozorované signifikantné zníženia ($P < 0,05$) v skupinách ošetrených 150 a $300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ extraktu.

Obrázok č. 1: Mitochondriálna aktivita [%] spermíí v boviných ejakulátoch ošetrených kôprovým extraktom



Legenda: * - $P < 0,05$



Výsledky mitochondriálnej aktivity v našej štúdií odzrkadľujú výsledky pohyblivosti spermíí. Podobne Matsuura et al. (2017) potvrdili koreláciu medzi mitochondriálnou aktivitou spermíí realizovanou MTT testom a pohyblivosťou spermíí analyzovanou CASA systémom. Štúdie hodnotiace účinok kôprového extraktu na mitochondrie sú zastúpené v obmedzenom počte. *In vivo* výskum na folikulárnych bunkách Wistar samíc ukázal, že podávaním extraktu semien kôpru v θ koncentrácii $0,45 \text{ g.kg}^{-1}$ vodného extraktu alebo 5 g.kg^{-1} etanolového extraktu došlo k výraznému zvýšeniu počtu mitochondrií (Monsefi et al., 2011). V našom experimente sme nasledovali počet mitochondrií, avšak z našich výsledkov vyplýva, že použitie extraktu listov kôpru *in vitro* môže nepriaznivo ovplyvniť aktivitu mitochondriálnej sukcinátdehydrogenázy, a tým znížiť aktivitu ostatných enzýmov dýchacieho reťazca, čo vedie k zníženej tvorbe ATP v mitochondriálnom oddieli spermíí.

Hodnotenie lipidovej peroxidácie (Tabuľka 3) v počiatočnom čase neprineslo signifikantné rozdiely medzi experimentálnymi skupinami a kontrolnou skupinou. Avšak každá vybraná koncentrácia kôprového extraktu znížila koncentráciu MDA v experimentálnych skupinách. Po 2 a 24 hodinách bol pozorovaný signifikantný pokles ($P < 0,001$) koncentrácie MDA v každej skupine oštrenej kôprovým extraktom.

Tabuľka č. 3: Oxidatívne poškodenie membránových lipidov [$\mu\text{mol MDA.g}^{-1}$ proteínu] spermíí v ejakulátoch oštrenej kôprovým extraktom.

Čas	0h	2h	24h
Kontrola	$0,39 \pm 0,08$	$0,92 \pm 0,06$	$2,28 \pm 0,41$
300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$0,36 \pm 0,05$	$0,55 \pm 0,04^{***}$	$1,29 \pm 0,22^{***}$
150 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$0,29 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,03^{***}$	$0,92 \pm 0,46^{***}$
75 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	$0,26 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,04^{***}$	$0,99 \pm 0,28^{***}$

Legenda: priemer \pm štandardná odchýlka; *** - $P < 0,001$

Z výsledkov hodnotenia lipidovej peroxidácie vyplýva, že látky, ktoré sú obsiahnuté v kôprovom extrakte môžu pozitívne ovplyvniť pomer antioxidantov k voľným radikálom, čím môžu zabezpečiť vhodné prostredie pre udržateľnosť lipidových štruktúr spermie. Ochranou integrity lipidov v membráne spermie sa zabezpečí udržanie celistvosti membrány a viability spermie, čím sa zachová fertilizačný potenciál vzorky. Bahramikia a Yazdanparast (2007) vo svojej štúdií potvrdili pozitívne antioxidačné účinky extraktu z listov kôpru. Konštatovali, že kôprový extrakt môže modulovať aktivitu enzymatických a neenzymatických antioxidantov



(superoxiddismutáza, kataláza, glutatiónperoxidáza, glutatiónreduktáza a redukovaný glutatión) a redukovať lipidovú peroxidáciu pri oxidatívnom zaťažení buniek.

Záver

Na záver môžeme skonštatovať, že *in vitro* účinok extraktu z listov kôpru na štruktúru a funkciu bovinných spermíí bol veľmi nejasný. Na jednej strane boli v kôprovom extrakte identifikované látky s potenciálnym antioxidantným účinkom, ktorý bol dokázaný zníženým množstvom malóndialdehydu ako sekundárneho produktu lipidovej peroxidácie. Na druhej strane chemické zloženie kôprového extraktu nezlepšovalo ani motilitu, ani mitochondriálnu aktivitu spermíí. Preto sú nevyhnutné podrobnejšie štúdie účinku kôprového extraktu na štruktúru a funkciu spermíí. Avšak na základe našich výsledkov neodporúčame využitie extraktu z listov kôpru ako potenciálny suplement prezervačného média.

Pod'akovanie

Táto štúdia bola podporená projektom Európskeho spoločenstva č. 26220220180: Budova VC AgroBioTech, projektami VEGA 1/0039/16, KEGA 009SPU-4/2018 a APVV-15-0544.

Literatúra

- Bahramikia, S., Yazdanparast, R. 2007. Improvement of liver antioxidant status in hypercholesterolemia rats treated with *Anethum graveolens* extracts. *Pharmacol online*. 3: 119-132.
- Blank, I., Grosch, W. 1991. Evaluation of Potent Odorants in Dill Seed and Dill Herb (*Anethum graveolens* L.) by Aroma Extract Dilution Analysis. *J Food Sci*. 56(1): 63-67.
- D'Cruz, S. C., Vaithinathan, S., Jubendradass, R., Mathur, P. P. 2010. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian J Androl*. 12(4): 468-479.
- Duke, J. A. 2002. *Handbook of medicinal herbs*. Londýn: CRC Press, 2002, 896 s., ISBN 978-0-42-912658-1
- Iamsaard, S., Prabsattroo, T., Sukhorum, W., Muchimapura, S., Srisaard, P., Uabundit, N., Thukhammee, W. 2013. *Anethum graveolens* Linn. (dill) extract enhances the mounting frequency and level of testicular tyrosine protein phosphorylation in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*. 14(3): 247-252.
- Jambor, T., Greifova, H., Kovacik, A., Kovacikova, E., Tvrda, E., Forgacs, Z., Massanyi, P., Lukac, N. 2018. Parallel effect of 4-octylphenol and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) alters steroidogenesis, cell viability and ROS production in mice Leydig cells. *Chemosphere*. 199: 747-754.
- Jana, S., Shekhawat, G. S. 2010. *Anethum graveolens*: An Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacogn Rev*. 4(8): 179-184.
- Kamal, R., Gupta, R. S., Lohiya, N. K. 2003. Plants for male fertility regulation. *Phytoter Res*. 17(6): 579-590.
- Klinefelter, G. R., Hall, P. F., Ewing, L. L. 1987. Effect of luteinizing hormone deprivation *in situ* on steroidogenesis of rat Leydig cells purified by a multistep procedure. *Biol Reprod* 36(3): 769-783.



Lukšič, L., Árvay, J., Vollmannová, A., Tóth, T., Škrabanja, V., Trček, J., Germ, M., Kreft, I. 2016. Hydrothermal treatment of Tartary buckwheat grain hinders the transformation of rutin to quercetin. *J Cereal Sci.* 72: 131-134.

Matsuura, K., Huang, H. W., Chen, M. C., Chen, Y., Cheng, C. M. 2017. Relationship between Porcine Sperm Motility and Sperm Enzymatic Activity using Paper-based Devices. *Sci Rep.* 7: 46213.

Monsefi, M., Zahmati, M., Masoudi, M., Javidnia, K. 2011. Effects of *Anethum graveolens* L. on fertility in male rats. *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 16(6): 488-497.

Shojaee, P., Ghasemi, L. V., Salmanzadeh, H., Estakhr, J. 2014. The Effects of *Anethum graveolens* L. Seeds on the Male Reproductive Functions and CREM Gene Expression in the Testis of Rat. *Res J App Sci Eng Technol.* 7(9): 1883-1886.

Świeca, M., Gawlik-Dziki, U. 2008. Influence of thermal processing on phenolics compounds level and antiradical activity of dill (*Anethum graveolens* L.). *Herba Pol.* 54(3): 59-69.

Pestrec mariánsky: liečivá rastlina s významnými terapeutickými vlastnosťami

Veronika Valková^{1,2}, Hana Ďúranová¹, Renáta Lužicová¹, Jana Bilčíková¹, Miroslav Habán²

¹Výskumné centrum AgroBioTech SPU v Nitre, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

²Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra udržateľného poľnohospodárstva a herbológie, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

*korešpondujúci autor: veronika.valkova@uniag.sk

Abstrakt

V poslednom období sa čoraz viac pozornosti vedeckej komunity sústreďuje na využitie primárneho extraktu z plodov pestreca mariánskeho, t.j. silymarínu (štandardizovaná zmes flavonolignanov) pri liečbe rôznych ochorení. Predkladaný príspevok je zameraný na zosumarizovanie potenciálnych benefičných účinkov uvedeného extraktu na zdravie ľudí a zvierat, ktorý štrukturálne pozostáva zo siedmich hlavných flavonolignanov (silybín A, silybín B, izosilybín A, izosilybín B, silydianín, silychristín a izosilychristín) a flavonoidu taxifolínu. Preventívny a terapeutický účinok silymarínu bol potvrdený u ľudí a rôznych experimentálnych zvierat s ochoreniami pečene. Okrem hepatoprotektívneho účinku vykazuje silymarín tiež protirakovinové, protizápalové, neuroprotektívne, laktogénne a ďalšie farmakologické vlastnosti. Účinnosť pestreca mariánskeho v prevencii a terapii viacerých ochorení predurčuje jeho sľubné využitie v rámci alternatívnej medicíny.

Kľúčové slová: *Silybum marianum*, flavonolignany, silymarín, hepatoprotekcia, farmakologické účinky

Botanická charakteristika

Pestrec mariánsky, *Silybum (S.) marianum* (L.) Gaertn. (čelad' *Asteraceae*) je uznávaná liečivá rastlina, ktorá rastie v teplej a suchej pôde (Abenavoli et al., 2010). Priama stonka tejto jednoročnej, príp. dvojročnej rastliny (Habán et al., 2016) dorastá do výšky 0,5 - 1,5 m a jej charakteristickým znakom sú striedavé, lesklé, zelené, okolo žilnatiny bielo škvrnité listy, obojpohlavné, purpurové alebo bledofialové kvety a sivohnedé nažky (*Silybi mariani fructus*)



s bielym chocholčekom (Habán et al., 2015). Extrakt pestreca mariánskeho sa získava z jeho rozdrvených plodov (Wagner et al., 1968).

Názov *S. marianum* sa v európskych krajinách spája s menom Panny Márie. Medzi ľuďmi sa traduje, že Panna Mária sama povedala ľuďom o liečivých vlastnostiach pestreca mariánskeho a biele škvrny na listoch boli dokonca označované ako „mlieko Najsvätejšej Matky Božej“ (Abenavoli et al., 2010).

Chemické zloženie extraktu pestreca mariánskeho

Aktívny komplex pestreca mariánskeho sa označuje ako silymarín (Abenavoli et al., 2010). Tento lipofilný extrakt obsahuje množstvo štruktúrne príbuzných flavonolignanov, z ktorých silybín A a B, izosilybín A a B, silychristín A, izosilychristín a silydianín spolu s flavonoidom taxifolínom sú považované za silymarínové markerové zlúčeniny používané na kvantitatívne analýzy (AbouZid et al., 2016). Saller et al. (2001) uvádzajú, že hlavnou a najaktívnejšou zložkou uvedených izomérov je silybín (60 - 70 %), po ktorom nasleduje silychristín (20 %), silydianín (10 %) a izosilybín (5 %). K ďalším chemickým komponentom plodov *S. marianum* patria podľa Abenavoli et al. (2010) flavonoidy (kvercetín, dihydrokaempferol, kaempferol, apigenín, naringín, eriodyktiol, chrysoeriol), proteíny (25 - 30 %), sacharidy (arabínóza, ramnóza, xylóza, glukóza), tokoferol, steroly (cholesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol) a lipidy (15 - 30 %) vo forme triglyceridov (60 % linolová, 30 % kyselina olejová a 9 % kyselina palmitová).

Biologická dostupnosť silymarínu

Komerčne dostupné extrakty z pestreca mariánskeho obsahujú 70 - 80 % silymarínu (AbouZid et al., 2016). Obsah silymarínového komplexu sa v nažkách uvedenej rastliny pohybuje v rozmedzí 0,2 - 0,6 % (Habán et al., 2009) v závislosti od jej odrody (Habán et al., 2010).

Abenavoli et al. (2010) poukazujú na skutočnosť, že absorpcia silymarínu v gastrointestinálnom trakte človeka je pomerne nízka (20 - 50 %). Všetky farmakokinetické parametre silymarínu boli stanovené vzhľadom na jeho najaktívnejšiu zložku, t.j. silybín (Javed et al., 2011). Zistilo sa, že po perorálnej absorpcii sa približne 80 % dávky silybínu vylučuje do žlče (Abenavoli et al., 2010) vo forme sulfátov a konjugátov glukuronidu (Saller et al., 2001) a približne 10 % vstupuje do enterohepatickej cirkulácie (Abenavoli et al., 2010). V pečňových bunkách sa metabolizuje na o-demetylovaný silybín (hlavný metabolit) a mono- a dihydroxy-silybín (minoritné) metabolity (Jančová et al., 2007). Počas II fázy biotransformácie vznikajú ďalšie konjugáty silybínu, a to: silybín monoglukuronid, silybín diglukuronid, silybín monosulfát a



silybín diglukuronid sulfát (Javed et al., 2011). Po perorálnej aplikácii boli maximálne koncentrácie silymarínu v plazme ľudí pozorované v priebehu 1,5 - 4 hod. Okrem exkrécie žlčou sa približne 5 % silymarínu vylučuje do moču ako celkový silymarín (s renálnym klírensom približne 30 ml/min; Corchete, 2008) a jeho neabsorbovaná časť sa vylučuje stolicou. Účinná denná dávka silymarínu sa u dospelých ľudí pohybuje v rozmedzí 240 - 600 mg (Saller et al., 2001). Žiadne symptómy intoxikácie, či vedľajšie účinky neboli zaznamenané u dospelých ľudí ani pri dennej dávke 900 mg silymarínu, rozdelenej do dvoch alebo troch dávok. Avšak pri dávkach presahujúcich 1500 mg/deň sa môžu objaviť laxatívne účinky silymarínu so zvýšenou sekréciou žlče (Abenavoli et al., 2010).

Účinky silymarínu na ľudské zdravie a ich molekulárne mechanizmy

Hepatoprotektívna aktivita

Silymarín je známy najmä vďaka svojim regeneračným a chemoprotektívnym účinkom na pečeň, vďaka čomu je často vyhľadávaným a používaným hepatoprotektívnym agensom (Testino et al., 2013). Vzhľadom na jeho schopnosť regenerovať pečeňové bunky sa používa pri liečbe rôznych ochorení tohto detoxikačného orgánu, ako je alkoholové poškodenie pečene, nealkoholové tukové ochorenie pečene, vírusová hepatitída, poškodenie pečene v dôsledku intoxikácie xenobiotikami a hubami, steatohepatitída a cirhóza pečene (Abenavoli et al., 2018). Základný molekulárny mechanizmus hepatoprotektívnej aktivity silymarínu je prisudzovaný najmä jeho antioxidačným (Borsari et al., 2001), antivírusovým, protizápalovým a imunomodulačným účinkom (Wagoner a kol., 2010). Navyše, výsledky viacerých prác preukázali, že silymarín je schopný vytvárať komplexy s toxínmi, zabraňujúc ich vstupu do hepatocytov, metabolicky stimulovať hepatocyty (Morales-González et al., 2013), zvyšovať syntézu proteínov v hepatocytoch stimuláciou aktivity RNA polymerázy I (Vargas-Mendoza et al., 2014) a pôsobiť ako chelátor železa (Borsari et al., 2001).

Antikarcinogénne účinky

Antikarcinogénny účinok silymarínu bol preukázaný vo viacerých *in vivo* a *in vitro* štúdiách pri rôznych typoch nádorových ochorení (Post-White et al. 2007; Won et al., 2018). Prostredníctvom interferencie s expresiou regulátorov bunkového cyklu a proteínov podieľajúcich sa na apoptóze buniek sú silymarín a silybín schopné narušiť rovnováhu medzi viabilitou buniek a ich apoptózou (Tyagi et al., 2002). Won et al. (2018) vo svojej štúdii zaznamenali silymarínom indukovanú apoptózu v nádorových bunkových líniiach ústnej dutiny (HSC-4, YD15 a Ca9.22) prostredníctvom aktivácie kaspázy-8 a receptora smrti 5.



Antikarcinogénny účinok silybínu je sprostredkovaný aj mechanizmami cielenej proliferácie buniek, inflamácie, angiogenézy a metabolizmom nádorových buniek (Deep a Agarwal, 2010).

Protizápalové účinky

Viaceré štúdie demonštrujú benefičný účinok silymarínu i pri rôznych experimentálnych modeloch akútneho a chronického zápalu, napr. u potkanov s edémom končatiny vyvolaným účinkom formalínu (Juma et al., 2009), pri alergických zápaloch dýchacích ciest, atopickej dermatitíde, či alergickej rinitíde (Bakhshae et al., 2011; Choi et al., 2012; Mady et al., 2016). Protizápalové účinky silymarínu sú prisudzované jeho schopnosti potlačiť metabolickú dráhu 5-lipoxygenázy, zapríčiňujúc inhibíciu syntézy leukotriénov (Saller et al., 2001), inhibovať mRNA viacerých prozápalových proteínov a komponentov signálnych dráh, ako je nukleárny faktor kappa B (NF- κ B), transkripčný faktor forkhead box O (FOXO; Lovelace et al., 2015), cyklooxygenáza 2 (COX-2), lipoxygenáza (LOX), indukibilná syntáza oxidu dusnatého (iNOS), faktor nádorovej nekrózy (TNF) a interleukín 1 (IL-1) (Agarwal et al., 2006).

Neuroprotektívne účinky

Silymarín je neoceniteľným potenciálnym agensom v prevencii vzniku mnohých neurologických ochorení vrátane Alzheimerovej choroby, Parkinsonovej choroby, cerebrálnej ischémie (Borah et al., 2013) a obsedantno-kompulzívnej poruchy. Medzi hlavné mechanizmy neuroprotektívneho účinku silymarínu patria inhibícia aktivity monoaminoxidázy (MAO, katalyzujúcej oxidačnú deamináciu monoamínov; Yin et al., 2011), inhibícia oxidačného stresu a zápalových reakcií generovaných v priebehu neurodegeneratívnych procesov, bunkovej apoptózy, modulácia viacerých kináz zapojených do signálnych dráh buniek a neurotrofné účinky (Borah et al., 2013).

Laktogénny účinok

Vo viacerých experimentálnych prácach bol preukázaný potenciálny laktogénny účinok silymarínu v zmysle zvýšenej produkcie mlieka u ľudí a zvierat (kravy a potkany; Peila et al., 2015). Uvedená skutočnosť by mohla byť asociovaná s vplyvom tohto extraktu na zvýšenie hladín prolaktínu, ktoré bolo zaznamenané u samíc potkanov (Capasso, 2014) a ošípaných, ktoré boli kŕmené silymarínom (Farmer et al., 2014). Zvyšovanie hladiny prolaktínu vplyvom silymarínu by mohlo aspoň čiastočne súvisieť s jeho vplyvom na dopamínový D2 receptor (Capasso, 2014).



Záver

Súčasnne experimentálne a klinické výskumy naznačujú, že silymarín, t.j. komplex aktívnych zložiek extraktu z plodov pestreca mariánskeho vykazuje benefičné účinky na ľudské zdravie. Silymarínové flavonolignanové a flavonoidné zložky, izolované z tejto rastliny, sú predmetom záujmu viacerých vedeckých štúdií, ktoré umožnili určiť ich hepatoprotektívne, protirakovinové, protizápalové, neuroprotektívne a laktogénne účinky, potenciálne využiteľné pre terapeutické účely. Extrakty z pestreca mariánskeho sú bezpečné a dobre tolerované, s minimálnymi toxickými alebo nepriaznivými účinkami na organizmus ľudí a zvierat. Vzhľadom na uvedené skutočnosti sa pestrecový výťažok čoraz viac aplikuje vo farmaceutickom priemysle, alternatívnej medicíne, potravinárstve, vo veterinárnej praxi a výžive zvierat.

PodĎakovanie

Vedecká publikácia vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech” ITMS 26220220180.

Literatúra

- Abenavoli, L., Capasso, R., Milic, N., Capasso, F. 2010. Milk thistle in liver diseases: past, present, future. *Phytother Res.* 24(10): 1423-1432.
- Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milić, N., Cicala, C., Santini, A., Capasso, R. 2018. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. *Phytother Res.* 32(11): 2202-2213.
- AbouZid, S. F., Chen, S. N., Pauli, G. F. 2016. Silymarin content in *Silybum marianum* populations growing in Egypt. *Ind Crops Prod.* 83: 729-737.
- Agarwal, R., Agarwal, C., Ichikawa, H., Singh, R. P., Aggarwal, B. B. 2006. Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side. *Anticancer Res.* 26(6B): 4457-4498.
- Bakhshae, M., Jabbari, F., Hoseini, S., Farid, R., Sadeghian, M. H., Rajati, M., Mohamadpoor, A. H., Movahhed, R., Zamani, M. A. 2011. Effect of silymarin in the treatment of allergic rhinitis. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 145(6): 904-909.
- Borah, A., Paul, R., Choudhury, S., Choudhury, A., Bhuyan, B., Talukdar, A. D., Choudhury, D. M., Mohanakumar, K. P. 2013. Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: Insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS Neurosci Ther.* 19(11): 847-853.
- Borsari, M., Gabbi, C., Ghelfi, F., Grandi, R., Saladini, M., Severi, S., Borella, F. 2001. Silybin a new iron-chelating agent. *J Inorg Biochem.* 85(2-3): 123-129.
- Capasso, R. 2014. Effect of Silitidil, a standardized extract of milk thistle, on the serum prolactin levels in female rats. *Nat Prod Commun.* 9(7): 943-944.
- Choi, Y. H., Jin, G. Y., Guo, H. S., Piao, H. M., Li, Ch., Li, G. Z., Yan, G. H. 2012. Silibinin attenuates allergic airway inflammation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 427(3): 450-455.
- Corchete, P. 2008. *Silybum marianum* (L.) Gaertn: the source of silymarin. In: *Bioactive Molecules and Medicinal Plants.* Berlin Heidelberg: Springer, 2008, s. 123-148, ISBN 978-3-540-74600-3.



- Deep, G., Agarwal, R. 2010. Antimetastatic efficacy of silibinin: molecular mechanisms and therapeutic potential against cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29(3): 447-463.
- Farmer, C., Lapointe, J., Palin, M. F. 2014. Effects of the plant extract silymarin on prolactin concentrations, mammary gland development, and oxidative stress in gestating gilts. *J Anim Sci.* 92(7): 2922-2930.
- Habán, M., Otepka, P., Habánová, M. 2009. Production and quality of milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in cultural conditions of warm agri-climatic macroregion. *HORTSCI.* 36(2): 69-74.
- Habán, M., Habánová, M., Otepka, P., Kobida, L. 2010. Milk thistle (*Silybum marianum* [L.] Gaertn.) cultivated in polyfunctional crop rotation and its evaluation. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.* 42(1): 111-117.
- Habán, M., Grančai, D., Luščáková, D. 2015. Interesting and less well-known herbal drugs in the Pharmacopoeia and Pharmaceutical Codex (7). *Liečivé rastliny.* 52(1): 29-30.
- Habán, M., Luščáková, D., Macak, M., Ražná, K. 2016. The Impact of Multifunctional Crop Rotation on the Yield of Milk Thistle Fruits in the Years 2012–2015. *JCEA.* 17(4): 1096-1103.
- Jančová, P., Anzenbacherova, E., Papoušková, B., Lemr, K., Lužná, P., Veinlichová, A., Azenbacher, P., Šimánek, V. 2007. Silybin is metabolized by cytochrome P450 2C8 *in vitro*. *Drug Metab Dispos.* 35(11): 2035-2039.
- Javed, S., Kohli, K., Ali, M. 2011. Reassessing bioavailability of silymarin. *Altern med rev.* 16(3): 239.
- Juma, K. M., Ahmed, Z. A., Numan, I. T., Hussain, S. A. R. 2009. Dose-dependent anti-inflammatory effect of silymarin in experimental animal model of chronic inflammation. *Afr J Pharm Pharmacol.* 3(5): 242-247.
- Lovelace, E. S., Wagoner, J., MacDonald, J., Bammler, T., Bruckner, J., Brownell, J., Beyer, R. P., Zink, E. M., Kim, E. M., Kyli, J. E., Webb-Robertson, B. J. M., Waters, K.M., Metz, T.O., Farin, F., Oberlies, N. H., Polyak, S. J. 2015. Silymarin suppresses cellular inflammation by inducing reparative stress signaling. *J Nat Prod.* 78(8): 1990-2000.
- Mady, F. M., Essa, H., El-Ammawi, T., Abdelkader, H., Hussein, A. K. 2016. Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatitis. *Drug Des Devel Ther.* 2016(10): 1101-1110.
- Morales-González, J. A., Gayosso-Islas, E., Sánchez-Moreno, C., Valadez-Vega, C., Morales-González, Á., Esquivel-Soto, J., Esquivel - Chirino, C., García-Luna y Gonzáles-Rubio, Madrigal-Santillán, E. 2013. Protective effect of silymarin on liver damage by xenobiotics. In: *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. Rijeka: IntechOpen, 2013, s. 485-501, ISBN 978 953 51 1123 8.
- Peila, C., Coscia, A., Tonetto, P., Spada, E., Milani, S., Moro, G., Fontana, C., Vagliano, L., Tortona, C., DiBella, E., Bertino, E. 2015. Evaluation of the galactogogue effect of silymarin on mothers of preterm newborns (< 32 weeks). *Pediatr Med Chir.* 37(3): 13-17.
- Post-White, J., Ladas, E. J., Kelly, K. M. 2007. Advances in the use of milk thistle (*Silybum marianum*). *Integr Cancer Ther.* 6(2): 104-109.
- Saller, R., Meier, R., Brignoli, R. 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.* 61(14): 2035-2063.
- Testino, G., Leone, S., Ansaldi, F., Borro, P. 2013. Silymarin and S-adenosyl-L-methionine (SAME): two promising pharmacological agents in case of chronic alcoholic hepatothopathy. A review and a point of view. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 59(4): 341-356.
- Tyagi, A., Bhatia, N., Condon, M. S., Bosland, M. C., Agarwal, C., Agarwal, R. 2002. Antiproliferative and apoptotic effects of silibinin in rat prostate cancer cells. *Prostate.* 53(3): 211-217.



Vargas-Mendoza, N., Madrigal-Santillán, E., Morales-González, Á., Esquivel-Soto, J., Esquivel-Chirino, C., González-Rubio, M. G. L., Gayosso-de-Lucio, J. A., Morales-González, J. A. 2014. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 6(3): 144.

Wagner, H., Hörhammer, L., Münster, R. 1968. On the chemistry of silymarin (silybin), the active principle of the fruits from *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (*Carduus marianus* L.). *Arzneim. Forsch.* 18(6): 688.

Wagoner, J., Negash, A., Kane, O. J., Martinez, L. E., Nahmias, Y., Bourne, N., Owen, D. M., Grove, J., Brimacombe, C., McKeating, J. A., Pécheur, E. I., Graf, T. N., Oberlies, N. H., Lohmann, V., Cao, F., Tavis, J. E., Polyak, S. J. 2010. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology*, 51(6): 1912-1921.

Won, D. H., Kim, L. H., Jang, B., Yang, I. H., Kwon, H. J., Jin, B., Oh, S. H., Kang, H. P. M., Shin, J. A., Cho, S. D. 2018. *In vitro* and *in vivo* anti-cancer activity of silymarin on oral cancer. *Tumour Biol.* 40(5): 1-11.

Yin, F., Liu, J., Ji, X., Wang, Y., Zidichouski, J., Zhang, J. 2011. Silibinin: A novel inhibitor of A β aggregation. *Neurochem Int.* 58(3): 399-403.



Toxicita hliníka a jeho vplyvy na bunkový cyklus

Petra Borotová^{1*}, Miroslava Požgajová¹

¹Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

**petra.borotova@uniag.sk*

Abstrakt

Hliník sa vo forme zlúčenín bežne vyskytuje v prírode, vo vode, v pôdach aj v potravinách. V neutrálnom pH je takmer nerozpustný, ale v mierne kyslom prostredí sa uvoľňuje vo forme hliníkových iónov Al^{3+} . Táto forma hliníka môže nepriaznivo vplyvať na metabolizmus mikroorganizmov, rastlín aj živočíchov. Expozícia hliníkom je bežnou súčasťou života, ale jeho prestup do krvného obehu je pomerne nízky. Po absorpcii sa však hliník môže dostať do orgánov celého tela. Jeho nadmerná expozícia spôsobuje kumuláciu v rôznych tkanivách, čo má za následok poruchy od bunkového metabolizmu až po rozvoj neurodegeneratívnych ochorení. Príjem hliníka v potrave nemá v ľudskom organizme žiadnu biologicky pozitívnu rolu, a preto je potrebná snaha minimalizovať možnosť expozície touto látkou. Keďže nie sú známe všetky toxické efekty hliníka na základné biologické javy organizmu, ako napríklad bunkový cyklus, na objasnenie ďalších vplyvov hliníka sú preto využívané modelové organizmy.

Kľúčové slová: Hliník, expozícia, absorpcia, toxicita

Úvod

Hliník je najrozšírenejší kov v prírode. Tvorí 8 % zemskej kôry vo forme zlúčenín, hlavne ako hornina bauxit. Taktiež sa bežne nachádza v potravinách a pitnej vode, ale aj v kuchynských potrebach a plechoch na pečenie, v hliníkových fóliách alebo v antiperspirantoch. Hliník sa vyskytuje aj v pôdach, na ktorých sú pestované poľnohospodárske plodiny. Medzi potraviny obsahujúce hliník patria tavené syry, pečivo, obilné výrobky a potravinové aditíva, napr. konzervačné činidlá, prípadne farbivá. Do pitnej vody sa hliník dostane prirodzene z prostredia aj vďaka procesom čistenia vody. Potraviny, ktoré obsahujú kyseliny, tiež môžu mierne napomôcť uvoľňovaniu hliníka z nádob na prípravu jedál (Stahl et al., 2017). Obsah



hliníkových zlúčenín je niekoľkonásobne vyšší v nápojoch, ktoré sú uskladnené v hliníkových plechovkách, na rozdiel od nápojov skladovaných vo fľašiach z iného materiálu (Duggan et al., 1992).

Expozícia a absorpcia hliníka

Hliník sa do organizmu môže dostať orálne, cez pokožku, cez nosovú sliznicu alebo pľúca (Exley, 2013). Hlavným zdrojom expozície do organizmu sú potraviny, avšak iba 0,1 % prijatého hliníka je biodostupná. Absorpcia hliníka z pitnej vody je stanovená na 0,3 %, ale možnosť expozície je nižšia (Yokel et al., 2008). Vstrebávanie hliníka z potravín začína v dvanástniku, v počiatočnej časti tenkého čreva. Vo fyziologickom pH sú hliníkové zlúčeniny takmer nerozpustné a nie sú schopné inkorporácie do buniek, avšak prítomnosť organických kyselín zvyšuje rozpustnosť týchto zlúčenín a ich schopnosť vstrebávať sa (Yokel a McNamara, 2001). Toxicita rozpustných foriem hliníka závisí na množstve hliníkových iónov Al^{3+} , ktoré sa dostanú do cieľových tkanív. V krvnom obehú sa väčšina hliníka viaže na transferín, glykoproteín, ktorý zabezpečuje prenos železa (Exley a Mold, 2015). Touto cestou môže byť hliník roz distribuovaný do orgánov, hlavne do kostí, pľúc, svalov, pečene a mozgu (Priest, 2004). Pomocou receptorov je hliník schopný prekročiť hematoencefalickú bariéru, čím môže vznikáť neurotoxicita, ktorá zvyšuje risk rozvoja neurodegeneratívnych ochorení (Huat et al., 2019). Akútna toxicita hliníkom z potravy nebola pozorovaná, avšak nadmernou expozíciou sa môže akumulovať v tkanivách. Majoritná časť absorbovaného hliníka je z tela eliminovaná pomocou obličiek a vylučovacej sústavy. Keďže z celkového príjmu hliníka je absorbované menej ako 1 %, zvyšná časť je vylúčená stolicou (Becaria et al., 2002).

Tolerovateľný týždenný príjem hliníka

Tolerovateľný príjem hliníka bol v roku 2008 stanovený Európskym úradom pre bezpečnosť potravín na 1 mg/kg telesnej hmotnosti/týždeň. Priemerná týždenná expozícia hliníkom sa u dospelého človeka pohybuje od 0,2 do 1,5 mg/kg telesnej hmotnosti. Expozícia je veľmi variabilná v závislosti od hmotnosti, veku, ale aj od krajiny, v ktorej človek žije. Vo Francúzsku bola zistená expozícia u mladých ľudí až do 2,3 mg/kg telesnej hmotnosti/týždeň (EFSA, 2008). WHO v roku 2011 stanovilo tolerovateľný týždenný príjem hliníka na 2 mg/kg telesnej hmotnosti (WHO | JECFA, 2011).



Vplyv hliníkových iónov na organizmus

Najviac absorbovaného hliníka sa ukladá v kostiach. Spôsobuje odčerpávanie minerálov z kostných buniek, čo prispieva k vzniku osteomalácie. Indukuje aj apoptózu osteoblastov a znemožňuje tak správnu formáciu kostí (Chappard et al., 2016; Rodríguez a Mandalunis, 2018). U pacientov s problémami obličiek, ktorí podstúpili dialýzu, bola pozorovaná mikrocytická anémia, ktorá súvisela s prítomnosťou hliníka v dialyzačnej kvapaline (Mahieu et al., 2000). Nadmerná expozícia hliníka má vplyv aj na funkcie centrálnej nervovej sústavy. U pacientov po dialýze sa tiež prejavila dialyzačná encefalopatia. Začali sa rozvíjať rečové poruchy, mentálne a behaviorálne poruchy, zhoršenie pamäte a dezorientácia (Chen et al., 2018).

Hliník má vplyv aj na celulórnú funkciu hepatocytov. Narúša rovnováhu mitochondriálneho metabolizmu a prispieva k vzniku oxidatívneho stresu. Vede tiež k akumulácii lipidov v bunkách, čím prispieva k mnohým ochoreniam pečene a tiež k obezite (Mailloux et al., 2011). V mozgu sa hliník vyskytuje v nižších koncentráciách ako v iných tkanivách, avšak po úspešnom prestupe cez hematoencefalickú bariéru je rozdistribuovaný do všetkých častí mozgu. Chronická expozícia hliníkom je spojená so zvýšeným rizikom vzniku Alzheimerovej choroby. Zvýšená prítomnosť hliníka bola dokázaná v neurónoch aj v gliových bunkách (Mirza et al., 2016; Wang et al., 2016).

Toxicita hliníka na bunkovej úrovni

Na bunkovej úrovni súvisí toxicita hliníkom so vznikom β -amyloidných plakov. Vplýva na konformačné zmeny a agregáciu amyloidu beta, ktorý úzko súvisí so vznikom Alzheimerovej choroby (Kawahara a Kato-Negishi, 2011). Mozgové bunky sú najviac náchylné na oxidatívny stres a prítomnosť reaktívnych foriem kyslíka. Hliník dokáže indukovať oxidatívny stres, čo vedie k apoptóze mozgových buniek a rozvoju neurodegeneratívnych chorôb. Produkty oxidácie proteínov, lipidov a DNA boli nájdené v tkanivách pacientov s neurodegeneratívnymi ochoreniami (Kumar a Gill, 2014).

Toxicita hliníkom zahŕňa tiež porušenie homeostázy magnézia, vápnika a železa v bunke (Yokel a McNamara, 2001). Výskum na intestinálnych bunkách ukázal, že hliníkové ióny mali vplyv na zastavenie bunkového cyklu a na apoptózu. Boli viditeľné typické znaky apoptotickej bunky, ako sú zmeny v nukleárnej morfológii, porušenie mitochondriálnej membrány a zvýšená produkcia reaktívnych foriem kyslíka (Djouina et al., 2016). Hliníkové ióny sa dokážu naviazať aj na fosfátovú kostru DNA a RNA, môžu interagovať s histónmi a narušiť



štruktúru DNA. Dokážu tak ovplyvniť transkripciu génov (Kawahara et al., 2006; (Skibniewska a Skibniewski, 2019).

Toxické vplyvy hliníka pozorované na modelových organizmoch

Na skúmanie vplyvov hliníka na bunkové procesy sú pre jeho škodlivosť často využívané modelové organizmy. Pod elektrónovým mikroskopom bol na *Saccharomyces cerevisiae* sledovaný vplyv hliníkových zlúčenín. Kvasinky vykazovali typické znaky apoptózy, ako sú zmršťovanie bunky, nukleárna fragmentácia, vakuolácia a marginalizácia chromatinu (Zheng et al., 2007). Intracelulárna akumulácia hliníkových iónov napomáha tvorbe atypických disulfidových mostíkov v proteínoch, čo spôsobuje ich nesprávne zbalenie a následnú apoptózu bunky (Tun et al., 2013). Vysoká koncentrácia hliníka má vplyv aj na tolerantnú kvasinku *Cryptococcus humicola*. Bunková smrť bola spôsobená oxidatívnym poškodením lipidov v bunkovej membráne (Nian et al., 2012). Bol realizovaný aj skrining genómu kvasinky a boli identifikované gény, ktoré súvisia s metabolizmom hliníka (Kakimoto et al., 2005).

Toxický vplyv hliníka na bunkový cyklus a na replikáciu DNA bol pozorovaný aj pri niektorých vyšších mnohobunkových organizmoch (Jaskowiak et al., 2018). Vplyvom toxicity hliníkových iónov bolo inhibované bunkové delenie alebo bola mitotická aktivita celkom zastavená. Taktiež boli zistené poruchy reorganizácie cytoskeletu, mikrotubulov alebo deliaceho vretienka (Zhang et al., 2014).

Náš výskum toxických účinkov hliníka sa zameriava na využitie modelového organizmu, kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Táto kvasinka má veľa génov, ktoré sú ortológne s ľudskými génmi zodpovednými za niektoré ochorenia. Mnoho génov zodpovedných za bunkové delenie a bunkový metabolizmus je vysoko konzervovaných medzi vyššími a nižšími eukaryotmi, čo umožňuje štúdium ich funkcie v jednobunkových eukaryotických modelových organizmoch. Navyše sa táto kvasinka delí mitózou, ktorá je podobná mitóze multicelulárnych organizmov. Vplyv expozície hliníka na bunkový cyklus je veľmi málo preskúmaný, a preto je využívaný tento modelový organizmus, ktorý by mohol vykazovať podobné reakcie ako mnohobunkové organizmy a mohol by napomôcť objasneniu ďalších toxických vplyvov.

Záver

Hliník je chemický prvok, ktorý je súčasťou každodenného života. Vplyv expozície jeho zlúčenín nie je možné absolútne eliminovať. Akútna toxicita síce nebola zistená a absorpcia hliníka do krvného obehu je nízka, avšak jeho príjem by mal byť kontrolovaný, pretože pri nadmernej a chronickej expozícii dokáže škodlivo vplývať na zdravie organizmu na bunkovej

aj orgánovej úrovni. Je preto potrebné naďalej skúmať mechanizmy vplyvu hliníka na organizmus a snažiť sa redukovať možnosť nadmernej expozície hliníkovými zlúčeninami. Keďže hliník vykazuje toxické vlastnosti, je vhodné využitie modelových organizmov, ktoré majú podobné gény a bunkové procesy ako bunky multiceľulárnych organizmov. Takýmito vlastnosťami oplýva kvasinka *Schizosaccharomyces pombe*, ktorá bola zvolená pre výskum toxických vplyvov hliníka na bunkový cyklus.

Pod'akovanie

Práca vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“ ITMS 26220220180.

Literatúra

- Becaria, A., Campbell, A. and Bondy, S.C. 2002. Aluminum as a toxicant. *Toxicology and Industrial Health* 18 (7): 309–320.
- Chappard, D., Bizot, P., Mabilieu, G. and Hubert, L. 2016. Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al(3+) deposition in the calcified matrix of bone. *Morphologie: Bulletin De l'Association Des Anatomistes* 100 (329): 95–105.
- Chen, Y., Tian, X. and Wang, X. 2018. Advances in dialysis encephalopathy research: a review. *Neurological Sciences* 39 (7): 1151–1159.
- Djouina, M., Esquerre, N., Desreumaux, P., Vignal, C. and Body-Malapel, M. 2016. Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. *Food and Chemical Toxicology* 91: 108–116.
- Duggan, J.M., Dickeson, J.E., Tynan, P.F., Houghton, A. and Flynn, J.E. 1992. Aluminium beverage cans as a dietary source of aluminium. *The Medical Journal of Australia* 156 (9): 604–605.
- EFSA, 2008. EFSA Advises on the Safety of Aluminium in Food. European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 6 (7): 754. Dostupné na: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/080715-0> cit.: jún 2019.
- Exley, C. 2013. Human exposure to aluminium. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15 (10): 1807–1816.
- Exley, C. and Mold, M.J. 2015. The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30: 90–95.
- Huat, T.J., Camats-Perna, J., Newcombe, E.A., Valmas, N., Kitazawa, M. and Medeiros, R. 2019. Metal Toxicity Links to Alzheimer's Disease and Neuroinflammation. *Journal of Molecular Biology* 431 (9): 1843–1868.
- Jaskowiak, J., Tkaczyk, O., Slota, M., Kwasniewska, J. and Szarejko, I. 2018. Analysis of aluminum toxicity in *Hordeum vulgare* roots with an emphasis on DNA integrity and cell cycle. *PLoS ONE* 13 (2).
- Kakimoto, M., Kobayashi, A., Fukuda, R., Ono, Y., Ono, Y., Ohta, A. and Yoshimura, E. 2005. Genome-wide screening of aluminum tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* 18 (5): 467–474.



- Kawahara, M. and Kato-Negishi, M. 2011. Link between Aluminum and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The Integration of the Aluminum and Amyloid Cascade Hypotheses. *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011.
- Kawahara, M., Konoha, K., Nagata, T. and Sadakane, Y. 2006. Aluminum and Human Health: Its Intake, Bioavailability and Neurotoxicity. *Biomedical Research on Trace Elements* 18 (3): 211–220.
- Kumar, V. and Gill, K.D. 2014. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. *NeuroToxicology* 41: 154–166.
- Mahieu, S., Contini, M. del C., González, M., Millen, N. and Monica Elias, M. 2000. Aluminum toxicity. Hematological effects. *Toxicology letters* 111: 235–242.
- Mailloux, R.J., Lemire, J. and Appanna, V.D. 2011. Hepatic response to aluminum toxicity: Dyslipidemia and liver diseases. *Experimental Cell Research* 317 (16): 2231–2238.
- Mirza, A., King, A., Troakes, C. and Exley, C. 2016. The Identification of Aluminum in Human Brain Tissue Using Lumogallion and Fluorescence Microscopy. *Journal of Alzheimer's Disease* 54 (4): 1333–1338.
- Nian, H., Wang, G. and Chen, L. 2012. Physiological and transcriptional analysis of the effects of aluminum stress on *Cryptococcus humicola*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (6): 2319–2329.
- Priest, N.D. 2004. The biological behaviour and bioavailability of aluminium in man, with special reference to studies employing aluminium-26 as a tracer: review and study update. *Journal of environmental monitoring: JEM* 6 (5): 375–403.
- Rodríguez, J. and Mandalunis, P.M. 2018. A Review of Metal Exposure and Its Effects on Bone Health. *Journal of Toxicology* 2018.
- Skibniewska, E. and Skibniewski, M. 2019. Aluminum, Al. In: Kalisińska, E. (ed.), *Mammals and Birds as Bioindicators of Trace Element Contaminations in Terrestrial Environments: An Ecotoxicological Assessment of the Northern Hemisphere*, 413–462. Springer International Publishing, Cham.
- Stahl, T., Falk, S., Rohrbeck, A., Georgii, S., Herzog, C., Wiegand, A., Hotz, S., Boschek, B., Zorn, H. and Brunn, H. 2017. Migration of aluminum from food contact materials to food—a health risk for consumers? Part I of III: exposure to aluminum, release of aluminum, tolerable weekly intake (TWI), toxicological effects of aluminum, study design, and methods. *Environmental Sciences Europe* 29 (1).
- Tun, N.M., O'Doherty, P.J., Perrone, G.G., Bailey, T.D., Kersaitis, C. and Wu, M.J. 2013. Disulfide stress-induced aluminium toxicity: molecular insights through genome-wide screening of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics: Integrated Biometal Science* 5 (8): 1068–1075.
- Wang, Z., Wei, X., Yang, J., Suo, J., Chen, J., Liu, X. and Zhao, X. 2016. Chronic exposure to aluminum and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neuroscience Letters* 610: 200–206.
- WHO | JECFA. 2011. *WHO | JECFA*. Dostupné na: <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=298> cit.: jún 2019.
- Yokel, R.A., Hicks, C.L. and Florence, R.L. 2008. Aluminum bioavailability from basic sodium aluminum phosphate, an approved food additive emulsifying agent, incorporated in cheese. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (6): 2261–2266.
- Zhang, H., Jiang, Z., Qin, R., Zhang, H., Zou, J., Jiang, W. and Liu, D. 2014. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology* 14.
- Zheng, K., Pan, J.-W., Ye, L., Fu, Y., Peng, H.-Z., Wan, B.-Y., Gu, Q., Bian, H.-W., Han, N., Wang, J.-H., Kang, B., Pan, J.-H., Shao, H.-H., Wang, W.-Z. and Zhu, M.-Y. 2007. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals. *Plant Physiology* 143 (1): 38–49.



Obsah stopových prvkov v ejakuláte kapra rybníčného (*Cyprinus carpio*) v podmienkach umelého chovu

Michal Miškeje^{1*}, Jaroslav Andrejčík^{2*}, Július Árvay^{3*}, Anton Kováčik^{4*}

¹Výskumné centrum AgroBioTech, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

²Katedra hydínárstva a malých hospodárskych zvierat, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

³Katedra chémie, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

⁴Katedra fyziológie živočíchov, FBP, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 94976 Nitra

*michal.miskeje@uniag.sk

Abstrakt

Uvedená štúdia bola zameraná na zistenie obsahu stopových prvkov v ejakuláte kapra rybníčného (*Cyprinus carpio*) v podmienkach umelého chovu. V práci boli použité pohlavne dospelé samce ($n = 16$) z lokality Kolíňany. Ryby boli transportované do laboratória, kde *post mortem* prebehol odber ejakulátu priamo zo semenovodu a následne sa vzorka uskladnila pri teplote -20°C . Pred analýzou bola vzorka mineralizovaná za pôsobenia reagentov HNO_3 ($5\text{ml} \geq 69,0\%$) a H_2O_2 ($1\text{ml} \geq 30,0\%$). Hodnotenie množstva prítomných prvkov vo vzorkách ejakulátu bolo zisťované prostredníctvom optického emisného spektrometra s indukčne viazanou plazmou ICP-OES 720. Najviac zastúpeným prvkom vo vzorke bol Zn ($6,59 - 177,57 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Schéma koncentrácie jednotlivých prvkov od najviac po najmenej zastúpený bola nasledovná $\text{Zn} > \text{As} > \text{Sr} > \text{Ni} > \text{Mn} > \text{Se} > \text{Pb} > \text{Cr} > \text{Cd}$. Zo získaných výsledkov môžeme konštatovať, že experimentálne plochy pre rybné hospodárstvo SPU sú vybranými prvkami kontaminované v minimálnej miere a nemajú zásadný vplyv na produkciu rýb a ich kvalitu.

Kľúčové slová: stopové prvky, *Cyprinus carpio*, ejakulát, ICP-OES

Úvod

Vo všeobecnosti je známe, že reprodukčný systém môže byť považovaný za zdroj informácii kontaminácie životného prostredia (Tosti a Gallo, 2012). Najvýznamnejšie škodlivé činitele, ktoré ovplyvňujú samčiu reprodukčnú sústavu sú ťažké kovy (Hatef et al., 2013), pesticídy (Selvaraju et al., 2011) a endokrinné disruptory (Jambor et al., 2017). Viaceré štúdie preukázali možný vplyv stopových prvkov na funkciu resp. dysfunkciu mužského reprodukčného systému



z hľadiska endokrínnej aktivity, produkcie gamét a ich kvality, a to obzvlášť u mužov (Slivková et al., 2009), kancov (Massányi et al., 2003), lišiakov (Massányi et al., 2005), býkov (Selvaraju et al., 2011) ako aj u druhov rýb, konkrétne u sumčeka afrického (*Clarias gariepinus*) (Kime et al., 1996), morského vlka (*Dicentrarchus labrax*) (Abascal et al., 2007), pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) (Dietrich et al., 2010), paúhrovca priečnopruhého (*Gymnotus carapo*) (Vergilio et al., 2015) a kapra rybníčného (*Cyprinus carpio*) (Chyb et al., 2001). Niektoré stopové prvky sú z hľadiska reprodukcie považované za esenciálne (Türk et al., 2014) avšak pri ich kombinácii a vysokých hladinách v semennej plazme, môžu mať nepriaznivý efekt na kvalitu spermií, produkovať oxidatívny stres a v konečnom dôsledku narušiť fyziologický proces nevyhnutný pre úspešné oplodnenie (Kasperczyk et al., 2015). Z hľadiska bioakumulácie a ťažkej alebo nemožnej odbúrateľnosti predstavujú environmentálne polutanty ako napríklad ťažké kovy významné riziko pre vodné organizmy. Svojím pôsobením na semenníky zapríčiňujú u rýb zníženie fertility a embryonálneho vývoja (Jezierska et al., 2009).

Materiál a metódy

Ryby a odber ejakulátu.

Pohlavne dospelé samce druhu kapor rybníčný (*Cyprinus carpio*) v počte 16 kusov boli vylovené z experimentálneho rybníka SPU v Nitre, farma Koliňany. Výlov rýb prebiehal v období máj až jún 2015 pomocou rybárskej siete. Následne bol vykonaný transport do laboratória na katedre hydínarstva a malých hospodárskych zvierat, kde po humánnom usmrtení a zbere základných ichtyologických parametrov kompetentnou osobou prebehol aj odber ejakulátu. Semenníky boli z brušnej dutiny odseparované chirurgicky a ejakulát bol odobratý zo semenovodu, aby sa zabránilo kontaminácii, či predčasnej aktivácii močom (Gennotte et al., 2012).

Analýza stopových prvkov

V štúdiu bola hodnotená koncentrácia vybraných stopových prvkov vo vzorkách ejakulátu kapra rybníčného (As, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, Se, Sr a Zn) pomocou optického emisného spektrometra s indukčne viazanou plazmou (ICP-OES).

Príprava vzorky

Po odbere ejakulátu boli vzorky uskladnené v mrazničke pri teplote -20°C až do vykonania analýzy v Laboratóriu výživy rastlín a ionomiky vo VC AgroBioTech SPU v Nitre. Rozmrazenú vzorku bolo nutné previesť do tekutého stavu a to procesom vysoko-tlakovkej mineralizácie ETHOS ONE (Milestone Srl., Sorisole, BG, Taliansko) za pôsobenia reagentov



HNO₃ v objeme 5ml ≥69,0% (TraceSELECT, Honeywell Fluka, Morris Plains, USA) a H₂O₂ v objeme 1ml ≥30,0% (Merck Suprapur). Navážka vzorky sa pohybovala v rozmedzí od 0,3g do 0,5g a bola zohľadnená vo výpočte výsledku. Na mineralizáciu vzoriek a slepej vzorky bol použitý program vyvinutý a optimalizovaný výrobcom pre rozklad živočíšneho tkaniva (15 min. zahrievanie na 200 °C, 15 min. udržiavanie teploty a 15 min. chladenie). Mineralizát bol po vychladnutí prefiltrovaný (filter grade 390, Sartorius AG, Goettingen, Nemecko) a doriedený do sklenených baniek s presným objemom 50 ml ultračistou vodou. Uskladnenie prebehlo pri laboratórnej teplote v pevne uzavretých 50mL centrifugačných skúmavkách.

ICP-OES analýza

Hodnotenie množstva prítomných prvkov (As, Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, Se, Sr a Zn) vo vzorkách ejakulátu bolo zisťované prostredníctvom optického emisného spektrometra s indukčne viazanou plazmou (ICP-OES 720, Agilent Technologies Austrália (M) Pty Ltd.). Detekčné limity (µg.l⁻¹) meraných stopových prvkov boli nasledovné As 1,50; Cd 0,05; Cr 0,15; Mn 0,03; Ni 0,30; Pb 0,80; Se 2,00; Sr 0,01; Zn 0,20. Vlnové dĺžky (nm) pre jednotlivé prvky boli zvolené nasledovné As 188,980; Cd 226,502; Cr 267,716; Mn 257,610; Ni 231,604; Pb 220,353; Se 196,026; Sr 407,771; Zn 206,200. Pre zvolenú analýzu sme použili mnohoprvkový štandard V pre ICP (Sigma-Aldrich Production GmbH, Švajčiarsko), ktorý pokrýval väčšie spektrum prvkov (Cd, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn) a jednodruhové štandardy pre As a Se toho istého výrobcu. Kalibračná krivka pre všetky prvky bola vytvorená pri riedení 0,01; 0,10 a 1,00 mg.L⁻¹.

Štatistická analýza

Získané výsledky boli štatisticky spracované v programe GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, Kalifornia, USA).

Výsledky a diskusia

Podľa Hatef et al. (2013) mnohé environmentálne kontaminanty vykazujú potenciál bioakumulácie v tkanivách rýb ako sú semenníky a môžu dosiahnuť rádovo vyššie koncentrácie ako v prostredí. Práca bola zameraná na zistenie obsahu vybraných stopových prvkov v ejakuláte kapra rybníčného (*Cyprinus carpio*). Priemerné hodnoty jednotlivých prvkov sú uvedené v tabuľke 1, kde sú ďalej uvedené aj hodnoty medián, štandardná odchýlka, variačný koeficient, štandardná chyba a minimum a maximum nameraných hodnôt. Najviac zastúpeným prvkom vo vzorke bol Zn (6,59 – 177,57 mg.kg⁻¹). Schéma koncentrácie jednotlivých prvkov od najviac po najmenej zastúpený je nasledovná Zn > As > Sr > Ni > Mn > Se > Pb > Cr > Cd. Jarapala et al. (2014) zisťovali prítomnosť viacerých stopových prvkov (Co, Cr, Cu, Mn, Zn a Se) v tkanivách rôznych druhov rýb pomocou optickej emisnej spektrometrie s hmotnostným

detektorom (ICP-MS). Pri druhu *Cyprinus carpio* ($n = 6$) namerali pri Cr $0,24 \pm 0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$; Mn $0,78 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$; Co $0,03 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$; Cu $0,97 \pm 0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$; Zn $3,25 \pm 0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ a Se $0,16 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$. Nami namerané hodnoty boli okrem Mn priemerne vyššie, čo môže poukazovať na viac zaťažený ekosystém, ale napríklad v prípade Zn, je jeho vyššia koncentrácia v reprodukčných sekrétoch prirodzená. Kvalita biotopu je významne ovplyvňovaná ľudskou činnosťou. V práci Ebrahimi a Taherianfard (2011) boli popísané koncentrácie Pb, Cd a As v troch rôznych úsekoch toku rieky Kor (A – horná časť, najmenej zaťažená, B – stredná časť, najviac zaťažená a C dolná časť) u druhu *Cyprinus carpio*. Hodnoty boli získané pomocou techniky ICP-OES. Koncentrácie Pb u samcov v jednotlivých častiach toku A $0,32 \pm 0,22 \text{ mg.kg}^{-1}$, B $1,16 \pm 0,11 \text{ mg.kg}^{-1}$ resp. C $0,82 \pm 0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$, pri Cd v mieste A $0,11 \pm 0,01 \text{ mg.kg}^{-1}$, B $0,03 \pm 0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$, resp. C $0,11 \pm 0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$ a hodnoty As v mieste A $0,12 \pm 0,07 \text{ mg.kg}^{-1}$, B $1,25 \pm 0,09 \text{ mg.kg}^{-1}$, resp. C $0,17 \pm 0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$. Experimentálna plocha odkiaľ pochádzajú naše vzorky nie je významne zaťažená priemyselnou ľudskou činnosťou. Nami získané výsledky vykazujú výrazne nižšie hodnoty ako výsledky uvádzanej štúdie v časti toku B, ktorý bol emisne najviac zaťažený.

Tabuľka č. 1 Koncentrácia vybraných stopových prvkov vo vzorkách ejakulátu

stopový prvok	priemer	medián	S.D.	CV %	SEM	Min - max
As (mg.kg^{-1})	0,76	0,71	0,49	65,52	0,13	0 – 1,77
Cd ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	22,96	10,14	27,49	119,70	6,87	0 – 87,73
Cr (mg.kg^{-1})	0,18	0,17	0,05	27,34	0,01	0,12 – 0,32
Mn (mg.kg^{-1})	0,44	0,39	0,19	44,89	0,05	0,18 – 0,82
Ni (mg.kg^{-1})	0,48	0,33	0,39	79,97	0,09	0,11 – 1,36
Pb (mg.kg^{-1})	0,25	0,27	0,17	66,81	0,04	0 – 0,55
Se (mg.kg^{-1})	0,33	0,00	0,56	166,15	0,14	0 – 1,67
Sr (mg.kg^{-1})	0,60	0,63	0,38	63,72	0,10	0,19 – 1,60
Zn (mg.kg^{-1})	50,08	51,28	46,03	91,92	11,51	6,59 – 177,57

S.D. - štandardná odchýlka, CV % - variačný koeficient, SEM - štandardná chyba, Min - max - minimum - maximum.

Záver

Podľa správy Európskeho strediska pre monitorovanie trhu s produktami rybolovu a akvakultúr (EUMOFA) z roku 2018 je zrejмый nárast spotreby rybieho mäsa o 3% oproti roku 2015. Spotreba rýb dosiahla 24,33 kg na obyvateľa Európskej únie (EUMOFA, 2018). Je dôležité, aby sa pri produkcii v rybom hospodárstve prihliadalo nielen na kvantitu, ale aj na kvalitu. Monitoring stopových prvkov v jednotlivých ekosystémoch je dôležitým ukazovateľom jeho



kvality. Mnohé z nich sú považované za esenciálne, ale pri ich nadmernej akumulácii v prostredí a následne v organizme, môžu mať za dôsledok viacero fyziologických porúch. Reprodukčný systém rýb je schopný akumulovať niektoré kontaminanty prostredia, medzi ktoré patria aj ťažké kovy. V prezentovanej štúdií sme ako bioindikátor prostredia využili kapra rybníčného (*Cyprinus carpio*). Výsledky poukazujú na fakt, že experimentálne plochy pre rybné hospodárstvo SPU sú vybranými prvkami kontaminované v minimálnej miere a nemajú zásadný vplyv na produkciu rýb a ich kvalitu.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-16-0289," a vznikla za podpory Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu „Vybudovanie výskumného centra Agrobiotech ITMS 26220220180“.

Literatúra

- Abascal, F.J., Cosson, J., Fauvel, C. 2007. Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility, *J. Fish Biol.* 70 (2) (2007) 509–522.
- Dietrich, G.J., Dietrich, M., Kowalski, R.K., Dobosz, S., Karol, H., Demianowicz, W., Glogowski, J. 2010. Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success, *Aquat. Toxicol.* 97 (4) (2010) 277–284.
- Ebrahimi, M., Taherianfard, M. 2011. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor river. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10 (1): 13-24.
- EUMOFA report, 2018. European Commission, Directorate-General for Maritime Affairs and Fisheries, Director-General. 120s. ISBN: 978-92-79-79971-6.
- Gennotte, V., François, E., Rougeot, C., Ponthier, J., Deleuze, S., Mélard, C. 2012. Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Theriogenology* 78 (1) (2012) 210–217.
- Hatef, A., Alavi, S.M.H., Golshan, M., Linhart, O. Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function in vitro—a review, *Aquat. Toxicol.* 140 (2013) 134 - 144.
- Chyb, J., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Kime, D.E., Socha, M., Epler, P. 2001. Influence of mercury on computer analysed sperm motility of common carp *Cyprinus carpio* L., in vitro, *Arch. Polish Fish.* 9 (2001) 51–60.
- Jambor, T., Tvrdá, E., Tušimová, E., Kováčik, A., Bistáková, J., Forgács, Z., Lukáč, N. In vitro effect of 4-nonylphenol on human chorionic gonadotropin (hCG) stimulated hormone secretion, cell viability and reactive oxygen species generation in mice Leydig cells, *Environ. Pollut.* 222 (2017) 219–225.
- Jarapala, S.R., Kandlakunta, B., Thingnganing, L. 2014. Evaluation of trace metal content by ICP-MS using Closed vessel microwave digestion in fresh water fish. *Journal of Environmental and Public Health*, vol. 2014, 1-8.
- Jeziarska, B., Ługowska, K., Witeska, M. 2009. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review), *Fish Physiol. Biochem.* 35 (4) (2009) 625–640.
- Kasperczyk, A., Dobrakowski, M., Horak, S., Zalejska-Fiolka, J., Birkner, E. 2015. The influence of macro and trace elements on sperm quality, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 30 (2015) 153–159.



- Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M., Ollevier, F. 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality offish; application to the effects of heavy metals, *Aquat. Toxicol.* 36 (3–4) (1996) 223–237.
- Massányi, P., Trandžik, J., Nad, P., Koréneková, B., Skalická, M., Toman, R. 2003. Concentration of copper, iron, zinc, cadmium, lead, and nickel in boar semen and relation to the spermatozoa quality, *J. Environ. Sci. Health Part A* 38 (11) (2003) 2643–2651.
- Massányi, P., Trandzik, J., Nad, P., Skalická, M., Koréneková, B., Lukac, N. 2005. Seminal concentration of trace elements in fox and relationships to spermatozoa quality, *J. Environ. Sci. Health Part A* 40 (5) (2005) 1097–1105.
- Selvaraju, S., Nandi, S., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P. 2011. Effects of heavy metals and pesticides on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functions in vitro, *Reprod.Domest. Anim.* 46 (5) (2011) 807–813.
- Slivkova, J., Popelkova, M., Massanyi, P., Toporcerova, S., Stawarz, R., Formicki, G. 2009. Concentration of trace elements in human semen and relation to spermatozoa quality, *J. Environ. Sci. Health Part A* 44 (4) (2009) 370–375.
- Tosti, E., Gallo, A. 2012. Best biomarker and bioindicator for marine environmental pollution. *J. Mar. Sci. Res. Dev.* 2 (2012).
- Türk, S., Mändar, R., Mahlapuu, R., Viitak, A., Punab, M., Kullisaar, T. 2014. Male infertility: decreased levels of selenium, zinc and antioxidants, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 28 (2) (2014) 179–185.
- Vergilio, C.S., Moreira, R.V., Carvalho, C.E.V., Melo, E.J.T. 2015. Evolution of cadmium effects in the testis and sperm of the tropicalfish *Gymnotus carapo*, *Tissue Cell* 47 (2) (2015) 132–139.



Štúdium regulácie priebehu bunkového cyklu pomocou fluorescenčnej mikroskopie v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*

Miroslava Požgajová^{1*}, Hana Ďúranová¹, Alica Navrátilová², Anna Trakovická²

¹Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

²Katedra genetiky a plemenárskej biológie, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

* korešpondujúci autor: miroslava.pozgajova@uniag.sk

Abstrakt

Bunkový cyklus každého živého organizmu zahŕňa sériu na seba nadväzujúcich dejov, počas ktorých bunka zdvojnásobí svoj genetický materiál a vzápätí sa rovnomerne rozdelí do dvoch identických dcérskych buniek. Tento proces, nazývaný mitóza, zabezpečuje rast a vývin organizmu. Špecializovaným bunkovým delením je meióza, výsledkom ktorej sú gaméty s haploidným počtom chromozómov, zabezpečujúce sexuálnu reprodukciu. Bezchybný priebeh bunkového cyklu je nevyhnutnou podmienkou zdravého priebehu života, nakoľko chyby v segregácii chromozómov vedú k nerovnomernej distribúcii genetického materiálu, čo môže viesť k nekontrolovateľnému rastu buniek alebo v prípade meiózy, k poškodeniu plodu, prípadne k abortom. Napriek tomu, že štúdiu bunkového cyklu sa venuje veľká pozornosť, mnohé stále zostáva nevysvetlené. V našej publikácii sa budeme venovať metodickému postupu sledovania segregácie chromozómov pomocou fluorescenčnej mikroskopie s fluorescenčne označeným druhým chromozómom v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe*. Výsledkom našej práce je sledovanie bezchybného priebehu bunkového cyklu na modelovom organizme, čo v konečnom dôsledku prispeje k pochopeniu regulácie delenia eukaryotických buniek.

Kľúčové slová: mitóza, meióza, fluorescenčná mikroskopia, *Schizosaccharomyces pombe*

Úvod

V priebehu evolúcie sa vyvinuli dva typy bunkového delenia, mitóza a meióza (Harigaya et al., 2007). Výsledkom mitózy sú dve identické dcérske bunky s diploidným počtom chromozómov (2n) pochádzajúcich z jednej materskej bunky. Chybný priebeh mitózy spôsobuje tzv. aneuploidiu, čiže stav, kedy kvôli nerovnomernej distribúcii genetického materiálu dcérske



bunky získajú viac alebo menej chromozómov (Michaelis et al., 1997). Viaceré štúdie poukázali na to, že táto abnormalita sa často vyskytuje v tumorových bunkách, z čoho vyplýva predpoklad, že chybný priebeh segregácie chromozómov zohráva dôležitú úlohu v tvorbe a raste nádorov (Sen, 2000). Špecializovaným typom bunkového delenia je meióza, pri ktorej dochádza k redukcii diploidného počtu chromozómov na haploidný (n) a výsledkom je vznik gamét umožňujúcich sexuálnu reprodukciu. Chyby v priebehu delenia chromozómov počas meiózy vedú k vzniku rôznych stupňov vrozených postihnutí, prípadne až k potratom (Hassold and Hunt, 2001). Z tohto dôvodu je štúdium priebehu chromozómovej segregácie predmetom výskumu mnohých vedeckých laboratórií (Rabitsch et al., 2004, Rumpf et al., 2010, Kovacikova et al. 2013, Pozgajova 2013). Napriek tomu, že mnoho základných regulačných procesov bolo popísaných, presný mechanizmus chromozómovej segregácie zostáva stále neobjasnený. V našom laboratóriu používame kvasinku *Schizosaccharomyces pombe* ako modelový organizmus na štúdium chromozómovej segregácie v eukaryotickej bunke. *S. pombe* je často používaná vo vedeckých laboratóriách, je to nepatogénna jednobunková huba, patriaca do rodu *archiascomycetes* (Forsburg, 1999). Jej genóm bol kompletne osekvenovaný v roku 2002 vedeckými partnerskými inštitúciami vedenými Sangerovým inštitútom. Genóm *S.pombe* má veľkosť 13,8Mb, je rozdelený do troch chromozómov a obsahuje 4824 proteín-kódujúcich génov, čo robí z kvasinky *S. pombe* samostatne žijúci eukaryotický organizmus s najmenším počtom génov (Wood et al., 2002). Najväčšia výhoda používania kvasinky *S. pombe* ako modelového organizmu spočíva vo finančnej nenáročnosti jej kultivácie, v rýchlosti rastu, ako aj to, že 172 jej proteínov vykazuje podobnosť s proteínmi zodpovednými za ľudské ochorenia. Navyše, organizácia chromozómov *S. pombe* je veľmi podobná tej, akú majú vyššie eukaryoty (Forsburg, 1999). Na pochopenie biologických procesov, ako je napríklad zabezpečenie správnej segregácie chromozómov, je potrebné uskutočniť detailné molekulárne analýzy, ktoré je možné realizovať prostredníctvom mikroskopickej vizualizácie. Moderné vizualizačné techniky, akou je fluorescenčná mikroskopia, nám umožňujú sledovať segregáciu chromozómov počas anafázy mitózy alebo meiózy (Pidoux et al., 2000). Spolu s najmodernejšími molekulárno-biologickými metódami umožňujúcimi značenie, modifikáciu alebo deletovanie študovaného proteínu, je možné analyzovať úlohu a funkciu konkrétnej molekuly v procese chromozómovej segregácie. V našej práci sme sa zamerali na prípravu vzoriek kvasiniek *S. pombe* na sledovanie priebehu segregácie chromozómov počas anafázy v priebehu mitotického a meiotického delenia buniek.

Materiál a metódy

Kvasinkové kmene

Divý typ: h⁺ prototrofný kmeň *S. pombe*

Divý typ GFP: h- cen2(D107)::KanR-ura4+-lacO his7+::lacI-GFP

Kmene kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe* boli kultivované za štandardných podmienok (Cipak et al., 2011, Sabatinos et al., 2010, Dudas et al. 2011).

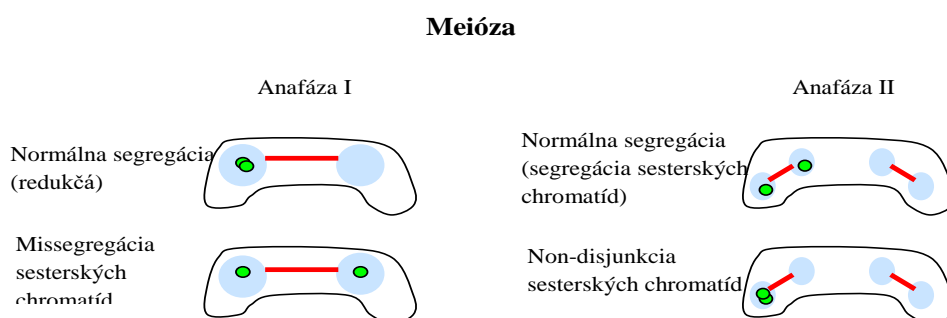
Fluorescenčná mikroskopia

Kvasinkové kmene *S. pombe* boli kultivované počas noci pri teplote 32°C na tuhom YES médiu obsahujúcom všetky živiny v ad libidnom množstve. Ďalších osem hodín boli kmene kultivované v tekutom YES médiu. Pre štúdium meiózy boli kmene opačných párovacích typov zmiešané a vysiate na PMG-N médium, ktoré je chudobné na dusík, čo spôsobuje hladovanie buniek a umožňuje im vstup do meiózy. Inkubácia prebiehala pri teplote 25°C po dobu 12 hodín. Bunky určené na sledovanie mitózy alebo meiózy boli fixované pomocou 4% PFA počas 45 minút, následne bola bunková stena natrávená zymolýzou, ktorá pôsobila 90 minút pri teplote 37°C a tukové vrstvy membrán boli rozrušené pomocou detergentu. Nasledovala inkubácia buniek pri izbovej teplote počas noci s primárnymi protilátkami určenými proti α -tubulínu a proti GFP, pomocou ktorého je značený druhý chromozóm. Na druhý deň, po premytí, nasledovala inkubácia so sekundárnymi protilátkami, označenými fluorescenčnými farbami, Alexa 568 (vizualizácia tubulínu) a Alexa 488 (vizualizácia GFP) v tme, pri izbovej teplote po dobu minimálne 6 hodín. Jadro je označené pomocou fluorescenčnej značky 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), ktorá penetruje cez bunkovú stenu do vnútra bunky a nešpecificky sa viaže na oblasti v molekule DNA bohaté na adenín a tymín. Vizualizácia buniek bola vykonaná na invertovanom fluorescenčnom mikroskope Leica DMI6000B, ktorý je vybavený digitálnou kamerou DCF345FX. Sledovaná bola segregácia druhého chromozómu v 100 bunkách počas anafázy v priebehu mitózy, ako aj prvého a druhého meiotického delenia. Reprezentatívne obrázky boli spracované pomocou LAS-X softwaru.

Výsledky

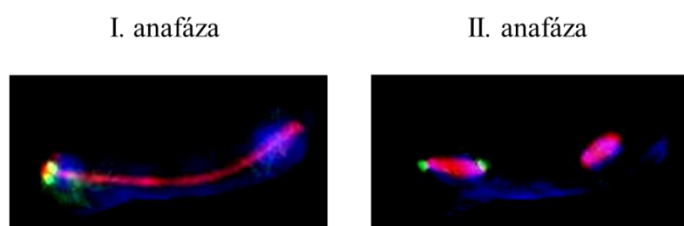
Na sledovanie procesu segregácie chromozómov sme použili divý typ kvasiniek *S. pombe*, ktoré majú jednu kópiu chromozómu II v blízkosti centroméry označenú zeleným fluorescenčným proteínom (GFP). Pomocou anti-GFP protilátky a prislúchajúcej sekundárnej protilátky s fluorescenčnou značkou, sme znásobili fluorescenčný signál. Na vizualizáciu deliaceho

vretienka bola použitá TAT1 protilátka, viažuca sa na α -tubulín a k nej prislúchajúca, fluorescenčne označená, sekundárna protilátka. Takto pripravené vzorky boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom a vyhodnocovaný bol priebeh anafáz v sto bunkách. Správna segregácia chromozómov počas meiózy vyžaduje rozdelenie homologických chromozómov počas prvého meiotického delenia. Segregácia sesterských chromatíd prebieha počas druhého meiotického delenia. Modrou farbou je znázornené jadro, zelená bodka znázorňuje druhý chromozóm a červená čiara predstavuje deliace vretienko. Schématické znázornenie normálneho a defektného priebehu segregácie chromozómov počas meiózy je znázornené na obrázku 1.



Obrázok 1. Schématické znázornenie sledovania priebehu segregácie druhého chromozómu počas prvého a druhého meiotického delenia v kvasinke *S. pombe* pod fluorescenčným mikroskopom.

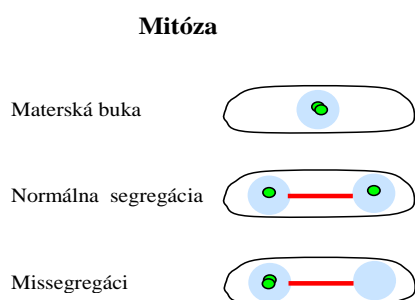
Za normálnych okolností je priebeh segregácie chromozómov počas prvého a druhého meiotického delenia v divom type buniek bez chýb. Takýto priebeh bol detegovaný aj v našom experimente, kde všetky analyzované anafázy prebehli bez pozorovaného defektu (Obrázok 2).



Obrázok 2. Reprezentatívne obrázky I. a II. anafázy počas meiózy znázorňujúce bezchybný priebeh delenia druhého chromozómu, vizualizovaný pod fluorescenčným mikroskopom.

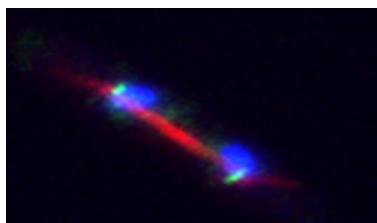
Podobný experimentálny postup bol použitý aj na vizualizáciu chromozómovej segregácie počas mitózy. Vegetatívne rastúce bunky boli inkubované v bohatom YES médiu do exponenciálnej fázy rastu pri teplote 32°C po dobu približne 6 hodín. Po fixácii a farbení pomocou protilátok boli bunky pozorované a anafáza vyhodnocovaná pod fluorescenčným

mikroskopom. Správna segregácia chromozómov počas mitózy vyžaduje rozdelenie sesterských chromatíd k opačným pólom bunky a vznik identických dcérskych buniek z jednej materskej bunky. Modrou farbou je znázornené jadro, zelená bodka znázorňuje druhý chromozóm a červená čiara predstavuje deliace vretienko. Schématické znázornenie normálneho a defektného priebehu segregácie chromozómov počas mitózy je znázornené na obrázku 3.



Obrázok 3. Schématické znázornenie priebehu segregácie chromozómov počas mitotického delenia v kvasinke *Schizosaccharomyces pombe* pod fluorescenčným mikroskopom.

Za normálnych okolností prebieha segregácia chromozómov počas mitotického delenia v divom type buniek bez chýb. Takýto priebeh bol pozorovaný aj v našom experimente, kde všetky analyzované anafázy prebehli bez pozorovaného defektu (Obrázok 4).



Obrázok 4. Reprezentatívny obrázok segregácie sesterských chromatíd počas mitózy znázorňujúci bezchybný priebeh mitózy, vizualizovaný pod fluorescenčným mikroskopom.

Diskusia

Bunkový cyklus je komplexný process, ktorého priebeh je regulovaný veľkým množstvom proteínov a proteínových komplexov (Nurse et al., 1981). Bunkové delenie môže prebiehať buď ako mitóza alebo meióza (Harigaya et al., 2007). Mitózou vzniknú dve identické dcérske bunky z prekursorovej materskej bunky, kdežto počas meiózy z jednej diploidnej bunky vzniknú štyri bunky s haploidným počtom chromozómov, nakoľko jednu duplikáciu DNA nasledujú dve bunkové delenia, nazývané meióza I a II (Ding et al. 2010). Moderné



vizualizačné postupy slúžia ako významný nástroj, ktorý vedcom umožňuje sledovať a analyzovať priebeh segregácie chromozómov počas mitózy aj v priebehu oboch meiotických delení, nielen v zafixovaných, ale aj v živých bunkách. Mikroskopické techniky pomohli identifikovať mnoho kľúčových komponentov bunkového delenia zahrnutých v regulačnej sieti zabezpečujúcej napríklad správnu orientáciu kinetochórových proteínov pri naväzovaní deliaceho vretienka na chromozómy. Gregan et al. (2007) identifikovali a pomocou fluorescenčnej mikroskopie charakterizovali, proteínový komplex Mde4/Pcs1, ktorý bráni vzniku merotelového naviazania deliaceho vretienka na kinetochóry. Taktiež úloha Mph1 ako aj Spo4 a Spo6 v procese regulácie chromozómovej segregácie počas meiózy bola dokázaná prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie (Kovacikova et al. 2013). Pomocou mikroskopie na živých bunkách a moderných molekulárno-biologických techník sa vedcom podarilo sledovať jediný chromozóm a analyzovať jeho architektúru počas meiózy a mitózy (Rumpf et al., 2010) ako aj opravu a dynamiku vzniku dvojitého zlomu na DNA počas meiotickej rekombinácie (Leland, 2014).

Záver

Z výsledkov práce vyplýva, že vizualizácia priebehu segregácie chromozómov prostredníctvom fluorescenčnej mikroskopie je užitočná metodika, poskytujúca nenahraditeľné výstupy umožňujúce lepšie pochopenie regulácie bunkového cyklu. V spojení s genetickými a biochemickými technológiami je možné porozumieť regulačným mechanizmom zabezpečujúcim správny priebeh bunkového cyklu až na molekulárnej úrovni.

Pod'akovanie

Vedecká publikácia vznikla s podporou VC AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech” ITMS 26220220180 a projektov APVV-14-0054 a APVV-0636-11.

Literatúra

- Cipak, L., Zhang, C., Kovacikova, I., Rumpf, C., Miadokova E., Shokat, K. M., et al. 2011. Generation of a set of conditional analog-sensitive alleles of essential protein kinases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*, 10: 3527-32.
- Ding, D. Q., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. 2010. From meiosis to postmeiotic events: Alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FEBS Journal*, 277 (3): 565-570.
- Dudas, A., Ahmad, S., Gregan, J. 2011. Sgo1 is required for cosegregation of sister chromatids during achiasmate meiosis I. *Cell Cycle*, 10: 951-5.
- Forsburg, S. L. 1999). The best yeast? *Trends Genet*, 15(9): 340-344.



- Gao, Q., Tanaka, T. U., He, X. 2011. GFP-based Microscopic Approaches for Whole Chromosome Analysis in Yeast. In: STANSFIELD, I. and STARK, M.J.R. Yeast Gene Analysis. London: Academic Press. p. 730.
- Gregan, J., Riedel, C. G., Pidoux, A. L., Katou, Y., Rumpf, C., Schleiffer, A., et al. 2007. The kinetochore proteins Pcs1 and Mde4 and heterochromatin are required to prevent merotelic orientation. *Curr Biol*, 17(14): 1190-1200.
- Hassold, T., Hall, H., Hunt, P. 2001. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics*, 16(2): 203-208.
- Harigaya, Y., Yamamoto, M. 2007. Molecular mechanisms underlying the mitosis-meiosis decision. *Chromosome Research*, 15(5): 523-537.
- Kováčiková, I. et al. 2013. A knockout screen for protein kinases required for the proper meiotic segregation of chromosomes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Cycle*, 12(4): 618-624.
- Leland B.A., King M.C. 2014. Using LacO arrays to monitor DNA double-strand break dynamics in live *Schizosaccharomyces pombe* cells. *Methods Mol. Biol*, 1176: 127-141.
- Michaelis, C., Ciosk, R., Nasmyth, K. 1997. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91(1): 35-45.
- Nurse, P., Bissett, Y. 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, 292: 558-560.
- Pidoux, A.L., Uzawa, S., Perry, P.E., Cande, W.Z., Allshire, R.C. 2000. Live analysis of lagging chromosomes during anaphase and their effect on spindle elongation rate in fission yeast. *J. Cell Sci*. 113: 4177-4191.
- Pozgajova, M., Cipak, L., Trakovicka A. 2013. Prp4 kinase is required for proper segregation of chromosomes during meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Acta Biochim Pol*, 60(4): 871-3.
- Rumpf, C. et al. 2010. Casein kinase 1 is required for efficient removal of Rec8 during meiosis I. *Cell Cycle*, 9(13): 2657-2662.
- Rumpf, C., Cipak, L., Schleiffer, A., Pidoux, A., Mechtler, K., Tolic-Norrelykke, I. M., et al. 2010. Laser microsurgery provides evidence for merotelic kinetochore attachments in fission yeast cells lacking Pcs1 or Clr4. *Cell Cycle*. 9(19): 3997-4004.
- Sabatinos, S.A., Forsburg, S.L. 2010. Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol*, 470: 759-95.
- Sen, S. 2000. Aneuploidy and cancer. *Curr. Opin. Oncol*, 12(1): 82-88.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874): 871-880.



Príprava vzoriek z kvasiniek *Schizosaccharomyces pombe* pre účely transmisnej elektrónovej mikroskopie: Review

Hana Ďúranová^{1*}, Miroslava Požgajová¹, Marta Novotová², Zuzana Kňazická³

¹Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

²Biomedicínske centrum SAV, Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 05 Bratislava

³Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

*korešpondujúci autor: hana.duranova@uniag.sk

Abstrakt

Jednobunkové kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) predstavujú prominentný modelový systém pre hodnotenie širokého spektra biologických procesov, ktoré prebiehajú i v bunkách cicavcov. Poznanie detailnej ultraštruktúry eukaryotických buniek je základnou podmienkou pre porozumenie ich funkcií. Transmisná elektrónová mikroskopia poskytuje unikátny nástroj štúdia komplexnej ultraštruktúry buniek za fyziologických podmienok, ako i ultraštruktúrnych zmien v bunkách indukovaných v dôsledku toxických alebo benefičných účinkov rôznych aditívnych látok. Viaceré vedecké práce naznačujú, že *S. pombe* je vhodným celulárnym systémom pre ultraštruktúrne štúdie s využitím transmisného elektrónového mikroskopu. Predkladaný príspevok sumarizuje prehľad metodického postupu prípravy vzoriek z kvasiniek *S. pombe* pre účely transmisnej elektrónovej mikroskopie.

Kľúčové slová: *Schizosaccharomyces pombe*; ultraštruktúra; príprava vzoriek; transmisná elektrónová mikroskopia

Úvod

Kvasinky sú unicelulárne eukaryotické organizmy, ktoré sa pomerne ľahko kultivujú v laboratórnych podmienkach (Zhao, 2017). Osumi (2012) konštatuje, že ich subcelulárna štruktúra je v podstate rovnaká s bunkami vyšších živočíchov a rastlín, a preto sa intenzívne využívajú ako modelové systémy v základných a aplikovaných oblastiach prírodných vied, v medicíne a biotechnológiách.



Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*) je jednobunkový eukaryotický modelový systém, patriaci do rodu *Ascomycetes* (Hoffman et al., 2015). Uvedená kvasinka sa používa najmä pri fermentácii piva a pri výrobe vína (Volschenk et al., 2003; Benito et al., 2016). Z morfológického hľadiska má bunka cylindrický, tyčinkový tvar s priemerom 4 μm (Piel a Tran, 2009) a lemovaná je bunkovou stenou, ktorá obsahuje najmä polysacharidy zodpovedné za jej rigiditu (Grün et al., 2004).

Bunkové organely sú vo všeobecnosti dynamické štruktúry, schopné meniť svoju veľkosť a tvar za účelom zachovania fyziologických potrieb bunky. Tieto zmeny sa uskutočňujú napr. ako súčasť bunkového cyklu (počas bunkového delenia) alebo ako reakcia na environmentálnu záťaž, a tak poukazujú na zmenenú funkciu danej organely (Heald a Cohen-Fix, 2014). Roque a Antony (2010) uvádzajú, že bunka *S. pombe* disponuje minimálnym množstvom molekulárnych komponentov, čo je zároveň reflektované i nižším počtom subcelulárnych štruktúr. Z uvedeného dôvodu je kvasinka *S. pombe* vhodným modelovým organizmom na štúdium ultraštruktúry buniek s použitím TEM za fyziologických alebo experimentálnych podmienok.

Prehľad metodického postupu prípravy vzoriek z kvasiniek *S. pombe* pre účely TEM

Ultraštruktúrne štúdie rôznych biologických vzoriek (vrátane *S. pombe*) prostredníctvom TEM vyžadujú transformáciu živých buniek z ich natívneho, hydratovaného stavu do stavu dehydratovaného, s presne zachovanou pôvodnou ultraštruktúrou. Jednotlivé kroky v rámci prípravy takýchto vzoriek vyplývajú z nutnosti získať ultratenké rezy zo skúmaného biologického materiálu, ktoré sú dostatočne tenké na to, aby umožnili prechod elektrónov danou vzorku za účelom tvorby obrazu. Hlavné kroky prípravy ultratenkých rezov zo vzoriek (kvasiniek) zahŕňajú: fixáciu, dehydratáciu a infiltráciu/zalievanie biologického materiálu (Wright, 2000).

Rastové podmienky a izolácia kvasiniek *S. pombe*

Podobne ako v prípade rastlinných buniek sa bunky kvasiniek pomerne náročne fixujú kvôli prítomnosti ich bunkovej steny, ktorá slúži ako bariéra pre difúziu fixačných činidiel (Bauer et al., 2001). Za účelom minimalizácie tejto refraktérnej povahy kvasiniek voči fixácii je potrebné bunky fixovať počas tzv. skorej log fázy, pri ktorej je denzita buniek limitovaná na 5×10^6 / ml, kedy bunky disponujú minimálnou denzitou cytoplazmy a naopak, maximálnou permeabilitou bunkovej steny (Sipiczki, 2016).



Optimálna teplota pre rast buniek *S. pombe* v laboratóriách je 30 °C. Najčastejšie používaným rastovým médiom, obsahujúcim všetky potrebné nutrienty je médium Standard Yeast Extract with Supplements (YES; Zhao, 2017). Izolácia kvasiniek sa uskutočňuje prostredníctvom centrifugácie (Bauer et al., 2001; Sipiczki, 2016; Koch et al., 2017), ktorá však môže zapríčiniť zmenu polohy cytoskeletu a jadra v bunkách (Roque a Antony, 2010). Z uvedeného dôvodu sa podľa viacerých autorov (Wright, 2000; Roque a Antony, 2010) odporúča pred samotnou centrifugáciou pridať do kultivačného roztoku k bunkám najskôr dvojnásobný zásobný fixačný roztok počas 5 min., bunky scentrifugovať a následne ich resuspendovať v čerstvom fixačnom roztoku.

Fixácia

Pod pojmom fixácia rozumieme zastavenie potenciálne deštruktívnych autolytických procesov v bunkách s cieľom zabrániť ich poškodeniu počas zalievania, rezania na ultramikrotóme a následnej expozície elektrónovým lúčom (Bozzola a Russell, 1999). Najčastejšie používanou metódou fixácie je ošetrenie buniek špecifickými chemickými látkami, označovanými ako fixačné činidlá. Pri ultraštruktúrnych štúdiách je najviac používanou metódou fixácie tzv. dvojitá fixácia, t.j. primárna fixácia (prefixácia) v aldehydoch a sekundárna fixácia (postfixácia) v oxidačnom činidle (Wright, 2000; Ayub et al., 2017).

Primárna fixácia (prefixácia)

Ako primárne fixačné činidlá sa najčastejšie používajú monofunkčné a bifunkčné aldehydy, t.j. formaldehyd (HCHO) a glutaraldehyd (CHO-CH₂-CH₂-CH₂-CHO), ktoré reagujú s aminoskupinami proteínov a makromolekúl asociovaných s proteínmi (ako sú lipoproteíny a histoproteíny spojené s DNA; Bozzola, 2007), zabezpečujúc denaturáciu týchto proteínov. Na prefixáciu kvasiniek sa bežne používa 2 % glutaraldehyd (GA; Bauer a et al., 2001; Roque a Antony, 2010; Sipiczki, 2016) alebo 0,5 až 4 % formaldehyd (FA; Wright, 2000). Pre účely elektrónovej mikroskopie sa však častejšie používa prášková forma polymerizovaného formaldehydu, t.j. paraformaldehyd (PFA), ktorý na rozdiel od GA disponuje iba jednou aldehydovou skupinou, a tak rýchlejšie difunduje cez bunkovú stenu kvasiniek (Frankl et al., 2015). Na druhej strane, disponuje však relatívne nižšou reverzibilnou efektivitou fixácie v porovnaní s GA (Hajibagheri et al., 1999; Park et al., 2016). Na fixáciu kvasiniek je podľa Sipiczki (2016) možné použiť i tzv. Karnovsky roztok, obsahujúci 0,5 % GA v kombinácii s 3 % PFA v 0,1 M fosfátovom pufri (PBS; pH 7,2).



Hoci GA a PFA predstavujú veľmi účinné fixačné činidlá pre zachovanie stabilnej ultraštruktúry rôznych buniek, nezabezpečujú dostatočný kontrast jednotlivých celulárnych zložiek a nie sú schopné takmer vôbec fixovať lipidy v biologických membránach (Wright, 2000). Z uvedeného dôvodu sa po dokončení prefixácie realizuje sekundárna fixácia pomocou oxidačných činidiel.

Sekundárna fixácia (postfixácia)

Najčastejšie používanými postfixačnými činidlami, ktoré stabilizujú membrány kvasiniek sú manganistan draselný (KMnO_4) a oxid osmičelý (OsO_4). Inkubácia aldehydom fixovaných vzoriek s KMnO_4 (0,5-6 % počas 1-24 h) umožňuje extrakciu cytoplazmatických komponentov, a tak umožňuje vizualizáciu bunkových membrán a membránou ohraničených organel (ako sú napr. mitochondrie, endoplazmatické retikulum, jadro a pod.; Tronchin a Bouchara, 2006). Na druhej strane, organely ako ribozómy, mikrotubuly a mikrofilamenty stabilizované nie sú (Frankl et al., 2015), a preto sa KMnO_4 na fixáciu kvasiniek využíva veľmi zriedkavo. Oxid osmičelý (1–2 %) reaguje intenzívne s nenasýtenými mastnými kyselinami lipidov, zabezpečujúc dobrú fixáciu lipidových štruktúr (Wright, 2000). Taktiež denaturované nukleové kyseliny a proteíny bohaté na aminokyseliny s nenasýtenými dvojitými väzbami (ako je cysteín a tryptofán) reagujú s OsO_4 (Park et al., 2016). V porovnaní s KMnO_4 , OsO_4 extrahuje z buniek oveľa menšie množstvo materiálu, čo vedie k vizualizácii mikrotubúl, mikrofilamentov, ribozómov a chromatinu. Avšak jeho penetrácia do buniek si vyžaduje enzymatické odstránenie alebo permeabilizáciu bunkovej steny účinkom enzýmov (napr. zymolyáza; Tronchin a Bouchara, 2006; Osumi, 2012).

Kontrastovanie vzoriek

Po ukončení fixácie sa bunky premyjú a následne sa kontrastujú použitím 1–2 % vodného roztoku uranyl acetátu pri laboratórnej teplote počas 30-240 minút (Wright, 2000). Kuo (2007) uvádza, že uranyl acetát reaguje s fosfátovými skupinami a aminoskupinami, čo vedie ku kontrastovaniu nukleových kyselín a fosfolipidov v membránach.

Dehydratácia vzoriek

V procese dehydratácie sa voľná voda vo vzorke nahrádza organickým rozpúšťadlom (Winey et al., 2014), nakoľko zalievacie médium nie je rozpustné vo vode (Sipiczki, 2016). Z tohto dôvodu sa bunky inkubujú v acetóne alebo etanole so vzrastajúcou koncentráciou (25, 50, 75, 95 a 100 %) počas 5 minút v každom roztoku (Wright, 2000). V porovnaní s acetónom



poukazuje Sipiczki (2016) na efektívnejšie použitie etanolu na dehydratáciu vzoriek vzhľadom na jeho schopnosť intenzívnejšej extrakcie lipidov z buniek.

Infiltrácia, zalievanie a polymerizácia vzoriek

Winey et al. (2014) charakterizujú zalievanie ako proces infiltrácie vzoriek zalievacím médiom, schopným polymerizácie za vzniku pevnej, dobre rezateľnej hmoty. Na tento účel sa používajú rôzne typy živíc určených pre TEM, ktoré sú komerčne dostupné z rôznych firiem. Z chemického hľadiska sa klasifikujú na: polyakrylové živice (metakryláty), polyesterové živice a epoxidové živice (Uhrín et al., 2003). Pretože etanol v dehydratovaných bunkách nie je miešateľný so zalievacím médiom, nevyhnutná je jeho substitúcia látkou, ktorá vykazuje vysokú miešateľnosť s etanolom a zároveň aj so zalievacím médiom. Ako štandardné tzv. infiltračné rozpúšťadlo sa používa propylénoxid (1,2-epoxypropán; Sipiczki, 2016). Pred samotným procesom infiltrácie (t.j. preniknutia zalievacieho média do vzorky) sa bunky najskôr vystavia na niekoľko minút účinku samotného propylénoxidu, následne sa infiltrujú zmesou propylénoxid a zalievacie médium a nakoniec sa zalejú samotným zalievacím médiom (Mascorro a Bozzola, 2007). V prípade kvasiniek sú podľa viacerých autorov (Wright, 2000; Frankl et al., 2015; Sipiczki, 2016) k dispozícii dva základné druhy živíc: epoxidové (Araldite, Epon, živica Spurr) a akrylové (Lowicryl, LR White, LR Gold). Frankl et al. (2015) uvádzajú, že epoxidové živice sa používajú na rozlíšenie bunkovej morfológie, zatiaľ čo akrylové živice umožňujú imunohistochemické štúdie.

Zhotovovanie ultratenkých rezov na ultramikrotóme a ich kontrastovanie

Po polymerizácii sa zaliate bločky režu na požadovanú hrúbku na ultramikrotóme a zachytávajú sa na nosné sieťky. Technika samotného rezania vzoriek zahŕňa nasledovné kroky: (i) orezávanie bločku do tvaru pyramídy s dostatočne širokou základňou, (ii) prípravu ultramikrotómového noža a nosných sieťok, (iii) samotné rezanie bločkov na ultramikrotóme s hrúbkou 60 – 80 nm, (iv) zachytávanie zhotovených ultratenkých rezov na nosné sieťky a (v) ich kontrastovanie za účelom zvýšenia kontrastu jednotlivých štruktúr v bunkách (Bozzola a Russell, 1999). Na kontrastovanie sa podľa Sato (1968) používa citrát olovnatý, ktorý sa viaže na negatívne nabitú zložku, ako sú hydroxylové skupiny alebo oblasti, ktoré predtým reagovali s OsO₄ (napr. membrány). Po kontrastovaní sa nosné sieťky nechajú vysušiť a pozorujú sa v TEM.



Záver

Transmisná elektrónová mikroskopia predstavuje veľmi cenný nástroj pre štúdium ultraštruktúry buniek rôznych biologických vzoriek, vrátane *S. pombe*. Uvedené kvasinky umožňujú ako modelový organizmus pozorovať rôzne molekulárne a ultraštruktúrne vzťahy na úrovni eukaryotickej bunky, ktoré sú v mnohých prípadoch podobné s tými, identifikovanými u vyšších organizmov (vrátane ľudí). Precízne ultraštruktúrne štúdie si však za účelom eliminácie vzniku akýchkoľvek nepriaznivých artefaktov vyžadujú dôkladnú prípravu ultratenkých rezov, ktorá je časovo veľmi náročná. Takéto štúdie sú však veľmi nápomocné a nevyhnutné pri kreovaní komplexného pohľadu na možné adaptačné mechanizmy vo vzťahu k ultraštruktúre organel týchto kvasiniek v podmienkach environmentálnej záťaže, ktoré môžu byť vo veľkej miere reflektované aj na vyššie biologické systémy.

PodĎakovanie

Vedecká publikácia vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech” ITMS 26220220180 a projektu VEGA 1/0163/18.

Literatúra

- Ayub, B., Wani, H., Shoukat, S., Para, P. A., Ganguly, S., Ali, M. 2017. Specimen preparation for electron microscopy: an overview. *Journal of Environment and Life Sciences*, 2(3): 85-88.
- Bauer, C., Herzog, V., Bauer, M. F. 2001. Improved technique for electron microscope visualization of yeast membrane structure. *Micros Microanal.* 7(6), 530-534.
- Benito, Á., Jeffares, D., Palomero, F., Calderón, F., Bai, F. Y., Bähler, J., Benito, S. 2016. Selected *Schizosaccharomyces pombe* strains have characteristics that are beneficial for winemaking. *PLoS one*, 11(3): e0151102.
- Bozzola, J. J., Russell, L. D. 1999. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd edition, Boston: Jones & Bartlett Learning, 670 p. ISBN 0763701920
- Bozzola, J. J. 2007. Conventional specimen preparation techniques for transmission electron microscopy of cultured cells. In Kuo, J. (ed.): *Electron Microscopy: Methods and protocols*, 2nd edition, Totowa: Humana Press, 1-18 p. ISBN 13: 978-1-58829-573-6
- Frankl, A., Mari, M., Reggiori, F. 2015. Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 2(11): 412-428.
- Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P., Vliegthart, J. F. G. 2004. The structure of cell wall α -glucan from fission yeast. *Glycobiology*, 15(3): 245-257.
- Hajibagheri, M. A. N., Sawin, K., Gschmeissner, S., Blight, K., Upton, C. 1999. Preparation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* for ultrastructural and immunocytochemical study. In: Hajibagheri, M. A. N. (ed.): *Electron Microscopy Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press, 183-207.



- Heald, R., Cohen-Fix, O. 2014. Morphology and function of membrane-bound organelles. *Curr Opin Cell Biol.* 26: 79-86.
- Hoffman, C. S., Wood, V., Fantes, P. A. 2015. An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system. *Genetics*, 201(2): 403-423.
- Koch, A., Bicho, C. C., Borek, W. E., Carpy, A., Maček, B., Hauf, S., Sawin, K. E. 2017. Construction, growth, and harvesting of fission yeast stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) Strains. *Cold Spring Harb Protoc* 2017(6): pdb-prot091678.
- Kuo, J. 2007. Processing plant tissues for ultrastructural study. In: Kuo, J. (ed.): *Electron microscopy: methods and protocols*. 2nd edition, Totowa: Humana Press, 35-46. ISBN 13: 978-1-58829-573-6
- Mascorro, J. A., Bozzola, J. J. 2007. Processing biological tissues for ultrastructural study. In Kuo, J. (ed.): *Electron microscopy: methods and protocols*. 2nd edition, Totowa: Humana Press, 19-34. ISBN 13: 978-1-58829-573-6
- Osumi, M. 2012. Visualization of yeast cells by electron microscopy. *J Electron Microsc.* 61(6): 343-365.
- Park, C. H., Kim, H. W., Uhm, C. S. 2016. How to get well-preserved samples for transmission electron microscopy. *Appl Microsc.* 46(4): 188-192.
- Piel, M., Tran, P. T. 2009. Cell shape and cell division in fission yeast. *Curr Biol.* 19(17): R823-R827.
- Roque, H., Antony, C. 2010. Fission yeast: A cellular model well suited for electron microscopy investigations. *Methods Cell Biol.* 96: 235-58.
- Sato, T. 1968. A modified method for lead staining of thin sections. *Microscopy*, 17(2): 158-159.
- Sipiczki, M. 2016. Visualization of fission yeast cells by transmission electron microscopy. In: Sanchez-Diaz, A., Perez, P. (eds.): *Yeast Cytokinesis: Methods and Protocols*. New York: Humana Press, 97-111 p. ISBN 978-1-4939-3144-6
- Tronchin, G., Bouchara, J. 2006. Transmission electron microscopy of pathogenic fungi. In: Kavanagh, K. (ed.): *Medical Mycology: Cellular and Molecular Techniques*. John Wiley & Sons, Ltd. 13-41 p. ISBN 978-0-470-01923-8
- Uhrín, V., Kuna, R., Jančová, A., Uhrín, P., Záhonová, A. 2003. Základy mikroskopických, submikroskopických a preparačných techník v biológii. In: Nitra: Fakulta prírodných vied UKF, 262 s. ISBN 80-8050-586-1
- Volschenk, H., van Vuuren, H. J. J., Viljoen-Bloom, M. 2003. Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. *Curr Genet.* 43(6): 379-391.
- Winey, M., Meehl, J. B., O'toole, E. T., Giddings, Jr., T. H. 2014. Conventional transmission electron microscopy. *Mol Biol Cell*, 25(3): 319-323.
- Wright, R. 2000. Transmission electron microscopy of yeast. *Microsc Res Tech.* 51(6): 496-510.
- Zhao, R. Y. 2017. Yeast for virus research. *Microb Cell*, 4(10): 311-330.

Parametre výťažnosti a čistoty DNA pri rôznych typoch homogenizácie dužín ovocia

Katarína Vicianová¹, Martina Žabková¹, Lucia Zamiešková¹, Jana Žiarovská^{1*}

¹Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 12, Nitra

*jana.ziarovska@uniag.sk

Abstrakt

Cieľom práce bolo vyhodnotiť vplyv troch spôsobov prvotnej homogenizácie dužín plodov broskyne, jablka a hrozna na celkovú výťažnosť a čistotu izolovanej DNA a RNA. V prípade plodov broskyne boli najvyššie výťažnosti DNA získané vo variante sušených plodov, kým v prípade izolácie RNA boli najvyššie výťažnosti získané vo variante čerstvých plodov. Jablká z hľadiska získaných výsledkov predstavovali skupinu s vysokým rozpätím získanej výťažnosti DNA. Izolácia celkovej genomickej DNA z plodov hrozna v prípade vyšších výťažností znamenala vo všetkých vzorkách zároveň aj ich nedostatočnú čistotu a naopak, v prípade nižších výťažností bola absorbancia hodnotená ako ukazujúca nekontaminovanú DNA. Výťažnosť RNA ako aj jej čistota boli pri hrozne najhoršie spomedzi hodnotených druhov, ale aj tu bola čistota a výťažnosť vo vzájomnej negatívnej korelácii.

Kľúčové slová: ovocie; extrakcia DNA; výťažnosť; čistota

Úvod

Čistota a výťažnosť izolovaných nukleových kyselín je v prípade rastlinných genómov kľúčovým parametrom, ktorý priamo určuje úspešnosť nasledujúcich analýz. Zrelé plody ovocia obsahujú vo vysokých koncentráciách mnohé biologické zložky, ktoré v prípade ich nedostatočného odstránenia v procese izolácie DNA alebo RNA pôsobia v následných PCR reakciách ako významné inhibítory a často vedú k nefunkčnosti týchto analýz. Čistota a koncentrácia DNA je rozhodujúcim krokom akéhokoľvek analytického systému. Tento krok by mal poskytnúť vysoko kvalitnú a dostatočne koncentrovanú DNA, aby najmä analytické kroky na nižšej úrovni boli úspešné (Reinholt a Baeumner, 2014). Účinnosť a čistota DNA extraktu a odhad výťažku DNA sa hodnotí podľa pomerov absorbancie A₂₆₀/A₂₈₀ a A₂₆₀/A₂₃₀. Vzorka DNA sa všeobecne považuje za "čistú" pre pomery absorbancií A₂₆₀/A₂₈₀ s hodnotou ~ 1,8. Nižšie pomery naznačujú kontamináciu proteínmi, ale neznamená to, že vzorka nie je vhodná na amplifikáciu DNA. Pomer A₂₆₀/A₂₃₀ pre vzorky "čistých" DNA je bežne v rozmedzí 1,8-



2,2 a je sekundárnym meradlom čistoty nukleovej kyseliny a jej zvýšené hodnoty naznačujú prítomnosť iných kontaminantov, ako sú organické zlúčeniny alebo chaotropné soli (Carvalho et al., 2018).

Vysoká kvalita RNA je potrebná najmä z hľadiska jej následného použitia v citlivých metódach ako sú reverzne transkripčná či kvantitatívna PCR atď. V skutočnosti je náročné extrahovať dobre purifikovanú RNA napríklad z rastlinných pletív bohatých na lipidy materiálov, a to najmä kvôli ich vysokému obsahu mastných kyselín a relatívne nízkemu množstvu nukleových kyselín a proteínov. Okrem toho je počet buniek v takýchto tkanivách zvyčajne veľmi nízky, čo vedie k zlej výťažnosti RNA. Všetky rutinné protokoly na extrakciu RNA majú množstvo obmedzení, ak sa používajú na tukové tkanivá, vrátane kontaminácie RNA soľami/lipidmi/organickými látkami, straty RNA počas extrakcie a degradácie RNA (Cicera, 2013). Nízka kvalita RNA je veľkou výzvou hlavne v podmienkach obmedzeného množstva materiálu keď kontaminácia extrahovanej RNA môže interferovať s následnou aplikáciou, a nízky výťažok RNA neumožní opakovanie experimentu. Množstvo a kvalita extrahovanej RNA sa meria absorbancom pri 260 nm (A_{260}) na stanovenie koncentrácie RNA; pri 280 nm (A_{280}) a 230 nm (A_{230}), rovnako ako výpočet pomerov 260/280 ($A_{260}/280$) a 260/230 ($A_{260}/230$) na hodnotenie čistoty RNA. Pred absorbančným rozkladom vzorky sa robia tri kroky premývania, aby sa predišlo akejkoľvek kontaminácii organickými látkami a polysacharidmi, ktoré môžu interferovať s čistotou extrahovanej RNA. Ďalšie kroky premytia 70% etanoom pred eluovaním RNA pozitívne ovplyvňujú čistotu konečnej vzorky RNA, pretože táto úprava umožňuje úplne vyhýbať sa stopám mastných kyselín, organických látok a iných kontaminantov prítomných vo vzorkách (Sinitsky et al., 2018).

Cieľom práce bola analýza vplyvu rozličných spôsobov primárnej homogenizácie dužinatých oplodí na celkovú výťažnosť a čistotu izolovanej DNA a RNA.

Materiál a metódy

Ako biologický materiál bolo použité dužinaté ovocie – plody jablone (*Malus domestica*), broskyne (*Prunus persica*) a hrozna (*Vitis vinefera*). V práci boli vyhodnocované výsledky vplyvu rozličných spôsobov primárnej homogenizácie (v morskom piesku, v tekutom dusíku a v extrakčnom lyzáte) na výťažnosť a čistotu DNA a RNA dvoch typov biologického materiálu – čerstvý plod a lyofilizovaný plod. Kódovanie označenia vzoriek používané ďalej v práci je uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Kódovanie vzoriek použitých v práci

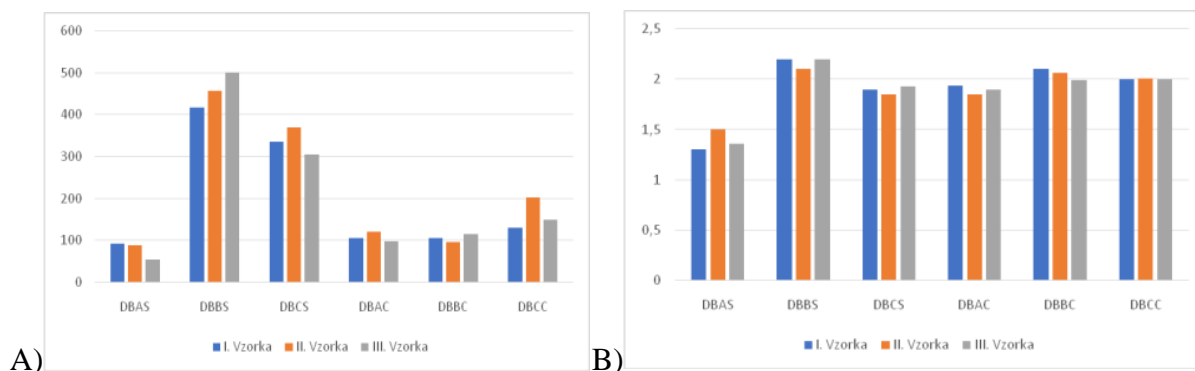
Izolovaná nukleová kyselina	Ovocie	Homogenizácia	Varianty
R - RNA	B - broskyňa	A - drvenie v morskem piesku	S - lyofilizovaný plod
	J - jablko	B - drvenie v tekutom dusíku	
D - DNA	H - hrozno	C - drvenie v extrakčnom lýzate	C - čerstvý plod

Izolácia DNA bola uskutočnená CTAB metodikou. Na izoláciu RNA z dužinatých oplodí bola použitá komerčne dostupná izolačná sada GeneJETPlant RNA Purification Mini Kit (ThermoScientific) a izolácia bola uskutočnená podľa pokynov výrobcu. Kvalita a kvantita izolovanej DNA bola vyhodnotená pomocou Nanofotometra Implen P330. Funkčnosť izolovanej celkovej genomickej DNA bola testovaná v polymerázovej reťazovej reakcii pomocou primérov pre ITS oblasti DNA (internal transcribed spacers) s nasledovným časovo - teplotným profilom: úvodná denaturácia 5 min. pri 94°C, 34x (1 min. pri 94°C, 1 min. pri 55°C, 1 min. pri 72°C) a záverečná denaturácia 5 min. pri 72°C. Elektroforéza zmnožených produktov bola uskutočnená na 1,5 % agarózovom géli.

Výsledky a diskusia

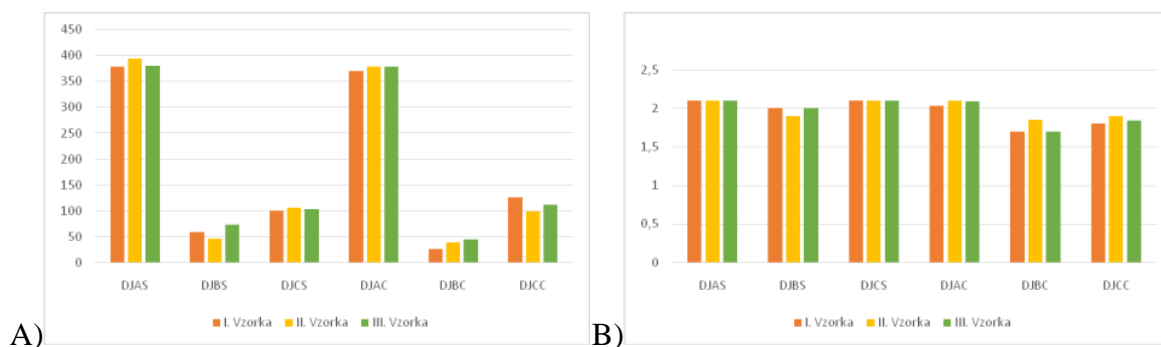
Rastliny produkujú sekundárne metabolity, ktoré interferujú nielen s extrakciou vysoko kvalitnej genómovej DNA, ale aj s následnými reakciami, ako je PCR a súvisiace genetické analýzy (Kotchoni et al., 2011). Prítomnosť polysacharidov, polyfenolov a iných organických zlúčenín môže v procese izolácie DNA predstavovať problém. Napríklad rastlinné tkanivá vo fyziologickej zrelosti sa neodporúčajú na extrakciu DNA, pretože obsahujú vysoké koncentrácie sekundárnych metabolitov (Zhang et al., 2000).

Najvyššiu výťažnosť DNA broskyne sme pozorovali pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 458,33 ng/μL a porovnateľný výsledok sme dosiahli (obrázok 1) pri čerstvom plode homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 336,67 ng/μL. Najnižšie výťažnosti boli dosiahnuté v prípade čerstvého plodu homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 77,67 ng/μL, vzorka mala nižšie hodnoty čistoty DNA s priemernou hodnotou 1,39 A260/A280 v porovnaní s ostatnými vzorkami (obrázok 1).



Obrázok 1. Získané výťažnosti (A) v ng (os y) a čistoty DNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z plodov broskyne v triplikátoch.

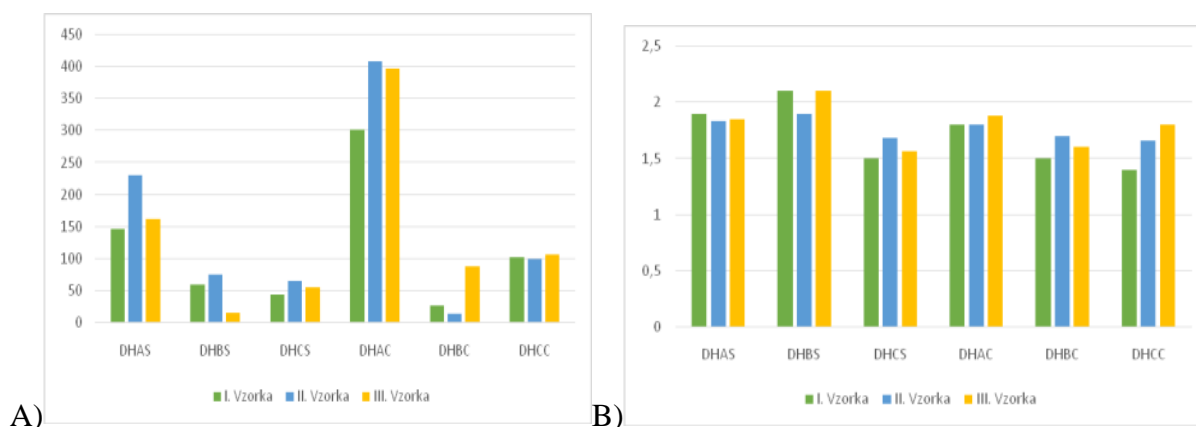
Najvyššiu výťažnosť DNA jablka sme pozorovali pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 384 ng/ μ L a porovnateľný výsledok sme dosiahli pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 375,67ng/ μ L (obrázok 2).



Obrázok 2. Získané výťažnosti (A) v ng (os y) a čistoty DNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z plodov jablka v triplikátoch.

Najnižšiu výťažnosť sme dosiahli v prípade čerstvých plodov homogenizovaných v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 36,33ng/ μ L. Výsledky čistoty DNA boli porovnateľne pri lyofilizovanom plode v homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 2,1 A260/A280, pri lyofilizovanom plode v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 1,97 A260/A280, pri lyofilizovanom plode v homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 2,09 A260/A280, pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 2,07 A260/A280 (obrázok 2). Nižšie hodnoty čistoty DNA sú pri čerstvom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 1,75 A260/A280 a pri čerstvom plode v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 1,85 A260/A280.

Najvyššiu výťažnosť DNA bobúľ hrozna sme pozorovali pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 369 ng/μL. Najnižšie výťažnosti sme dosiahli pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 54 ng/μL, pri lyofilizovanom plode v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 49,33 ng/μL a pri čerstvom plode v homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 41,67 ng/μL (obrázok 3). Najvyššiu čistotu DNA sme mali pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 2,03 A260/A280 (obrázok 3).

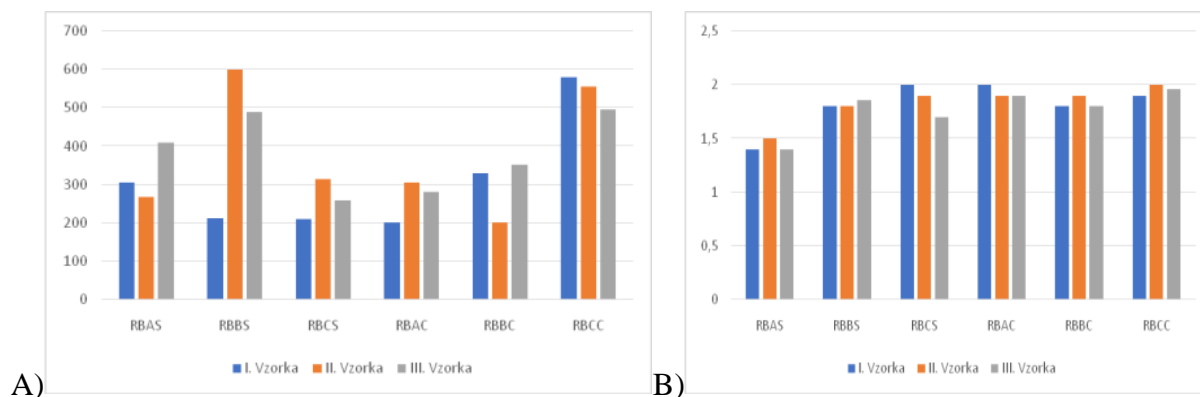


Obrázok 3. Získané výťažnosti (A) v ng (os y) a čistoty DNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z bobúľ hrozna v triplicátoch.

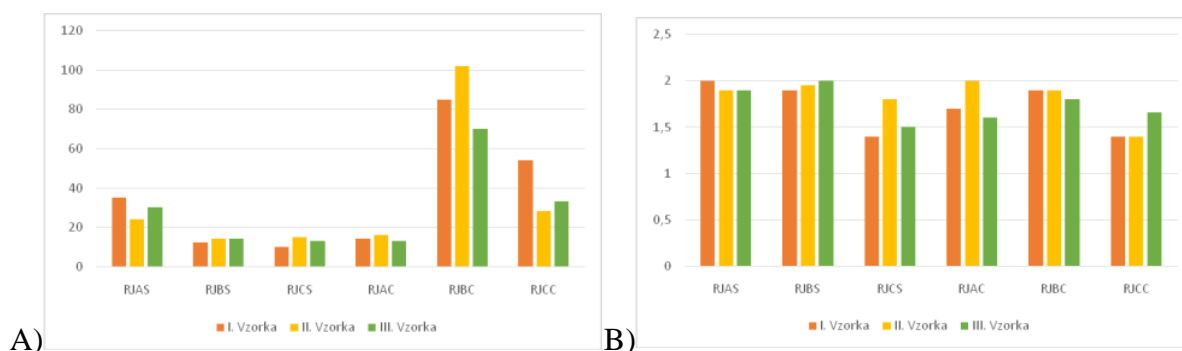
Najvyššiu výťažnosť RNA broskyne sme pozorovali pri čerstvom plode homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnou 543,67 ng/μL. Najvyššiu výťažnosť sme dosiahli pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 259,57 ng/μL (obrázok 4), pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 261,67 ng/μL a pri čerstvom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 293,33 ng/μL. Najnižšia hodnotu čistoty RNA bola získaná pri lyofilizovanom plode v morskem piesku s priemernou hodnotou 1,43 A260/A280. V ostatných variantoch boli výsledky porovnateľné (obrázok 4).

Najvyššiu výťažnosť RNA jablka sme pozorovali v čerstvom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 85,67 ng/μL (obrázok 5). Najnižšie hodnoty sme dosiahli pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 13,33 ng/μL, pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v extrakčnom lýzate s priemernou hodnotou 12,67 ng/μL a pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku

s priemernou hodnotou 14,33 ng/ μ L. Najnižšiu hodnotu čistoty RNA sme mali pri homogenizácii v extrakčnom lyzáte s priemernou hodnotou 1,49 A260/A280 (obrázok 5).

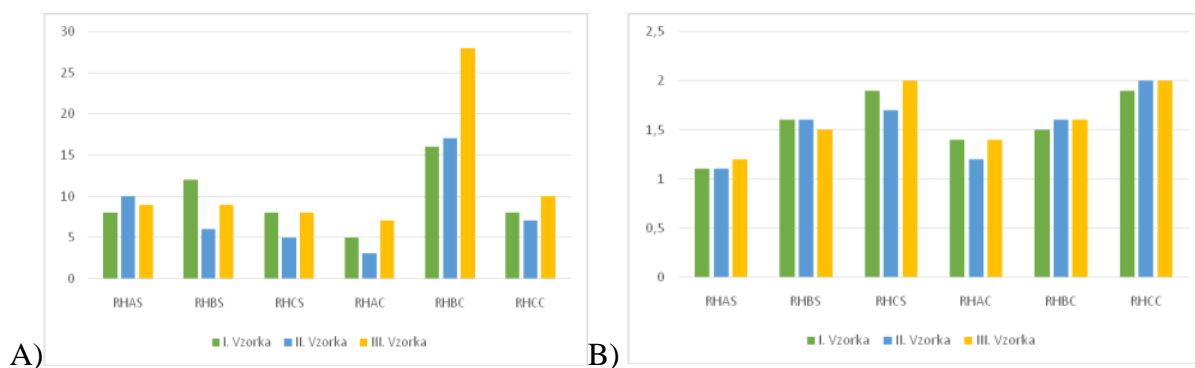


Obrázok 4. Získané výt'aznosti (A) v ng (os y) a čistoty RNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z plodov broskyne v triplikátoch.



Obrázok 5. Získané výt'aznosti (A) v ng (os y) a čistoty RNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z plodov jablka v triplikátoch.

Najvyššiu výt'aznosť vzorky hrozna sme pozorovali v čerstvom plode homogenizovanom v tekutom dusíku s priemernou hodnotou 20,33 ng/ μ L. Najnižšia výt'aznosť vzorky hrozna bola pri čerstvom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 5 ng/ μ L (obrázok 6).

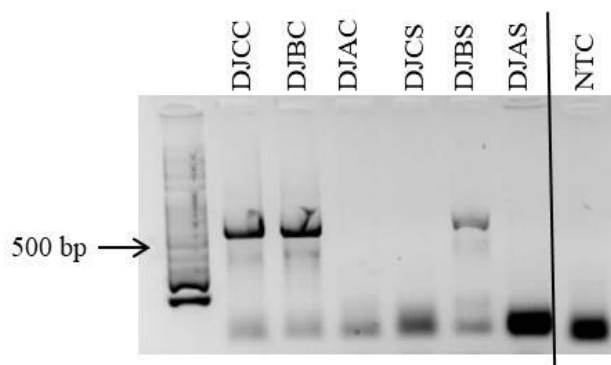


Obrázok 6: Získané výťažnosti (A) v ng (os y) a čistoty RNA (B) v pomere A260/A280 (os y) izolovanej z bobúľ hrozna v triplikátoch.

Čistota RNA mala najnižšiu hodnotu pri lyofilizovanom plode homogenizovanom v morskem piesku s priemernou hodnotou 1,13 A260/A280. Najvyššiu hodnotu čistoty RNA sme mali pri čerstvom plode homogenizovanom v extrakčnom lyzáte s priemernou hodnotou 1,97 A260/A280 (obrázok 6).

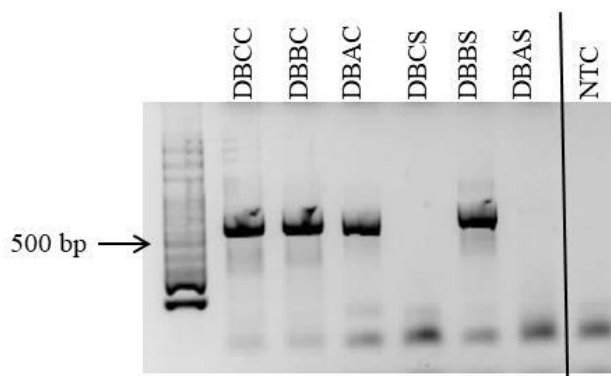
Na základe výsledkov je možné konštatovať vyššiu výťažnosť DNA v prípade použitia morského piesku ako homogenizačného činidla a homogenizácia čerstvých plodov dávala vyššiu výťažnosť DNA ako v prípade lyofilizovaných plodov. Použitie rôznych homogenizačných metód nemalo výrazný vplyv na čistotu DNA, avšak na základe získaných výsledkov je možné konštatovať vplyv homogenizačných metód na čistotu RNA, pričom ako najvhodnejšia metóda bola vo väčšine prípadov homogenizácia morským pieskom.

Pri izolovanej DNA získanej z jednotlivých variant izolácie bola overená aj jej reálna funkčnosť v podmienkach PCR. V PCR bola zmnožená ITS oblasť (internal transcribed spacers) prítomná vo všetkých organizmoch a slúžiaca ako možnosť overenia funkčnosti izolovanej DNA. Pri použití primérov ITS1 a ITS4, ktoré boli použité aj v práci, sa pri rastlinách očakáva amplicón veľkosti nad 600 bp (Zarrin et al., 2016). Vo všetkých prípadoch bol v reakcii použitý 1 μ l neriedenej DNA priamo z izolátu. V prípade amplifikácie ITS oblasti v izolovaných variantoch plodov jablone bola táto úspešná len pri vzorkách, v ktorých A260/A280 nepresahovala 2,0 (obrázok 7). Inhibíciu PCR reakcie pri DNA izolovanej z jabĺk literatúra pripisuje najmä pektínom (Martínez-González et al., 2017). Množstvo získaného amplicónu v tomto prípade nebola ovplyvnená množstvom DNA v reakcii (do PCR reakcií bolov prípade vzorky DJCC pridávané dvojnásobné množstvo oproti DJBC) ale čistotou, nakoľko výrazne slabší amplicón vznikol v prípade vzorky DJBS, pri ktorej bolo v amplifikácii zhodné množstvo DNA, ale A260/A280 mala hraničnú hodnotu 2,0.



Obrázok 7. Kontrolná PCR funkčnosti DNA izolovanej z jablka. NTC – negatívna kontrola bez templátu.

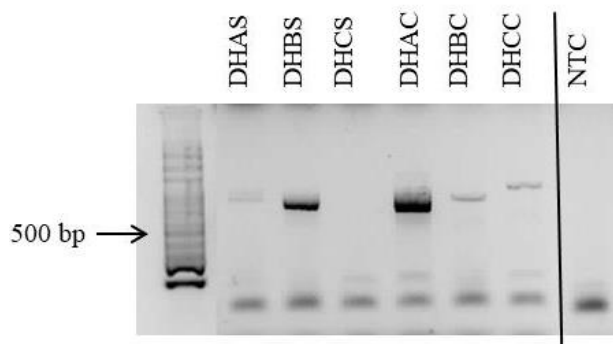
Pri amplifikácii ITS oblasti v izolovaných variantoch plodov broskyne nebola táto úspešná v prípade použitia lyofilizovaných plodov drvených priamo v lyzačnom roztoku a morským pieskom (obrázok 8), čo pripisujeme vzhľadom na húževnatosť lyofilizovaných plodov broskyň ich nedostatočnému rozdrveniu ako subjektívnemu faktoru, pretože hodnoty A260/A280 mali odlišné, vzorka DBCS dosahovala kvalitatívne optimum.



Obrázok 8. Kontrolná PCR funkčnosti DNA izolovanej z broskyne. NTC – negatívna kontrola bez templátu.

V prípade amplifikácie ITS oblasti v izolovaných variantoch hrozna vznikla v kontrole funkčnosti DNA v PCR podobná situácia ako pri jablku, kedy neúspešná bola amplifikácia len pri silnej kontaminácii vzorky DHCS s priemerom A260/A280 = 1,58 (obrázok 2). Ostatné vzorky poskytli úspešnú amplifikáciu, ale v prípade hodnôt v okolí optima A260/A280 boli PCR produkty výrazne slabšie, a to aj napriek tomu, že v PCR bol takmer trojnásobok DNA, ako pri vzorkách DHAS a DHBS.

Mnohé z vyššie uvedených štúdií vyžadujú extrakciu DNA z viacerých typov tkanív, ktoré sa majú použiť v testoch, ako je PCR. Pre vysoko výkonnú a nákladovo efektívnu extrakciu DNA z rastlinných tkanív bolo vyvinutých mnoho metodológií. Patria sem protokoly rýchlej extrakcie DNA špecificky vyvinuté pre rastliny, rovnako ako metódy uplatniteľné na rastlinné aj živočíšne tkanivá (Carrier et al., 2011).



Obrázok 9. Kontrolná PCR funkčnosti DNA izolovanej z hrozna. NTC – negatívna kontrola bez templátu.

Jedna z najbežnejšie používaných metód na extrakciu DNA z rastlín používa ionový detergent cetyltrimetylamónium bromid (CTAB) na rozrušenie membrán a zmes chloroformu a izoamylalkoholu, ktorá oddeľuje kontaminanty do organickej fázy a nukleovej kyseliny do vodnej fázy (Doyle – Doyle, 1987). Avšak mnohé rastliny obsahujú veľmi vysoké hladiny sekundárnych metabolitov vrátane lipidov, fenolových zlúčenín a viskózných polysacharidov, ktoré je možné ťažko odstrániť bez ďalšieho spracovania, často s organickými rozpúšťadlami, ako je fenol alebo iné toxické zlúčeniny (Bellstedt et al., 2010). Ak sa tieto nečistoty neodstránia, potom často inhibujú následné analýzy, vrátane PCR. Jedna alternatíva k metóde extrakcie CTAB DNA bola vyvinutá autormi Edwards et al. (1991). Táto metóda používa aniónový detergent SDS na rozpustenie membrán, po ktorej nasleduje vyzrážanie DNA izopropylalkoholom. Jedná sa o rýchly, jednoduchý a nenákladný spôsob extrakcie DNA z rastlín a DNA môže byť použitá priamo na PCR amplifikáciu bez ďalšieho spracovania.

Záver

Rozmanitosť a rozdielne množstvá rôznych sekundárnych metabolitov robia z rastlín objekty, pri ktorých je na začiatku experimentov potrebné ako prvé nájsť najvhodnejší postup izolácie ako DNA, tak aj RNA. V prípade dužinatých plodov je situácia zhoršovaná aj tým, že pletivo je z väčšej časti tvorené vnútrobunkovou vodou a do procesu izolácie tak vstupuje prirodzene



menej bunkovej hmoty. Na základe získaných výsledkov možno konštatovať: izolácia DNA je úspešnejšia, ak je uskutočnená z čerstvých plodov, pri izolácii parametre čistoty merané absorbanciou A260/A280 vykazujú v skupine čerstvých a lyofilizovaných plodov podobné hodnoty, mierna kontaminácia izolovanej DNA nebráni jej funkčnosti v PCR, moderné polymerázy dokážu amplifikovať PCR produkt aj v takomto prípade, ampikón je však slabší.

PodĎakovanie

Práca vznikla za pomoci riešenia projektu: VEGA 1/0411/17 - Determinácia účinku biologicky aktívnych látok v procese výroby vína na mikrobiálne a ovariálne bunky.

Literatúra

- Bellstedt, D. et al. 2010. A rapid and inexpensive method for the direct PCR amplification of DNA from plants. *Am J Bot Methods*. 97(7): 1-4.
- Carrier, G. et al. 2011. An efficient and rapid protocol for plant nuclear DNA preparation suitable for next generation sequencing methods. *Am J Bot*. 98: 13–15.
- Carvalho, J. et al. 2018. Highly efficient DNA extraction and purification from olive oil on a washable and reusable miniaturized device. *Analytica Chimica Acta*. DOI: 10.1016/j.aca.2018.02.079.
- Cicera, S. 2013. Highly efficient method for isolation of total RNA from adipose tissue. *BioMed Central*. 6: 472.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*. 19(1): 11–15.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res*. 19(6): 1349.
- Kotchoni, S.O., Gachomo, E. W. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol Biol Rep*. 36(6):1633-1636.
- Martínez-González, C.R. et al. 2017. Improved method for genomic DNA extraction for *Opuntia* Mill. (*Cactaceae*) *Plant Methods*. 13: 82.
- Reinhold, S.J., Baeumner, A.J. 2014. Microfluidic isolation of nucleic acids. *Angew. Chem. Int. Ed*. 53 (51): 13988-14001.
- Sinitsky, M.Y. et al. 2018. Modifications in routine protocol of RNA isolation can improve quality of RNA purified from adipocytes. *Analytical Biochemistry*. 543: 128-131.
- Zarrin, M., Ganj, F., Faramarzi, S. 2016. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomedical Reports*. 4(4): 471-474.
- Zhang, J., Stewart, J.M. 2000. Economic and rapid method for extracting cotton genomic DNA. *Journal of Cotton Science*. 4: 193-201.

AFLP a ISSR polymorfizmus láskavca po gama-radiačnej mutácii

Matúš Kyseľ¹, Jana Žiarovská¹, Ján Gažo¹, Katarína Ražná¹, Mária Labajová², Veronika Lancíková³, Veronika Štefúnová¹, Andrea Hricová³

¹Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76, Nitra

²Centrum biológie rastlín a biodiverzity, SAV, Dúbravská cesta 9, 845 23 Bratislava

³Ústav genetiky a biotechnológií rastlín, Centrum biológie rastlín a biodiverzity, SAV, Akademická 2, 950 07 Nitra

* Corresponding author: Jana Žiarovská, +421376414244, jana.ziarovska@uniag.sk

Abstrakt

Informačné charakteristiky techník AFLP a ISSR boli porovnané v analýze dĺžkového polymorfizmu gama-mutantných línií *Amaranthus cruentus* a *Amaranthus hypochondriacus* × *Amaranthus hybridus*. Obe techniky sú široko používané ako univerzálne markérovacie systémy vhodné na analýzu akéhokoľvek rastlinného druhu, ale líšiac sa nákladmi a časom potrebným na analýzu. Štatistické analýzy spočívali v použití matice binárnych údajov. Klastrová analýza, vykonaná metódou UPGMA s použitím euklidovskej vzdialenosti na vytvorenie dendrogramov, generovala dáta ďalej spracované analýzou hlavných komponentov. Porovnanie techník bolo uskutočnené na grafoch získaných z výsledkov PCA a dendrogramov. Matricové porovnania Mantelovho testu pre korešpondenciu matíc podobnosti boli uskutočnené pre nulovú hypotézu, že neexistuje vzťah medzi maticami podobnosti. V analyzovanom súbore použitom v tejto štúdií ISSR prajmery produkovali 59 % polymorfných fragmentov, zatiaľ čo AFLP prajmery produkovali 48 % polymorfných fragmentov a obe techniky boli podobné vo svojich získaných informačných vlastnostiach.

Kľúčové slová: AFLP, ISSR, láskavec, porovnanie

Úvod

Amaranthus sp. je široko rozšírený rod s približne 70 druhmi, ktoré sú známe ako buriny, výživná zelenina alebo okrasné rastliny. Niektoré z nich majú vysoký potenciál v ľudskej výžive (Rivelli *et al.*, 2008). V súčasnosti je zaujímavou plodinou na celom svete (Muyonga *et al.*, 2008; Fejér *et al.*, 2011). V Európe sa pestovaniu láskavca aktuálne venujú v Rakúsku,



Česku, Slovensku, Nemecku, Poľsku, Taliansku, Slovinsku a Rusku (Berghofer *et al.*, 2002). Gama lúče sú najúčinnějšíou technikou na prípravu rastlinných mutantov s potenciálom produkovať mutačné zmeny vysokou rýchlosťou (Sato *et al.*, 2006; Eroglu *et al.*, 2007). Mutačné šľachtenie sa používa ako veľký zdroj vytvárania variability kvalitatívnych a kvantitatívnych znakov láskavca. Gajdošová *et al.* (2004; 2005; 2008) použili radiačnú mutagenézu na vytvorenie línií láskavca so zvýšenou hmotnosťou tisícov semien. Táto metóda sa použila aj na výrobu trojfarebného láskavca tolerantného k aridite a s vyššou regeneračnou schopnosťou po stresovom stave (Slabbert *et al.*, 2004). Gama žiarenie sa taktiež použilo na produkciu genotypov láskavca s vyšším výťažkom, toleranciou na hubu *Sclerotinia* sp. a produkciou semien odlišných farbou a veľkosťou než jej rodičovské rastliny (Goméz-Pando *et al.*, 2009).

DNA markéry sú intergénne sekvencie alebo gény, ktoré sa používajú na definovanie a interpretáciu sekvenčnej genetickej variability v organizmoch (Govindaraj *et al.*, 2015; Hasanova *et al.*, 2017). Niektoré markéry sú širokospektrálne použiteľné, najmä markéry RAPD, ISSR, AFLP alebo iPBS. Všetky boli úspešne aplikované aj na rastlinných druhoch, ktoré sú genomicky menej známe (Mehmood *et al.*, 2013; Alp a Geboluglu, 2017). Cieľom predloženej štúdie bolo vyhodnotiť výsledky dvoch techník DNA markérov (AFLP a ISSR) spôsobom, ktorým sa porovná ich schopnosť charakterizovať zmeny genómu v ožiarených mutantných líniách láskavca. Analyzovaná genetická variabilita *Amaranthus cruentus*, genotypu Fichta a hybridného K-433 (*Amaranthus hybridus* L. × *Amaranthus hypochondriacus* L.) a porovnávali sa s kontrolami (bez ošetrenia gama lúčmi).

Materiál a metódy

V analýze boli použité Hybridné línie *Amaranthus* odrody Fichta pozitívne vybrané pre zvýšenie hmotnosti tisíc semien (označené: C15/1, C26/2, C27/5, C82/1, C236/1) a neošetrenú kontrolu (označenú A) spolu s *A. hybridus* × *A. hypochondriacus* K-433 riadkov (označené: D54/1, D279/1 a D282/1) a neošetrená kontrola (označená B). Tento rastlinný materiál pochádza zo semien, ktoré boli ošetrené gama žiarením v dávke 175 Gy.

Mladé sadenice láskavca boli pestované v kvetináčoch. DNA bola extrahovaná v triplikátoch z čerstvých listov s použitím súpravy DNeasy® Plant Mini (Qiagen) podľa inštrukcií výrobcu. Kvalita a množstvo extrahovanej DNA sa analyzovali použitím Nanodrop Nanophotometer™ (Implen). Reakcie AFLP a ISSR sa uskutočnili podľa publikovaných metodík (Vos *et al.*, 1995; Ražná *et al.*, 2012; Žiarovská *et al.*, 2013).



Získané elektroforeogramy boli spracované do binárnych matíc na základe prítomnosti (1) alebo neprítomnosti (0) amplifikovaných fragmentov po overení reprodukovateľnosti profilov v dvoch nezávislých analýzach. Na ďalšie analýzy boli použité len polymorfne fragmenty, monomorfne amplikóny neboli zahrnuté. Indexy podobnosti (SI, index podobnosti) – Jaccardov koeficient (GDJC) (Jaccard, 1908) boli vypočítané z binárnej matice. Na štatistické analýzy sa použili matice binárnych údajov ISSR a AFLP markérov.

Klastrová analýza bola vykonaná metódou nevážených párových skupín (UPGMA) s použitím euklidovskej vzdialenosti na vytvorenie dendrogramov. Analýzy hlavných zložiek (PCA) sa uskutočnili na dátach generovaných z každého typu markéra. Porovnanie (ISSR vs. AFLP) sa uskutočnilo na grafoch získaných z výsledkov PCA a dendrogramov, ktoré sa získali z výsledkov klastrovej analýzy. Okrem toho, maticové porovnania Mantelovho testu (Mantel, 1967), pre korešpondenciu matíc podobnosti (ISSR vs AFLP), boli uskutočnené pomocou MXCOMP postupu NTSYS-pc pre nulovú hypotézu, že neexistuje žiadna súvislosť medzi maticami podobnosti. Na získanie hladiny významnosti sa uskutočnilo 250 permutácií. Klastrová analýza a analýza hlavných zložiek (PCA) sa uskutočnili s použitím softvéru STATISTICA Cz ver. 10, StatSoft, Inc. (2011). Mantelov Z test NTSYS pc verzia 2.1 (Rohlf, 2000).

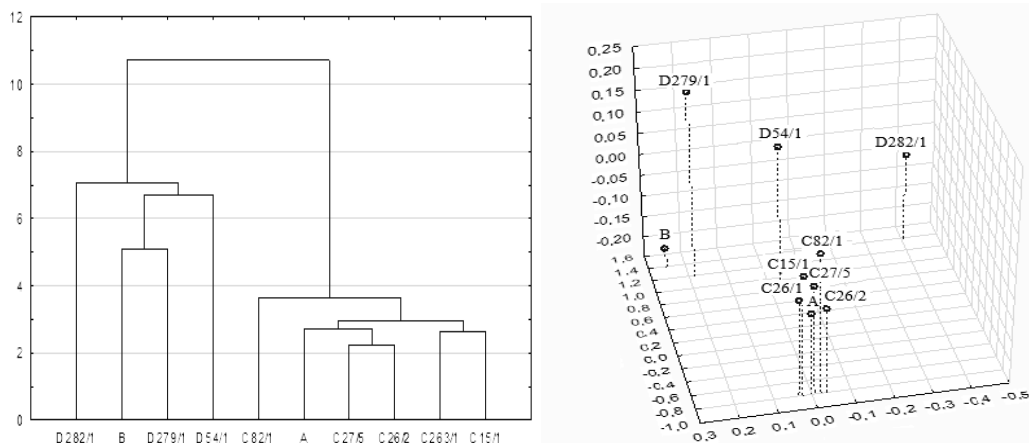
Výsledky a diskusia

Variabilita genómov je neoddeliteľnou súčasťou života. Prirodzené spontánne zmeny v genómoch rastlín sú kombinované s cieľovou mutagenézou rôznymi fyzikálnymi faktormi a/alebo chemikáliami. Odpoveď na spontánnu aj cieľovú mutagenézu je náhodná, viacsmerová a nepredvídateľná. Tu sa uskutočnilo porovnanie dvoch rôznych markérovacích systémov na báze polymorfizmu reštrikčných miest (AFLP, polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov) a mikrosatelitového polymorfizmu (ISSR, zmnoženie oblastí medzi jednoduchými opakovaniami nukleotidov). Obidve techniky použité v tejto štúdii boli predtým opísané ako techniky, ktoré majú potenciál rozlíšiť mutanty láskavca po ošetrovaní ionizujúcim žiarením gama (Ražná *et al.*, 2012; Labajová *et al.*, 2013; Žiarovská *et al.*, 2013). Obe techniky sa stále široko používajú pri hodnotení diverzity rastlinných genetických zdrojov, ale majú veľmi odlišné ekonomické charakteristiky. Preto niektorí autori sa zameriavajú na porovnanie výsledkov oboch techník za účelom hodnotenia polymorfizmu dĺžky (Kafkas *et al.*, 2006). Získaný polymorfizmus závisí od individuálnych kombinácií prajmerov (Xu a Sun, 2001). V tomto dokumente sa uvádza štúdia, kde sa genetické vzťahy medzi gama-ožiatimi mutantmi

láskavca a ich neožiarenými kontrolami hodnotili a porovnávali na základe údajov získaných analýzami AFLP a ISSR.

Zoskupenie kontrol a mutantov ošetrovaných gama žiarením poukázalo na vyššiu variabilitu pre líniu K-433 medzidruhového hybridu. Pozícia kontrol v dendrograme (obrázok 1) ukazuje, že má úplne odlišný profil AFLP bez ohľadu na úroveň genetickej variability, avšak obidve kontroly sú súčasťou skupín. Úroveň polymorfizmu DNA pre jednotlivé kombinácie prajmerov AFLP bola odlišná pri porovnaní genotypov Fichia a K-433. Bolo získaných 352 amplifikovaných fragmentov a 169 z nich bolo polymorfných, čo predstavuje 48 %. Index polymorfného informačného obsahu o prístupoch gama-ožiarených a kontrolných vzoriek láskavcov pre AFLP údaje bol 0,997. Výsledky z PCA AFLP markérov (obrázok 1) ukázali, že vzorky láskavca C15/1, C26/2, C27/5, C82/1 a C263/1 môžu byť zoskupené spolu s A a môžu byť oddelené od zvyšku použitím PCA osi 1. Druhá skupina prístupov (D54/1, D279/1, D282/1 a B) sa zoskupila do dendrogramu získaného z klastrovej analýzy prostredníctvom UPGMA. Úroveň podobnosti je nižšia ako v prípade vzoriek skupiny C a ich oddelenie sa vykonáva pomocou PCA osi 2. PCA os 3 oddeľuje B od vzoriek skupiny D.

Metóda AFLP sa použila na analýzu polymorfizmu dĺžky v genóme láskavca, M7 generácie mutantov po ošetrovaní gama žiarením. Reštrikčné štiepenie sa uskutočnilo s použitím endonukleáz MseI (miesto štiepenia – T*TAA) a EcoRI (miesto štiepenia – G*AATTC). Táto kombinácia bola zvolená z dôvodu veľmi vysokej frekvencie štiepenia a odlišného frekvenčného výskytu (Vekemans *et al.*, 2002). Preselektívna a selektívna amplifikácia sa použili na zníženie počtu fragmentov po reštrikčnom štiepení. Ak je obsah bázy G/C v genóme väčší ako 65%, MseI neposkytne vhodné množstvo fragmentov. Pre vhodnú produkciu MseI fragmentov je optimálne menej ako 50 % G/C báz. Uvádza sa, že MseI štiepne miesta sa vyskytujú viackrát v genóme v porovnaní s EcoRI, kvôli ich rozdielnemu počtu rozpoznávacích nukleotidov. EcoRI má tiež tendenciu produkovať viac fragmentov v G/C chudobných genómoch. V prípadoch, keď nie je pre posudzovaný organizmus známy obsah bázy G/C, musí byť účinnosť reštrikčných enzýmov stanovená empiricky. Bolo publikované (Vekemans *et al.*, 2002), že väčší počet fragmentov v profile zvyšuje pravdepodobnosť detekcie genetického polymorfizmu. Tiež sa zvyšuje pravdepodobnosť nedostatočne separovaných fragmentov. V prípade, že sa použije 80 prajmerov na báze jedného selektívneho nukleotidu MseI prajmeru a jedného EcoRI prajmeru, dosahuje polymorfizmus detekcie 93,75 %.



Obrázok 1. Klastrová analýza údajov AFLP a analýza hlavných zložiek (PCA) prístupov láskavca
Vľavo: Dendrogram profilov amplikónov AFLP analyzovaných prístupov láskavca; vpravo: Graf PCA
pre AFLP údaje analyzovaných prístupov láskavca

Pre K-433 hybrid bol detegovaný oveľa vyšší počet unikátnych lokusov. V tabuľke 1 sú uvedené veľmi konkrétne počty unikátnych fragmentov pre jednotlivé prístupy. Ako ukazujú výsledky DNA odtlačkov analýzy ISSR (obrázok 2), všetky mutantné línie genotypu Fichta (C15/1, C26/2, C27/5, C82/1, C236/1) zdieľali genetickú odlišnosť 0,16 a mutantné línie hybridu K-433 (D54/1, D279/1, D282/1) zdieľali genetickú odlišnosť 0,22.

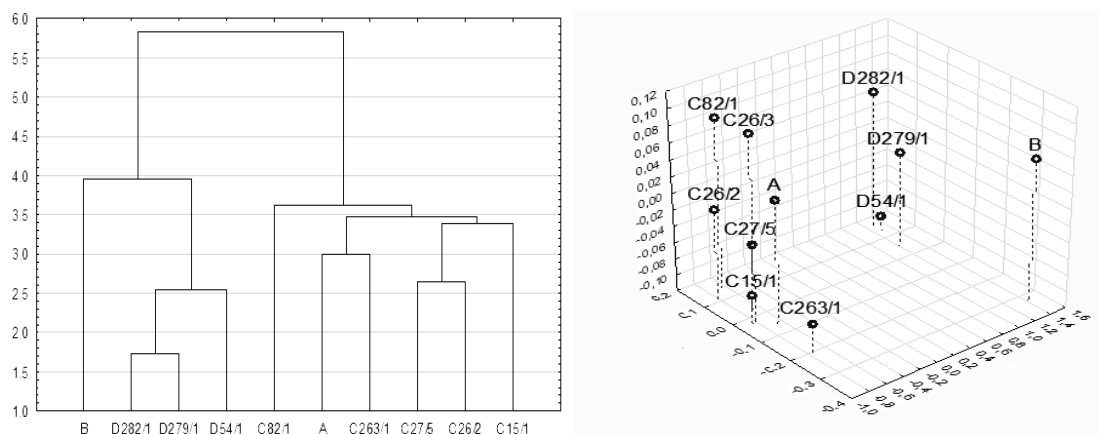
Tabuľka 1. Počet unikátnych fragmentov detekovaných pre prístupy *A. cruentus* a *A. hybridus* L. × *A. hypochondriacus* L.

Prístup	Celkový počet fragmentov	Počet unikátnych fragmentov	Percento unikátnych fragmentov (%)
C15/1	265	1	0,38
C26/2	262	2	0,76
C27/5	263	0	0
C82/1	259	1	0,39
C236/1	266	1	0,38
Fichta kontrola A	261	1	0,38
D54/1	287	0	0
D279/1	258	0	0
D282/1	291	18	6,2
K-433 kontrola B	258	2	0,78

Dendrogram profilov ISSR zobrazuje väčšiu podobnosť mutantných línií Fichta s A ako mutantných línií K-433 ako celku s B. Dva hlavné klastre boli pozorované pri koeficiente

rozdielnosti 0,38, čo znamená, že použité prajmery vytvorili dva relatívne odlišné súbory DNA odtlačkov, jeden pre Fica a jeho mutantné línie a jeden pre mutantné línie genotypu K-433. ISSR je zdrojom genetických markérov, ktoré spolu s technikou RAPD sú stále preferovanou metódou rýchlej primárnej identifikácie genotypov, pretože sú relatívne lacné, využívajú ľubovoľné prajmery a náhodne odoberajú potenciálne veľký počet lokusov v menej komplexnom vzore ako iné markéry na báze PCR (Milella *et al.*, 2011). V tejto štúdiu boli použité markéry ISSR na rozlíšenie mutantných línií dvoch genotypov láskavca Fica a K-433. Lee *et al.* (2008) uviedli potenciál markérov založených na mikrosatelitoch pre hodnotenie *A. hypochondriacus*, keď sa úspešne amplifikovali vo všetkých testovaných genotypoch (12 lokusov) a preukázali použiteľnosť týchto markérov pre štúdiu nielen intra-, ale aj interšpecifickej genetickej diverzity láskavca.

Klastrová analýza založená na markéroch ISSR (obrázok 2) je podobná klastrovaniu AFLP markérov. Podľa jednej z osí PCA grafu je skupina vzoriek C15/1, C26/2, C27/5, C82/1 a A (na ľavej strane PCA grafu) oddelená od skupiny vzoriek D54/1, D279/1, D282/1 a B (na pravej strane PCA grafu). Zvyšné 2 osi odfinujú vzorky skupiny C a D. Na rozdiel od PCA na báze AFLP markérov má skupina genotypov skupiny C dobré rozlíšenie. Výsledky porovnávacích matric porovnania pomocou Mantelovho Z testu ukázali, že existuje pozitívna korelácia medzi podobnostnými maticami AFLP a ISSR-RAPD ($r = 0,86$, $P < 0,001$). Korelácia medzi maticami podobnosti markérov AFLP a ISSR bola zhodná s výsledkami oboch klastrových analýz PCA (UPGMA) s korelačnou hodnotou matice 0,86. Prístup molekulárnych markérov bol úspešne použitý na pochopenie intra- a interšpecifickej genetickej diverzity a/alebo evolučných vzťahov v láskavci (Xu a Sun, 2001; Lee *et al.*, 2008; Mladenović Drinić *et al.*, 2012; Tony-Odigie *et al.*, 2012).



Obrázok 2. Klastrová analýza údajov ISSR a analýza hlavných zložiek (PCA) prístupov láskavca



Vľavo: Dendrogram profilov amplikónov ISSR analyzovaných prístupov láskavca; vpravo: Graf PCA pre údaje ISSR analyzovaných prístupov láskavca.

Interšpecifický polymorfizmus medzi 7 genotypmi láskavca dosiahol hodnoty od 94 % do 99 %. Na základe vyhodnotenia vnútrošpecifickej variability Xu a Sun (2001) zistili, že aj vnútrodruhovú variabilitu je relatívne vysoká, hoci je významne nižšia v porovnaní s interšpecifickou variabilitou. Polymorfizmus 44 % bol zaznamenaný medzi druhmi *Amaranthus cruentus*, 34 % u *A. gangeticus*, 49 % u *A. caudatus*, 55 % u *A. viridis*, 50 % u *A. hypochondriacus* a 62 % u *A. hybridus*. Amplifikácia jedinečných fragmentov charakteristických pre kontroly poskytla diferenciáciu gama-ožiarovaných variantov od kontroly. Celkovo bolo amplifikovaných 11 fragmentov charakteristických pre Fichta kontrolu a 21 fragmentov charakteristických pre K-433 kontrolu. Rozlíšenie gama-ožiarovaných variantov láskavca od kontroly umožnila tiež amplifikácia fragmentov charakteristických len pre varianty a neprítomné pre kontroly. V odrode Fichta 3 kombinácie prajmerov amplifikovali jeden fragment charakteristický pre gama ožiarované varianty. V línii K-433 interšpecifického hybridu boli detekované 2 gama-ožiarované fragmenty.

Záver

Klastrová analýza a PCA (ISSR vs. AFLP) viedli k veľmi podobným výsledkom v analýze polymorfizmu prístupov ošetrovaných gama žiarením a kontrolných genotypov láskavca. Ukazuje sa, že oba systémy markérov majú podobné vlastnosti pri hodnotení celogenomického polymorfizmu rastlín, a preto sa môžu používať alebo súbežne, alebo sa môže vybrať len jeden z nich, pričom sú získané relevantné genomické informácie založené na analýzach špecifických lokusov. Obe techniky potvrdili výbornú opakovateľnosť získaných profilov.

PodĎakovanie

Túto štúdiu podporil projekt VEGA 2/0109/19 – Morfo-fyziologická, genetická a biochemická odpoveď rastlín láskavca (*Amaranthus* spp.) na stres vyvolaný ťažkými kovmi.

Literatúra

- Alp, F. M., Geboluglu, M. D. 2017. Two different molecular markers (SSR & IPBS) assessment on *Coriandrum sativum* L. with capillary electrophoresis. *Fresen Environ Bull.* 26 (7): 4568 - 4573.
- Berghofer, E., Schoenlechner, R. 2002. Grain Amaranth. V Belton, P., Taylor, J. Pseudocereals and Less Common Cereals, Grain Properties and Utilization Potential. Springer-Verlag, 2002, 219 - 260 s., ISBN 3-540-42939-5.



- Eroglu, Y., Eroglu, H. E., Ilbas, A. I. 2007. Gamma ray reduces mitotic index in embryonic roots of *Hordeum vulgare* L. *Adv Biol Res.* 1 (1-2). 26 - 28.
- Fejér J., Gajdošová, A., Libiaková, A. 2011. Charakteristika láskavca s ohľadom na možnosti využitia jeho fyto-masy na energetické účely. V *Pestovanie a využitie láskavca (Amaranthus L.) a iných plodín na energetické účely*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2011, 17 s., ISBN 978-80-552-0561-8.
- Gajdošová, A., Libiaková, G., Húska, J. 2004. Improvement of selected *amaranthus* cultivars by means of mutation techniques and biotechnological approaches. V *Genetic improvement of under-utilized and neglected crops in low income food deficit countries through irradiation and related techniques*. Viedeň: IAEA, 2004, 25 - 36 s., ISBN 92-0-113604-8.
- Gajdošová, A. *et al.* 2005. Aplikácia radiačnej mutagenézy v šľachtení láskavca. V *Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín*. Zborník z 12. odborného seminára. Piešťany: VÚRV, 2005, 103 - 104 s., ISBN 80-88790-43-3.
- Gajdošová, A. *et al.* 2008. Mutation Breeding in selected *Amaranthus* spp. V *Amaranth - Plant for the Future*. Nitra: Slovenská akadémia vied, 2008, 93 - 94 s., ISBN 978-80-89088-70-6.
- Goméz-Pando, L. *et al.* 2009. Barley (*Hordeum vulgare*) and Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) Improvement by Mutation Induction in Peru. V *Shu, Q.Y. Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009, 330 - 332 s., ISBN 978-92-5-106324-8.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., Srinivasan, M. 2015. Importance of Genetic Diversity Assessment in Crop Plants and Its Recent Advances: An Overview of Its Analytical Perspectives. *Genet Res Int.* 431487: 14 s.
- Hasanova, S. *et al.* 2017. Genetic diversity of chickpea genotypes as revealed by ISSR and RAPD markers. *Genetika.* 49 (2): 415 - 423.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Natl.* 44 (163): 223 - 270.
- Kafkas, S. *et al.* 2006. Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. *J Am Soc Hortic Sci.* 31 (4): 522 - 529.
- Labajová, M. *et al.* 2013. Restriction Analyze of Starch Synthesis Genes in Amaranth Mutant Lines. *Pak J Biol Sci.* 17 (1): 68 - 73.
- Lee, J. R. *et al.* 2008. Characterization of microsatellite loci developed for *Amaranthus hypochondriacus* and their crossamplification in wild species. *Conserv Genet.* 9 (1): 243 - 246.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27 (2): 209 - 220.
- Mehmood, A. *et al.* 2013. Evaluation of genetic diversity in open pollinated guava by iPBS primers. *Pak J Biol Sci.* 50 (4): 591 - 597.
- Mladenović Drnić, S. *et al.* 2012. Correlation of genetic distance based on SSR markers, yields and heterosis of maize hybrids and their parental inbred lines. *Genetika.* 44 (2): 399 - 408.
- Milella, L. *et al.* 2011. Total phenolic content, RAPDs, AFLPs and morphological traits for the analysis of variability in *Smalanthus sonchifolius*. *Gen Res Crop Evol.* 58: 545 - 551.
- Muyonga, J. H. *et al.* 2008. Efforts to promote amaranth production and consumption in Uganda to fight malnutrition. V *Robertson, G.L., Lupien, J.R. Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote Chapter 8. National Development. International Union of Food Science & Technology, 2008, 10 s., ISBN 978-0-9810247-0-7.*
- Ražná, K., Žiarovská, J., Labajová, M. 2012. Genome changes in mutant lines of *Amaranthus* as detected by microsatellite-directed PCR. *ARNP JABS.* 7 (11): 877 - 884.



- Rivelli, A. R. *et al.* 2008. Field Evaluation of *Amaranthus* Species for Seed and Biomass Yields in Southern Italy. *Ital J Agron.* 3 (3): 225 - 229.
- Rohlf F. J. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy System. Ver. 2.1. Setauket, NY: Exeter Publishing.
- Sato, Y. *et al.* 2006. Mutant selection from progeny of gamma-ray-irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using brassica petiole extract. *Breed Sci.* 56 (2): 179 - 183.
- Slabbert, M. M. *et al.* 2004. Development and evaluation of mutant germplasm of *Amaranthus*. V Genetic improvement of under-utilized and neglected crops in low income food deficit countries through irradiation and related techniques. Viedeň: IAEA. 2004, 13 - 23 s., ISBN 92-0-113604-8.
- Tony-Odigie, A. E. *et al.* 2012. Assessment of Genetic Interspecies Relationships among Five Selected *Amaranthus* Species Using Phenotypic and RAPD markers. *Int J Botany.* 8 (3): 145 - 152.
- Vekemans, X. *et al.* 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol Ecol.* 11 (1): 139 - 151.
- Vos, P. *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21): 4407 - 4414.
- Xu, F., Sun. M. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. *Mol Phylogenet Evol.* 21 (3): 372 - 387.
- Žiarovská, J., Ražná, K., Labajová, M. 2013. Using of Inter Microsatellite Polymorphism to Evaluate gamma-irradiated Amaranth Mutants. *Emir J Food Agric.* 25 (9): 673 - 681.



DNA microarray – významný nástroj molekulárnej biológie na sledovanie zmien génovej expresie

Veronika Fialková^{1*}, Jana Bilčíková^{1,2}, Lucia Zamiešková², Jana Žiarovská²

¹Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

²Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovenská republika

**veronika.fialkova@uniag.sk; veronikacaplakova@gmail.com*

Abstrakt

Metóda DNA microarray je dnes veľmi populárnou technikou molekulárnej biológie, ktorá má širokospektrálne využitie v oblasti medicíny, farmácie, toxikológie, či klinickej mikrobiológie na detekciu genetických zmien a variácií. Vo všeobecnosti je DNA microarray aplikovaná najmä na komplexnú analýzu zmien transkripčného profilu buniek alebo tkanív, pretože umožňuje sledovať niekoľko tisíc génov paralelne v priebehu jedného experimentu, a tak hlbšie porozumieť patofyziológii molekulárnych procesov v priebehu mnohých ochorení, liekovej rezistencie alebo identifikovať nové biomarkery v diagnostike a klinickej praxi. Dlhodobý rozvoj metód na poli microarray platforiem sa dnes spája so zaradením *in situ* syntetizovaných DNA čipov do bežnej rutinej praxi. Cieľom našej práce je podať stručný popis a charakteristiku DNA microarray metódy, konkrétne princípu fungovania *in situ* syntetizovaných čipov a ich využitia v oblasti monitorovania génových expresií.

Kľúčové slová: DNA microarray, génová expresia, *in situ* syntetizované čipy

Úvod

Kompletné poznanie celej genómovej sekvencie a ukončenie Projektu mapovania ľudského genómu (*Human Genome Project*, 1990 – 2003) umožnilo prudký rozmach metód v oblasti molekulárnej biológie a genetiky (Venter et al., 2001). V súčasnosti neustále rastie počet vedeckých publikácií a pribúdajú informácie o možnostiach využitia microarray technológií na detekciu molekulárnych zmien na úrovni RNA, DNA a tiež proteínov. Technológie DNA microarray (zvané ako génové alebo DNA čipy) sú dnes významným nástrojom v oblasti molekulárnej biológie (genomiky a transkriptomiky), ktorý nám poskytuje kvantitatívne,



simultánne, a komplexné monitorovanie expresie niekoľkých tisícov génov paralelne na princípe hybridizácie nukleových kyselín (Jaksik et al., 2015). Bunková variabilita je významným znakom génovej expresie odlišných génov daného genómu, ktorá úzko súvisí s odlišnými mechanizmami bunkovej regulácie. V súčasnosti sa odhaduje, že 1 – 2 % ľudského genómu tvoria proteín kódujúce gény (20 000 – 25 000 génov) a zvyšok genómu tvoria repetitívne sekvencie, regulačné oblasti a unikátne nekódujúce sekvencie s neznámou funkciou (Bakalova et al., 2005; Durmaz et al., 2015). Každý gén môže byť, navyše, prítomný v rôznych genetických variantoch, zvaných polymorfizmy, ktoré výrazne zvyšujú variabilitu expresného profilu buniek. V ľudskom genóme bolo doteraz popísaných 3×10^6 genetických polymorfizmov (hoci, ich počet sa reálne odhaduje na 11×10^6), ktoré môžu byť zodpovedné za vznik a rozvoj niektorých ochorení. Monitorovanie týchto genetických zmien, ktoré môžu byť asociované s etiológiou ochorenia a objavom nových biomarkerov pre skorú prognózu alebo predikciu závažných ochorení, umožňuje využiť DNA microarray metódu ako sľubný terapeutický nástroj (Bakalova et al., 2005; Penes et al., 2017). Navyše, za posledné desaťročie našli DNA microarray metódy svoje uplatnenie i na poli klinickej mikrobiológie, kde zvyšujú súčasné poznatky v detekcii populačných mikrobiálnych patogénov i špecifickej odpovedi hostiteľa na patogén (Miller a Tang, 2009; Bannister et al., 2018). Avšak, výstupy získané z DNA microarray techník majú i svoje limitácie (napr. meranie relatívnej koncentrácie nukleových kyselín, pozadie genetických variácií, či prítomnosť genetických homológií a pod.), a preto musia byť verifikované inými, najčastejšie, vysoko-citlivými sekvenačnými metódami (Bumgarner, 2013).

V tejto práci stručne popisujeme históriu vzniku DNA microarray technológií, princíp fungovania *in situ* syntetizovanej DNA microarray metódy a zaoberáme sa možnosťami jej využitia v analýze génovej expresie.

História vzniku DNA microarray technológií

Metódy založené na princípe microarray sa rozvinuli koncom 70. rokov s metódami kolóniovej hybridizácie, pri ktorej DNA záujmu bola náhodne klonovaná do *E. coli* plazmidov, ktoré boli vysiate na agarózové platne a replikované na nitrocelulóзовé filtre. Po následnom lyzovaní bakteriálnych kolónií a denaturácii DNA, bola DNA záujmu detegovaná na základe hybridizácie s rádioaktívne značenou próbou DNA (Grustein a Hogness, 1975). To umožnilo skrining tisícov kolónií a následnú identifikáciu klonov, ktoré obsahujú DNA, ktorá je komplementárna s próbou. V nasledujúcich dvoch desaťročiach boli tieto techniky s využitím agarózových platní nahradené mikroplatňami (Gergen et al., 1979), čo umožnilo sledovať



krátke nukleotidové polymorfizmy (SNP, *short nucleotide polymorphism*) a analyzovať odlišne exprimované gény medzi vzorkami (Miller a Barnes, 1986). Koncom 80. a začiatkom 90. rokov nastala automatizácia microarray techník za využitia prvých robotických systémov, čím sa urýchlil proces replikácie klonov z mikrotitračných platní na filtre (Lennon a Lehrach, 1991), a tiež snaha vytvoriť referenčné sety cDNA prôb pre rôzne organizmy (Lennon et al., 1996). Neskôr, využitie fluorescenčnej detekcie a množstvo dostupných informácií o sekvenciách rôznych genómov umožnilo rýchly pokrok moderných DNA microarray technológií a využívanie krátkych oligonukleotidových prôb (25 – 60 bp). To umožnilo zvýšiť špecifickosť tejto metódy a zlepšiť dizajn DNA prôb pre špecifické cieľové sekvencie študovaných génov (Govindarajan et al., 2012; Bumgarner et al., 2013). V tomto období boli vyvinuté nasledovné DNA microarray techniky, ktoré možno rozdeliť podľa typu prôb: oligonukleotidové a cDNA microarray a spôsobu ich prípravy: tlačené na sklíčku (*spotted* microarray), *in situ* syntetizované a tzv. *self assembled* microarray (Naidu a Suneetha, 2012; Bumgarner, 2013).

***In situ* syntetizovaná DNA microarray**

In situ syntetizované microarray, nazývané aj ako génové čipy, sú v súčasnosti najznámejšie a najčastejšie využívané oligonukleotidové microarray. Krátke oligonukleotidy (zvyčajne dlhé 20 – 25 bp) sú chemicky syntetizované priamo na pevnom substráte s plochou 1 – 2 cm². Dĺžka *in situ* syntetizovaných oligonukleotidov umožňuje zvýšiť hustotu prôb na platni, čo zabezpečuje vyššiu citlivosť, špecifickosť a štatistickú presnosť v porovnaní s inými microarray metódami (Dalma-Weiszhausz et al., 2006). Veľkou výhodou týchto techník je i reprodukovateľnosť výsledkov, možnosť štandardizácie reagensov a využitie referenčných prôb a vnútorných kontrol reakcií (Kreil et al., 2006). Dnes je známych na trhu niekoľko výrobcov génových čipov.

Génové čipy typu AffymetrixTM umožňujú analyzovať naraz viac ako 1 x 10⁶ spotov v jednom experimente. Oligonukleotidové próby sú tu syntetizované fotochemicky na kremíkovom substráte, kde sú modifikované svetlo-citlivými chemickými skupinami, ktoré zabraňujú náhodnému pridávaniu nukleotidov. Keď je povrch platne exponovaný UV svetlom, môžu byť reaktívne nukleotidy pridávané na rastúci oligonukleotidový reťazec (Bannister et al., 2018). Firmy Roche NimbleGen a Agilent Technologies produkujú oligonukleotidové čipy s dĺžkou oligonukleotidov (60 – 100 bp), ktoré zabezpečujú vyššiu citlivosť metódy, detegujú > 10⁶ spotov a ako substrát používajú sklíčka (Hughes et al., 2001).

Oligonukleotidové microarray majú v súčasnosti širokospektrálne využitie. V štúdiu Bannister et al. (2018) bolo navrhnuté, že oligonukleotidové génové čipy sú vhodným diagnostickým



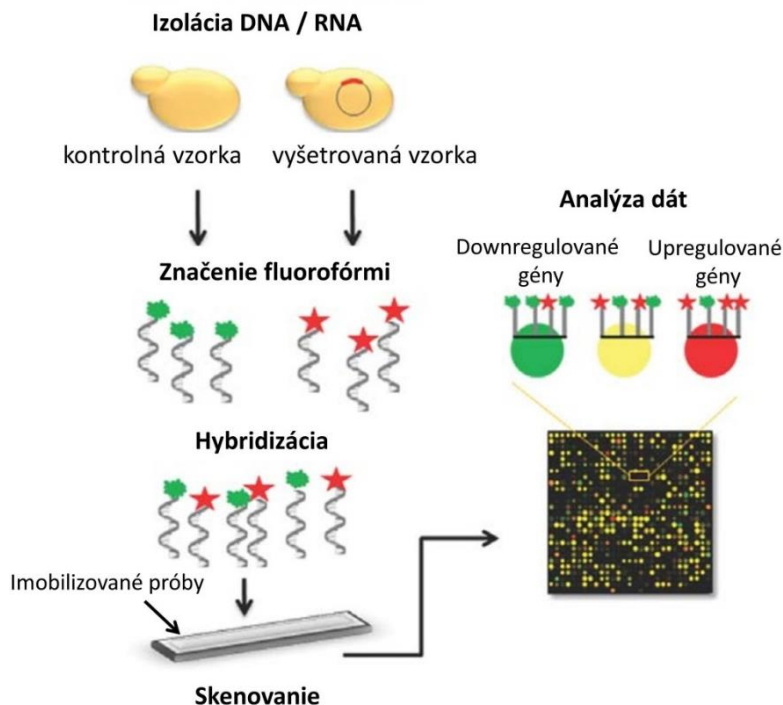
nástrojom na detekciu a typizovanie bakteriálnych patogénov meningitídy alebo hubových intrakraniálnych patogénov (Cao et al., 2018). Svoje uplatnenie našli i v toxikogenomike (Rao et al., 2018); v profilovaní génovej expresie nádorových ochorení (Yang et al., 2018); analýze mutačného profilu a detekcii skorých biomarkerov ochorenia (Damin et al., 2018); v epidemiologických analýzach liekovej rezistencie (Chen et al., 2019); monitorovaní transkriptómu rôznych druhov rýb (Caballero-Solares et al., 2018) ako i v analýze mikrobiómu domácich zvierat (Thissen et al., 2019).

Analýza génovej expresie s využitím oligonukleotidovej DNA microarray

Prvotná myšlienka dizajnu micorarray technológie sa spájala s analýzou profilu génovej expresie a meraním množstva transkribovaných génov buniek a tkanív, kde našla svoje veľké uplatnenie (Bakalova et al., 2005). Typické microarray experimenty zahŕňajú pri práci viac krokov: izolácia RNA / DNA, syntéza cDNA, značenie, hybridizácia, analýza a validácia dát (Obrázok č. 1) (Jaksik et al., 2015). Pri sledovaní génovej expresie je izolovaná mRNA z analyzovaných vzoriek priamo značená fluorescenčnými farbičkami, transformovaná reverznou transkripciou do viac stabilných cDNA molekúl, alebo konvertovaná na cRNA pomocou T7RNA promótoru a následne amplifikovaná. Tieto molekuly sú značené pomocou fluorescenčne- alebo biotín-značených nukleotidov počas syntézy. Následne sú značené cDNA a cRNA molekuly hybridizované na DNA čipy, premyté a signál je detegovaný na základe intenzity fluorescencie každého spotu pomocou konfokálneho skenovacieho mikroskopu. Intenzita farebného signálu zodpovedá hladine expresie konkrétneho génu (Bumgarner et al., 2013). Analýzy génovej expresie na báze DNA čipov nachádzajú veľké uplatnenie najmä vo výskume nádorových ochorení: pri identifikácii prognostických markerov karcinómu prsníkov (Xu et al., 2019), kolorekta (Akiyoshi et al., 2019), hľadani nových terapeutických markerov nemalobunkového karcinómu pľúc (Wu et al., 2019). Dokonca, bolo preukázané využitie DNA čipov i na monitorovanie vplyvu environmentálnych toxických látok na zmeny génovej expresie epitelu pľúc (Cayir et al., 2019).

Napriek tomu, že DNA microarray metódy sú široko využívané pri analýze génovej expresie, majú i svoje limitácie. Tieto techniky merajú relatívnu koncentráciu nukleových kyselín, ktorá môže byť ovplyvnená kinetikou hybridizácie a analyzujú len set preddefinovaných génov. Obzvlášť, pre komplexné cicavčie genómy je náročné nadizajnovať DNA čipy, kde dochádza len k špecifickej hybridizácii z dôvodu sekvenčnej homológie niektorých génov. Veľkou nevýhodou DNA microarray technológií sú tiež ich vysoké finančné náklady (Jaksik et al., 2015). Pre tieto limity sú microarray metódy nahrádzané a verifikované vysoko-účinnými

a citlivými sekvenáčnymi technológiami novej generácie (RNA sekvenovanie), ktoré poskytujú obrovské množstvá dát profilu expresie génov (> 100 bil. analyzovaných sekvencií) využiteľných pre klinickú prax (Durmaz et al., 2015).



Obrázok č. 1: Zjednodušená schéma princípu microarray metódy pri analýze génovej expresie (Upravené podľa Pereira et al., 2012).

Záver

Metódy DNA microarray predstavujú významný nástroj v oblasti genomiky a transkriptomiky, ktorý umožňuje globálne preskúmať transkripčný profil buniek alebo tkanív, a tak popísať biologické zmeny za konkrétnych fyziologických podmienok. Na rozdiel od tradičných molekulárnych biologických metód, ktoré analyzujú samotné gény, microarray platformy detegujú expresiu niekoľkých tisícov génov naraz a môžu byť aplikované nielen pri štúdiu profilovania génovej expresie, ale i pri hľadaní nových biomarkerov, či identifikácii rôznych patogénov, mechanizmov ochorenia a liekovej rezistencie. I s ohľadom na svoje limitácie, metódy DNA microarray sú dnes dôležitou súčasťou mnohých vedeckých komunit, kde častokrát prepájajú získané informácie z diagnostiky do klinickej praxe.



Pod'akovanie

Táto práca vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu „Vybudovanie výskumného centra AgroBioTech ITMS 26220220180“ a projektu „The Danube strategy project DS-2016-0051”.

Literatúra

Akiyoshi, T., Tanaka, N., Kiyotani, K., Gotoh, O., Yamamoto, N., Oba, K., Fukunaga, Y., Ueno, M., Mori, S., 2019. Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer *Br J Surg*. doi: 10.1002/bjs.11179.

Bakalova R., Ewis, A., Baba, Y. 2005. Microarray-Based Technology: Basic Principles, Advantages and Limitations. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. 2005, 24 s., ISBN 3-527-30550-5.

Bannister, S. A., Kidd, S. P., Kirby, E., Shah, S., Thomas, A., Vipond, R., Elmore, M. J., Telfer Brunton, A., Masrh, P., Green, S., Silman, N. J., Kempell, K. E. 2018. Development and Assessment of a Diagnostic DNA Oligonucleotide Microarray for Detection and Typing of Meningitis-Associated Bacterial Species. *High Throughput*. 7(4): 1-30.

Bumgarner, R. 2013. Overview of DNA microarrays: Types, Applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*. 22(22.1): 1-17.

Caballero-Solares, A., Xue, X., Parrish, C. C., Foroutani, M. B., Taylor, R. G., Rise, M. L. 2018. Changes in the liver transcriptome of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed experimental diets based on the terrestrial alternatives to fish meal and fish oil. *BMC Genomics*. 19(1): 796.

Cao, J., Gao, S., Chen, J., Zhu, B., Min, R., Wang, P. 2018. The preparation and clinical application of diagnostic DNA microarray for the detection of pathogens in intracranial bacterial and fungal infections. *Exp Ther Med*. 16(2): 1304-1310.

Cayir, A., Barrow, T. M., Guo, L., Byun, H. M. 2019. Exposure to environmental toxicants reduces global N6-methyladenosine RNA methylation and alters expression of RNA methylation modulator genes. *Environ Res*. 175: 228-234.

Dalma-Weiszhausz, D. D., Warrington, J., Tanimoto, E. Y., Miyada, C. G. 2006. The Affymetrix GeneChip platform: an overview. *Methods Enzymol*. 410: 3-28.

Damin, F., Galbiatis, S., Soriani, N., Burgio, V., Ronzoni, M., Ferrari, M., Chiari, M. 2018. Analysis of KRAS, NRAS and BRAF mutational profile by combination of in-tube hybridization and universal tag-microarray in tumor tissue and plasma colorectal cancer patients. *PLoS One*. 13(12): ee0207876.

Durmaz, A. A., Karaca, E., Demkow, U., Toruner, G., Schoumans, J., Cogulu, O. 2015. Evolution of genetic techniques: past, present, and beyond. *Biomed Res Int*:461524: 1-7.

Gergen, J. P., Stern, R. H., Wensink, P. C. 1979. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. *Nucleic acids research*. 7: 2115-2136.

Govindarajan, R., Duraiyan, Kaliyappan, K., Palanisamy, M. 2012. Microarray and its applications. *J pharm Bioallied Sci*. 4(2): S310-S312.

Grunstein, M., Hogness, D. S. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 72: 3961-3965.

Hughes, T. R., Mao, M., Jones, A. R., Burchard, J., Marton, M. J., Shannon, K. W., Lefkowitz, S. M., Ziman, M., Friend SH, Linsley PS. 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol*. 19(4): 342-347.



- Chen, C. Y., Weg, J. Y., Huang, H. H., Yen, W. C., Tsai, Y. H., Cheng, T. C., Jou, R. 2019. A new oligonucleotide array for the detection of multidrug and extensively drug- resistance tuberculosis. *Sci Rep.* 9(1): 4425.
- Jaksik, R., Iwanaszko, M., Rzeszowska-Wolny, J., Kimmel, M. 2015. Microarray experiments and factors which affect their reliability. *Biol Direct.* 10:46.
- Kreil, D. P., Russell, R. R. Russell, S. 2006. Microarrayoligonucleotide probes. *Methods Enzymol.* 410: 73-98.
- Lennon, G. G., Lehrach, H. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends in Genetics: TIG.* 7(10): 314-317.
- Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., Soares, M. B. 1996. The I.M.A.G.E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics.* 33(1): 151-152.
- Miller, Barnes, W. M. 1986. Colony probing as an alternative to standard sequencing as a means of direct analysis of chromosomal DNA to determine the spectrum of single-base changes in regions of known sequence. *Proc Natl Acad Sci.* 83(4): 1026-1030.
- Miller, M. B., Tang, Y. W. 2009. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clin Micro Rev.* 22(4): 611-633.
- Naidu, Ch. K., Suneetha, Y. 2012. Current Knowledge on Microarray Technology – An Overview. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 11(1): 153-164.
- Penes, N. Q., Weber, B., Paun, S. D. 2017. Role of genetic polymorphism in nutritional supplementation therapy in personalized medicine. *Rom J Morphol Embryol.* 58(1): 53-58.
- Pereira, C., Leao, M., Soares, J., Bess, C., Saraiva, L. 2012. New therapeutic strategies for cancer and neurodegeneration emerging from yeast cell-based systems. *Curr Pharm Des.* 18(27): 4223-4235.
- Rao, M. S., Van Vleet T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. w., Blomme, E. A. G., Liguori, M. J. 2019. Comparison of RNA-Seq and Microarray Gene Expression Platforms for the Toxicogenomic Evaluation of Liver From Short- Term Rat Toxicity Studies. *Front genet.* 9: 636.
- Thissen, J. B., Be, N. A., McLoughlin, K., Gardner, S., Rack, P. G., Shapero, M. H., Rowland, R. R. R. Slezak, T., Jaing, C. J. 2019. Axiom Microbiome Array, The next generation microarray for high-throughput pathogen and microbiome analysis. *PLoS One.* 14(2): e0212045.
- Venter, J. C., Adams, M., Myers E. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science.* 291(5507): 1304-1351.
- Wu, Q., Zhang, B., Sun, Y., Xu, R., Hu, X., Ren, S., Ma, Q., Chen, C., Shu, J., Qi, F., He, T., Wang, W., Wang, Z. 2019. Identification of novel biomarkers and candidate small molecule drugs in non-small-cell lung cancer by integrated microarray analysis. *Onco Targets Ther.* 12: 3545-3563.
- Xu, W., Wang, Y., Wang, Y, Xu, X., Dong, X., 2019. Screening of differentially expressed genes and identification of NUF2 as a prognostic marker in breast cancer. *Int J Mol Med.* 44: 390-404.
- Yang, X., Mo, W., Fang, Y., Wei, G., Wei, M., Dang, Y., Chen, G., Hu, K., Wei, D. 2018. Up-regulation of Polo-like Kinase 1 in nasopharyngeal carcinoma tissues: a comprehensive investigation based on RNA-sequencing, gene chips, and in-house tissue arrays. *Am J Transl Res.* 10(12): 3924-3940.



Aeroalergény v podmienkach klimatických zmien

Lucia Zamiešková^{1*}, Jana Bilčíková², Jana Žiarovská¹

¹ KGŠR, FAPZ, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01

² AgroBioTech, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01

**xzamieskova@uniag.sk*

Abstrakt

Globálna klíma sa mení a s ňou aj podmienky pre všetky sféry života. Znečisťovanie ovzdušia spôsobuje zvyšovanie počtu pacientov s ochorením dýchacieho systému, s čím súvisí oslabenie imunitného systému a uľahčenie prieniku aeroalergénov do slizníc dýchacieho traktu senzitívnych jedincov. Globálne otepľovanie zabezpečuje predlžovanie teplého obdobia, čo prispieva ku zvýšenej expozícii aeroalergénov v ovzduší. Jedným z najdôležitejších aeroalergénov centrálnej a severnej Európy je Bet v 1, hlavný alergén peľu brezy a predstaviteľ skupiny PR-10 bielkovín. Jeho homológy sa vyskytujú v rôznych druhoch rastlinnej potravy a spôsobujú krížové reakcie, ktorých prevalencia stále stúpa najmä u detí. Preto je dôležité skupinu PR-10 skúmať nielen na proteínovej úrovni, ale taktiež na úrovni samotného génu. Na to môže slúžiť jednoduchá a pomerne lacná metóda polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP).

Kľúčové slová: globálna klíma, Bet v 1, PR-10, RFLP

Úvod

Alergiológia spolu s imunológiou sa tradične zamerali na vnútorné environmentálne faktory, predovšetkým na redukciiu expozície alergénov, ale tiež na zníženie ďalších dráždivých látok v dýchacích cestách ako napr. tabakový dym (Bernstein et al., 2004). Niekoľko epidemiologických štúdií však už preukázalo úzke prepojenie medzi globálnym otepľovaním, znečistením ovzdušia a alergickými ochoreniami dýchacích ciest. Klimatické zmeny ovplyvňujú množstvo, kvalitu, načasovanie a distribúciu aeroalergénov (D'Amato et al., 2011). Zvýšené koncentrácie oxidu uhličitého v atmosfére v dôsledku spaľovania fosílnych palív stimulujú rast rastlín vrátane alergénnych druhov. Okrem toho, vyššie teploty môžu viesť k skoršiemu a dlhšiemu obdobiu opeľovania, čo vedie k zvýšeniu expozície peľu a pretrvávaniu



symptomatických reakcií (Landrigan, et al., 2019). V súvislosti so zvyšovaním priemernej ročnej teploty je tiež všeobecne známe, že roky s väčším počtom teplých dní sú pacientmi znášané horšie ako roky s miernejším počasím. Pacientov imunitný systém je teda dráždený dlhšie, vo vyššej miere a väčším počtom faktorov, a preto symptomatickú povahu alergie môže nadobudnúť aj jedinec, ktorého imunitný systém doposiaľ reagoval iba tvorbou imunoglobulínu E (IgE) a symptómy neregistroval alebo jednotlivé reakcie prechádzajú do agresívnejších foriem (Patella, et al., 2018).

Klimatické zmeny ako záťaž pre dýchaciu sústavu

Klimatické zmeny už prebiehajú a majú tendenciu pokračovať aj v nasledujúcich desaťročiach: teploty sa zvyšujú, menia sa globálne modely zrážok, topia sa ľadovce a sneh a priemerná globálna hladina mora rastie. Okrem toho vplyv globálneho otepľovania na ľudské zdravie dokumentujú viaceré správy Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) (WHO, 2005), ktoré dokazujú, že hlavným problémom tohto javu je zvýšenie úrovne znečistenia ovzdušia. V tejto súvislosti posledná správa Európskej environmentálnej agentúry (EEA) uvádza, že až 96 % mestského obyvateľstva v Európskej únii je vystavená časticiam a jemným prachovým časticiam presahujúcim prahové hodnoty (EEA, 2016). Častice sa môžu dostávať do najhlbších častí dýchacieho systému, čo vedie k zápalovým a pro-karcinogénnym účinkom na bronchiálnej sliznici (Donaldson et al., 2001). Zápalové reakcie citlivých jedincov zvyšujú permeabilitu pľúcnej sliznice, čo uľahčuje prienik aeroalergénov na bunky imunitného systému (D'Amato, 2011). Okrem toho sa preukázalo, že prítomnosť ozónu má nepriaznivé účinky na zdravie, vrátane rôznych pľúcnych ochorení. Výskum zisťuje, že látky znečisťujúce ovzdušie, najmä prízemný ozón a tuhé častice, priamo súvisia so zvýšenou prevalenciou astmy (Guarnieri and Balmes, 2014) a iných alergických ochorení. V roku 2017 vydala komisia znečistenia a zdravia Lancet správu, v ktorej potvrdzuje nárast pacientov s ochoreniami dýchacieho systému. Tento nárast je paralelný so zvýšením počtu ľudí s alergickými príznakmi (napr. alergickou rinitídou alebo astmou), ktorí často vyžadujú pohotovostnú lekársku starostlivosť (Landrigan et al., 2017).

Stimulácia aeroalergénov v dôsledku klimatických zmien

Zmena klimatických podmienok neovplyvňuje výskyt alergií iba priamo. Stúpajúce teploty, vyššia koncentrácia oxidu uhličitého v atmosfére, silnejšie zrážky a vyššia vlhkosť spôsobujú rýchlejšie šírenie peľov a plesní (Chan et al., 2018). Rastlinné patogény sa po celom svete šíria rýchlo, čo koreluje s dlhším vegetačným obdobím a teplejšími zimami. Patogény dráždia



imunitný systém rastlín, ktorého odpovede nie sú bunkového charakteru ale molekulárneho. Jednou zo skupín chemických látok považujúcich sa za súčasť imunitného systému rastlín je veľká skupina proteínov PR (PR – z ang. *pathogenesis-related*).

Jedným z príkladov aeroalergénov so stúpajúcou prevalenciou je hlavný alergén peľu brezy, Bet v 1 proteín. Patrí do skupiny PR, konkrétnejšie je hlavným zástupcom PR-10 skupiny – známu tiež ako Bet v 1 a jeho homológy (URL 1). Ako alergén indukuje senzitivizáciu sprostredkovanú IgE vo viac ako 95 % jedincov citlivých na peľ brezy. Z doteraz identifikovaných alergénov má Bet v 1 zásadný význam v molekulárnej alergiológii. Po prvýkrát bol identifikovaný ako alergén v roku 1988 a dosiahol kľúčovú úlohu v základnom aj klinickom výskume. Zistilo sa, že má mnoho štruktúrne podobných (homológnych) molekúl, ktoré sa nachádzajú v peľi stromov z radu *Fagales*, ako aj v potravinách pochádzajúcich z rastlín. Z alergiológického hľadiska patrí Bet v 1 medzi najdôležitejší peľový alergén na severnej pologuli a jeho homológy medzi najčastejšie spúšťače potravinových alergií súvisiacich s peľom v adolescencii a dospelosti v oblastiach pôsobenia peľu brezy. Preto skupina PR-10 má dôležitú úlohu v chápaní krížovej reaktivity, diagnostiky, poradenstva a alergénovo-špecifickej imunoterapie pre alergikov (Kleine-Tebbe J., et al, 2017).

Hlavný alergén peľu brezy a jeho homológy vstupujúce do krížovej reakcie

Homológy Bet v 1 sú bielkoviny štruktúrne veľmi podobné až identické hlavnému alergénu peľu brezy a to najmä v mieste epitopu, ktorý je vystavený bunke imunitného systému. Skupina týchto proteínov je rozšírená v mnohých rastlinných druhoch, pričom sem patria aj potraviny ako jablko, čerešňa, mrkva, zeler a mnohé iné (niektoré stále neobjavené). Imunitný systém pacienta alergického na peľ brezy môže v dôsledku podobnosti proteínov odpovedať aj na inak neškodný proteín z tejto skupiny a vyvolať tzv. krížovú reakciu. Avšak, samotná prítomnosť proteínu, ako sa zdá, nie je jediným faktorom vyvolávajúcim symptómy. Medzi ďalšie faktory môžeme zaradiť kvantitu proteínu v potravinách rastlinného pôvodu, senzitivitu imunitného systému podmieneného geneticky, ale ako bolo uvedené vyššie, taktiež rôznymi podmienkami prostredia, v ktorom žije konkrétny pacient. Mnoho výskumných úloh bolo zameraných na jablko ako modelový druh PR-10 skupiny. Kvantita alergénu je rozdielna v rôznych pletivách (šupka obsahuje viac alergénu ako dužina), dokonca sa mení počas vývinu plodu rastliny. Väčšina pacientov tvrdí, že niektoré odrody jablák znášajú lepšie ako iné (Ricci et al., 2010).

Genetická variabilita ako jedna z príčin hyper/hypo-alergénosti odrôd

Príčina schopnosti vyvolať alergickú reakciu doposiaľ nie je objasnená a uvažuje sa či sekvencia génu (izoforma) nemôže ovplyvňovať mieru pacientových symptomatických prejavov. Na zistenie izoform alergénu v odrodách sa môže použiť veľmi jednoduchá a cenovo nenáročná metodika polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP) (S. D. Tanksley et al., 1989). Ako prvé sa amplifikuje gén alergénu z rôznych odrôd rastlinného druhu, ktorý sa poštiepi vybranými reštrikčnými enzýmami. Reštrikčné enzýmy sú navrhované *in silico* na základe sekvenčného záznamu genomických databáz. Pomocou rôznych nástrojov, dostupných aj ako online neplatné verzie, sa sekvencia štiepi všetkými nástrojmi dostupnými enzýmami, z ktorých sa najvhodnejšie vyberú a použijú do reálneho štiepenia. Poštiepené fragmenty sa elektroforeticky rozdelia na gély, ktorý je pomocou softvéru premenený na 0-1 maticu. Pomocou ďalších nástrojov je možné z jednotlivých matíc vytvoriť dendrogramy, ktoré navzájom porovnávajú štiepne profily. Rozdiely v počte a dĺžke fragmentov (rovnako ako izoformy) vznikajú na základe mutačných zmien v nukleotidovej sekvencii alergénu a tieto zmeny sa môžu prejaviť v podobe epitopu na konečnom bielkovinovom produkte a teda v prejave alergickej reakcie.

Pod'akovanie

Túto štúdiu podporil projekt VEGA 2/0109/19 – Morfo-fyziologická, genetická a biochemická odpoveď rastlín lúskavca (*Amaranthus* spp.) na stres vyvolaný ťažkými kovmi.

Literatúra

- Bernstein, J. A., Alexis, N., Barnes, C., Bernstein, I.L., Nel, A., Diaz-Sanchez, D., et al. 2004. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 114:1116-23.
- Chan, A. W., Hon, K. L., Leung, T. F., Ho, M. H., Duque, R. J. S., Hong Kong, L. T. H. 2018. The effects of global warming on allergic diseases. *Med J.* 24(3):277-284.
- D'Amato, G. 2011. Effects of climatic changes and urban air pollution on the rising trends of respiratory allergy and asthma. *Multidiscip Respir Med.* 6(1):28-37.
- D'Amato, G., Rottem, M., Dahl, R., Blaiss, M., Ridolo, E., Cecchi, L., Rosario, N., Motala, C., Ansotegui, I. 2011. Climate change, migration, and allergic respiratory diseases: an update for the allergist. *World Allergy Organ J.* 4(7):120-5.
- Donaldson, K., Stone, V., Clouter, A., Renwick, L., MacNee, W. 2001 Ultrafine particles. *Occup Environ Med.* 58(3):211-6.
- EEA. 2016. European Environment Agency (EEA) report. EEA Report No 28.
- Guarnieri, M., Balme, J.R. 2014. Outdoor air pollution and asthma. *Lancet.* 383: 1581-92.



Kleine-Tebbe, J., Ballmer-Weber, B. K., Breiteneder, H., Vieths, S. 2017. Bet v 1 and its Homologs: Triggers of Tree-Pollen Allergy and Birch Pollen-Associated Cross-Reactions. Kleine-Tebbe J., Jakob T. (eds) *Molecular Allergy Diagnostics*. Springer, Cham, pp 21-42. ISBN: 978-3-319-42499-6.

Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N., et al. 2017. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*. 391(10119):462-512.

Landrigan, P. J., Fuller, R., Fisher, S., Suk, W. A., Thomas, P. S., Bose-O'Reilly, C. S., 2019. *Science of The Total Environment*. 650(2): 2389-94.

Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H., Bonierbale, M. W. 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Bio/Technology*. 7:257-264.

Patella, V., Florio, G., Magliacane, D., Giuliano, A., Crivellaro, M. A., Di Bartolomeo, D., Genovese, A., Palmieri, M., Postiglione, A., Ridolo, E., Scaletti, C., Ventura, M. T., Zollo, A. 2018. Urban air pollution and climate change: “The Decalogue: Allergy Safe Tree” for allergic and respiratory diseases care. *Clinical and Molecular Allergy*. 16(1):20.

Ricci, G., Dondi, A., Belotti, T., Baldi, E., Tartarini, S., Paris, R., Pagliarani, G., Serafini-Fracassini, D., Casadio, R., Giannetti, A., Masi, M. 2010. Allergenicity of different apple cultivars assessed by means of skin prick test and sensitisation to recombinant allergens Mal d 1 and Mal d 3 in a group of Italian apple-allergic patients. *International Journal of Food Science & Technology*. 45(7):1517-23.

World Health Organization: WHO. 2005. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide. Global Update 2005. In summary of risk assessment.

Internetové odkazy:

URL 1 - <http://www.meduniwien.ac.at/allfam/>

Možnosti využitia elektronického panela na hodnotenie kvality potravín

Matej Hynšt^{1*}, Jana Štefániková¹, Vladimír Vietoris²

¹Výskumné centrum AgroBioTech, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

²Katedra technológie a kvality rastlinných produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovensko

**matej.hynst@uniag.sk*

Abstrakt

Elektronický panel sa čoraz viac používa na hodnotenie kvality a bezpečnosti potravín. Môže sa použiť na zaznamenávanie nepriaznivých zmien v organoleptických vlastnostiach potravín, ako sú ovocie, zelenina, víno alebo syry. V tomto článku sme zhrnuli niektoré z výhod a možností použitia elektronického nosa, elektronického jazyka a elektronického oka, ktorými sú hlavne rýchlosť merania a jednoduchosť prípravy vzorky. Chceli by sme tiež poukázať na jeho možné využitie na našom pracovisku.

Kľúčové slová: elektronický nos, elektronické oko, elektronický jazyk

Úvod

Zabezpečenie kvality a stability potravinárskych výrobkov má veľký význam pre spotrebiteľov a výrobcov, vzhľadom na rastúce očakávania z hľadiska bezpečnosti, zdravia a senzorických vlastností potravín (Buratti et al., 2018). Senzorická analýza potravín väčšinou prebieha pomocou školeného panelu hodnotiteľov. Nevýhodou panelu hodnotiteľov sú zvýšené počiatkové náklady na tréning hodnotiteľov, limitované množstvo vzoriek, ktoré sa môžu hodnotiť, oneskorené výsledky, ktoré sú ovplyvnené určitou úrovňou subjektivity hodnotiteľa. V dôsledku týchto nedostatkov sa výskum v oblasti senzorického hodnotenia zameril na vývoj aplikácií elektronických a multi-senzorových technológií, ktoré by dokázali nahradiť panel hodnotiteľov. Boli vyvinuté elektronické prístroje, konkrétne elektronický nos, elektronický jazyk a elektronické oko, simulujúce zmysly hodnotiteľov, vďaka ktorým je odstránená subjektivita pri hodnotení. Tak isto sa znížila doba potrebná na analýzu jednej vzorky, ktorá pri súčasnom elektronickom paneli trvá v priemere len niekoľko minút (Apretei et al., 2010; Sliwiska et al., 2014; Majchrzak et al., 2018). Dĺžka analýzy je časovo úsporná aj v porovnaní

s citlivejšími analytickými metódami, ktoré zvyčajne trvajú jednu alebo dve hodiny pre jednu vzorku (Xu et al., 2019). Vďaka rýchlym analytickým technológiám možno nájsť širokú škálu aplikácií využitia e-nosa, e-jazyka a e-oka na meranie kvality potravín, ako sú ovocie (Lihuan et al., 2017), džúsy (Yu et al. 2018) alebo víno (Apetrei et al., 2012).

E-nos

E-nos je založený na princípoch činnosti ľudského nosa. Prchavé zložky vzoriek sa analyzujú v poli senzorov, ktoré napodobňujú čuchové bunky prítomné v nose. Signály sú následne odoslané do systému rozpoznávania dát, ktorý simuluje funkciu mozgu. Pole senzorov vytvára jedinečný pachový profil, tzv. „odtlačok prsta“, ako odozvu na interakciu s prchavými molekulami v rovnováhe so vzorkami. Rozpoznanie zložiek zmesi sa uskutočňuje porovnaním získaného profilu pachu so štandardmi pachu uloženými v NIST knižnici. Zvyčajne sa e-nos skladá zo sady snímačov alebo pracuje na princípe plynovej chromatografie s FID detektormi; elektronických komponentov, čerpadiel, klimatizácie, regulátora prietoku atď. (Sliwinska et al., 2014; Sanaeifar et al., 2017).



Obrázok č. 1 Elektronický nos

E-nos sa často používa v potravinárskom priemysle, napríklad Štefániková et al. v roku 2019 použili e-nos na hodnotenie kvality slovenských parených syrov typu parenica, kde hodnotili rozdiely medzi vzorkami počas skladovania. Na druhej strane Prieto et al. v roku 2011 analyzoval vplyv spôsobu uzavretia vínnych fliaš na organoleptické vlastnosti červeného vína.

E-oko

Elektronické oko je počítačová technológia, ktorá premieňa obraz na digitálny obraz. Používa obrazové snímače namiesto ľudských očí na zhromažďovanie snímok objektov a používa počítačové simulačné kritérium na identifikáciu obrazu, ktoré zabráni subjektívnej odchýlke ľudského oka. Výsledky získané na elektronickom oku sa hodnotia použitím analýzy hlavných zložiek (PCA) (Apetrei et al., 2012; Buratti et al., 2018).



Obrázok č.2 Elektronické oko

Elektronické oko bolo použité na hodnotenie znečistenia v olivovom oleji (Cano Marchal et al., 2013), bolo tiež použité na určenie účinku typu uzáveru na organoleptické vlastnosti červeného vína (Prieto et al., 2011).

E-jazyk

Elektronický jazyk je tvorený radom snímacích jednotiek, ktoré môžu byť tvorené lipidovými membránami, iónovo selektívnymi elektródami, vodivými polymérmi alebo ušľachtilými kovmi (Das et al., 2017; Ha et al., 2018). Na riešenie snímacích prvkov v systéme

elektronického jazyka možno použiť niekoľko metodík merania. Najpoužívanejšie sú elektrochemické merania, menovite potenciometria, amperometria a cyklická voltametria.



Obrázok č.3 Elektronický jazyk

V roku 2002 Riul et al. zaviedli používanie malých meraní impedancie signálu v elektronických jazykoch. Merania impedancie s nízkym signálom ponúkajú výhodu použitia materiálov, z ktorých snímacie jednotky nemusia byť elektroaktívne a nie je potrebná referenčná elektróda. E-jazyky na báze impedancie alebo impedančné jazyky sú založené na meraní impedancie malého signálu elektrickej dvojvrstvovej vrstvy (EDL) alebo Helmholtzovej vrstvy vytvorenej na rozhraní elektródy/elektrolytu vo frekvenčnom rozsahu (Ruil et al., 2002; Elamine et al., 2019). E-jazyk sa dostal do pozornosti vedeckej obce ako metóda, ktorá sa dá aplikovať v rôznych oblastiach, najmä na hodnotenie kvality a autenticity potravinárskych výrobkov (Dias et al., 2016; Elamine et al., 2019). Za posledných niekoľko rokov sa uskutočnilo veľa štúdií, pri ktorých sa elektronický jazyk použil pre klasifikáciu a certifikáciu niektorých druhov nápojov (Dias et al., 2016), olivových olejov (Apretei et al., 2010; Buratti et al., 2018), medu a kávy alebo znečisťujúcich látok vo vode. Taktiež sa používa aj na odhalenie falšovania výrobkov.

Korelácia výsledkov elektronického panelu a panelu hodnotiteľov

Pre sensorickú analýzu sú používané rôzne metódy. Najpoužívanejšou, ale najmenej objektívnou metódou sensorického hodnotenia je hodnotenie pomocou panelu hodnotiteľov.



Menej subjektívnymi metódami sú využitie elektronického panelu alebo chromatografická analýza. Eckert et al. (2013) vo svojej štúdií, kde hodnotili chuť viaczložkových zmesí rôznymi metódami uvádza, že najpreukázanejšie výsledky boli namerané pomocou panela hodnotiteľov. Zároveň však poukazuje na prínos využitia elektronického panelu ako podpornej metódy získavania výsledkov. Naproti tomu, Lipkowitz et al. (2018), ktorí vo svojej štúdií sledovali pomer bielkovín v syre cheddar počas jeho starnutia naznačujú, že využitie elektronického panelu, konkrétne elektronického jazyka, umožňuje zachytiť menšie zmeny ako pri použití trénovaného panelu hodnotiteľov, a tým skôr odhaliť nepriaznivé zmeny v syre. Zároveň však poukazuje na potrebu extrahovať lipidy zo vzorky pred analýzou a taktiež na nutnosť vybudovania knižnice profilov syrov pre lepšiu kalibráciu prístroja.

Záver

V tomto prehľade sme načrtli možnosti využitia elektronického panelu ako alternatívnej metódy posudzovania kvality a bezpečnosti potravín. Výhodou elektronického panelu je aj jeho možné využitie pri zisťovaní falšovania potravín alebo sledovaní zmien v potravinách počas skladovania. Rôzne štúdie ukazujú, že sledovaním týchto zmien dokážeme účinne minimalizovať nežiaduce zmeny potravín, ktoré by viedli k zhoršeniu kvality výrobkov. V budúcnosti by sme chceli využiť elektronický panel na analýzu pekárenských výrobkov s pridaním špeciálnej múky, monitorovanie kvality bryndze v priebehu roka alebo sledovanie organoleptických zmien v nápojoch počas starnutia.

PodĎakovanie

Práca bola spolufinancovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja číslo APVV-16-0244 a vznikla s podporou Výskumného centra AgroBioTech vybudovaného v rámci projektu Vybudovanie výskumného centra „AgroBioTech“ ITMS 26220220180.

Použitá literatúra

Apetrei, C., Apetrei, I. M., Villanueva, S., de Saja, J. A., Gutierrez-Rosales, F., Rodríguez-Méndez, M. L. 2010. Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Anal Chim Acta*. 663(1): 91-97.

Apetrei, I. M., Rodríguez-Méndez, M. L., Apetrei, C., Nevares, I., del Alamo, M., de Saja, J. A. 2012. Monitoring of evolution during red wine aging in oak barrels and alternative method by means of an electronic panel test. *Food Res Int*. 45(1): 244-249.

Cano Marchal, P., Martínez Gila, D., Gámez García, J., Gómez Ortega, J. 2013. Expert system based on computer vision to estimate the content of impurities in olive oil samples. *J Food Eng*. 119: 220-228.



- Buratti, S., Malegori, C., Benedetti, S., Oliveri, P., Giovanelli, G. 2018. E-nose, e-tongue and e-eye for edible olive oil characterization and shelf life assessment: A powerful data fusion approach. *Talanta*. 182: 131-141.
- Das, C., Chakraborty, S., Acharya, K., Kumar, N. 2018. FT-MIR supported electrical impedance spectroscopy based study of sugar adulterated honeys from different floral origin. *Talanta*. 171: 327-334.
- Dias, L. G., Rodrigues, N., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A. 2016. Monovarietal extra - virgin olive oil classification: a fusion of human sensory attributes and an electronic tongue. *Eur Food Res Technol*. 242: 259-270.
- Eckert, C., Pein, M., Reimann, J., Breitreutz, J. 2013. Taste evaluation of multicomponent mixtures using a human taste panel, electronic taste sensing systems and HPLC. *SENSOR ACTUAT B-CHEM*. 182: 294-299.
- Elamine, Y., Inácio, P. M. C., Lyoussi, B., Anjos, O., Estevinho, L. M., de Graça Miguel, M., Gomes, H. L. 2019. Insight into the sensing mechanism of an impedance based electronic tongue for honey botanic origin discrimination. *Sens Actuators B: Chem*. 285: 24-33.
- Ha, D., Sun, Q., Su, K., Wan, H., Li, H., Xu, N., Sun, F., Zhuang, L., Hu, N., Wang, P. 2015. Recent achievements in electronic tongue and bioelectronic tongue as taste sensors. *Sens Actuators B: Chem*. 207: 1136-1146.
- Lihuan, S., Liu, W., Xiaohong, Z., Guohua, H., Zhidong, Z. 2017. Fabrication of electronic nose system and exploration on its applications in mango fruit (*M. indica* cv. Datainong) quality rapid determination. *J Food Meas Charact*. 11(4): 1969-1977.
- Lipkowitz, J. B., Ross, C. F., Diako, Ch., Smith, D. M. 2018. Discriminating aging and protein-to-fat ratio in cheddar cheese using sensory analysis and a potentiometric electronic tongue. *J. Dairy Sci*. 101: 1990-2004.
- Majchrzak, T., Wojnowski, W., Dymerski, T., Gębicki, J., Namieśnik, J. 2018. Electronic noses in classification and quality control of edible oils: A review. *Food Chem*. 246: 192-201.
- Prieto, N., Gay, M., Vidal, S., Aagaard, O., de Saja, J. A., Rodríguez-Méndez, M. L. 2011. Analysis of the influence of the type of closure in the organoleptic characteristics of a red wine by using an electronic panel. *Food Chem*. 129: 589-594.
- Riul, A., Dos Santos, D. S., Wohnrath, K., Di Tommazo, R., Carvalho, A. C. P. L. F., Fonseca, F. J., Oliveira, O. N., Taylor, D. M., Mattoso, L. H. C. 2002. Artificial taste sensor: efficient combination of sensors made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene containing polymer. *Langmuir*. 18: 239-245.
- Sanaeifar, A., ZakiDizaji, H., Jafari, A., De La Guardia, M. 2017. Early detection of contamination and defect in foodstuffs by electronic nose: review. *Trends Anal Chem*. 97: 257-271.
- Sliwinska, M., Wisniewska, P., Dymerski, T., Namiesnik, J., Wardencki, W. 2014. Food analysis using artificial senses. *J. Agric. Food Chem*. 62(7): 1423-1448.
- Štefániková, J., Nagyová, V., Hynšt, M., Victoris, V., Martišová, P., Nagyová, Ľ. 2019. Application of electronic nose for determination of Slovak cheese authentication based on aroma profile. *Potr S J F Sci*. 13: 262-267.
- Xu, M., Wang, J., Zhu, L. 2019. The qualitative and quantitative assessment of tea quality based on E-nose, E-tongue and E-eye combined with chemometrics. *Food Chem*. 289: 482-489.
- Yu, H., Zhang, Y., Zhao, J., Tian, H. 2018. Taste characteristics of Chinese bayberry juice characterized by sensory evaluation, chromatography analysis, and an electronic tongue. *J Food Sci Tech*. 55(5): 1624-1631.



Veronika Fialková a kolektív autorov

Recenzovaný zborník vedeckých prác Výskumného centra AgroBioTech 2019

Vydavateľ: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vydanie: Prvé

Rok vydania: 2019

Náklad: online

Neprešlo redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre.

ISBN 978-80-552-2053-6

